

Pontifícia Universidade Católica do Paraná



PUCPR

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Mestrado em Ciências da Saúde

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ALELOS DE POLIMORFISMOS DOS
GENES *PARK2* e *LTÁ* E A SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE EM
UMA POPULAÇÃO PARANAENSE

FLÁVIA COSTA PREVEDELLO

Curitiba
2008

FLÁVIA COSTA PREVEDELLO

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ALELOS DE POLIMORFISMOS DOS
GENES *PARK2* e *LTÁ* E A SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE EM
UMA POPULAÇÃO PARANAENSE**

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título em mestrado em Ciências da
Saúde

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Mestrado em Ciências da Saúde

Orientador: Marcelo Távora Mira, PhD

Curitiba
2008

“Dedico este trabalho aos meus pais, Nelson e Sônia, cujo exemplo de integridade, cordialidade e perseverança, sempre espelharam a minha trajetória na vida e na profissão”.

Agradecimentos

Marcelo Távora Mira

Por me proporcionar desvendar outro universo no campo da ciência médica, pelos seus ensinamentos e paciência.

Fundação Pró-Hansen de Curitiba-PR

Instituição onde tive boa receptividade e colaboração de todos os funcionários para ajuda no recrutamento de pacientes.

Sra. Nivera Noemia Stremel

Cuja colaboração e sua sempre disponibilidade em nos atender foram fundamentais para este trabalho.

Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná - São Roque –

Meus sinceros agradecimentos a todos os funcionários do Hospital e a direção clínica pela enorme colaboração na fase de recrutamento de participantes, sãos e doentes.

Secretaria Municipal de Saúde de Prudentópolis- PR

Agradeço aos funcionários da Seção de Epidemiologia e Controles de Doenças, que se disponibilizaram em colaborar e convidar pacientes hansenianos do município a participarem do projeto.

A todos os meus amigos e colegas de mestrado que muito me ensinaram e têm uma parcela importante na realização deste trabalho, com carinho agradeço:

Ângela Schneider Frâncio, Caio Castro, Ciane Cristina Market, Denise Endo da Costa, Felipe César Gomes Fernandes, Fernando Panissa Lázaro, Geison Cambri, Liliane do Nascimento, Marcela Ferreira Dias, Renan Mattar, Renata Helena Sindeaux, Renata Werneck, Raphaela de Paula Pimentel, Vinícius Fava.

A Prof. Márcia Olandoski e a minha amiga Renata Werneck, cuja colaboração na análise estatística foi de suma importância.

A minha amiga e colega de profissão Dra. Luciane Zoletti, que me ajudou no recrutamento, enviando amostras de pacientes.

As auxiliares de enfermagem de unidades de saúde pública de Piraquara-PR, a Sra. Dorca Tiera e a Sra. Maria Conceição Santos de Jesus, cujas colaborações foram fundamental no recrutamento dos voluntários para compor a população controle.

Ao técnico do laboratório NIMA, o Sr. José Marcelo Camargo, pela sua solicitude em todos os momentos que se fizeram necessários.

E não deixando de agradecer, especialmente, a todos os pacientes portadores de hanseníase que sem restrições concordaram em ser voluntário para a pesquisa.

“É pela lógica que provamos, mas é pela intuição que descobrimos.”
Henri Poincaré

RESUMO

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* e tem como principal hospedeiro o ser humano. A pele e o sistema nervoso periférico são os principais órgãos acometidos. A humanidade há muitos séculos já sofre com a doença e há indícios de que sua origem aconteceu no leste do Continente Africano. A hanseníase já foi motivo de estigma no passado e hoje, com a eficácia do tratamento, as lesões que antes eram irreversíveis e incapacitantes já podem ser evitadas. Embora sua etiologia seja infecciosa, hoje é amplamente aceita a noção de que a susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase seja parcialmente controlada por fatores genéticos. Neste estudo, apresentamos uma análise de associação entre hanseníase e marcadores de genes candidatos ao controle da susceptibilidade à doença. Os genes candidatos estudados, *PARK2* e *LTA*, foram selecionados com base em resultados anteriores, indicando sua participação no controle da patogênese da doença. A população em estudo foi recrutada no Estado do Paraná, seguindo um desenho caso-controle; pacientes foram caracterizados como portadores de hanseníase *per se*, isto é, a doença independente de sua forma de manifestação clínica, através de consulta e análise de prontuários médicos por um único médico dermatologista. O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis, sem história de prévia de doença infecciosa crônica e com história de convivência com pacientes portadores de hanseníase. A análise genética dos marcadores *PARK2*(-2599) do gene *PARK2* e *LTA*(+252) do gene *LTA* foram realizadas pelos métodos de discriminação alélica em plataforma automatizada TaqMan e por *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), respectivamente. Ao todo, 120 portadores de hanseníase *per se* e 163 contatos saudáveis foram incluídos no estudo. Análise de associação baseada em populações não mostrou associação estatisticamente significativa entre os marcadores genéticos escolhidos com susceptibilidade à hanseníase, sendo o χ^2 e o valor de *p* igual a 1,3167 e 0,5177 e 2,66 e 0,2645 para os marcadores *PARK2*(-2599) e *LTA*(+252), respectivamente. Apesar da ausência de evidência para associação, a participação destes genes na patogênese da doença não pode ser descartada. Por exemplo, é possível que diferenças entre as populações originalmente investigadas e a população paranaense, em particular em relação à idade de diagnóstico da doença, tenha causado impacto sobre o resultado da análise.

ABSTRACT

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects humans as main natural hosts, with the skin and peripheral nerves being the target tissues. There is evidence of the origin of leprosy in east Africa and, since then, the disease has been a major burden over mankind during the past thousands of years. Leprosy has always associated with a strong social stigma; yet today, with efficient treatment available, irreversible skin and nerves damage causing permanent disability can be avoided. Although of infectious etiology, today it is accepted that the host susceptibility of leprosy is partially controlled by genetic factors. We present here an association analysis between leprosy and markers of candidate genes controlling host susceptibility to disease. The candidate genes *PARK2* and *LTA* were selected based on previous studies indicating their participation on disease pathogenesis. The population studied was enrolled from the state of Paraná, following a case-control design. Patients were characterized by having leprosy per se, i. e., the disease independently of clinical forms, by checking of medical records by a single dermatologist. The control group was composed of individuals without history of leprosy or other chronic infectious diseases, but with history of contact with leprosy patients. Genotyping of markers *PARK2*(-2599) and *LTA*(+252) was performed by allelic discrimination using the automated platform Taqman and by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), respectively. One hundred twenty leprosy patients and 163 healthy controls were included. Population-based association analysis failed to detect evidence for association between the genetic markers investigated and susceptibility to leprosy: the χ^2 and the p-value was 1.3167 and 0.5177, and 2.66 and 0.2645 for *PARK2*(-2599) and *LTA*(+252) markers, respectively. Despite of no evidence for association, the participation of those two genes on the pathogenesis of leprosy can not be excluded. For example, it is possible that differences between the original and the Paraná populations, in particular regarding age of diagnosis, could have major impact over the observed outcome.

ABREVIATURAS

a.C.- antes de cristo
BAAR- bacilo ácido-álcool resistente
BB- borderline borderline
BCG- bacilo Calmette Guérin
BL- borderline lepromatoso
BT- borderline tuberculóide
DNA- ácido desoxirribonucléico
ENH- eritema nodoso hansênico
I- indeterminada
IB- índice baciloscópico
LD- desequilíbrio de ligação
LL- lepra lepromatosa
LOD- logaritmo da *odds ratio*
LTA- linfotoxina alfa
HAB- habitantes
HLA- antígeno leucocitário humano
MB- multibacilar
MHC- complexo maior de histocompatibilidade
OMS- Organização Mundial de Saúde
PARK- parquina, gene do Parkinsonismo Juvenil Autossômico Recessivo
PB- paucibacilar
PCR- reação em cadeia da polimerase
PGL-1- Glicolipídio fenólico 1
PQT- poliquimioterapia
RFLP- polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição
RR- reação reversa
SNP- polimorfismo de base única
TCLE- termo de consentimento livre e esclarecido
TH- células T *helper*
TT- tuberculóide tuberculóide
V- virchowiano

1	Hanseníase – Aspectos Gerais	2
1.1	Epidemiologia.....	2
1.2	O <i>Mycobacterium leprae</i>	3
1.3	Manifestação clínica	4
1.4	Classificação da Hanseníase.....	5
1.4.1	Classificação de Madri.....	5
1.4.2	Classificação de Ridley e Jopling	6
1.4.3	Classificação OMS	7
1.5	Diagnóstico.....	7
1.6	Tratamento.....	8
1.7	Prevenção	9
1.8	Estados Reacionais	9
1.9	Genética e Hanseníase	10
1.9.1	O Scan Genômico Vietnamita – O Gene <i>PARK2</i>	11
1.9.2	O Gene <i>LTA</i>	12
2	Justificativa e Hipótese.....	34
3	Objetivos.....	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos Específicos.....	36
4	Métodos	38
4.1	Recrutamento da Amostra Populacional dos Casos	38
4.2	Recrutamento da Amostra Populacional dos Controles.....	39
4.3	Critérios de Inclusão	39
4.4	Critérios de Exclusão	39
4.5	Extração do DNA e Determinação da Concentração das Amostras.....	40
4.6	Definição dos Genes Candidatos e Marcadores Correspondentes	40
4.7	Genotipagem.....	41
4.7.1	Genotipagem do Marcador <i>LTA</i> (+252) – Amplificação por PCR.....	41
4.7.2	Genotipagem do Marcador <i>LTA</i> (+252) – Análise por <i>RFLP</i>	42
4.7.3	Genotipagem do Marcador <i>PARK2</i> (-2599) – Discriminação Alélica	44
4.8	Análise Estatística.....	46
5	Resultados.....	49
5.1	Características Gerais da População em Estudo.....	49
5.2	Características Epidemiológicas do Grupo de Casos	50

5.2.1	Distribuição Quanto as Formas Clínicas.....	50
5.2.2	Número de Lesões	52
5.2.3	Episódios Reacionais	53
5.2.4	Dados Complementares	54
5.3	Análise de Associação entre Hanseníase e Alelos dos Marcadores <i>PARK2</i> (-2599) e <i>LTA</i> (+252) na Amostra Populacional Estudada	55
5.3.1	Análise do Marcador <i>PARK2</i> (-2599).....	55
5.3.2	Análise do Marcador <i>LTA</i> (+252).....	55
5.4	Análise de Regressão Logística Multivariada	56
5.5	Análise Haplotípica.....	56
6	Discussão	60
7	Conclusões.....	68
8	Referências	70

1 Hanseníase – Aspectos Gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que encontra no ser humano e no tatu seus únicos hospedeiros naturais. A doença, que afeta primariamente a pele e o sistema nervoso periférico, tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) intracelular obrigatório, de lenta multiplicação e cujo cultivo *in vitro* ainda não foi possível (1). O bacilo foi identificado pela primeira vez pelo cientista norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873 (2). A transmissão da doença faz-se pelo contato íntimo e prolongado de uma pessoa infectada que apresenta carga bacilar elevada e o indivíduo saudável, através de secreções naso-orofaríngeas expelidas (3). Acredita-se que o período de incubação da doença seja prolongado, estipulando-se um tempo igual ou maior que cinco anos a partir do contato para o aparecimento da hanseníase (4). A maioria das pessoas não desenvolve hanseníase mesmo após exposição maciça ao bacilo e estima-se um ligeira predominância da infecção no gênero masculino em relação ao feminino, em torno 1,5-2 para 1, respectivamente (5, 6).

O sintoma principal que o portador vai apresentar são manchas na pele com alteração da sensibilidade local, de início alteração da sensibilidade térmica, após dolorosa e por último táctil e motora além de espessamento do nervo periférico próximo ao sítio da lesão cutânea (7).

No Brasil adota-se oficialmente o termo hanseníase desde 1976 de acordo com a lei nº. 9010 - DO de 30/3/95, em substituição ao termo “lepra” ou aos que a ela se refiram nos documentos oficiais, com o objetivo de reduzir o estigma associado ao portador da doença ou de seus familiares (8).

1.1 Epidemiologia

O reconhecimento da doença hanseníase vem da antiguidade com os primeiros relatos da doença datando do ano 600 a.C., com casos existentes na China, Egito e Índia. Supõe-se, no entanto, que a origem da doença seja o Continente Africano (9). Hoje a doença encontra-se distribuída praticamente em todos os países da África, Ásia e América Latina. Na Europa não se tem registro de casos novos, segundo ultimo levantamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2005. Na América do Norte, o Canadá também não tem registro de casos novos e o México e os Estados Unidos (EUA) registram novos casos, mas a prevalência encontra-se inferior a 1:10.000 habitantes (hab). Em relação aos EUA, segundo dados oficiais, 7.029 casos

foram identificados no período entre 1975 a 2005, mantendo nestes anos uma prevalência inferior a 1:10.000 hab. (10). Estes dados indicam que a doença nestes continentes está sob controle não representando problema de saúde pública conforme os critérios da OMS.

Com a introdução da poliquimioterapia (PQT) para tratamento da doença no início da década de 80, o número global de casos identificados, que na época era em torno de cinco milhões distribuídos em 122 países, reduziu drasticamente. O grande sucesso da PQT levou a OMS a lançar, em 1991, uma campanha mundial para eliminação da hanseníase como problema de saúde pública até o ano 2000. A iniciativa reforçou a queda na prevalência da doença; porém, no começo de 2008, o último levantamento da OMS mostra que o objetivo de eliminação ainda precisa ser alcançado: a prevalência da doença foi de 212.802 casos, com três países apresentando taxa de prevalência acima de 1:10.000 hab (11). O Brasil encontra-se entre estes três países, e é aquele com a maior prevalência da doença, com uma taxa de 2,4:10.000 hab. e com 45.847 casos detectados, no começo de 2008 (11). No estado do Paraná, as taxas de prevalência da hanseníase encontram-se muito próximas das expectativas da OMS. No ano de 2007 foram detectados 1.242 novos casos com uma prevalência de 1,63/10.000 hab. (12).

1.2 O *Mycobacterium leprae*

O bacilo causador da hanseníase foi identificado pela primeira vez em 1873 pelo cientista norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, sendo por este motivo também chamado de bacilo de Hansen (2). O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é um microrganismo intracelular obrigatório, álcool-ácido resistente (BAAR), imóvel, de conformação levemente curva e que mede em torno de 2-8 μm por 0,5 μm . O fato do bacilo não ser cultivável em meio artificial, além de intrigante cientificamente, têm sido um fator limitante clássico da pesquisa em hanseníase. Tipicamente, os estudos sobre o metabolismo do *M. leprae* e da resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção são feitos ou por comparação com outras micobactérias cultiváveis, tais como o *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. bovis*, ou utilizando-se bacilos mantidos por inoculação em patas de camundongos timentizados, ou ainda, a partir de tecido infectado de tatu, seu outro hospedeiro natural (13). O *M. leprae* é o microrganismo conhecido que apresenta o tempo mais longo de multiplicação, em torno de 14 dias, o que seria uma explicação plausível para o longo período de incubação da doença (14).

Sabe-se que a composição da parede celular é semelhante em todas as micobactérias, sendo esta parede composta por ligações covalentes de complexos de ácido micólico, arabinogalactanas e peptideoglicanas. No entanto, na composição da parede celular do *M. leprae* encontram-se peptideoglicans e glicolípídeos fenólicos (PGLs) que conferem especificidade imunológica ao bacilo, em particular, o PGL-1 (13).

O bacilo tem tropismo pelas células fagocitárias e de Schwann da bainha de mielina que reveste os nervos periféricos. Este neuro-tropismo é atribuído à ligação específica do *M. leprae* com a laminina- α 2 da membrana basal anexa às células de Schwann. O complexo *M. leprae*/laminina liga-se então à α -dístroglicana, uma proteína de membrana de célula de Schwann em um evento que medeia a invasão celular (15, 16). As células de Schwann são incapazes de destruir os patógenos e os agentes terapêuticos têm dificuldade de atingir os tecidos-alvo nervosos. O estímulo imunológico gerado pela presença do *M. leprae* somado a desmielinização dos nervos periféricos, leva ao dano neural (13).

Com o sequenciamento do genoma do *M. leprae*, ficou evidente uma dramática redução de seu material genético. Comparado com o seu parente mais próximo, o genoma do *M. leprae* apresenta em torno de 3,27 megabases (Mb) contra 4,41Mb do *M. tuberculosis*, ocupado parcialmente por 1.116 pseudo-genes inertes na tradução de proteínas. Análises comparativas detectaram apenas 391 espécies de proteínas solúveis codificadas pelo genoma do *M. leprae*, em comparação com aproximadamente 1.800 do *M. tuberculosis* (14). Esta evolução redutiva do genoma do *M. leprae* contribuiu para a eliminação de importantes funções do seu metabolismo, talvez justificando peculiaridades, tais como o fato do bacilo não ser cultivável, ter um tempo de duplicação muito longo e ter se firmando como parasita intracelular obrigatório.

1.3 Manifestação clínica

A hanseníase tem uma forma peculiar de manifestar-se clinicamente, de acordo com o perfil imunológico do hospedeiro: dependendo do predomínio da resposta imunológica do tipo celular (Th1) ou do tipo humoral (Th2), a doença assume clinicamente formas distintas (5, 17).

A primeira manifestação da doença é uma lesão cutânea com alteração da sensibilidade local, de início térmica, depois dolorosa e por último táctil. O nervo periférico próximo, ao sítio da lesão encontra-se normalmente espessado e doloroso à palpação. Se a doença evolui, novas

lesões cutâneas podem ocorrer, bem como acometimento da face, incluindo os olhos e mucosa nasal e comprometimento de órgãos internos. Maior dano do sistema nervoso periférico também pode ocorrer com a progressão da doença. Para melhor entender as manifestações clínicas da doença, criaram-se critérios de classificação, levando-se em consideração os aspectos cutâneos, histopatológicos, bacteriológicos e imunológicos da doença, estabelecendo-se, então, formas clínicas distintas.

Todas as formas clínicas cursam com o acometimento neurológico e que se não tratado devidamente vai conduzir o portador a deformidades e seqüelas permanentes. No passado, antes da introdução da terapia eficaz, eram estas deformidades, somadas as lesões cutâneas inestéticas, que geravam o estigma ou mesmo a exclusão da pessoa do convívio social.

1.4 Classificação da Hanseníase

Existem três formas mais comuns de classificação da doença, criadas com objetivos diferentes: a classificação de Madri, a de Ridley e Jopling e da OMS. A seguir será apresentada uma descrição destes três protocolos de classificação, bem como uma sugestão de sobreposição de protocolos, conforme ilustrado no quadro I. O Brasil adota tanto a classificação de Madri como a da OMS em seus documentos oficiais. A classificação de Ridley e Jopling é freqüentemente utilizada para fins de pesquisa.

É importante esclarecer que devido à terminologia adotada no Brasil, termos derivados da palavra “lepra” foram substituídos por outros derivados de “virchow”, uma referência ao aspecto “espumoso” do macrófago rico em bacilos de Hansen, também chamados de células de Virchow. Adota-se também, em nosso país, para as formas intermediárias o termo “dimorfo” como tradução de “borderline”. Esta nomenclatura particular gera inclusive polêmica quando na codificação da doença pelo Classificação Internacional de Doenças (CID 10) 10ª revisão, que mesmo traduzido para o Português mantém as siglas em Inglês, segundo a classificação de Ridley e Jopling (18).

1.4.1 Classificação de Madri

Uma das primeiras formas de classificação da doença, até hoje adotada preferencialmente no Brasil, é a Classificação de Madri de 1953. Este protocolo determina primariamente quatro

formas de apresentação da doença baseados nos aspectos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos: as duas formas polares tuberculóide (T) e lepromatosa ou virchowiana (L/V), a forma inicial ou transitória denominado indeterminada (I) e a forma instável e intermediária denominada dimorfa ou borderline (D/B) (19). A forma indeterminada manifesta-se normalmente por lesão única, hipocrômica e hipoestésica que pode se auto curar ou evoluir para um dos pólos clínicos, de acordo com a resposta imune do hospedeiro. A forma tuberculóide tem baixo número de lesões cutâneas, que normalmente são bem definidas com comprometimento neural limitado, normalmente próximo ao sítio da lesão, pouco ou nenhum bacilo detectável. Já a forma virchowiana apresenta maior número de lesões cutâneas, por vezes sistêmicas, com baixa definição e com grande número de bacilos detectáveis. A forma dimorfa é a forma limítrofe entre os dois pólos maiores (20).

1.4.2 Classificação de Ridley e Jopling

Com o objetivo de criar uma classificação clínica espectral, também de acordo com critérios clínicos, imunológicos e histopatológicos, mas com riqueza nos detalhes, Ridley e Jopling em 1966, propuseram um protocolo que dispõe à doença em dois pólos maiores e em três formas interpolares. Em um dos pólos está a forma Tuberculóide ou TT, cuja manifestação é mais restrita, com pouco número de lesões cutâneas, pouco ou nenhum bacilo identificado, tanto por baciloscopia linfática ou exame histopatológico de biópsia de pele, e com predomínio por parte do hospedeiro de resposta imunológica do tipo celular ou Th1. No outro extremo está a forma Lepromatosa ou LL, em que o número de lesões é maior, tem acometimento também de órgãos internos, apresenta grande número de bacilos detectáveis e tem predomínio de resposta imunológica do tipo humoral ou Th2. Nas formas interpolares ou também chamadas *Borderline - Dimorfa* no Brasil - classificam-se três modos distintos de manifestações clínicas da doença que se caracterizam pela sua instabilidade imunológica, com lesões de aspecto misto, mesclando lesões do tipo tuberculóide e lepromatoso. As três formas são: *borderline-lepromatosa (BL)*, *borderline-borderline (BB)* e *borderline-tuberculóide (BT)* (21). Paralelamente às formas clínicas do espectro encontra-se a forma indeterminada, que seria a manifestação inicial da doença com surgimento de lesão única, hipoestésica e sem bacilos detectáveis. Existe ainda uma forma com acometimento neural puro, sem manifestação cutânea.

1.4.3 Classificação OMS

Para fins de orientação terapêutica adota-se a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) que classifica o doente com base no número de lesões cutâneas e índice baciloscópico (22). Na orientação prática, doentes com menos de 5 lesões cutâneas e sem bacilos detectáveis como paucibacilar (PB) e os com mais de 5 lesões e presença de bacilos como multibacilar (MB).

Quadro I - Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley e Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase (adaptado de Souza C.S et al. (20)).

	Indeterminada	Tuberculóide	Borderline	Lepromatosa
Madri	I	T	B	L
Ridley e Jopling	I	TT	BT* BB BL	LL
OMS	Paucibacilar		Multibacilar	

TT: Tuberculóide-tuberculóide; ***BT:** Borderline-tuberculóide, embora apresente características da forma paucibacilar, operacionalmente tem sido classificada como multibacilar; **BB:** Borderline-borderline; **BL:** Borderline-lepromatoso e **LL:** Lepromatoso-lepromatoso.

1.5 Diagnóstico

Basicamente o diagnóstico da hanseníase é feito de acordo com as manifestações clínicas da doença (23), embora tentativas de identificação direta do *M. leprae* nas amostras biológicas de pacientes, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, em inglês) ou mesmo por sorologia, em busca de anticorpos específicos como o anti-PGL-1, têm sido realizadas (13). A primeira manifestação sugestiva da doença é uma mancha na pele com alteração de sensibilidade. A confirmação pode ser feita, então, pela identificação de bacilos na linfa coletada dos lóbulos das orelhas, cotovelos ou da própria lesão por bacterioscopia. Conta-se então o número de bacilos por campo microscópico e gera-se um índice, o índice baciloscópico (IB), que vai ser útil tanto para o

diagnóstico como para o acompanhamento pós-tratamento. A biópsia de pele afetada também pode ser utilizada com alta especificidade, pois além de refletir a resposta inflamatória na pele e nervos periféricos, pode identificar a presença do bacilo por colorações específicas como a de Ziehl-Neelsen e serve para diferenciar a reação granulomatosa da hanseníase de outras doenças granulomatosas (6).

Na tentativa de identificar o perfil de resposta imunológica de um indivíduo frente a antígenos do *M. leprae*, pode-se fazer um teste cutâneo denominado reação de Mitsuda, realizada pela primeira vez em 1919 e aperfeiçoada desde então (24). O antígeno de Mitsuda ou lepromina, utilizada neste teste intradérmico, é formado por uma suspensão de bacilos de Hansen autoclavados. O antígeno é injetado intradematicamente, e a reação é mensurada após 28 dias. A resposta é positiva quando existe a formação de um granuloma no local da inoculação maior ou igual a 5mm de diâmetro. A resposta positiva evidencia a integridade da resposta imunológica celular, ou seja, a capacidade de formar granuloma. Por esta razão a possibilidade de influências genéticas na resposta à lepromina têm sido motivo de interesse dos geneticistas no que concerne aos aspectos de herança imunológica. Esta reação ajuda na classificação clínica e serve como prognóstico na forma indeterminada (13).

1.6 Tratamento

O tratamento atual da hanseníase é poliquimioterápico, baseado na associação de três medicamentos, e foi introduzido na década de 80 pela OMS. Desde o início da década de 90, os medicamentos têm sido distribuídos de forma gratuita em todo o mundo (4). Este esquema terapêutico revolucionou a história natural da doença e hoje se pode dizer que a doença é curável em 100% dos casos tratados.

O esquema da PQT é padronizado para as formas paucibacilares e multibacilares, seguindo critérios da OMS de 1998. Os casos paucibacilares são tratados com Dapsona, 100mg/dia e Rinfampicina 600mg em uma dose mensal supervisionada, em um total de seis doses. Já para as formas multibacilares o tratamento consta de 100mg/dia de Dapsona, 50mg/dia de Clofazimina, mais dose mensal supervisionada de 100mg Dapsona, 300mg de Clofazimina e 600mg de Rifampicina, em um total de doze doses. As doses supervisionadas são feitas nas

unidades de saúde que prestam atendimento ao hanseniano e servem para evitar o abandono do tratamento e diminuição da população bacteriana viável, diminuindo o contágio (25).

Importante ressaltar que, embora o tratamento multiterápico a longo prazo elimine o agente bacteriológico, a eventual perda da função nervosa ocasionada não pode ser revertida (13)

1.7 Prevenção

A prevenção da hanseníase, até o momento, está baseada na detecção dos casos, principalmente multibacilares e o tratamento precoce com drogas efetivas, com o objetivo de se impedir a cadeia de transmissão. Cogita-se a elaboração de vacinas específicas para prevenir a doença em pessoas expostas ou de áreas endêmicas, na tentativa de profilaxia tanto pré como pós exposição. Isto ainda não se concretizou, mas com o seqüenciamento do genoma do *M. leprae*, a investigação de antígenos potenciais para confecção de vacinas voltou a tornar-se uma possibilidade plausível.

Na atualidade utiliza-se como profilaxia a vacina BCG, com antígenos do *M. bovis*. Esta vacina confere níveis de proteção entre 20 a 80%, com uma enigmática eficácia (13, 24). Três relativamente recentes *trials* estudaram a hipótese que a combinação de BCG com *M. leprae* morto aumentava a eficácia da vacina. Os estudos foram conduzidos na Venezuela e Malawi e ambos os estudos concluíram que não é a adição do *M. leprae* que aumenta a eficácia e sim o número de doses, sendo que uma segunda dose, mesmo naqueles com cicatriz vacinal aumentava a chance de proteção em até 50% (13, 26).

No Brasil segundo orientação do ministério da saúde, preconiza-se uma única dose de BCG intradérmica em todos os contatos intradomiciliares, independente de serem PB ou MB e de terem ou não cicatriz vacinal prévia (27).

1.8 Estados Reacionais

No curso evolutivo da doença podem acontecer os episódios reacionais, reações inflamatórias agudas ou subagudas que podem ocorrer antes, durante ou mesmo após o tratamento (28). Os episódios reacionais são divididos em duas formas, denominadas Reação Reversa (RR) Tipo 1 e Eritema Nodoso Hansênico (ENH) ou Tipo 2 que juntas podem afetar de 30 a 50% dos pacientes acometidos por hanseníase. Nos episódios reacionais o portador tem

piora do estado geral, piora do acometimento neural e cutâneo, podendo também ter os órgãos internos afetados. Estes episódios são considerados emergências médicas, devido ao dano neural que pode ser irreversível. A causa, mecanismo e tratamento dos estados reacionais ainda são pouco entendidos e desafiadores. Os estados reacionais parecem ser elicitados por respostas imunológicas diversas. A RR acomete mais os pacientes das formas interpolares (BV, BB e BT) e parece ser uma resposta imunológica celular do tipo hipersensibilidade tardia (28). Frente a um episódio de RR, o portador até pode mudar dentro do espectro clínico da doença para melhor (*upgrading*) ou pior (*downgrading*); neste tipo de reação as lesões cutâneas ficam mais edematosas e eritematosas e ocorre neurite progressiva com perda sensorial e motora. O ENH afeta mais os doentes bacilares (BV ou V), o episódio caracteriza-se por nódulos cutâneos, por vezes ulcerados, febre e mal-estar geral, podendo ocorrer iridociclite, epididimite, artrite e miosite, além de certo grau de neurite. Esta reação deve-se ao aumento de imunoglobulinas circulantes e pobre resposta celular. Uma outra forma particular de reação, embora não tão freqüente, pode acontecer nos doentes bacilares: trata-se de uma vasculite necrotizante, chamada de fenômeno de Lucio, cuja mortalidade e morbidade são bastante elevadas (13). Os estados reacionais normalmente são tratados com altas doses de corticosteróides e/ou talidomida, sendo este último medicamento mais utilizado no ENH devido sua ação antiinflamatória – porém, por ser reconhecidamente teratogênico, o uso da talidomida exige medidas preventivas quanto à anticoncepção que devem ser adotadas por mulheres que necessitam deste tratamento (28).

1.9 Genética e Hanseníase

Considerar o grau de susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase como uma característica com contribuição genética não é uma condição nova. Estudos observacionais e de segregação complexa vêm consistentemente demonstrando a existência de genes que contribuem para o controle da infecção e manifestação da doença (29). Estudos realizados com gêmeos demonstram que o grau de concordância de doença é maior nos gêmeos monozigóticos (82,6%) quando comparado com os dizigóticos (16,7%) (30). O fato de a doença apresentar manifestações clínicas diversas de acordo com o perfil de resposta imunológica do hospedeiro já é por si só um motivo para investigar o *background* genético deste hospedeiro (31).

O que difere a susceptibilidade à hanseníase das demais doenças genéticas é que ela é considerada uma característica genética complexa, ou seja, resultante da ação de mais de um gene somada a condições ambientais favoráveis que contribuem para o fenótipo (32). Os primeiros genes candidatos estudados em hanseníase eram genes HLA ligados ao complexo MHC do cromossomo 6p21, uma vez que o *M. leprae* é um patógeno intracelular e seu reconhecimento pelo hospedeiro e o desencadeamento dos mecanismos de defesa dependem da resposta imune controlada por genes deste complexo (33-40). Hoje, vários genes ligados ou não ao complexo HLA têm sido investigados, e os dados sugerem que conjuntos diferentes de genes controlam fenótipos distintos da doença, tais como susceptibilidade à hanseníase *per se* (a doença independente da forma clínica), e suas formas de manifestação clínica.

Tivemos a oportunidade de contribuir em uma revisão que aponta, até o momento, os principais avanços na área da genética da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase. Esta revisão foi publicada recentemente na revista Anais Brasileiros de Dermatologia, volume 82 na edição de setembro/outubro de 2007. O manuscrito do artigo é apresentado no capítulo seguinte, como texto complementar a esta introdução. Uma cópia do arquivo em formato PDF, conforme publicado, está disponível no anexo 1.

Como complementação, uma contextualização mais detalhada dos genes estudados neste projeto será apresentada a seguir.

1.9.1 O Scan Genômico Vietnamita – O Gene *PARK2*

Um scan genômico completo realizado em uma população vietnamita identificou um novo locus envolvido na susceptibilidade a hanseníase *per se* no cromossomo 6q25-q27 (41). O mesmo trabalho confirmou, na população vietnamita, a existência de um locus no cromossomo 10p13 atuando como modificador para a forma paucibacilar da doença. O locus 10p13 havia sido previamente detectado em um scan genômico realizado em uma coleção de famílias paucibacilares da Índia, mas até o momento nenhum gene candidato emergiu desta região em relação a hanseníase (42). A construção de um mapa denso de Desequilíbrio de Ligação (LD) do segmento genômico localizado sob o pico de ligação do cromossomo 6q25-q27 resultou na identificação de um bloco de LD de 80 kb contendo variantes genéticas compartilhadas por dois genes: o *PARK2*, também conhecido como gene da doença de parkinson autossômica recessiva

juvenil, ou parkinson de início precoce e o seu co-regulador e *PACRG*, envolvidas no controle da susceptibilidade à hanseníase *per se* na população vietnamita (43). O gene *PARK2* codifica uma E3 proteína ubiquitina ligase, enzima que participa da via da ubiquitina e degradação de proteínas do proteossomo. O achado foi replicado em um amplo estudo caso-controle em uma amostra populacional brasileira. Um dos *tag* SNP identificados nesse estudo foi o marcador *PARK2*(-2599), rs 9356058, localizado em uma região não transcrita. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que a estratégia de aplicação de estudos sistemáticos de associação envolvendo genes candidatos localizados em regiões previamente identificadas por scans genômicos pode ser bem sucedida na identificação de novos genes associados à patogênese de doenças infecciosas.

1.9.2 O Gene *LTA*

No mesmo estudo do scan genômico da população vietnamita que identificou a região 6q25-q27 como locus de suscetibilidade à hanseníase, um segundo pico sugestivo de ligação foi identificado no cromossomo 6p21. Nesta localização o pico de ligação estava sobre um cluster de genes da superfamília que inclui o gene do fator de necrose tumoral (*TNF*) e o gene da linfotóxina alfa (*LTA*). O *LTA* é o gene que codifica uma citocina altamente produzida e secretada por linfócitos que ancora com a linfotóxina-beta na superfície celular, gerando uma variedade de estímulo imunológico e resposta inflamatória e anti-viral. Em estudo subsequente, o mapeamento fino deste locus levaram à identificação de marcadores do gene *LTA* associados com a doença (44), sendo que o marcador *LTA*(+80) mostrou significância para associação com susceptibilidade à hanseníase, curiosamente apenas quando analisados casos de diagnóstico precoce da doença, em pelo menos três grupos étnicos distintos, a saber: vietnamita, indiano e brasileiro. Os marcadores desse gene que foram analisados, no entanto encontravam-se em bins diferentes nas populações estudadas, sendo um *bin* formado por um conjunto de marcadores, nem sempre consecutivos fisicamente, cujos alelos estão associados entre si, caracterizando um fenômeno conhecido como Desequilíbrio de Ligação (LD). Em um destes *bins* estava localizado o marcador *LTA*(+252) (rs909253), que no estudo original, não mostrou associação significativa com hanseníase, mas como a divergência dos marcadores genéticos em populações étnicas distintas ocorre com frequência, justifica-se sua análise em estudos de replicação.

Hanseníase: Uma Doença Genética?

Artigo de Revisão

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa milenar que, apesar da existência de terapêutica eficaz, ainda persiste como problema de saúde pública em seis países, entre eles o Brasil, líder mundial em prevalência da doença. Ao longo das últimas décadas, a hanseníase vem sendo estudada por perspectiva talvez inesperada para uma doença infecciosa: modernos métodos de análise experimental têm sido empregados para evidenciar um importante componente genético no controle da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase e seus fenótipos. Esses estudos indicam que constituição genética favorável do hospedeiro, somada a fatores propícios, ambientais e relativos ao agente patogênico, tem alto impacto na definição da susceptibilidade tanto à infecção propriamente dita quanto à evolução clínica da doença. Hoje, diversos genes e regiões genômicas já foram relacionados ao controle da susceptibilidade à hanseníase. Outros estudos estão em andamento, visando ao avanço no entendimento das bases moleculares de controle da susceptibilidade do hospedeiro à doença. O conjunto de resultados desses estudos pode levar a formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase e outras doenças infecciosas.

Abstract

Leprosy is an ancient chronic infectious disease that, despite the existence of efficient therapy, still persists as a public health problem in six countries, including Brazil, the world leader in leprosy prevalence. During the past decades, leprosy has been studied from a somewhat unusual perspective for an infectious disease: modern methods for experimental analysis have been applied to demonstrate the existence of an important genetic effect controlling host susceptibility to leprosy and its phenotypes. These studies indicate that a favorable host genetic

make-up, combined with environmental and pathogen-related variables, has a high impact on the definition of susceptibility to both infection and clinical manifestation of leprosy. To date, several genes and genomic regions have been implicated in the control of leprosy susceptibility. Additional ongoing studies aim at advancing further in the elucidation of the molecular basis of host susceptibility to the disease. This body of evidence may lead to new strategies for diagnosis, treatment and prevention of leprosy and other infectious diseases.

Palavras-chave: Genética; Hanseníase; Polimorfismo genético; Predisposição genética para doença.

1- Introdução

Na história da humanidade, provavelmente nenhuma doença gerou estigma social tão intenso quanto a hanseníase, sempre associada com conceitos tais como pecado, impureza e punição. Na era pré-microbiológica, contribuía para o fortalecimento do estigma a noção de que hanseníase era hereditária, já que agregação familiar de casos era observada com frequência. Com a identificação do bacilo causador da doença no século XIX por Armauer Hansen, confirmou-se a natureza infecciosa da enfermidade, e muito da investigação científica passou a se concentrar em aspectos relativos ao agente patogênico e suas propriedades, tais como virulência, capacidade de indução de resposta imune e resposta a tratamento. Contudo, observações clínicas sempre indicaram que não bastava o contato com o bacilo para se desenvolver a doença, que a hanseníase ocorria com maior ou menor frequência em diferentes populações e que a doença se manifestava de diferentes maneiras em diferentes indivíduos. Por exemplo, já em 1937, Rotberg, estudando a reação de Mitsuda, havia sugerido a possibilidade de um componente genético de controle da susceptibilidade à doença, em que pacientes que manifestassem positividade à reação apresentariam um fator natural de resistência, denominado pelo autor de *Fator N*, de natureza desconhecida (1). Hoje, pode-se especular que o *Fator N* é na verdade a manifestação de um conjunto de genes, os quais, interagindo de forma complexa, resultam em diferentes formas de resposta do indivíduo ao antígeno de Mitsuda.

Hanseníase pode ser brevemente definida como uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) que afeta primariamente a pele e o sistema nervoso periférico. A doença ocorre naturalmente apenas em duas espécies conhecidas, os seres humanos e os tatus. O seqüenciamento completo do genoma do *M. leprae* revelou extensa redução evolutiva, com a perda de um grande número de genes em comparação com o *M. tuberculosis*, desde que estas espécies divergiram de um ancestral comum (2). A manutenção de um conjunto mínimo de genes pode ser a explicação para algumas características únicas do *M. leprae*, tais como a incapacidade de ser cultivado em meio artificial, o longo tempo de duplicação e a altíssima especificidade por seus alvos celulares, os macrófagos e as células de Schwann do sistema nervoso periférico. Recentemente, ferramentas de genômica comparativa foram aplicadas para dar suporte à hipótese de que a doença tenha tido origem na África oriental, de onde se espalhou para o resto do mundo seguindo as rotas migratórias das primeiras populações humanas (3).

A hanseníase é doença de manifestação clínica espectral. Segundo Ridley e Jopling (4), os pólos deste espectro são ocupados de um lado pela forma mais localizada denominada tuberculóide, associada a uma resposta imunológica do tipo Th1 (celular), e do outro, pela forma virchowiana (assim denominada no Brasil em substituição ao termo “lepromatosa” da classificação original), sistêmica, e associada com uma resposta imunológica do tipo Th2 (humoral), com três formas clínicas intermediárias, ou *borderline*. Os pólos tuberculóide e virchowiano correspondem aproximadamente às formas paucibacilar e multibacilar criadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para fins de orientação terapêutica.

Desde meados da década de 1980, esforço global tem sido empregado, sob orientação da OMS, com o objetivo de se eliminar hanseníase como problema de saúde pública. Originalmente, esta meta deveria ter sido atingida em 2000. No entanto, em 2007, cerca de 300.000 novos casos/ano ainda são diagnosticados, a maioria no Brasil e na Índia. Considerando-se que (i) não existe reservatório natural de importância biológica conhecido para o *M. leprae*; (ii) casos novos da doença são tratados por poliquimioterapia através de protocolos 100% eficazes; e (iii) os medicamentos são fornecidos gratuitamente pela OMS, a origem destes novos casos permanece desconhecida (www.who.int/lep/en/).

2- Breve Introdução à Análise Genética das Doenças Complexas

Em genética, doenças complexas são aquelas que não apresentam um padrão de herança Mendeliana clássica, em que há perfeita correlação entre genótipo e fenótipo. A ocorrência destas doenças é controlada por componente genético, resultado da ação integrada de um número variado de genes, associado a fatores ambientais, socioeconômicos, culturais, entre outros. Tal definição conduz à conclusão de que todas as doenças comuns, entre elas, as infecções, pelo menos em parte, são genéticas.

Em termos gerais, a dissecção do componente genético de doenças complexas inicia-se por meio de estudos observacionais, que buscam evidências de participação de genes contribuindo para a característica que se está estudando. Entre as estratégias adotadas estão as análises de agregação familiar de casos, os estudos comparativos de taxas de concordância da ocorrência da doença entre gêmeos mono e dizigóticos, e as análises de segregação complexa, que visam descrever o modo de herança genética que melhor explica as observações em um conjunto de *pedigrees*. Esses estudos, entretanto, não fornecem informações sobre a exata natureza do componente genético em questão, tais como a localização, número e identidade dos genes envolvidos. Para se avançar, portanto, é necessária a adoção de outros modelos de estudos, agora envolvendo marcadores genéticos moleculares, tal como é feito nas análises de ligação e associação.

2.1- Estudos de Ligação

Estudos de ligação são estudos de mapeamento genético, cujo objetivo é localizar genes responsáveis por um determinado efeito no intervalo cromossômico mais estreito possível. Esses estudos, embora poderosos no mapeamento de genes exercendo um efeito genético moderado a intenso, não tem poder de resolução para implicar um único gene – tipicamente, estudos de ligação terminam localizando o gene em questão em um intervalo genômico contendo dezenas de genes. O resultado deste tipo de estudo normalmente é expresso em LOD score; um LOD score igual ou superior a 3,0 indica significância estatística, e a região genômica encontrada passa a ser tratada como região candidata a abrigar o gene que está se procurando identificar.

2.2- Estudo de Associação

Os estudos de associação, em seu formato mais simples, baseiam-se na comparação das frequências alélicas de um marcador genético entre os indivíduos afetados e não afetados. Determinado alelo é considerado associado com o fenótipo estudado quando ocorre com frequência diferente entre indivíduos afetados em comparação com um grupo controle de não-afetados. Estudos de associação têm alto poder de detecção de efeitos genéticos moderados a fracos e geralmente são utilizados ou na análise de genes candidatos, ou como sequência complementar de estudos de ligação, com o objetivo de se identificar com precisão, em região genômica candidata, o gene responsável pelo efeito detectado.

3- Genética da Hanseníase

Na hanseníase, estratégias como as descritas acima têm sido empregadas com o objetivo de serem elucidadas as bases moleculares do controle da susceptibilidade do hospedeiro ao *M.leprae*. Hoje, é amplamente aceita a noção de que conjuntos diferentes de genes modificam a susceptibilidade à doença em pelo menos dois momentos distintos, a saber: (i) no controle da infecção *per se*, isto é, a doença independentemente da sua forma de manifestação clínica; e (ii), uma vez o indivíduo infectado, na definição das diferentes formas clínicas da doença, conforme ilustrado na figura 1.

3.1- Primeiros estudos: estudos de gêmeos e análises de segregação complexa

A hipótese que a hanseníase teria um componente hereditário vem sendo investigada desde a Idade Média. Observações do monge franciscano Bartholomaeus Angelicus em 1246 já o levavam a postular que a transmissão da doença ocorria de pais para filhos (5). Bem mais tarde, estudo clássico de gêmeos realizado em larga escala na Índia evidenciou taxas significativamente maiores de concordância da ocorrência de hanseníase entre gêmeos monozigóticos em comparação com gêmeos dizigóticos, não só para a doença *per se*, mas também para suas formas clínicas (6).

Em 1988, foi realizada uma análise de segregação complexa em uma população da ilha caribenha Desirade, envolvendo 953 indivíduos, entre eles, 82 pacientes hansenianos (28 virchowianos e 54 não-virchowianos). A prevalência de hanseníase na ilha era de aproximadamente 30/1.000 habitantes, uma das mais elevadas do mundo na ocasião. Os resultados do estudo rejeitaram um modelo esporádico (não-familiar), indicando um modelo de

herança mendeliana com um gene principal co-dominante ou recessivo controlando a susceptibilidade à doença (7). Mais recentemente, esse achado foi em parte confirmado em estudo envolvendo uma amostra de 76 pedigrees brasileiros e que também resultou na rejeição de um modelo predominantemente ambiental de controle da susceptibilidade à hanseníase (8).

3.2- Genes Candidatos

A escolha de genes candidatos para análise genética molecular é tarefa difícil para o geneticista, em particular frente à constatação de que o genoma humano é formado por estimados 30 a 40 mil genes. Assim, genes candidatos são tipicamente selecionados com base em três critérios: (i) possível papel crítico na patogênese da doença (candidatos funcionais); (ii) sua localização em uma região genômica previamente envolvida no controle da doença (candidatos posicionais), ou (iii) uma combinação dos dois anteriores (candidatos funcionais/posicionais). Breve descrição dos genes candidatos mais intensamente estudados em hanseníase é apresentada a seguir.

3.2.1- Genes ligados ao complexo do Antígeno Leucocitário Humano (HLA)

3.2.1.1- HLA II

O complexo HLA é um conjunto de genes localizados na região cromossômica 6q21 (figura 2). Estudos relacionando genes HLA com hanseníase são suportados pela observação de que as formas clínicas da doença estão associadas ao perfil de resposta Th1/Th2 apresentado pelo hospedeiro; essa resposta seria parcialmente controlada por mecanismos de apresentação de antígenos e interação célula-célula, por sua vez dependentes da expressão de genes HLA. De fato, um grande número de estudos de ligação e associação demonstrou envolvimento de alelos e haplótipos do complexo HLA, em particular, HLA-DR2 e HLA-DR3, ambos da classe HLA II, como importante fatores de risco genéticos para susceptibilidade a subtipos da hanseníase (5, 8, 9). Esse efeito não é tão evidente para susceptibilidade à hanseníase *per se*.

3.2.1.2– MICA e MICB

MICA e *MICB* são dois genes da classe I do complexo HLA que expressam proteínas na superfície de células quando sujeitas a estresse, fazendo então que sejam reconhecidas por células

T CD8⁺ e *natural killer*. Estudo recente envolvendo pares de irmãos afetados por hanseníase paucibacilar recrutados no sul da Índia identificou evidência positiva para associação entre a doença e uma variação funcional do gen *MICA*, bem como com polimorfismo do tipo microssatélite próximo ao gene vizinho *MICB*. Esta associação parece ser independente daquela observada no mesmo estudo para variantes do gene *TNFA*, apesar de sua proximidade genômica (Figura 2). O mesmo não pôde ser confirmado para alelos do complexo HLA classe II, especificamente HLA-DRB1, devido à falta de poder de resolução estatística da amostra (10). Infelizmente, os autores não testaram nenhum marcador para o gene *LTA*, associado de forma independente com hanseníase em diferentes populações (11). As proteínas codificadas pelos genes MIC parecem ter papel na resposta imune inata à infecção; resta agora esclarecer melhor a relevância dos polimorfismos dos genes *MICA* e *MICB* na patogênese da hanseníase.

3.2.1.3- *TNFA*

O *TNFA* é o gene que codifica o fator de necrose tumoral alfa, citocina pró-inflamatória que participa de vários processos biológicos, incluindo a modulação da resposta imune inata e adaptativa. Diversos estudos genéticos têm produzido evidências de impacto de variações genéticas no gene *TNFA* sobre fenótipos da hanseníase em populações de origem étnica distintas, como a brasileira (12) e a indiana (13). Porém, a exata natureza deste efeito ainda é motivo de controvérsia, uma vez que a direção da associação de variantes do gene *TNFA* tem-se mostrado inconsistente em diferentes estudos, com um mesmo alelo ora associado com fenótipos de resistência, ora com fenótipos de susceptibilidade nas populações brasileira e indiana.

3.2.1.4- *LTA*

A linfotoxina alfa, codificada pelo gene *LTA*, é citocina importante na modulação da resposta inflamatória. Recentemente, estudo em larga escala envolvendo mais de 400 marcadores genéticos da região HLA encontrou forte evidência de associação entre alelos do gene *LTA* e susceptibilidade à hanseníase *per se* em duas amostras populacionais independentes do Vietnã do Sul. No mesmo estudo, o achado foi replicado em amostra populacional da Índia (11). Interessantemente, evidência para associação, em todas as populações analisadas, mostrou-se mais forte à medida que diminuía a idade de diagnóstico dos casos, sugerindo efeito genético

mais pronunciado em pacientes precocemente afetados por hanseníase. Além disso, a proximidade física entre os genes *TNFA* e *LTA* (figura 2) permite especulações quanto a qual dos dois genes – se não os dois – é o verdadeiro responsável pelos efeitos genéticos observados para este segmento genômico em diversas doenças complexas.

3.2.2- Genes não-HLA

Os achados, amplamente replicados, apontando para a região HLA como locus crucial na definição do risco genético de susceptibilidade a fenótipos da hanseníase, têm levado a uma série de perguntas não respondidas. Por exemplo, associação de alelos HLA com hanseníase *per se* é menos evidente do que com determinadas formas clínicas da doença. É, portanto, razoável pressupor a existência de genes não ligados à região HLA envolvidos na definição da susceptibilidade à hanseníase. Assim, vários genes candidatos não-HLA têm sido testados para ligação e/ou associação com fenótipos da doença. Além disso, até o momento, três *scans* genômicos completos já foram realizados em coleções de famílias afetados por hanseníase em diferentes populações. Todos eles apontam para a existência de *loci* não-HLA envolvidos no controle de fenótipos da doença. O quadro 1 resume alguns dos principais achados envolvendo genes e regiões genômicas não ligadas ao complexo HLA. Mais detalhes desses estudos estão apresentados a seguir.

3.2.2.1- *IL-10*

Evidência experimental acumulada sugere que a interleucina-10 é citocina importante na modulação da resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae*. Estudo de associação baseado em populações realizado por Moraes e colaboradores, do Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz, detectou efeito protetor de haplótipo específico formado por três marcadores intragênicos ao gene *IL-10*, tanto contra hanseníase *per se* quanto contra a sua forma multibacilar (14, 15). No mesmo estudo, haplótipo alternativo composto por alelos dos mesmos três marcadores foi encontrado em associação com susceptibilidade à hanseníase *per se*, mas não com determinada forma clínica da doença, reforçando a hipótese da participação de variantes do gene *IL-10* no controle de fenótipos da hanseníase.

3.2.2.2- *NRAMP1* (ou *SCL11A1*)

Em importante série de artigos, Gros e colaboradores acumularam sólida evidência de que a resistência natural a parasitas intracelulares no camundongo é controlada pelo gene *Natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1)*, como foi batizado pelos autores (16). O gene homólogo no ser humano localiza-se na região cromossômica 2q25 e é expresso no baço, fígado, nos pulmões e mais intensamente nos leucócitos do sangue periférico. Hoje, numerosos estudos têm sugerido um impacto de variações genéticas do gene *NRAMP1* sobre o controle de várias doenças inflamatórias crônicas, auto-imunes e, em particular, infecciosas, tais como Aids, leishmaniose e tuberculose.

As primeiras evidências de que polimorfismos neste gene seriam fatores de risco para susceptibilidade a doenças em humanos surgiram de estudos com hanseníase. Estudos baseados em famílias encontraram evidência positiva de ligação entre haplótipos do *NRAMP1* e susceptibilidade a hanseníase *per se* (17) e à resposta granulomatosa da reação de Mitsuda, analisada como fenótipo tanto quantitativo quanto qualitativo (18). Entretanto, estudos de associação baseados em populações têm encontrado resultados discordantes, deixando ainda incerta a magnitude e a natureza da participação desse gene no controle da manifestação de fenótipos da hanseníase em populações humanas. (19-21).

3.2.2.3 Os genes *PARK2/PACRG*

Um scan genômico para genes de susceptibilidade à hanseníase *per se* em população vietnamita resultou no primeiro estudo bem-sucedido de clonagem de posição de variantes genéticas exercendo papel no controle da susceptibilidade do ser humano a uma doença infecciosa. Análise de ligação não-paramétrica foi aplicada no estudo de 86 famílias multiplex afetadas por hanseníase, recrutadas na cidade de Ho Chi Min, Vietnam do Sul. Foi encontrada forte evidência de ligação entre hanseníase *per se* e a região cromossômica 6q25-q27, com um LOD score máximo multiponto de 4,31 ($P=2.5 \times 10^{-14}$) (22). Em estudo complementar, 197 famílias vietnamitas simplex independentes foram utilizadas na construção de um mapa de associação de alta resolução da região candidata 6q25-q27. Esse estudo levou à identificação de 17 SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) associados com hanseníase *per se* na população vietnamita. Análise de Desequilíbrio de Ligação da região candidata mostrou que 15 dos 17 SNPs associados estavam localizados em um único bloco com 80 quilobases de extensão, cobrindo região reguladora compartilhada por dois genes: o gene do parkinsonismo juvenil autossômico

recessivo (AR-JP), denominado Parquina (*PARK2*) e o gene *PACRG* (Gene co-regulado com parquina). Análise de regressão logística multivariada detectou dois *tag* SNPs que capturavam completamente a informação de associação observada na região. Haplótipos definidos por estes dois *tag* SNPs foram associados com um aumento de até 5,28 vezes do risco de contrair hanseníase ($P = 0,0005$). Ainda no mesmo estudo, esses achados foram integralmente replicados em população caso-controle independente e etnicamente distinta recrutada na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (23). Mais recentemente, associação entre um dos *tag* SNPs associados no Vietnã e Brasil foi detectada em uma população caso-controle da Índia (24). Embora significância estatística não tenha resistido à correção para testes múltiplos, em um contexto de replicação, este achado independente reforça a hipótese da participação universal de variantes regulatórias dos genes *PARK2* e *PACRG* no controle da susceptibilidade à hanseníase.

Interessantemente, as mesmas variações do sistema *PARK2/PACRG* associadas com hanseníase foram relacionadas com susceptibilidade à febre tifóide e paratifóide em uma população da Indonésia (25), sugerindo um papel destes genes candidatos sobre o controle da susceptibilidade do hospedeiro a outros patógenos intracelulares.

3.2.2.4- VDR

As primeiras evidências de um papel imunológico importante para a vitamina D datam do século XVIII, quanto propriedades terapêuticas do óleo de fígado de peixe eram aplicadas no tratamento da tuberculose. Em meados do século XX, a vitamina D era usada com sucesso no tratamento da tuberculose cutânea. A forma ativa da vitamina D é produzida pelos macrófagos e é capaz de ativar monócitos, estimular imunidade celular e suprimir imunidade humoral através da regulação da produção de citocinas (26). Para exercer seus efeitos, a vitamina D precisa ligar-se a um receptor polipeptídico intracelular específico, codificado pelo gene do receptor da vitamina D (*VDR*). Essas observações levaram à hipótese que variantes do gene *VDR* pudessem estar envolvidas no controle da resposta imune do hospedeiro contra micobactérias. Em hanseníase, Roy e colaboradores (19) conduziram um estudo envolvendo 170 casos de indivíduos com hanseníase tuberculóide, 124 com a forma virchowiana da doença e 166 doadores de sangue saudáveis. Os autores encontraram associação estatisticamente significativa entre alelos de marcador do gene *VDR* e susceptibilidade a formas clínicas da hanseníase, com homocigotos “tt” e “TT” enriquecidos nos grupos tuberculóide e virchowiano, respectivamente. Esse achado foi

confirmado em estudo mais recente envolvendo uma população de 270 indivíduos hansenianos e 452 controles saudáveis recrutados em Malawi (27).

3.3 Regiões candidatas posicionais

3.3.1. Regiões cromossômicas 10p13 e 20p12

O primeiro scan genômico para susceptibilidade à hanseníase foi realizado em coleção de famílias indianas das províncias de Tamil Nadu e Andhra Pradesh apresentando predominantemente a forma paucibacilar da doença. Uma análise em dois passos resultou em evidência positiva para ligação entre hanseníase e a região cromossômica 10p13, com um LOD score máximo multiponto de 3,52. A adição de oito marcadores na região candidata resultou em aumento do conteúdo de informação e aumento do LOD score para 4,09 ($P < 2 \times 10^{-5}$) (28). Esse achado foi confirmado no scan genômico realizado na população vietnamita, quando incluída na análise apenas uma subpopulação de famílias com hanseníase paucibacilar (22). Esse resultado sugere o locus 10p13 como um modificador para a forma clínica paucibacilar da hanseníase.

Em desdobramento do estudo original, análise envolvendo apenas famílias recrutadas na província de Tamil Nadu identificou ligação entre a região cromossômica 20p12 com hanseníase, com um LOD score máximo de dois pontos de 3,48 ($P = 0,00003$) (29). Curiosamente, a análise multiponto resultou em LOD score máximo menor, de 3,16. Quando as famílias de Andhra Pradesh foram incluídas, não foi encontrada ligação estatisticamente significativa na análise multiponto. Embora encorajadores, estes achados devem ser interpretados com cautela, uma vez que a forma paucibacilar da hanseníase não pode ser considerada representativa de todas as formas clínicas da doença. Até o momento, nenhum gene candidato emergiu de estudos envolvendo as regiões 10p13 e 20p12.

3.3.2 - Região cromossômica 6q25-q27

O forte efeito genético de ligação detectado para a região cromossômica 6q25-q27, associado à observação de associação positiva entre hanseníase e alelos de marcadores do tipo microssatélites e SNPs localizados adjacentes à região regulatória dos genes *PARK2/PACRG*, sugere a presença de genes candidatos adicionais para a susceptibilidade à hanseníase nesta região cromossômica (22, 23). Estudos adicionais estão em andamento, com o objetivo de se

avançar na dissecação completa do papel deste locus no controle da susceptibilidade do hospedeiro à doença.

3.3.3 - Região cromossômica 17q11-q21

Mais recentemente, um terceiro scan genômico em hanseníase foi realizado em coleção de 71 famílias brasileiras multiplex multigeracionais. Os autores reportaram evidências sugestivas para ligação entre a região 17q11-q21 e susceptibilidade à hanseníase. O indício de ligação manifesta-se em dois picos com um LOD score máximo de 2,67 ($P=0,004$). Infelizmente, o número de trios era insuficiente para análise de associação baseada em famílias. O mesmo estudo reportou fraca evidência para ligação entre a região 20p13 e hanseníase (LOD score 1,51, $P=0,004$), região localizada 3,5 megabases distais do reportado no estudo indiano (30).

5. Considerações Finais

A participação de fatores genéticos contribuindo para a infecção e fenótipos clínicos da hanseníase, de mera suposição, é hoje uma certeza, graças em grande parte à aplicação das poderosas ferramentas de análise genéticas modernas atualmente disponíveis. Em conjunto, dados acumulados a partir de estudos observacionais e estudos moleculares de ligação e/ou associação têm-nos levado mais próximo da elucidação das bases moleculares que influenciam a susceptibilidade do hospedeiro a essa doença milenar. No entanto, a complexidade da característica, claramente resultado de efeito poligênico associado a ampla gama de variáveis ambientais, ainda faz de sua completa dissecação enorme desafio à ciência. Hoje, uma importante questão diz respeito à viabilidade de aplicação de estudos de associação, mais sensíveis que os de ligação, na investigação de genomas completos, os chamados “estudos pangenômicos de associação”. Esses estudos, geradores de hipóteses, embora potencialmente muito poderosos, ainda dependem da aplicação de tecnologia avançada, hoje só disponível em poucos grandes centros de pesquisa, concentrados na América do Norte e Europa. Além disso, a imensa quantidade de dados primários produzidos por essas plataformas tecnológicas gera dificuldades consideráveis para sua análise e interpretação, tornando necessário o desenvolvimento de métodos e de estratégias inovadoras de análise estatística. Finalmente, esses estudos pangenômicos ainda são de altíssimo custo. A superação dessas dificuldades é ponto crucial na popularização dessas estratégias.

Na hanseníase, pouco se questiona quanto à relevância da participação de genes HLA e não-HLA no controle da manifestação de fenótipos da doença. Alguns dos resultados já obtidos têm levado à implicação de vias metabólicas antes insuspeitas na patogênese da doença, por exemplo: o gene *PARK2* codifica uma E3 proteína-ubiquitina ligase, enzima que participa da via da ubiquitina e degradação de proteínas do proteossomo. Mutações nesse gene têm sido associadas à ocorrência de doença de Parkinson de início precoce. Como a via da ubiquitina participa da patogênese da hanseníase e qual a relação entre hanseníase e doença de Parkinson - duas patologias neurodegenerativas crônicas de etiologia distinta – são perguntas científicas intrigantes que podem ser exploradas intensamente.

Apesar desses avanços, a exata natureza deste componente genético, em particular o número exato de genes envolvidos, suas funções biológicas e as variações genéticas desses genes responsáveis pelos efeitos observados ainda é amplamente desconhecida. O melhor entendimento do impacto da genética em doenças infecciosas como a hanseníase poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prevenção e terapêutica dessas doenças no futuro.

Referências

1. Beiguelman B. Genética e Hanseníase. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2002 7(1):117-28.
2. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001 Feb 22;409(6823):1007-11.
3. Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005 May 13;308(5724):1040-2.
4. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.
5. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(4):1124-31.

6. Chakravartii M.R, FV. A Twin Study on Leprosy. Stuttgart: Georg Thieme; 1973.
7. Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet.* 1988 Feb;42(2):256-66.
8. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001 Jun;2(4):196-204.
9. Mira MT, Alcais A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun.* 2003 Jan;4(1):67-73.
10. Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AV, Pitchappan R. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet.* 2006 Oct 1;15(19):2880-7.
11. Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet.* 2007 Apr;39(4):517-22.
12. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis.* 2002 Dec 1;186(11):1687-91.
13. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176(2):530-2.
14. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006 Sep;77(3):189-202.
15. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborcht PR, Nery JA, Santos AR, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 2004 Nov;5(7):592-5.
16. Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection genomics: Nrampl as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med.* 1998;49:275-87.
17. Abel L, Sanchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998 Jan;177(1):133-45.

18. Alcais A, Sanchez FO, Thuc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):302-8.
19. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis.* 1999 Jan;179(1):187-91.
20. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AV. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Dec;65(6):733-5.
21. Ferreira FR, Goulart LR, Silva HD, Goulart IM. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004 Dec;72(4):457-67.
22. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):412-5.
23. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004 Feb 12;427(6975):636-40.
24. Malhotra D, Darvishi K, Lohra M, Kumar H, Grover C, Sood S, et al. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. *Eur J Hum Genet.* 2006 Apr;14(4):438-42.
25. S. Ali AMV, S. Widjaja, C. Surjardi, E. van de Vosse, J.T. van Dissel. PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. *Clin Exp Immunol.* 2006;144:425-31.
26. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2003 Mar;49(2):277-300.
27. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Sep;71(3):330-40.

28. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):439-41.
29. Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR, Balakrishnan K, Ghei S, Golding M, et al. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J Infect Dis.* 2002 Oct 15;186(8):1190-3.
30. Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004 Jan;5(1):63-7.

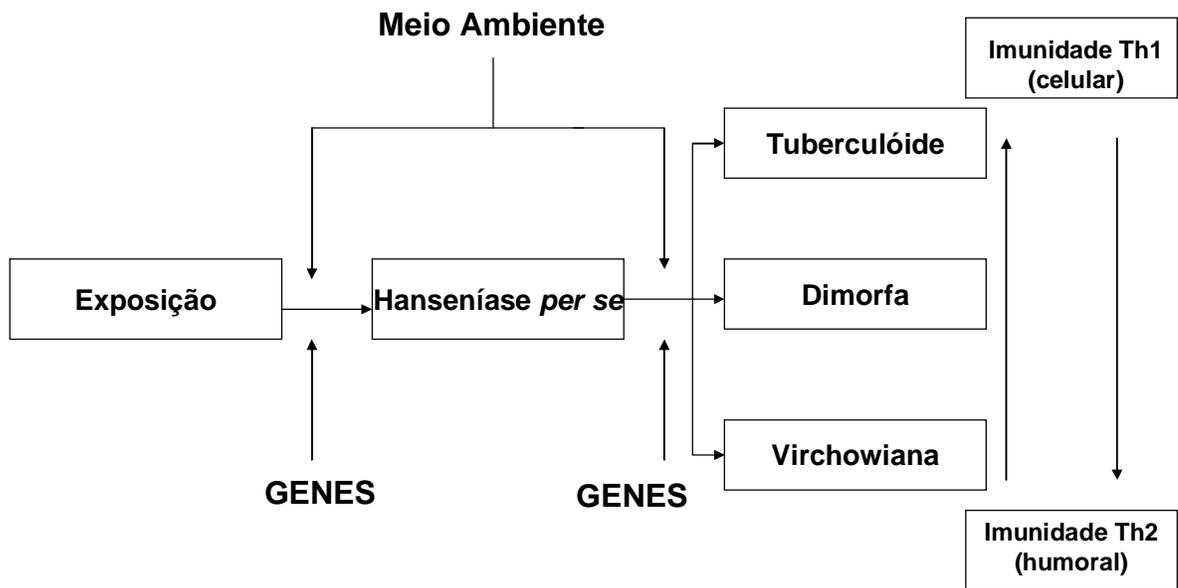


Figura 1: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase, sugerindo a participação de conjuntos diferentes de genes no controle das duas etapas da patogênese da doença - infecção *per se* e manifestação clínica.

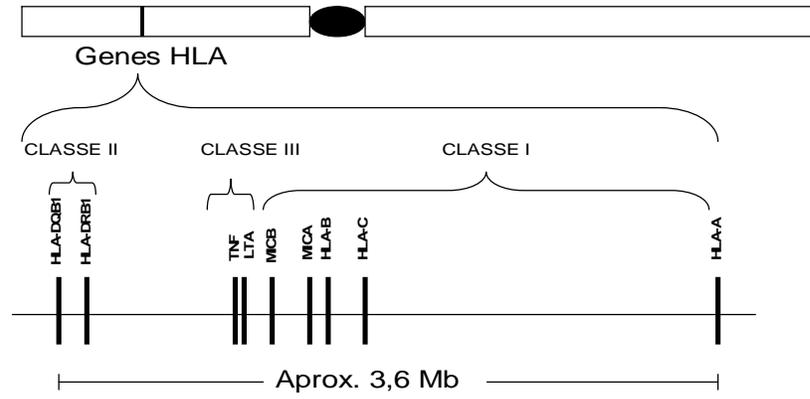


Figura 2: Desenho esquemático do cromossomo 6, com representação em escala da localização relativa dos principais genes HLA envolvidos com hanseníase. Fonte: Sanger Institute.

Tabela 1 – Principais genes e regiões candidatas não HLA relacionados a hanseníase, já estudados e algumas evidências estatísticas.

Gen Candidato	Desenho	Fenótipo	Tipo Estudo	Cromossomo	LOD, OR, Valor de P	População	Primeiro Autor	Ano
IL-10	caso-controle	Hanseníase <i>per se</i> , MB	Associação	1q31-q32	P=0,005	Brasileira	Moraes et al,	2004
VDR	caso-controle	Tipo clínico	Associação	12q13.11	OR=4,3, P=0,004	Indiana	Roy et al,	1999
NRAMP1	pares irmãos	Hanseníase <i>per se</i>	Ligação	2q35	P<0,005	Vietnamita	Abel et al,	1998
	caso-controle	Tipo clínico	Associação		P=0,007	Mali/Indiana	Meisner et al,	2001
PARK2/PACRG	scan genômico	Hanseníase <i>per se</i>	Ligação	6q25.2-q27/6q26	P = 0,0002 (overall)	Vietnamita/Brasileira	Mira et al,	2004
Região Candidata								
Região 6q25-q27	scan genômico	Hanseníase <i>per se</i>	Ligação		LOD=4,31, P=2,5x10 ⁻¹⁴	Vietnamita	Mira et al,	2004
Região 10p13	scan genômico	Hanseníase PB	Ligação		LOD=4,09, P<2x10 ⁻¹⁵	Indiana	Siddiqui et al,	2001
Região 20p12	scan genômico	Hanseníase PB	Ligação		LOD=3,48, P=0,00003	Indiana	Tosh et al,	2002
Região 17q11-q21	scan genômico	Hanseníase <i>per se</i>	Ligação		LOD=2,67, P=0,004	Brasileira	Miller et, al	2004

2 Justificativa e Hipótese

Embora a presença de loci controlando a susceptibilidade do ser humano à hanseníase e a suas formas clínicas tenha sido detectado e confirmada por diversos estudos, a exata natureza do controle genético envolvido permanece desconhecida. Por exemplo, hoje é amplamente aceita entre os geneticistas a noção de que achados originais de associação entre marcadores genéticos e fenótipos complexos precisam ser validados por replicação em estudos independentes, de preferência envolvendo populações de *background* étnico distinto do original. Nossa hipótese é que polimorfismos nos genes *PARK2* e *LTA*, previamente associados à ocorrência de hanseníase em pelo menos duas amostras populacionais diferentes, estejam envolvidos também no controle da susceptibilidade à doença em uma população sul-brasileira.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa é de investigar, em uma população sul-brasileira, a associação entre hanseníase e polimorfismos de genes candidatos previamente descritos como associados com a susceptibilidade à hanseníase em outras populações.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Recrutar, caracterizar e descrever epidemiologicamente uma amostra populacional de pacientes hansenianos do Estado do Paraná para compor o grupo de casos;
- 2- Identificar e recrutar uma amostra de indivíduos sem sinal ou história de hanseníase, sem relação de parentesco com a amostra populacional de casos e com histórico de convivência prolongada com a doença para compor o grupo controle;
- 3- Produzir dados genotípicos da amostra populacional estudada, relativos aos marcadores *PARK2*(-2599) e *LTA*(+252) dos genes *PARK2* e *LTA* candidatos ao controle da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase;
- 4- Aplicar um desenho do tipo caso-controle na investigação de associação entre alelos dos polimorfismos testados e a susceptibilidade à hanseníase *per se* na população estudada.

4 Métodos

4.1 Recrutamento da Amostra Populacional dos Casos

Para compor a amostra populacional de casos, foram recrutados indivíduos portadores de hanseníase independente da forma clínica, pacientes de unidades de saúde pública que prestam atendimento e dispensação de medicamento aos hansenianos no estado do Paraná. As seguintes unidades de saúde participaram da pesquisa: Fundação Pró-Hansen, de Curitiba, Unidade de Saúde Central de Pato Branco, Unidade de Saúde Central de Prudentópolis, Unidade de Saúde Central de Piraquara.

Todos os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por médico especialista seguindo critérios da OMS. Casos antigos de hanseníase foram identificados junto aos prontuários e cadastros de pacientes mantidos pelos serviços participantes. Os indivíduos foram contactados por telefone pelo seu médico pessoal, apresentados ao estudo e, caso houvesse interesse em participar, convidados a comparecer para uma consulta com médico membro da equipe de pesquisa. Na ocasião da consulta, o estudo era apresentado em detalhes e o indivíduo era convidado a, caso aceitasse participar, assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, anexo 2), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (anexo 2). Com a inclusão do paciente formalizada, dados relativos à idade, gênero, etnia e vacinação por BGC foram obtidos. A variável etnia foi definida pelo entrevistador e confirmada por consulta ao prontuário do paciente. A variável vacinação por BCG foi auto-relatada. Consulta subsequente a prontuário permitiu a coleta de dados clínicos relativos à hanseníase, a saber: idade de diagnóstico, forma clínica conforme estabelecida pelos protocolos da OMS e de Madri, número de lesões no diagnóstico, ocorrência de episódios reacionais, índice baciloscópio, resposta da reação de Mitsuda e realização ou não de biópsia cutânea. Nem todos os pacientes apresentaram dados da realização de todos os exames complementares, mas pelo menos um deles estava sempre presente. Apenas pacientes que tiveram seu estado de afetado por hanseníase confirmado pelo procedimento descrito acima, foram incluídos no estudo. Finalmente, os pacientes eram submetidos a uma coleta de 10ml de sangue periférico em tubos do tipo Vacutainer® com EDTA, seguindo padrões básicos de anti-sepsia, para obtenção do DNA.

4.2 Recrutamento da Amostra Populacional dos Controles

Para compor a amostra populacional controle, foram recrutados indivíduos sem histórico de hanseníase, doenças infecciosas e/ou inflamatórias crônicas e neoplásicas. Três tipos de indivíduos foram incluídos: (i) trabalhadores da área de saúde com longo histórico de atuação junto a pacientes hansenianos; (ii) moradores de domicílios com histórico de hanseníase, porém sem parentesco biológico com indivíduo afetado incluído no estudo; e (iii) moradores de domicílios vizinhos àqueles com histórico de hanseníase. Todos os controles foram recrutados no município de Piraquara, região metropolitana de Curitiba-PR. O município hospeda o antigo “leprosário” São Roque, hoje denominado Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná, ao redor do qual vive hoje uma comunidade de ex-doentes, seus familiares e funcionários do hospital. Dados relativos a gênero, idade, etnia e vacinação por BGC foram obtidos, seguindo protocolo idêntico ao aplicado para o grupo de casos.

Todos os indivíduos recrutados para compor o grupo controle também assinaram o TCLE e também tiveram 10ml de sangue periférico coletado para extração do DNA.

4.3 Critérios de Inclusão

- 1- Ser ou ter sido portador de hanseníase, independente da forma clínica, com diagnóstico confirmado e passível de verificação nos registros médicos disponíveis, para compor o grupo de casos;
- 2- Não apresentar histórico de hanseníase, de doença infecciosa ou inflamatória crônica, neoplasia ou relação de parentesco com os pacientes hansenianos recrutados, para compor a amostra controle.

4.4 Critérios de Exclusão

- 1- Pacientes para os quais não foi possível a obtenção de DNA de qualidade, conforme definido no item 4.5 de “Métodos”;
- 2- Pacientes cujo DNA não amplificou em todos os testes de genotipagem, ou que consistentemente não tenham produzido genótipos possíveis de serem definidos de forma inquestionável para ambos os marcadores testados.

4.5 Extração do DNA e Determinação da Concentração das Amostras

O sangue coletado foi centrifugado e separou-se a camada leucocitária para extração do DNA, segundo o protocolo para extração rápida do DNA genômico proposto em (45). Brevemente, a camada leucocitária foi transferida para tubos plásticos de 14ml com tampa para precipitação de DNA e proteínas. O precipitado foi submetido ao processo de *salting out* e o sobrenadante resultante foi utilizado para precipitação do DNA em etanol absoluto. O DNA foi então transferido para microtubos de 1,5 ml esterilizados, lavado com etanol a 70%, centrifugado e deixado para secar em estufa a 37°C. O pellet de DNA resultante foi finalmente ressuspendido em tampão TE e armazenado a -20°C. Uma descrição detalhada do método de extração utilizado está disponível no anexo 3.

O DNA extraído foi submetido à leitura por espectrofotometria para verificar a concentração da amostra. O método espectrofotométrico empregado tem como princípio a absorção seletiva de luz ultravioleta de 260 nm de comprimento de onda pelo DNA, enquanto que proteínas absorvem seletivamente luz em 280nm. Portanto, a leitura da solução nestes dois comprimentos de onda permite a quantificação tanto de DNA quanto de proteínas presentes na amostra extraída. A absorbância (A) encontrada em 260nm é utilizada no cálculo da concentração de DNA, e a razão A_{260}/A_{280} fornece uma indicação do grau de pureza da amostra.

Para determinar a concentração e pureza do DNA obtido, as amostras foram diluídas 1:200 (1 parte da solução para 200 partes de água milli-Q). Em seguida, foi medida a absorbância em 260nm e 280nm, e calculada tanto a concentração de DNA, com base nas leituras a 260 nm, quando a razão A_{260}/A_{280} . Valores entre 1,7 e 2,0 para a razão A_{260}/A_{280} indicam boa concentração e pureza da amostra, com maior proporção de DNA em relação às proteínas.

Após a determinação da concentração, as amostras foram diluídas em soluções de trabalho a 20 ng/μl e armazenadas em freezer a - 20°C.

4.6 Definição dos Genes Candidatos e Marcadores Correspondentes

Genes candidatos foram selecionados com base em resultados anteriores positivos para associação com fenótipos da hanseníase. Foi dada prioridade para genes candidatos identificados por clonagem de posição. Com base neste critério, incluímos neste estudo os genes *PARK2* e

LTA, os dois únicos exemplos conhecidos, até o momento, de genes identificados por clonagem de posição como fatores de risco genéticos para fenótipos da hanseníase.

Marcadores bialélicos do tipo Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP, de *Single Nucleotide Polymorphism*) foram selecionados para cada gene candidato. A escolha do marcador foi baseada em resultados positivos anteriores, para populações de origem étnicas distintas. Para o gene *PARK2*, foi selecionado o marcador *PARK2*(-2599) (rs9356058), um dos dois *tag* SNPs que capturavam completamente a informação de associação observada nas populações vietnamita e brasileira do Rio de Janeiro (43). Para o gene *LTA*, foi selecionado o marcador *LTA*(+252) (rs909253), uma das variantes investigadas no estudo original em duas populações vietnamitas independentes e uma população indiana (44).

4.7 Genotipagem

A genotipagem do marcador do gene *LTA* foi realizada através do sistema de Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP, de *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). A genotipagem do marcador do gene *PARK2* foi realizada através do sistema de discriminação alélica por PCR em tempo real, conforme descrito em detalhes a seguir.

4.7.1 Genotipagem do Marcador *LTA*(+252) – Amplificação por PCR

A região genômica contendo o marcador genético para o gene *LTA* foi amplificada por PCR. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems*, sob condições uniformes. Os oligonucleotídeos utilizados, bem como as condições de ciclagem e tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se discriminados no quadro II. As reações foram realizadas em um volume final de 25µL contendo tampão para Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração de 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.3 µM de cada oligonucleotídeo e 1.0 U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 40ng de DNA.

Após as reações de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,7% em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,045M, EDTA 1 mM) para verificação de produto. Foram aplicados 10 µL do produto amplificado, homogeneizados em 2µL de tampão de corrida (glicerol 30%, azul

de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25%). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel a 100V durante aproximadamente 40 minutos utilizando marcador de peso molecular (Invitrogen) de 123 pb. Em seguida o gel foi submetido à coloração por imersão em solução de brometo de etídeo 0,1 µg/mL. As bandas foram visualizadas em transiluminador e fotografadas em sistema de fotodocumentação digital *Geliance 200 Imaging System* da Perkin Elmer.

Quadro II - Os Oligonucleotídeos, Condições de Ciclagem e Tamanho dos Fragmentos Utilizados na PCR.

SNP	Oligonucleotídeos (orientação 5'-3')	Ciclagem	Tamanho do Fragmento
<i>LTA+252</i>	Sense 5'-CCGTGCTTCGTGTTTGGACTA-3'	95°C- 3 min	} 35X 782pb
		95°C- 45 seg	
	Antisense 5'-AGAGGGGTGGATGCTTGGGTTC-3'	62°C- 45 seg	
		72°C- 1'30"	
		72°C – 5 min	

4.7.2 Genotipagem do Marcador *LTA(+252)* – Análise por *RFLP*

A técnica de RFLP baseia-se na detecção de variantes genéticas com base no resultado obtido pela digestão do amplicom de DNA contendo a variação em análise por enzimas de restrição. Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição específica, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A separação destes fragmentos por eletroforese permite a distinção dos diferentes genótipos.

Para a genotipagem do SNP *LTA(+252)*, procedeu-se a digestão do produto de PCR contendo a variação com a enzima de restrição *NcoI*, através de protocolo indicado pelo fabricante, modificado quando necessário. Brevemente, duas unidades de enzima foram adicionadas a 15 uL de produto de PCR para um volume final de 25 uL. O sistema foi incubado por 15 horas a 37°C e os produtos da digestão foram separados por eletroforese a 90 V por 1 hora e 30 minutos em gel de agarose a 3%. O padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos foi visualizado em transiluminador após coloração com brometo de etídeo segundo descrito

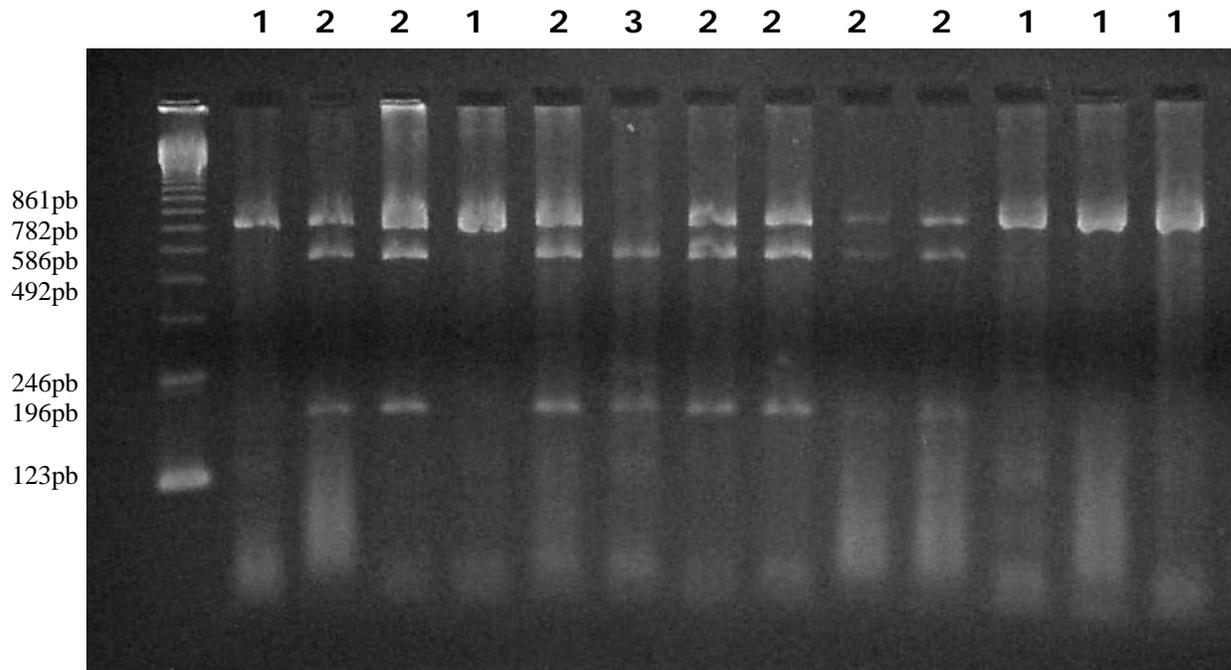
anteriormente (figura 1). O amplicom de 782 pares de bases (pb), quando digerido, resultava na formação de um fragmento de 586 pb e outro menor de 196 pb. A genotipagem foi realizada de acordo com o padrão de bandas observado após a reação, conforme descrito no quadro III e ilustrado na figura 1.

Quadro III - Reação de Digestão para Genotipagem da Variação *LTA(+252)* e Tamanho dos Fragmentos Observados.

SNP	Condições de Digestão	Fragmentos Observados
LTA(+252)	Temperatura: 37oC Tempo de digestão: 15 horas Enzima: NcoI 2U Seqüência reconhecida: 5'-C'CATGG-3' Tampão 4 (NEB)-1x Volume Produto de PCR - 15µl Volume final de reação - 25µl	AA: 1 fragmento (782pb) GA: 3 fragmentos (782, 586 e 196pb) GG: 2 fragmentos (586 e 196pb)

Legenda: 2U= duas unidades; NEB = New England Biolab; pb= pares de bases

Figura 1 – Padrão de Digestão de Produtos de PCR Contendo a Sequência Flanqueadora do SNP *LTA*(+252) após Incubação com Enzima *NcoI*.



Gel de agarose a 3%, com os genótipos 1= homozigoto não digestão AA, 2= heterozigoto AG e 3= homozigoto GG

4.7.3 Genotipagem do Marcador *PARK2*(-2599) – Discriminação Alélica

A genotipagem do marcador *PARK2*(-2599) foi realizada através do sistema TaqMan de discriminação alélica do tipo *Assay by Design* (*Applied Biosystems*, código do produto C_179028-10). O sistema de reação é composto de um par de primers flanqueadores do polimorfismo em análise e duas sondas, ambas marcadas com um *quencher* (responsável por omitir a luz do fluoróforo quando ambas estão ligadas à sonda) e um fluoróforo diferente para cada uma delas. A sonda específica para o alelo C foi marcada com o fluoróforo VIC que emite uma luz em um comprimento de onda diferente de FAM, fluoróforo marcador da sonda específica para o alelo T.

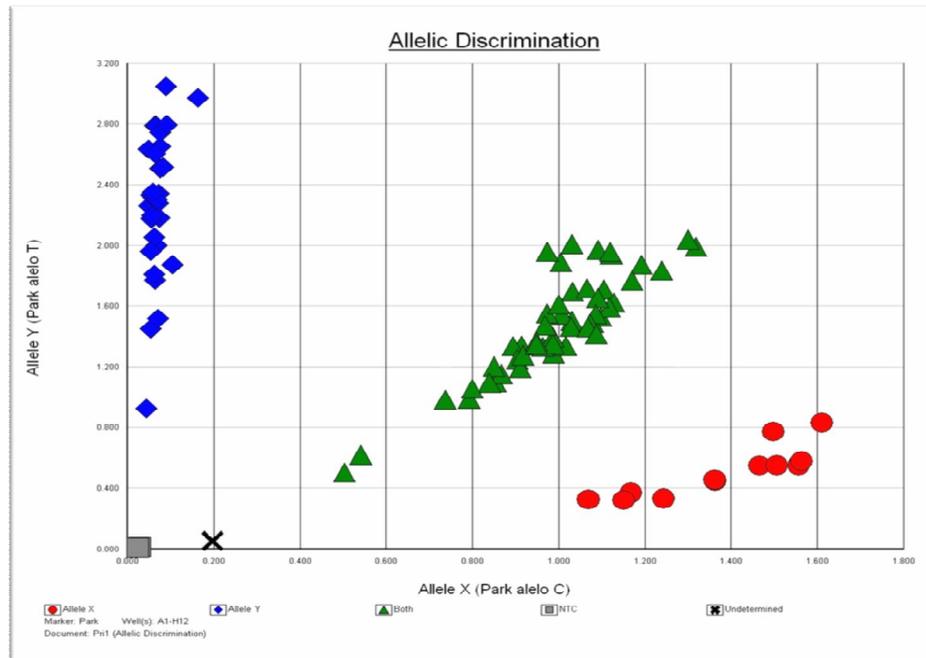
O experimento pode ser descrito em quatro etapas:

1. Preparo do sistema de reação de PCR em tempo real contendo:

- 1 μl de DNA a 20 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$
 - 0,0125 μl de mistura de reação contendo os primers *reverse* e *forward* específicos para o segmento genômico contendo a variante investigada e as duas sondas marcadas com fluorófulos.
 - 2,5 μl de solução master mix contendo Taq Polimerase Gold com atividade de 5' DNase, dNTP's tampão a base de cloreto de magnésio.
 - 1,375 μl de diluente (Água Milli Q)
2. Pré-leitura de placa de reação para determinação de luminescência basal.
 3. Amplificação e leitura óptica da placa a cada ciclo, conforme os passos descritos abaixo:
 - Passo 1: O sistema é incubado por 10 minutos a 95°C para que ocorra a desnaturação inicial da fita de DNA
 - Passo 2: A temperatura então é reduzida a 60°C por um minuto para permitir o anelamento dos primers *forward* e *reverse*, da sonda e a extensão da cadeia. Se sonda for **exatamente complementar** ao DNA, quando ocorrer a extensão, a DNA polimerase, graças à sua atividade de 5' DNase, cliva a sonda separando o quencher do fluorófulo. Nesse processo a luz é liberada e pode ser medida por um leitor de luminescência. Caso a sonda não anele perfeitamente, não haverá separação do quencher e do fluoróforo, com conseqüente ausência de emissão de luminescência.
 - Passo 3: A temperatura é novamente elevada a 95°C por 15 segundo para que ocorra uma nova desnaturação das fitas de DNA.
 - Passo 4: Retorna-se ao passo 2 e repete-se o ciclo, 40 vezes.
 4. Leitura final da luminescência:
 - Nos indivíduos homocigotos, como só ocorre o anelamento perfeito com uma das sondas (pois a outra não é complementar), luminescência de apenas uma cor, correspondente à sonda em questão, será detectada.
 - Nos indivíduos heterocigotos, ambas as sondas são clivadas, liberando as duas fluorescências distintas em quantidades equivalentes.

A figura 2 a seguir ilustra como é visualizada a discriminação alélica pelo programa.

Figura 2 – Discriminação alélica – Plataforma Taqman



Em azul no eixo Y estão os homocigotos para o alelo T, em vermelho no eixo X os homocigotos para o alelo C, no centro do gráfico em verde os heterocigotos e em preto o que não foi determinado.

4.8 Análise Estatística

Análise estatística descritiva foi aplicada para ambos os grupos de casos e controles. Para as variáveis qualitativas foram calculadas as frequências em porcentagens em cada grupo, e para as variáveis quantitativas obteve-se a média, desvio padrão, valores mínimo e máximo. A comparação entre os grupos para variáveis qualitativas foi realizada através da aplicação do teste de chi-quadrado (χ^2) para análise bivariada. Comparação da variável quantitativa idade entre os grupos foi conduzida utilizando-se o teste “t” de Student. Para análise multivariada, modelo de regressão logística *step-wise* foi aplicado utilizando-se genótipos, idade e gênero como variáveis explicativas e hanseníase como variável resposta. As variáveis idade e gênero foram incluídas no modelo por estarem distribuídas de forma não homogênea entre os grupos de casos e controles e serem clássicos fatores de risco para hanseníase. Todos estes procedimentos foram realizados conforme implementados no programa SAS versão 9.1.

Haplótipos foram construídos utilizando-se o programa *THESIAS (Testing Haplotype Effects In Association Studies)*. Este programa permite construir haplótipos com base no grau de desequilíbrio de ligação entre os alelos, bem como calcular suas frequências. Num primeiro momento, foi realizado um teste de verossimilhança para verificar se existia o efeito dos haplótipos. Para tanto, o programa conduz uma análise de regressão logística para calcular a verossimilhança sob a hipótese nula (H_0) de que não há efeito dos haplótipos; em seguida, no caso do fenótipo ser binário, a regressão logística é usada para calcular a verossimilhança sob a hipótese alternativa H_1 de um modelo no qual há efeito dos haplótipos sobre o fenótipo (46). Finalmente, subtrai-se o logaritmo (log) das verossimilhanças encontradas para H_0 e H_1 , obtendo-se o *LRT (likelihood ratio test)*. Significância do *LRT* é testada aplicando-se um teste do chi-quadrado (χ^2).

Após o efeito dos haplótipos ser confirmado, o efeito de cada haplótipo foi analisado. O parâmetro estimado (β) na regressão logística é dado pelo logaritmo das *Odds Ratio (OR)* de cada haplótipo. O valor de OR de cada haplótipo é o exponencial do parâmetro β . A ordem que os haplótipos são apresentados é baseada na ordem em que os polimorfismos são lidos no arquivo.

5 Resultados

5.1 Características Gerais da População em Estudo

A aplicação de nossa estratégia resultou no recrutamento de 120 indivíduos portadores de hanseníase. Esta amostra populacional foi descrita para as seguintes variáveis epidemiológicas: local de recrutamento, gênero, etnia, biópsia de pele, resposta à reação de Mitsuda, índice baciloscópico e vacinação com BCG. Foram ainda levantados dados quanto ao número de lesões por ocasião do diagnóstico, idade média no recrutamento e no diagnóstico, presença de estado reacional, forma clínica e classificação operacional em PB ou MB. Nem todos os pacientes tinham todos os dados disponíveis; neste caso, a informação não disponível foi codificada como ND (não disponível).

Dos 120 portadores de hanseníase incluídos, 72 foram recrutados em Curitiba (60%), 24 em Prudentópolis (20%), 11 em Pato Branco (9,1%) e três (2,5%) em Piraquara. Houve predominância do gênero masculino (67 indivíduos, 55,8%) em relação ao feminino (53 indivíduos, 44,1%). A idade média por ocasião do recrutamento foi de 49,4 anos e, por ocasião do diagnóstico, de 45,4 anos. A distribuição por etnia (termo utilizado aqui em substituição a “raça”, de conotação negativa), considera os grupos em branco, negro ou pardo, conforme apresentado nas fichas de notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) e coletado em prontuários médicos ou no momento da entrevista com o paciente.

Obtivemos um total de 163 indivíduos para compor o grupo controle, sendo 90 (55%) do gênero feminino e 73 (45%) do masculino. Dados epidemiológicos como etnia, idade e vacinação quanto a BCG foram levantados, bem como histórico de contato com indivíduo portador de hanseníase. Dos 163 indivíduos, 29 (17,7%) tiveram contato com portador de hanseníase em nível profissional e 26 (15,9%) devido à relação de parentesco, o restante (108, 66,4%) eram indivíduos moradores de domicílios vizinhos a hansenianos. Nestes casos, a relação de parentesco foi sempre com indivíduos que não foram incluídos no grupo de casos, mantendo-se assim a independência das duas amostras populacionais. A idade média de recrutamento foi de 42,37 anos.

A tabela 1 sumariza o resultado de análise comparativa entre a população de casos e de controles em relação a gênero, etnia, idade média e status vacinal com BCG.

Tabela 1 - Comparação entre Casos e Controles para as Variáveis: Gênero, Etnia, Idade no Recrutamento e Vacinação por BGC

		Casos	Controles	P-value
Gênero	Feminino	53(44,17%)	90(52,21%)	0,06
	Masculino	67(55,83%)	73(44,78%)	
Etnia	Branços	92(77%)	114(69,93%)	NS
	Negros	7(5,93%)	8(4,9%)	
	Pardos	19(16,1%)	38(23,31%)	
	Outros		3(1,84%)	
	ND	2(1,66%)		
Média de Idade		49,4 anos	42,37 anos	0,001
BCG	Sim	13(10,8%)	86(52,76%)	0,0001
	Não	8(6,66%)	39(23,92%)	
	ND	99(82,5%)	38(23,31%)	

NS= não significativo

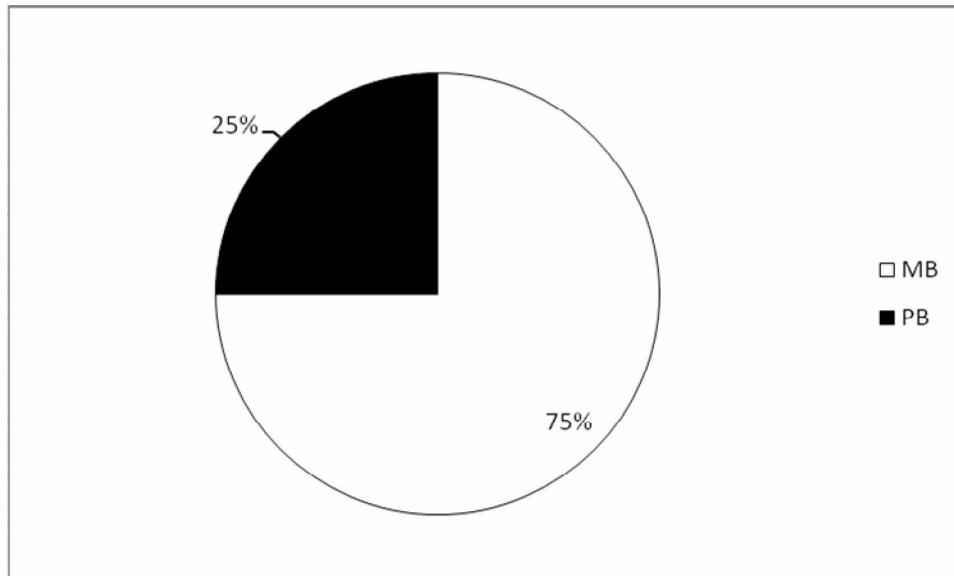
5.2 Características Epidemiológicas do Grupo de Casos

5.2.1 Distribuição Quanto as Formas Clínicas

5.2.1.1 Classificação Segundo OMS

A classificação da população de 120 pacientes quanto ao critério da OMS revelou uma maior proporção de casos multibacilares (MB, 90 indivíduos, 75%) em comparação com a frequência de casos paucibacilares (PB, 30 pacientes, 25%), conforme ilustrado no gráfico 1.

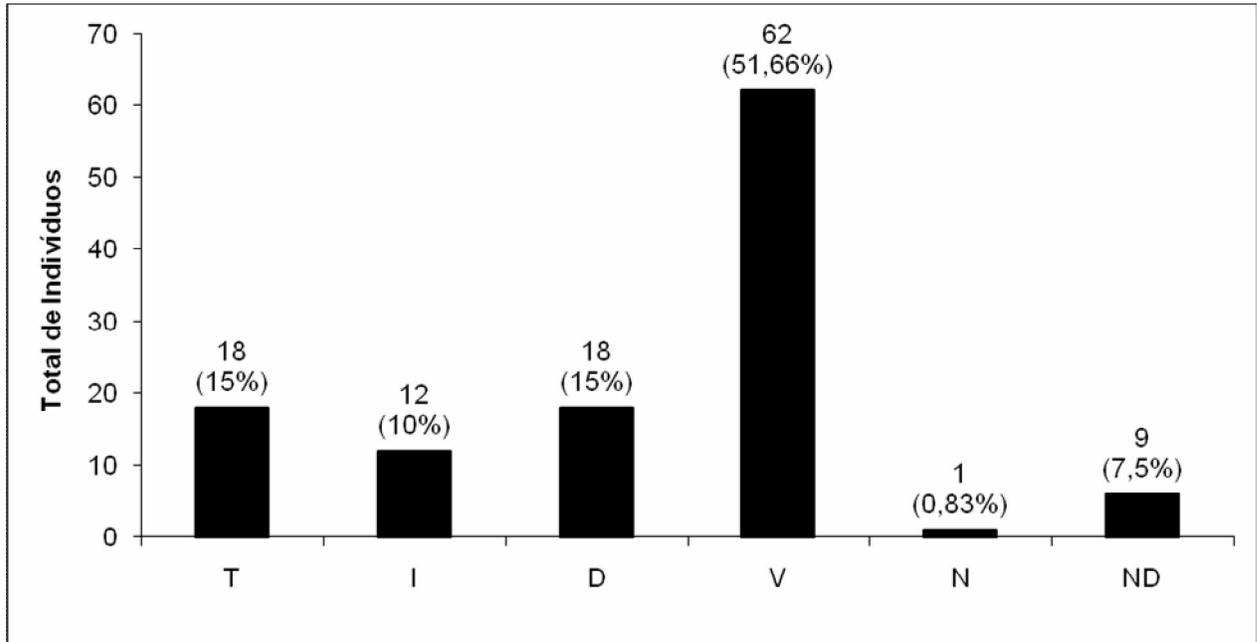
Gráfico 1 - Distribuição da Amostra Populacional de Casos em Formas Clínicas em Valores Porcentagem, Segundo Critério da OMS



MB = Multibacilar; PB = Paucibacilar;

5.2.1.2 Classificação Segundo o Protocolo de Madri

Dos 120 pacientes, 117 foram classificados segundo o protocolo de Madri, que distribui a doença em formas clínicas T para Tuberculóide, V para Virchowiana, D para Dimorfa, I para Indeterminada e N para Neural. Nossos dados indicam um predomínio das formas dimorfa e virchowiana, confirmando um enriquecimento das formas multibacilares na população estudada (gráfico 2).

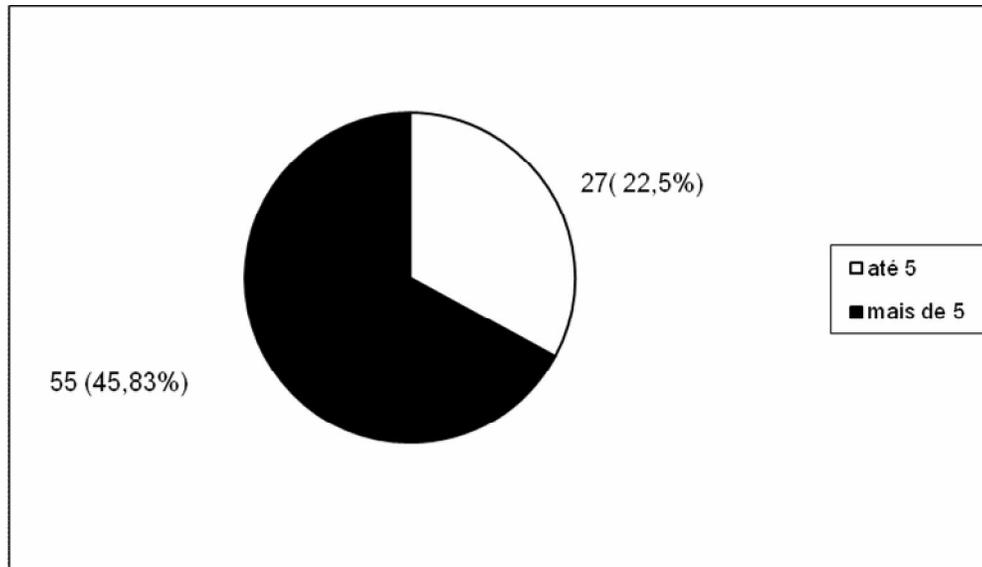
Gráfico 2: Formas Clínicas Segundo Classificação de Madri

No eixo Y encontra-se o número total de indivíduos e sobre as colunas o número exato de cada forma clínica e porcentagem em parênteses, sendo: T= Tuberculóide, I= Indeterminada, D= Dimorfo, V= Virchowiano, N= neural

5.2.2 Número de Lesões

Para a descrição da distribuição do número de lesões, conforme observado na ocasião do diagnóstico, os pacientes foram agrupados em dois subgrupos: com até 5 lesões (n=27, 22,5%) e com mais de 5 lesões (n=55, 45,8%). Para 38 casos não estava especificado o número de lesões. O resultado indica um predomínio da presença de mais de 5 lesões por ocasião do diagnóstico, mais uma vez confirmando a maioria de casos multibacilares nesta população (gráfico 3).

Gráfico 3 - Distribuição do Número de Lesões Cutâneas no Diagnóstico em Números Absolutos e (Porcentagem)

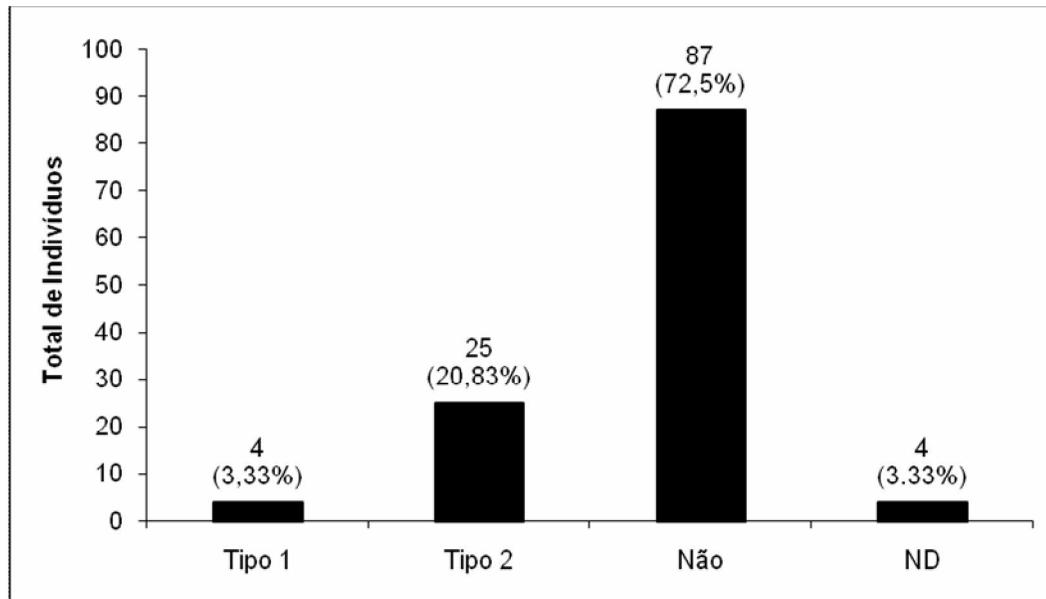


São apresentados valores absolutos e em porcentagem em parênteses

5.2.3 Episódios Reacionais

A não houve observação da ocorrência de episódios reacionais na maioria dos pacientes incluídos no grupo de casos (n=87, 72,5%). Entre os pacientes que apresentaram estado reacional, a reação tipo 2 (ENH) foi a mais freqüente, com 25 pacientes (20,8%) apresentando este tipo de estado reacional contra quatro (3,3%) com história de ocorrência de Reação Reversa do tipo 1 (gráfico 4).

Gráfico 4 - Distribuição da Frequência de Ocorrência de Episódios Reacionais na População Estudada



Os valores no eixo Y estão em números total de indivíduos. Os valores acima das barras indicam o número exato em cada grupo, em parêntese o valor em %.. Tipo 1 = Reação Reversa tipo 1 (RR1); Tipo 2 = Eritema Nodoso Hansênico; Não = sem histórico de estado reacional; ND = informação não disponível.

5.2.4 Dados Complementares

Os resultados referentes aos dados epidemiológicos como realização do teste intra-dérmico de Mitsuda, baciloscopia, realização de biópsia de lesão cutânea e vacinação com BCG levantados dos prontuários dos pacientes estão ilustrados na tabela 2. Nota-se uma grande proporção de indivíduos sem informações disponíveis quando a resposta ao antígeno de Mitsuda, realização de biópsia e vacinação por BCG.

Tabela 2 - Outros Dados Epidemiológicos

		Mitsuda	IB n(%)	Biópsia
Sim	Positivo	3(2,5)	40(33,3)	55(45,8)
	Negativo	8(6,7)	41(34,1)	
Não		23(19,1)	16(13,3)	2(1,6)
ND		86(71,6)	23(19,1)	63(52,5)

Dados em valor absoluto e percentual (entre parêntesis). ND= Não disponível.

5.3 Análise de Associação entre Hanseníase e Alelos dos Marcadores *PARK2*(-2599) e *LTA*(+252) na Amostra Populacional Estudada

Ambos os marcadores testados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.3.1 Análise do Marcador *PARK2*(-2599)

As frequências alélicas e genóticas do marcador *PARK2*(-2599) do gene *PARK2* nas populações de casos e controles está descrita na tabela 3. Em ambos os grupos, o percentual de sucesso na determinação dos genótipos foi superior a 95%. Não foi detectada evidência positiva para associação entre genótipos ($P = 0,5177$) ou alelos ($P = 0,9155$) deste marcador com hanseníase na amostra populacional estudada.

Tabela 3 – Comparação das Distribuições das Frequências Alélicas e Genóticas do Marcador *PARK2*(-2599) entre os Grupos de Casos e Controles

		Casos	Controles	χ^2	<i>P-Value</i> *
Freq. Genóticas	CC	17(14,6%)	29(18,3%)	1,3167	0,5177
	CT	56(48,2%)	66(41,7%)		
	TT	43(37%)	63(39,8%)		
	IND	4(3,33%)	5(3%)		
Freq. Alélicas	C	90(38,70%)	124(39,20%)	0,0113	0,9155
	T	142(61,30%)	192(60,80%)		

Valores absolutos e percentual para os genótipos e percentual para as frequências alélicas. * Valor de P para comparação global entre os 3 grupos genotípicos e os dois grupos alélicos. IND = genótipo não determinado.

5.3.2 Análise do Marcador *LTA*(+252)

Para o SNP *LTA*(+252) do gene *LTA*, os alelos A e G foram analisados também em homo e heterozigose em ambas as populações, assim como suas frequências alélicas foram determinadas (tabela 4). Não foi possível obter o genótipo em 10 amostras dos casos e 18 amostras dos controles. Novamente, análise de diferenças na distribuição das frequências alélicas e genóticas entre os grupos de casos e controles não mostrou evidência positiva para associação na amostra populacional estudada ($P = 0,4406$ e $P = 0,2645$, respectivamente).

Tabela 4 - Resultados Genotípicos do Marcador LTA(+252)

		Casos	Controles	χ^2	<i>P-Value</i>
Genótipos	AA	54(49%)	73(50,3%)	2,6601	0,2645
	AG	46(41,8%)	66(45,5%)		
	GG	10(9%)	6(4,1%)		
	IND	10(8,33%)	18(11%)		
Freq. Alélica	A	154(70%)	212(74%)	0,5946	0,4406
	G	66(30%)	78(28%)		

Valores absolutos e percentual para os genótipos e percentual para as freqüências alélicas. * Valor de P para comparação global entre os 3 grupos genotípicos e os dois grupos alélicos. IND = genótipo não determinado.

5.4 Análise de Regressão Logística Multivariada

Como citado na metodologia, a variável “grupo”, isto é, caso e controle, é a variável dependente da regressão logística conduzida. Os valores genotípicos dos marcadores são as variáveis independentes. As variáveis gênero e idade foram incluídas por serem fatores de risco para hanseníase. É importante ressaltar que, apesar de não se observar diferença estatisticamente significativa na distribuição do gênero entre os grupos, na presença da variável idade, aquela se torna significativa em um contexto de análise multivariada.

A tabela 7 mostra que as variáveis de confundimento idade e gênero permanecem sendo as únicas significativas na análise de regressão logística, isto é: na presença destas variáveis, não há evidência estatisticamente significativa de distribuição diferente das freqüências genotípicas entre os grupos de casos e controles.

Tabela 7 - Análise da Regressão Logística

Parâmetro	β	χ^2	<i>P-Value</i>
Gênero	0,5895	5,3605	0,0206
Idade	0,0318	15,6509	<,0001

5.5 Análise Haplotípica

Quatro haplótipos foram estimados pelo programa, com freqüências haplotípicas e erro padrão apresentados na tabela 8 para o conjunto da amostra populacional estudada. A distribuição das freqüências dos haplótipos entre os grupos de casos e controles está indicada na tabela 9.

Tabela 8 - Frequências Haplotípicas em Desequilíbrio de Ligação

		Frequências	Erro Padrão
Haplótipo 1	TA	0.394958	
Haplótipo 3	TG	0.201056	0.021236
Haplótipo 2	CA	0.266274	0.021974
Haplótipo 4	CG	0.137712	0.019696

Tabela 9 – Frequências Haplotípicas

Frequências Haplotípicas		Controles	Casos
Haplótipo 1	TA	0.420586	0.357991
Haplótipo 3	TG	0.177574	0.234929
Haplótipo 2	CA	0.278801	0.248204
Haplótipo 4	CG	0.123040	0.158876

O log da verossimilhança obtido sob a hipótese nula (H_0) foi de $-643,00$ com um grau de liberdade (df) = 1. Em seguida, o efeito dos haplótipos foi testado sob a hipótese alternativa H_1 , obtendo-se um log da verossimilhança em $-639,07$. Finalmente, subtraindo-se H_1 de H_0 e multiplicando-se por 2, obtivemos o valor do *LRT* de 7,86 ($P = 0,048$), indicando a presença de um efeito dos haplótipos (tabela 10).

Tabela 10 – Teste de Hipótese e Valor do LRT

	Log	<i>LRT</i>	<i>P-Value</i>
Sem Efeito (H_0)	-643,00		
Com Efeito (H_1)	-639,07	7,86	0,048

Log= logaritmo da verossimilhança , *LRT*= likelihood ratio test.

Análise de regressão logística, quando aplicada para se investigar diferenças na distribuição das frequências haplotípicas entre os grupos falhou em identificar efeito estatisticamente significativo (tabela 11).

Tabela 11 - OR dos Haplótipos Comparados com a Referência e com 95% de Intervalo de Confiança

		Beta	Erro Padrão	T-Test	OR	<i>P-Value</i>
Haplótipo 1	TA	-0.38559	0.145050	-2.658.315		
Haplótipo 3	TG	0.56445	0.325579	1.733.683	1,75848(0.92897-3,32871)	0,082974
Haplótipo 2	CA	0.08554	0.268069	0.319110	1,08931(0,64412-1,84220)	0,749643
Haplótipo 4	CG	0.44553	0.320601	1.389.678	1,56132(0,83290-2,92680)	0,164627

6 Discussão

A hanseníase é uma doença com características que combinadas a tornam única, a saber: (i) tem o ser humano como um de apenas dois hospedeiros conhecidos (o outro hospedeiro natural é o tatu); (ii) é causada por um agente etiológico intracelular obrigatório, o *M. leprae*, que não é cultivável *in vitro* (14); (iii) seu mecanismo de transmissão ainda é desconhecido, apesar de ser aceita a noção da transmissão por contato de um doente com um não doente, pelo convívio íntimo e prolongado através de secreções das vias aéreas superiores (47); (iv) não existem vetores conhecidos, embora esta possibilidade não esteja descartada; (v) a doença manifesta-se clinicamente em formas distintas, dependendo do perfil imunológico do hospedeiro, em formas mais brandas com predomínio da resposta imunológica Th1 (celular) ou mais graves com predomínio da resposta Th2 (humoral) (31); e (vi) a doença tem cura, através da aplicação de um esquema de medicamentos antimicrobiano (a PQT) fornecido gratuitamente e de maneira eficaz em todo o globo e, no entanto, em pleno século XXI, no ano de 2008, são registrados um total de 212 802 casos no mundo (11).

Por todas estas particularidades a hanseníase, cuja origem pode ter sido no Leste do Continente Africano (9), é uma doença que acomete a humanidade a muitos séculos, de forma tão dramática como nenhuma outra, o que a torna uma doença instigante e proporciona um campo vasto de pesquisa com o intuito de esclarecer os seus mistérios.

Na antiguidade acreditava-se que apenas pessoas “impuras”, que mereciam uma punição divina, adquiriam a doença. Com a identificação do agente patogênico por Armauer Hansen no século XIX (2), estas crenças perderam credibilidade entre os médicos e cientistas, porém, persistem até hoje com força entre as populações leigas, mesmo as mais educadas. Infelizmente, a etiologia contagiosa da hanseníase foi interpretada de maneira que os fatores genéticos do hospedeiro fossem excluídos como relevantes para o risco de aquisição da doença. Hoje se sabe que esta visão não é correta (48).

Estudos genéticos clássicos como os estudos observacionais em famílias (49), estudos de gêmeos (30), análises de segregação complexa (29), e mais recentemente, estudos de ligação (41, 42, 50, 51) e associação (38, 52-54) demonstram que a genética do hospedeiro tem papel relevante na aquisição e desenvolvimento das formas clínicas distintas da hanseníase.

Para os geneticistas, não poderia haver uma doença mais desafiadora. Dentro do conceito genético das doenças complexas, a hanseníase se encaixa perfeitamente: doenças complexas são aquelas que não apresentam padrão de herança mendeliana clássica, em que há perfeita correlação entre genótipo e fenótipo, sendo a ocorrência controlada por um componente genético resultante da ação integrada de um número variado de genes, associado a fatores ambientais, socioeconômicos, culturais, entre outros (55).

Como demonstrados em estudos prévios, evidências positivas da participação do *background* genético do hospedeiro controlando a susceptibilidade à hanseníase já é uma condição aceita, mas a exata natureza dos genes envolvidos ainda precisa ser esclarecida na sua plenitude. Uma grande dificuldade de iniciar um estudo genético neste sentido reside na escolha inicial do gene ou genes candidatos, nunca uma tarefa fácil. Existem duas estratégias principais aplicadas para dirigir o processo de escolha: genes podem ser candidatos funcionais, quando são selecionados com base em profundo conhecimento da fisiopatologia da doença e as vias metabólicas envolvidas; alternativamente, pode-se definir um gene candidato posicional, sempre a partir de estudos de mapeamento genético, com base exclusivamente na sua posição no genoma. A combinação das duas estratégias, gerando candidatos funcionais e posicionais, é uma alternativa atraente, mas nem sempre aplicável. Para tal, busca-se em regiões genômicas candidatas genes com um possível papel na fisiopatologia da doença. Ainda assim, estas estratégias não garantem o sucesso dos experimentos, uma situação explicável visto que o genoma humano é composto de cerca de 35 mil genes, e exemplos vem se acumulando de que a escolha mais óbvia nem sempre é a correta.

Com o objetivo de contribuir para o melhor entendimento da participação genética no controle da susceptibilidade à hanseníase *per se*, neste trabalho optou-se por testar para associação entre a ocorrência da doença e dois marcadores de genes previamente investigados em outras populações. Assim, dois marcadores localizados nos genes *PARK2* e *LTA* (41, 43, 44) foram investigados. Tanto o gene *PARK2* como o *LTA*, encontram-se no cromossomo 6, respectivamente nas regiões 6q25-q27 e 6p21, mapeadas em estudo de *scan* genômico publicado em 2003 – neste estudo, encontrou-se forte efeito de ligação, com *LOD score* de 4,31 para a região 6q25-q27 e 2,39 para a região 6p21 (41). Estudos subsequentes identificaram marcadores destes dois genes em associação com a hanseníase em populações independentes do Vietnã, Brasil e Índia. Dentre estes marcadores, foram selecionadas as variações *PARK2*(-2599) (43) e

LTA(+252) para investigação de repetição de observações anteriores, neste estudo, em uma população de hansenianos recrutados em municípios do estado do Paraná. (44). Estudos de replicação são importantes em genética, pois se um efeito observado, como por exemplo, a associação de determinado alelo de um gene em uma amostra populacional, for também detectada em mais de uma amostra populacional independente da original, a relevância de participação deste efeito é reforçada.

Assim, partimos para o recrutamento de uma população de indivíduos afetados por hanseníase identificados em municípios do estado do Paraná. Importante notar que, embora o Brasil seja o país com maior prevalência de hanseníase no mundo, com uma taxa de prevalência em 2008 de 2,4/ 10.000 hab. (11). O Estado do Paraná apresenta um bom controle da doença, com índice de prevalência próxima das expectativas propostas pela OMS (1,63/10.000 hab.), sendo registrado em 2007, 1.242 casos novos de hanseníase no estado (56). Isso gerou uma dificuldade adicional na identificação de novos casos, o que levou à decisão de se incluir na amostra casos antigos que já obtiveram a alta do tratamento medicamentoso, mas cujos registros médicos estavam disponíveis. Esta estratégia permitiu o recrutamento de 120 casos documentados de hanseníase e 163 controles saudáveis semelhante ao grupo de casos na distribuição de gênero e etnia. Os dados epidemiológicos foram então descritos e comparados entre os dois grupos. As amostras de DNA foram genotipadas para os marcadores estudados e a distribuição das frequências alélicas nos dois grupos foi comparada tanto para cada marcador isoladamente como para haplótipos construídos combinando-se os dois marcadores, conforme implementado no programa *THESIAS* (46). As comparações foram realizadas utilizando-se tanto ferramentas de análise univariada quanto aplicando modelos de regressão logística.

Dentre os casos recrutados foi observado um predomínio do gênero masculino (55,8%), a faixa etária da população foi acima dos 50 anos por ocasião do recrutamento, mas com média de idade por ocasião do diagnóstico de 45,4 anos, e predomínio das formas multibacilares da doença (70%). O acometimento mais frequente de homens não difere do que observado em outros estudos e dados epidemiológicos (47, 57), sendo que a própria OMS estipula uma relação de 2:1 para homens e mulheres afetados por hanseníase. O predomínio das formas multibacilares observado na população de estudo também está de acordo com dados disponíveis para o Brasil, indicando uma frequência de 53,53% de casos MB em 2008, segundo dados OMS (11). O Paraná teve em 2005 62,6% dos casos de hanseníase classificados com MB, segundo dados da Secretaria

da Saúde do Paraná (58). Assim, ambas as observações para distribuição da doença entre gêneros e formas clínicas não diferem do encontrado em outras amostras populacionais, principalmente nos países da América Latina que ainda apresentam casos de hanseníase (59). No entanto, é curioso notar que a idade média de diagnóstico na nossa amostra foi mais elevada em comparação com o que se observa no Brasil, cuja idade média de aparecimento da doença é de 39 anos (60). Este efeito pode ser devido a diversos fatores, tais como, uma possível exposição tardia da população estudada à doença, devido à população paranaense apresentar níveis de desenvolvimento socioeconômicos mais altos do que a média brasileira. Desta forma, reduzir-se-ia a chance de exposição a doenças infecciosas classicamente associadas à pobreza e ao baixo grau de escolaridade (61, 62), como é o caso da hanseníase. No entanto, esta hipótese precisa ser formalmente investigada, e não é possível descartar a possibilidade de um desvio de recrutamento ou mesmo, desta diferença ser ao acaso. Quanto à etnia, houve predomínio da cor branca, o que condiz com a característica étnica no Sul do Brasil.

Um aspecto crucial em estudos desta natureza diz respeito ao recrutamento de um grupo controle adequado. Neste estudo, indivíduos saudáveis selecionados para compor o grupo controle não apresentavam qualquer grau de parentesco com os casos recrutados e não tinham histórico de acometimento por hanseníase ou outra doença infecciosa crônica. Foram ainda selecionados indivíduos que apresentaram contato com a doença de alguma forma, ou por convivência domiciliar, ou como consequência de suas atividades profissionais, ou ainda, por residirem próximos a domicílios com histórico de casos de hanseníase. Curiosamente, no processo de recrutamento foi percebida uma resistência maior dos homens em aceitar participar e doar uma amostra de sangue; como consequência, o gênero feminino está mais frequentemente representado no grupo controle ($n=90$, 52,21%) em relação ao masculino ($n=73$, 44,78%), diferindo de forma não significativa estatisticamente ($P = 0,06$) da população dos casos. Já para a variável idade, a média encontrada para os controles foi de 42,37 anos, significativamente inferior a dos casos. Esta diferença pode ter impacto sobre o resultado da análise genética, uma vez que idealmente, os controles deveriam apresentar idade média igual ou superior à dos casos, garantindo um tempo de exposição à doença semelhante ou mais alto.

Na comparação entre as populações dos casos e controles, outra variável que mostrou diferença significativa foi quanto à condição de vacinação com BCG. Os controles apresentaram positividade para a vacina BCG em 52,76% contra 10,8% dos casos. A vacinação com BCG, que

é aplicada já no recém-nato como profilaxia a tuberculose é também utilizada como medida de profilaxia contra hanseníase. É uma medida adotada no Brasil bem como em outros países (63), sendo aplicado uma ou até duas novas doses (revacinação) para os contatos de pacientes hansenianos, mas sua real eficácia ainda não é comprovada – dados indicam que esta pode variar entre 34-80% (47). Um estudo recente realizado com escolares na cidade de Manaus, capital do Amazonas, Brasil, acompanhados por quase 7 anos, demonstrou que a revacinação com BCG não protege contra a hanseníase (64). Assim, o impacto da diferença observada para vacinação com BCG entre os grupos de casos e controles neste estudo pode ser limitado. Além disso, o status de vacinado ou não, neste estudo, foi definido apenas com base no auto-relato, e a grande maioria dos pacientes com hanseníase (82,5%) não souberam responder a esta pergunta, contra apenas 23,31% dos controles, o que limita a interpretação deste dado. No entanto, não é possível descartar que o status de vacinação por BCG não atuou como um fator de confusão na análise genética. Para evitar esta situação em análises futuras, vacinação por BCG está sendo verificada, no exame físico, através da caracterização da cicatriz vacinal.

Quanto à ocorrência das reações reversas, o ENH ocorreu em 25 dos casos incluídos neste estudo (20,8%). Segundo dados de literatura, a reação tipo 2 (ENH) pode acontecer em até 30% dos pacientes com as formas virchowianas da doença, tanto na vigência do tratamento medicamentoso como até após 2 anos da alta medicamentosa (65). A ocorrência da reação reversa tipo 1 foi detectada em apenas 4 pacientes. Uma provável justificativa reside no fato de na nossa amostra populacional predominaram os casos MB e sabidamente, a reação tipo 1 é mais comum nas formas interpolares da doença, tendendo ao pólo PB (28); simetricamente, o achado mais comum de ENH é compatível com a maior proporção de casos MB mencionada.

Quando se analisa o resultado do índice baciloscópio (IB), a positividade encontrada foi de 33,3% contra 34,1% de negatividade, uma aparente contradição, já que se esperaria maior porcentagem de positividade, compatível com a predominância observada de casos multibacilares. Relatório da secretaria de Saúde do Estado do Paraná publicado *on-line* indica uma proporção de 25% de casos multibacilares notificados com baciloscopia negativa em 2005, sugerindo inconsistências no preenchimento de prontuários e fichas de notificação que podem estar associada com o observado neste estudo (66). Outra hipótese sugerida para esta diferença seria um falso predomínio da negatividade do IB, uma vez que em muitos dos casos este exame

não foi realizado e pode ter sido relatado como negativo por engano. Uma amostra maior é necessária para a confirmação destas hipóteses.

Análise estatística univariada empregada na comparação das frequências alélicas dos marcadores *PARK2*(-2599) e *LTA*(+252) e hanseníase não revelou evidência positiva de associação na amostra populacional estudada. Para aprofundar esta análise, análise de regressão logística multivariada, incluindo as variáveis idade e gênero, foi aplicada; porém, o achado negativo para associação se manteve, mesmo quando estes possíveis fatores de confusão foram considerados no modelo. Finalmente, haplótipos foram construídos, tiveram suas frequências estimadas e testadas para associação com hanseníase; novamente, não houve evidência estatisticamente significativa de associação entre a doença e os haplótipos testados.

Ambos os genes incluídos neste estudo foram encontrados em associação com hanseníase em populações vietnamita, indiana e brasileira. No caso do marcador *PARK2*(-2599), o achado original foi realizado em uma população do Vietnã do Sul com uma idade de diagnóstico muito mais baixa do que a observada para a população paranaense (41). Da mesma forma, associação positiva entre hanseníase e vários marcadores do gene *LTA* foi observada em uma população da Índia com idade de diagnóstico inferior àquela descrita para nossa população de estudo (44). Neste mesmo estudo, os autores descrevem a idade de diagnóstico como variável fundamental para explicar os efeitos genéticos observados. Assim, é provável que os resultados negativos aqui descritos sejam devido à idade avançada de diagnóstico dos casos incluídos, uma característica da população de hansenianos do estado do Paraná. Além disso, a amostra populacional incluída neste estudo é pequena em comparação com as dos estudos originais – novamente, a baixa prevalência da doença no Paraná contribuiu para agravar esta limitação. Assim, para se testar o efeito dos genes *PARK2* e *LTA* na população paranaense, seria necessário o recrutamento de uma amostra populacional maior e com idade de diagnóstico mais precoce, tarefa longe de trivial. O recrutamento de casos e controles adicionais, com ênfase em casos com idade de diagnóstico precoce, estão atualmente em andamento.

Outro aspecto importante a ser destacado é o fato de que os marcadores do gene *LTA* associados previamente com hanseníase (44) pertencem a dois *bins* de LD que não incluem o SNP *LTA*(+252). É possível nestes casos que, apesar da proximidade física deste marcador com outros do mesmo gene implicados na doença, nenhuma evidência matemática de associação seja detectada. Finalmente, é possível ainda que a estrutura de LD na população estudada seja

diferente daquela observada em estudos anteriores. Se for o caso, marcadores adicionais, selecionados entre *tag* SNPs de forma a cobrir todo o gene em estudo, devem ser genotipados. Eventual resultado positivo indicaria, mesmo na ausência de replicação no sentido estrito do termo, a participação do gene em estudo no controle da suscetibilidade do hospedeiro à doença.

Como conclusão, frente ao exposto acima, o resultado negativo na análise de associação realizada neste estudo não exclui a participação dos genes candidatos estudados no controle da suscetibilidade à hanseníase na população paranaense. Como perspectiva futura, sugere-se: (i) a ampliação deste estudo com o aumento do tamanho da amostra populacional, aumentando o poder da análise estatística; (ii) a inclusão preferencial de pacientes com diagnóstico de hanseníase em idade mais precoce, e (iii) a genotipagem de marcadores adicionais, a fim de se obter uma cobertura mais abrangente dos genes em estudo. Finalmente, a amostra populacional aqui descrita poderá ser utilizada no estudo de outros genes e regiões candidatas ao controle da suscetibilidade do hospedeiro à hanseníase.

7 Conclusões

- 1- Nossa estratégia de recrutamento resultou na composição de um grupo de casos e controles aplicável a estudos genéticos de susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase;
- 2- A população de casos de hanseníase recrutada no estado do Paraná é predominantemente branca, do gênero masculino, apresentando as formas multibacilares da doença e com idade média de diagnóstico de 45 anos.
- 3- Não foi detectada evidência estatisticamente significativa de associação entre o marcador do tipo SNP PARK2(-2599) do gene *PARK2* com hanseníase *per se* na população estudada;
- 4- Não foi detectada evidência estatisticamente significativa de associação entre o marcador do tipo SNP LTA(+252) do gene *LTA* com hanseníase *per se* na população estudada;
- 5- Análise de associação entre haplótipos construídos com genótipos dos genes *PARK2* e *LTA* e hanseníase não mostrou diferença estatisticamente significativa na população estudada.

8 Referências

1. Matsuo E. Leprosy as a challenge to science on the ability to decode its enigma. A hypothesis on how to respond. *Jpn J Infect Dis.* 2005 Apr;58(2):59-64.
2. P. P. Translation of Gerhard Armauer Hansen. *Spedalskhedens Aarsager*(causes of leprosy). *IntJ Lepr.* 1955;23:307-9.
3. WHO. Health topics - leprosy elimination: transmission. <http://www.who.int/lep/transmission/em/indexhtml> Acesso: 03 agosto de 2008.
4. WHO. Health topics: leprosy factsheets: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/index.html>. Acesso: 03 Agosto 2008.
5. Alcais A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol.* 2005 Feb;17(1):44-8.
6. Warwick J, Britton DNJL. Leprosy. *Lancet.* 2004(363):1209-19.
7. MSB. Ministério da Saúde do Brasil. Portal Saúde: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27445. Acesso: 03 Agosto 2008.
8. Morhan. Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas por Hanseníase. Hanseníase Informações Gerais: http://www.morhan.org.br/hans_informacoes_gerais.htm. Acesso: 03 Agosto 2008.
9. Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science.* 2005 May 13;308(5724):1040-2.
10. National Hansen's Disease Program Data Statistics. HRSC. Gov: Hansens 30 yeartrend. <http://www.hrsa.gov/hansens/30yeartrend.htm>. Acesso: 03 Agosto 2008. 2008.
11. Weekly epidemiological record. World Health Organization. 2008 15 agosto;33(83):293-300.
12. MSB. Ministério da Saúde do Brasil. Portal Saúde: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27640. Acesso: 03 Agosto 2008.

13. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr;19(2):338-81.
14. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001 Feb 22;409(6823):1007-11.
15. Anura Rambukkana JLS, Peter D. Yurchenco and Elaine I. Tuomanem. Neural Targeting of *Mycobacterium leprae* Mediated by the G Domain of the Laminin- α 2. *Cell* 1997 March 21;88:811-21.
16. Rambukkana A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol.* 2000 Jan;8(1):23-8.
17. Y.Liew F. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology.* 2002 january 2002;2:55-60.
18. Paula Araújo Opromolla ACCM. A terminologia relativa à Hanseníase. *An Bras Dermatol.* 2005;80(3):293-4.
19. classification Co. Internacional Congress of Leprosy, Madri 1953.Report of the Committee on Classification. *Internacional Journal of Leprosy.* 1953 1953;21:504-16.
20. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina Ribeirão Preto.* 1997 jul/set;30:325-34.
21. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.
22. Lockwood DN, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients--searching for the perfect solution? *Lepr Rev.* 2007 Dec;78(4):317-20.
23. WHO. Health topics- leprosy elimination: leprosy the disease: diagnosis. <http://www.who.int/lep/diagnosis/index.html>. Acesso: 03 Agosto 2008.
24. Celina Maria Turchi Martell ea. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: Hanseníase. *Rev Bras Epidemiol.* 2002;5(3).
25. MSB. Ministério da Saúde do Brasil.Portal saúde. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27447. Acesso: 27 Outubro 2008.
26. Convit J, Sampson C, Zuniga M, Smith PG, Plata J, Silva J, et al. Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results. *Lancet.* 1992 Feb 22;339(8791):446-50.

27. MSB. Ministério da Saúde do Brasil. Portal da Saúde. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27448 . Acesso: 27 Outubro 2008.
28. Indira P. Kahawita SLW, Diana N.J.Lockwood. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol.* 2008 jan-fev;83(1):75-82.
29. Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet.* 1988 Feb;42(2):256-66.
30. M.R.Chakravartii FV. *A Twin Study on Leprosy.* Stuttgart: Georg Thieme; 1973.
31. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect.* 2006 Apr;8(4):1124-31.
32. Mary F. Feitosa Hk. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. *ciência & Saúde Coletiva.* 2002;7(1):73-83.
33. Demenais F, Feingold N. [HLA and leprosy]. *Pathol Biol (Paris).* 1986 Jun;34(6):735-7.
34. Haregewoin A, Yemaneberhan T, Aredath SP, Fekete E, Mock B. HLA-D identity in a family with multiple cases of multibacillary leprosy. *Lepr Rev.* 1984 Mar;55(1):51-6.
35. Hill AV. HLA and infection. *J R Coll Physicians Lond.* 1992 Jan;26(1):11-6.
36. Mira MT, Alcáis A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun.* 2003 Jan;4(1):67-73.
37. Ottenhoff TH, de Vries RR. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1987 Sep;55(3):521-34.
38. Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA, Beena KR, Stastny P. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. *Tissue Antigens.* 1993 Sep;42(3):133-7.
39. Serjeantson SW. HLA and susceptibility to leprosy. *Immunol Rev.* 1983;70:89-112.
40. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006 Sep;77(3):189-202.
41. Mira MT, Alcáis A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):412-5.

42. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):439-41.
43. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004 Feb 12;427(6975):636-40.
44. Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet.* 2007 Apr;39(4):517-22.
45. JOHN SW, G; ROZEN, R; SCRIVER, CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(2):408.
46. Garelle DATaV. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics : Applications Note.* 2007 February 18, 2007;23(8):1038-9.
47. Lockwood D. Leprosy. *Clin Evid.* 2004 Dec(12):1103-14.
48. Schurr E, Alcais A, de Leseleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol.* 2006 Dec;18(6):404-10.
49. Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *J Clin Invest.* 1987 Apr;79(4):1139-43.
50. Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR, Balakrishnan K, Ghei S, Golding M, et al. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J Infect Dis.* 2002 Oct 15;186(8):1190-3.
51. Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004 Jan;5(1):63-7.
52. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AV. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Dec;65(6):733-5.
53. Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JA, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type

- hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics*. 2001 Feb;53(1):45-7.
54. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):187-91.
55. F.C.Prevedello MTM. Hanseníase: uma doença genética? *An Bras Dermatol*. 2007 Setembro-Outubro 2007;82(5):451-9.
56. MSB. Ministério da Saúde do Brasil. Portal da Saúde.http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_hansen_2007.pdf. Acesso: 03 Agosto 2008.
57. M.V.Moreira EAW, C.L.Martins. Hanseníase no Estado do Espírito Santo, Brasil: uma epidemia em ascensão? *Cad Saude Publica*. 2008 jul.2008;24(7):1619-30.
58. SSPR. Secretaria de Saúde do Paraná. Arquivos Hanseníase doc 4. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_hansen_2007.pdf. Acesso: 03 Agosto 2008.
59. WHO. Health topics: leprosy- leprosy elimination: global situation: Americas.<http://www.who.int/lep/situation/AMROStatsEnd2006.pdf>. Acesso: 03 Agosto 2008.
60. Brasil MdSd. Portal saúde : casos de Hanseníase 2007. 2008.
61. Kerr-Pontes LR BM, Evangelista CM, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *Int J Epidemiol*. 2006;35(4):994-1000.
62. Marcket CCdO. Estudo de Base Populacional de Fatores Epidemiológicos de Risco em Hanseníase. Curitiba: PUCPR; 2008.
63. Paul E. M. Fine IAMC, Julie B. Milstien, C. Jonh Clements. Issues relating to the use of BCG in imunization programmes. In: *Biologicals* Va, editor.: World Health Organization; 1999.
64. S.S.Cunha NA, M.L.Barreto, E.S.Pereira, I.Dourado, M. F. Maroja, Y. Ichihara, S. Brito, S. Pereira, L.C. Rodrigues. BCG Revaccination Does Not Protect Against Leprosy in Brazilian Amazon: A Cluster Randomised Trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2008;2(2):1-8.
65. Walker SL, Waters MF, Lockwood DN. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev*. 2007 Sep;78(3):197-215.
66. SSPR. Secretaria da Saúde do Paraná. Arquivo de Hanseníase: análise dos dados epidemiológicos no Estado do Paraná.

http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/hanseniose/analise_da_cons_de_dados.doc . Acesso: 03 Agosto 2008.

