



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUANA KAREN CORREIA DOS SANTOS

**GENES DE RECEPTORES DA RESPOSTA IMUNE E A HANSENÍASE EM UMA
POPULAÇÃO ALAGOANA**

Maceió
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUANA KAREN CORREIA DOS SANTOS

**GENES DE RECEPTORES DA RESPOSTA IMUNE E A HANSENÍASE EM UMA
POPULAÇÃO ALAGOANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Carolinne de Sales Marques

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

Maceió
2021

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

S237G Santos, Luana Karen Correia dos.
Genes de receptores da resposta imune e a hanseníase em uma população alagoana / Luana Karen Correia dos Santos. – 2021.
103 f. : il.

Orientadora: Carolinne de Sales Marques.
Co-orientadora: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 83-94.
Apêndices: f. 95-97.
Anexos: f. 98-103.

1. Genética. 2. Alergia e imunologia. 3. *Mycrobacterium leprae* - Alagoas. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Título.

CDU: 616-002.73(813.5)

*Aos pacientes e àqueles que acreditam no poder
transformador da ciência.*

Agradecimentos

À Deus, ao Universo e à Santa Catarina de Alexandria por sempre colocarem em meu caminho tudo o que eu preciso viver para evoluir e aprender, todos os obstáculos, mas também a coragem para os superar, por me apresentarem as pessoas certas no momento certo para que tudo ocorresse da maneira que tinha de ser.

À minha querida “prof Carol” pelo acolhimento, por todos os ensinamentos tanto acadêmicos quanto pessoais, pela paciência, pela confiança em mim depositada e por todo o apoio na realização desse trabalho. Sou imensamente grata pela oportunidade que tive de trabalhar com você e pela sua amizade.

Aos pacientes, por dedicarem seu tempo para realização das coletas, pela a sua humildade e simpatia. Vocês com certeza acrescentaram muito no meu crescimento pessoal.

Às minhas amigas Susana e Everly, que estavam comigo no começo de todos os experimentos. Agradeço pelos bons momentos que passamos no laboratório, pelas risadas de felicidade e as de desespero quando algo não saía como queríamos.

Agradeço aos meninos do PIBIC, Karen, Heloisa e Victor e as meninas do PIBIT, Vitória, Ayara e Samilla por me acompanharem no laboratório e nas inúmeras coletas durante esses anos.

À Prof^a. Dr^a. Elaine Virgínia pela sua co-orientação e pelo seu suporte durante toda a realização desta pesquisa. Agradeço por toda disponibilidade em me ajudar.

À equipe do CRIA, em especial a Walcélia, que foi meu braço direito em todos os momentos que passei lá, sempre esteve disposta a me ajudar, sou grata pela sua amizade. Cláudia, Roberta, José Rodrigues, Dr. Karlisson, Ailton e JP, meu muito obrigada, a ajuda de vocês foi indispensável para realização desse estudo.

Agradeço a equipe do Hemoal Arapiraca que estiveram sempre dispostos a ajudar nas coletas. Grata também aos doadores voluntários, que foram uma parte fundamental desse estudo.

À minha família pelo apoio e pelo esforço dado à mim, em especial minha irmã Rayssa que sempre discutiu comigo resultados, experimentos e me ajudou inúmeras vezes, isso foi fundamental para a realização dessa etapa na minha caminhada acadêmica.

À Katy Perry. Suas músicas e sua história sempre foram meu combustível para os momentos em que me faltava motivação para continuar na minha jornada tanto acadêmica quanto pessoal.

Agradeço à Ithallo que é mais que um técnico de laboratório, é um amigo que o LABMEG e a UFAL me presentearam. Obrigada por todas as conversas e momentos de descontração.

Sou grata ao Diego Siqueira que foi a ponte para o contato com a professora Carol lá em 2017, esse trabalho não teria sido realizado sem esse pequeno detalhe.

À Carolzinha e Lucia, suas contribuições foram imprescindíveis para a realização da meta-análise.

Aos meus colegas da pós-graduação, em especial Ellyda e Lúcia por se mostrarem tão solícitas em todas as vezes que precisei passar um tempo na sua casa.

Agradeço a todo o pessoal que me deu carona para Maceió quando eu precisei, Renise, Ithallo, Edilson, Eloiza e Abel.

A equipe de segurança da UFAL Arapiraca, em especial Marcelo, Yuri, Fernando e a Lailza que sempre foram solícitos em me ajudar em tudo que precisei e também pelas boas conversas que tivemos.

Por último, mas não menos importante agradeço à Gabriela, obrigada por ter entrado na minha vida, pelo amor, carinho, apoio e compreensão dados a mim todos os dias. Eu te amo.

Às agências de fomento FAPEAL (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas, edital UNIVERSAL FAPEAL 4/2016 processo n° 60030 1025/2016) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, edital UNIVERSAL MCTI/CNPq N° 01/2016, processo n° 429669/2016-0) por todo o apoio científico e financeiro.

A todos que de maneira direta e indireta contribuíram para a realização desse trabalho e não foram citados, meu muito obrigada.

Gratidão!

“I know there’s gotta be rain if I want the rainbows”

Resilient – Katy Perry.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae* que atinge a pele e os nervos periféricos, podendo causar deformidades físicas. A baixa diversidade em seu genoma faz com que a hanseníase seja um ótimo modelo para se estudar a influência da genética do hospedeiro na doença. Evidências apontam que genes da resposta imune inata, principalmente os genes *TLR1* e *NOD2*, são importantes no desfecho e na diferenciação das formas clínicas e já foram associados em populações brasileiras, no entanto, não há investigação do papel desses genes em Alagoas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação de polimorfismos nos genes *TLR1* e *NOD2* na hanseníase e suas formas clínicas em uma população alagoana. Foi conduzido um estudo caso-controle, onde os casos incluíram pacientes do CRIA (Centro de Referência Integrado de Arapiraca) e os controles indivíduos saudáveis, doadores de sangue no Hemoal-Arapiraca. Foram avaliados os polimorfismos rs4833095-*TLR1* e rs8057341-*NOD2*. O DNA dos indivíduos que aceitaram participar do estudo foi extraído através do método *salting out* e genotipado por meio de PCR em tempo real através de discriminação alélica usando sondas TaqMan. Foram obtidas as frequências alélicas, genotípicas e de carreadores de alelo, que posteriormente foram comparadas entre os grupos através de regressão logística. Foi conduzida uma revisão sistemática afim de agrupar os resultados obtidos em uma meta-análise sobre polimorfismos no gene *TLR1* seguindo o guia PRISMA. Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente R versão 1.4.1717 utilizando os pacotes “genetics” e “SNPassoc” para as análises de associação genética e “meta” e “metafor” para a meta-análise. Como resultado do recrutamento populacional em Alagoas, obtivemos 424 indivíduos, sendo 159 casos e 265 controles. A frequência dos polimorfismos na população de alagoas (controles) foi de 17% para o genótipo TT do SNP rs4833095-*TLR1* e de 11,8% para o genótipo TT do SNP rs8057341-*NOD2*. No desenho caso-controle e de associação genética com a hanseníase as estimativas de associação foram as seguintes: rs4833095-*TLR1* alelo C com OR=0,90 ($p=0,63$), genótipo TC com OR=1,06 ($p=0,83$) e CC com OR=0,84 ($p=0,58$); rs8057341-*NOD2* alelo T com OR=0,97 ($p=0,91$), genótipo CT com OR= 1,10 ($p=0,64$) e TT com OR=0,84 ($p=0,62$). Os resultados demonstram que os SNPs estudados não possuem associação com a hanseníase na população investigada, mesmo após a correção para a covariável sexo. Além disso, a análise de associação com a classificação operacional (MB *versus* PB) também não resultou em associação mesmo após ajuste ($p>0,05$). Na meta-análise os carreadores do alelo C do rs5743618-*TLR1* se mostraram associados com a hanseníase exibindo um efeito protetor OR=0,57 ($p=0,048$). A análise de sensibilidade confirmou um efeito protetor em todos os modelos genéticos para esse mesmo SNP, exibindo valores de OR=0,48 ($p=0,010$) para o alelo C, OR=0,47 ($p=0,028$) para os carreadores de C e OR=0,26 ($p=0,003$) para o genótipo CC. Os resultados obtidos na meta-análise apontam uma associação protetora do SNP rs5743618 do gene *TLR1* com a hanseníase. Os achados do presente estudo agregam informações a respeito da influência genética na hanseníase em uma população de Alagoas, que podem ser úteis para compreender sobre o desenvolvimento da doença na região.

Palavras-chave: Genética. Imunologia. *Mycobacterium leprae*. SNPs.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects the skin and peripheral nerves, leading to physical deformities. The low diversity in your genome makes leprosy a great model to study the host genetic influence of the disease. Evidence shows that genes in the innate immune response, mainly *TLR1* and *NOD2*, are important in the outcome and differentiation of clinical forms and, have been associated in Brazilian populations, however, there is no investigation of the role of these genes in Alagoas. The study aimed to evaluate the association of polymorphisms in the genes *TLR1* and *NOD2* in leprosy and its clinical forms in an alagoana population. We conducted a case-control study, where the cases were constituted by patients from CRIA (Integrated Reference Center of Arapiraca) and, the controls were healthy individuals, blood donors from Hemoal-Arapiraca. We evaluated the rs4833095-*TLR1* e rs8057341-*NOD2*. The individuals' DNA who accepted to participate in the study was extracted through the *salting-out* method and genotyped through Real-Time PCR via allelic discrimination using TaqMan probes. We obtained the alleles, genotypes and allele carriers frequencies, that afterward were compared between the groups through logistic regression. We conducted a systematic review to group the results obtained in a meta-analysis about polymorphisms in the *TLR1* gene following PRISMA guidelines. All statistical analyses were performed in R studio version 1.4.1717 using the packages “genetics” and “SNPassoc” for the genetic association analysis and “meta” and “metafor” to meta-analysis”. As result of populational recruitment in Alagoas, we achieved 424 individuals, 159 cases, and 265 controls. The frequency of polymorphisms from Alagoas population (controls) was 17% to TT genotype of rs4833095-*TLR1* SNP and 11,8% to TT genotype of rs8057341-*NOD2* SNP. In the case-control and genetic association with leprosy the estimates of association were the following: rs4833095-*TLR1* C allele with OR=0,90 ($p=0,63$), TC genotype with OR=1,06 ($p=0,83$) and CC with OR=0,84 ($p=0,58$); rs8057341-*NOD2* T allele with OR=0,97 ($p=0,91$), CT genotype with OR= 1,10 ($p=0,64$) and TT with OR=0,84 ($p=0,62$). The results show that the studied SNPs do not have an association with leprosy in the investigated population, even after correction to sex co-variate. Furthermore, the association analysis with operational classification (MB *versus* PB) did not result in association even after correction to sex ($p=>0,05$). In the meta-analysis, carriers of the C allele of the SNP rs5743618-*TLR1* showed association with leprosy exhibiting a protector effect OR= 0,57 ($p=0,048$). When performed the sensitivity analysis and omitting a study, this protector effect was observed in all genetics models to the same SNP, showing OR=0,48 ($p=0,010$) to the C allele, OR=0,47 ($p=0,028$) to C carriers and, OR=0,26 ($p=0,003$) to CC genotype. The results obtained in the meta-analysis indicated a protector association of SNP rs5743618 of the *TLR1* gene and leprosy. The findings of this study aggregate information regarding the genetic influence in leprosy a sample from Alagoas, which may be useful to understand the disease development in the region.

Keywords: Genetics. Immunology. *Mycobacterium leprae*. SNPs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Origem e disseminação da hanseníase ao redor do mundo.....	22
Figura 2 – Distribuição do número de novos casos de hanseníase notificados globalmente no ano de 2019 segundo a Organização Mundial da Saúde.....	24
Figura 3 – Formas clínicas da hanseníase pela classificação de Ridley e Joplin (1966) e a classificação da Organização Mundial da Saúde.....	32
Figura 4 – Localização dos Toll-like receptors no meio extra e intracelular, bem como seus ativadores.	35
Figura 5 – Ativação da resposta imune através do reconhecimento e sinalização feito pelo receptor NOD2.....	37
Figura 6 – Genética como fator determinante no curso natural da hanseníase e nos diferentes estágios da doença.....	42
Figura 7 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real por discriminação alélica	52
Figura 8 – Fluxograma da seleção dos estudos que compuseram a meta-análise ..	64
Figura 9 – Gráficos de floresta e teste de heterogeneidade dos estudos da meta-análise para o SNP rs4833095 do gene <i>TLRI</i> para o (A) alelo C, (B) genótipo CC e (C) carreador de C.	70
Figura 10 – Gráficos de floresta do teste de sensibilidade referente a meta-análise nos estudos que investigaram o SNP rs4833095-<i>TLRI</i>. (A) alelo C, (B) genótipo CC e (C) carreador de C.	71
Figura 11 – Gráficos de floresta e teste de heterogeneidade dos estudos da meta-análise para o SNP rs5743618 do gene <i>TLRI</i> para o (A) alelo C, (B) genótipo CC e (C) carreador de C	72
Figura 12 – Gráficos de floresta do teste de sensibilidade referente a meta-análise nos estudos que investigaram o SNP rs5743618-<i>TLRI</i>.	73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Tratamento da hanseníase para adultos adotado pelo Ministério da Saúde.**
30
- Tabela 2 – Frequência de variáveis populacionais de ambos os grupos de indivíduos incluídos no estudo e frequência das informações clínicas do grupo casos.....** 57
- Tabela 3 – Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs4833095 no gene *TLR1* em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.....** 59
- Tabela 4 – Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs8057341 no gene *NOD2* em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.....** 60
- Tabela 5 – Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo em pacientes paucibacilares e multibacilares nos SNPs rs4833095-*TLR1* e rs8057341-*NOD2*.**
63
- Tabela 6 – Frequências alélicas e genotípicas e odds ratio com valor de *p* do SNP rs4833095 no gene *TLR1* das populações que compuseram a revisão sistemática.** 66
- Tabela 7 – Frequências alélicas e genotípicas e odds ratio com valor de *p* do SNP rs5743618 no gene *TLR1* das populações que compuseram a revisão sistemática.** 68

SIGLAS

3' UTR- região 3' não traduzida de um gene, do inglês *3' untranslated region*

AAR- álcool-ácido resistente

APCs- células apresentadores de antígeno, do inglês *antigen-presenting cells*

ATG16L1- relacionada à autofagia 16 como 1, do inglês *autophagy related 16 like 1*

BB- *borderline borderline*

BL- *borderline* lepromatosa

BT- *borderline* tuberculóide

CARD- domínios de recrutamento da caspase, do inglês *caspase recruitment domain*

CCDC122- gene que codifica uma proteína que contém um domínio de bobina em espiral, do inglês *coiled-coil domain containing 122*

CRIA- Centro de Referência Integrado de Arapiraca

DAMPs- padrões moleculares associados ao dano, do inglês *damage-associated molecular patterns*

DCs- células dendríticas, do inglês *dendritic cells*

DP- desvio padrão

EDTA- ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*

ENH- eritema nodoso hansênico

Foxp3- fator de transcrição nuclear P3, do inglês *forkhead box P3*

GM-CSF- fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GWAS- estudo de associação do genoma completo, do inglês *genome-wide association study*)

HLA- antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*

IB- índice baciloscópio

IFN- γ - interferon gama

IgG- imunoglobulina G

IgM- imunoglobulina M

IL- interleucina

INF- interferon

INFG- gene que codifica para a proteína interferon gama, do inglês *interferon gamma*

INFG- gene que codifica para citocina interferon gama

IRAK- quinase associada ao receptor interleucina-1, do inglês *interleukin-1 receptor-associated kinase*

IRF-3- fator regulador de interferon 3, do inglês *interferon regulatory factor 3*

LABMEG- laboratório de biologia molecular e expressão gênica

LACC1- domínio lacase contendo 1, do inglês *laccase domain-containing protein 1*

LID-1- do inglês *leprosy IDRI diagnostic-1 antigen*

LL- lepromatosa

LPS- lipopolissacarídeo

LRRK2- gene que codifica para a proteína quinase 2 rica em leucina, do inglês *leucine rich repeat kinase 2*

M1/M2 - subpopulações de macrófagos

MAPK- proteína quinase ativada por mitógenos, do inglês *mitogen activated protein kinase*

MAVS- sinalização antiviral mitocondrial, do inglês *mitochondrial antiviral signaling*

MB- multibacilar

MDP- muramil dipeptídeo

MDT- multidrogaterapia

MHC- complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *major histocompatibility complex*

miRNAs- microRNAs

MRC1- receptor de manose lectina tipo C1, do inglês *mannose receptor C-type 1 lectin*

mRNA- RNA mensageiro

MyD88- fator de diferenciação mielóide 88

NBD- domínio de ligação a nucleotídeos, do inglês *nucleotide-binding domain*

NDO-HSA- do inglês *natural disaccharide linked to human serum albumin via octyl*

NDO-LID- do inglês *natural disaccharide octyl-leprosy IDRI diagnostic 1*

NF- κ B- fator nuclear kappa B, do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLRs- receptores do tipo NOD, do inglês *NOD-like receptors*

NOD- domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo, do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain*

NOD1/2- domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo contendo 1/2, do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain containing 1/2*

NP- forma clínica neural pura

OMS- organização mundial da saúde

PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*

PARCG- gene co-regulado da parkina, do inglês *parkin coregulated gene*

PB- paucibacilar

PCR- reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PGL-1- glicolípido fenólico 1, do inglês *phenolic glycolipids*

PQT- poliquimioterapia

PRKN- gene que codifica para proteína parkina

PRRs- receptores de reconhecimento padrão, do inglês *Pattern Recognition Receptors*)

RIPK2- serina/treonina quinase 2 de interação com o receptor do inglês *receptor interacting serine/threonine kinase 2*

ROR γ T- receptor órfão gamma T relacionado ao receptor do ácido retinóico do inglês *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma T*

RR- reação reversa

SNP- polimorfismo de base única, do inglês *single nucleotide polymorphism*

STR- sequências curtas repetidas em tandem, do inglês *short tandem repeat*

TCLE- termo de consentimento livre e esclarecido

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDT- Teste de Desequilíbrio de Transmissão

TGF- β - fator de transformação de crescimento beta, do inglês *transforming growth factor-beta*

Th0- linfócitos T auxiliares não polarizados, do inglês *t helper*

Th1/Th2- linfócitos T auxiliares 1 e 2, do inglês *t helper*

TLR1- receptor do tipo Toll 1, do inglês *toll-like receptor 1*

TLRs- receptores do tipo Toll, do inglês *toll-like receptors*

TNF- fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis fator*

TNFSF15- gene que codifica para a proteína membro 15 da superfamília TNF, do inglês *TNF superfamily member 15*

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor-alpha*

TRAF- fator associado ao receptor de TNF, do inglês *TNF receptor associated factor*

T_{reg}- células T reguladoras, do inglês *regulatory T cells*

TT- tuberculóide

UFAL- universidade federal de Alagoas

VDR- receptor de vitamina D, do inglês *vitamin D receptor*

VNTR- repetição em tandem de número variável, do inglês *variable number of tandem repeats*

WHO- organização mundial da saúde, do inglês *world health organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 Aspectos gerais da hanseníase	22
2.2 Epidemiologia.....	23
2.3 Características do <i>Mycobacterium leprae</i> (<i>M. leprae</i>)	26
2.4 Transmissão	27
2.5 Diagnóstico e tratamento	28
2.6 Formas clínicas	31
2.7 Resposta imune e a hanseníase	33
2.8 A genética e hanseníase	40
2.8.1 Estudos de associação genética	40
2.8.2 Influência da genética na susceptibilidade à hanseníase	42
2.9 Principais genes da resposta imune e a hanseníase	43
2.9.1 Genes da resposta imune inata	43
2.9.2 Genes da resposta imune adaptativa.....	46
3. OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4. METODOLOGIA	49
4.1 População e desenho experimental.....	50
4.2 Coleta do material biológico.....	50
4.3 Extração de DNA.....	51
4.4 Genotipagem.....	51
4.5 Análise de dados	53
4.6 Aspectos Éticos	54
4.7 Revisão Sistemática.....	54
5. RESULTADOS	56
5.1 Frequência alélica e genotípica do SNP <i>TLR1</i> (rs4833095).....	58
5.2 Frequência alélica e genotípica do SNP <i>NOD2</i> (rs8057341)	59
5.3 Associação genética dos SNPs de acordo com a forma clínica operacional	61
5.3.1 SNP rs4833095 no gene <i>TLR1</i>	61
5.3.2 SNP rs8057341 no gene <i>NOD2</i>	61
5.4 Revisão da literatura e meta-análise	64
6. DISCUSSÃO	74

6.1 O SNP <i>TLRI</i> (rs4833095) e a hanseníase.....	74
6.2 O SNP <i>NOD2</i> (rs8057341) e a hanseníase	77
6.3 Meta-análise.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	82
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICES	96
ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa e crônica, com registros milenares e de evolução lenta, que atinge a pele e os nervos periféricos, e quando não tratada precocemente pode levar ao desenvolvimento a incapacidades físicas e deformidades gerando um estigma que frequentemente é enfrentado pelos pacientes. Em países subdesenvolvidos ainda é considerada um sério problema de saúde pública ocasionado pelo perfil incapacitante (BOKU *et al.*, 2010; SCOLLARD *et al.*, 2006).

O agente causador da hanseníase é o bacilo intracelular *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e tem como hospedeiro o ser humano, que pode transmitir a hanseníase pelas vias respiratórias superiores através de aerossóis que são provenientes da boca. Como o período de incubação do bacilo é grande, é necessário um contato prolongado para que haja infecção, além disso, indivíduos sem tratamento são os principais disseminadores da hanseníase. O *M. leprae* tem a capacidade de infectar muitos indivíduos, no entanto, apenas as pessoas mais susceptíveis tendem a desenvolver a doença e a maioria daqueles que entram em contato com o bacilo consegue conter a infecção (MARTINEZ *et al.*, 2011; WHO, 2017a).

Desde a implementação da poliquimioterapia o número de casos sofreu uma grande diminuição, no entanto, ainda são detectados milhares de casos novos no mundo a cada ano. O Brasil é o segundo país com o maior número de casos registrados anualmente, em 2018 foram notificados 28.660 casos novos no país, perdendo apenas para a Índia que no mesmo ano registrou 120.334 casos, completando o ranking dos três países com maior número de casos está a Indonésia com 17.017 casos. Ainda no mesmo ano Alagoas notificou 357 novos caso, o qual representa uma taxa de detecção 10,53 casos a cada 100.000 habitantes, gerando uma certa preocupação, pois caracteriza o estado como um local de alta endemicidade para a doença (BRASIL, 2021a; WHO, 2019a).

A hanseníase se apresenta em um espectro de formas clínicas, indo de um polo mais brando, o tuberculóide à um polo mais grave, o lepromatoso, além disso, entre um polo e outro ainda existe formas imunologicamente instáveis, as formas *borderlines*, que podem migrar para qualquer um dos polos dependendo da resposta imune do hospedeiro, essa resposta juntamente com a genética desempenham um papel importante no desfecho da doença. (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Os receptores da resposta imune são considerados como a primeira linha de interação do *M. leprae* com o hospedeiro e são importantes para o reconhecimento do bacilo e ativação das vias inflamatórias. Nesse contexto, os receptores da resposta imune inata TLR1 e NOD2

desempenham um papel importante na contenção da infecção. Tendo em vista que o bacilo sofreu pouca alteração durante sua evolução, os fatores genéticos atuam fortemente no estágio inicial da doença e no desenvolvimento das formas clínicas, nesse contexto, alguns autores investigaram a influência de polimorfismos nos genes desses receptores e observaram associações relacionadas ao risco ou proteção à hanseníase em várias populações (BERRINGTON *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011a; SURYADEVARA *et al.*, 2017).

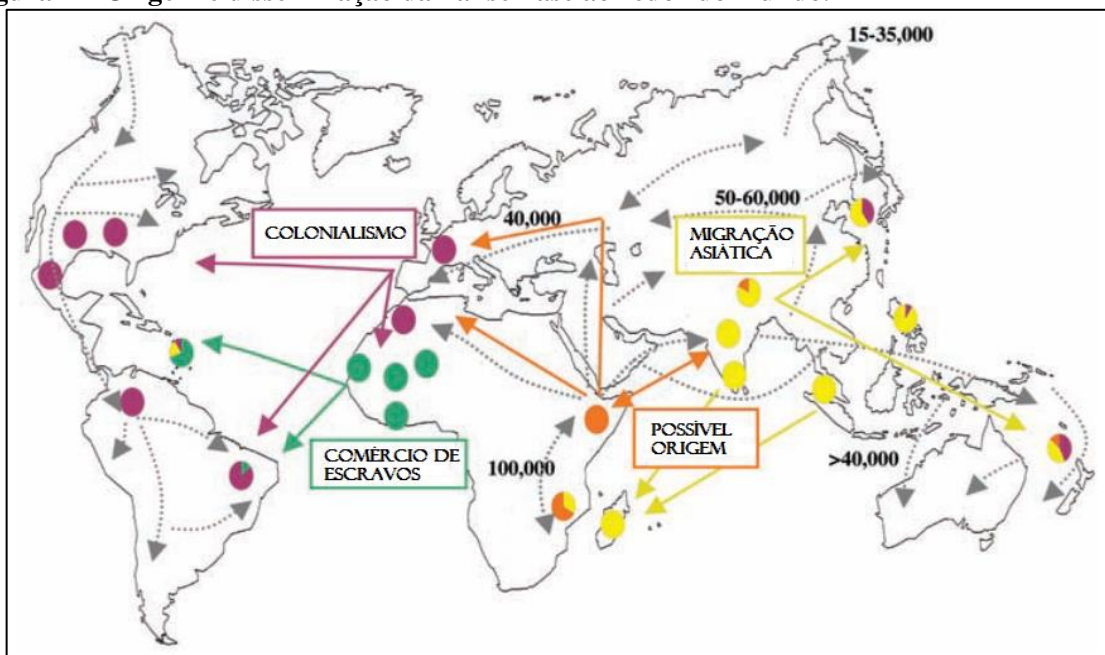
Estudos de associação genética são uma ferramenta indispensável para compreender os diferentes perfis dentro uma população e aumentar o conhecimento da fisiopatologia da hanseníase, além disso, possibilita a criação de biomarcadores genéticos que são imprescindíveis para o monitoramento de casos, e atrelado a outros fatores não genéticos possibilita a criação de métodos de prevenção aos grupos de risco. Até o momento em Alagoas não se foi investigado o perfil genético da população e hanseníase, e tratando-se de um estudo inédito de abordagem genética servirá como base para outros estudos. Portanto, partindo da hipótese que polimorfismos nos genes de receptores da resposta imune TLR1 e NOD2 estão associados ou não com o desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas a presente pesquisa teve a finalidade de investigar a associação genética desses polimorfismos em uma população alagoana através de um estudo caso-controle.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) que acomete a pele e os nervos periféricos, sendo considerada uma das doenças mais antigas a acometer o ser humano (ROBBINS *et al.*, 2009; TAN; GRAHAM, 2008). Acredita-se que a doença tenha se originado no Leste africano e se disseminado para Europa, Oriente Médio e Ásia através de migrações e viagens comerciais em seguida para as Américas a partir do colonialismo e tráfico de escravos (Figura 1) (MONOT *et al.*, 2005). A vinda da hanseníase para as Américas se deu por volta dos séculos XVI e XVII, os primeiros casos de hanseníase no Brasil foram reportados no Rio de Janeiro no ano de 1600 e posteriormente se espalhou para outros estados brasileiros (EIDT, 2004).

Figura 1 – Origem e disseminação da hanseníase ao redor do mundo.



Fonte: Adaptado de Monot *et al.*, 2005.

Nota: Os círculos mostram os diferentes tipos (cepas) do bacilo e o seu lugar de origem. As setas coloridas indicam a direção das migrações de cada cepa e as setas em cinza indicam a rota de migração do ser humano.

O bacilo *M. leprae* possui uma predileção pelas células de Schwann nos nervos periféricos, levando à um comprometimento das funções motoras, perda da sensibilidade e pode também causar deformidades físicas, sendo considerada um problema de saúde pública em alguns países (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015). Devido a seu perfil incapacitante,

muitos pacientes encontram dificuldade ao se restabelecer na comunidade ao qual pertencem em consequência do preconceito sofrido pelo estigma social causado pela hanseníase, o que impacta também na sua saúde psicológica prejudicando sua qualidade de vida, além disso, os danos neurais causam limitação na realização de atividades (BOKU *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2020; MARAHATTA *et al.*, 2018).

É uma doença de evolução lenta e o período de incubação pode levar de 1 a 20 anos para o aparecimento dos sintomas, no entanto, já foi observado casos de hanseníase entre crianças e adolescentes (BRUBAKER; MEYERS; BOURLAND, 1985; BARRETO *et al.*, 2014; WHO, 2019a). O que demonstra uma transmissão ativa da doença com um rápido período de transmissão tanto entre contatos domiciliares quanto em regiões endêmicas.

Devido à baixa diversidade genômica do *M. leprae*, na hanseníase, a genética do indivíduo está estritamente ligada tanto com o adoecimento, quanto com o desenvolvimento das suas formas clínicas e reações. Uma pessoa infectada pode assim evoluir para a cura sem a necessidade de intervenção ou desenvolver a patologia (MORAES *et al.*, 2006). O bacilo apresenta uma alta infectividade, ou seja, tem a capacidade de infectar muitos indivíduos, no entanto possui baixa patogenicidade (acometimento de poucas pessoas que foram infectadas), acredita-se que apenas 5% das pessoas que entram em contato com o bacilo desenvolverão a doença, e isto está relacionado com a genética atuando em sinergia com a resposta imune do indivíduo (WHO, 2017a; BRASIL, 2020a).

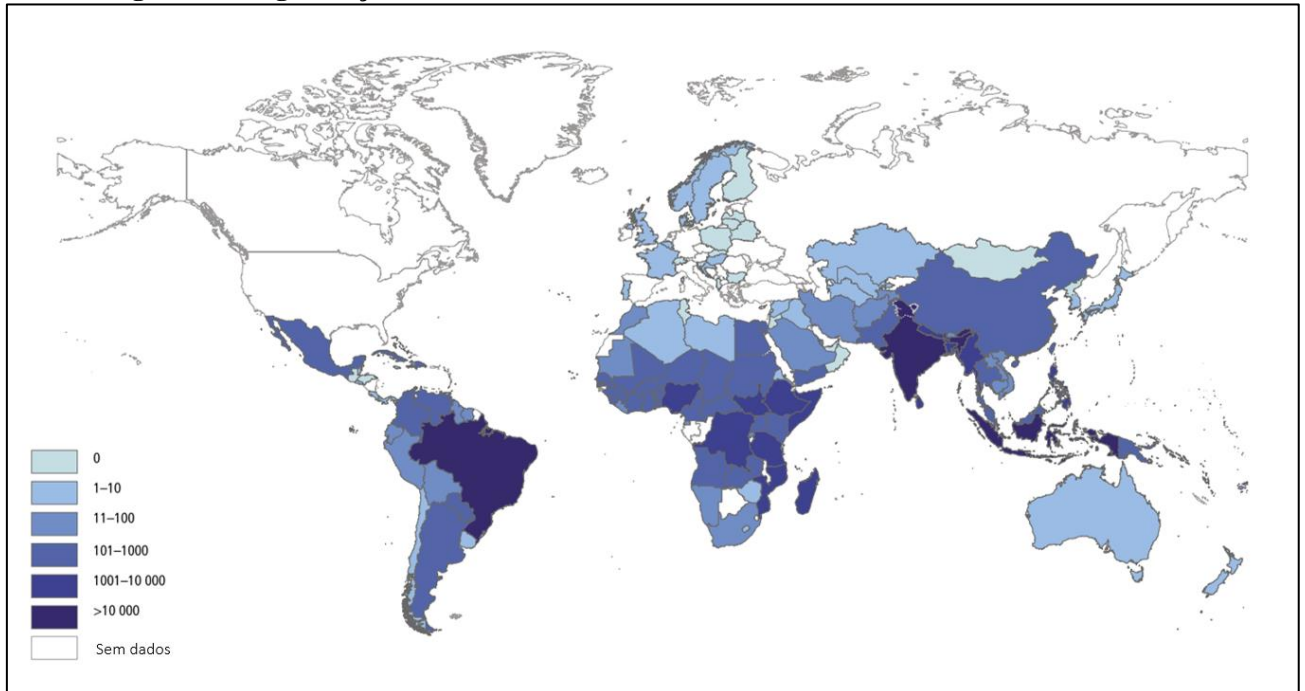
2.2 Epidemiologia

Mesmo sendo conhecida como uma das patologias que acomete o ser humano desde a antiguidade, até os dias de hoje, a hanseníase é considerada um grande problema de saúde pública em países subdesenvolvidos, como o Brasil. Embora tenha ocorrido uma diminuição nos números de casos da doença a partir da implementação do tratamento em 1981, passando de aproximadamente mais de 5 milhões de casos de hanseníase por volta de 1985 para menos de 215.000 casos em 2016, no entanto, novos casos continuam a acontecer mundialmente indicando uma transmissão contínua (WHO, 2017b).

Em 2019 foram detectados 202.185 novos casos de hanseníase globalmente, com uma taxa de detecção de 25,9 casos a cada um milhão de habitantes, quando esse número é comparado ao ano anterior observa-se que houve uma diminuição de 6.506 casos quando comparado com o ano de 2018. Os números registrados no Brasil são preocupantes, pois o país ocupa a 2º colocação no ranking de mundial pela OMS (Organização Mundial de Saúde).

Foram notificados 27.863 casos em 2019 Brasil, perdendo apenas para Índia em números de casos, sendo notificado nesse mesmo ano 114.451 casos. Juntos, Brasil Índia e Indonésia contribuíram com 79% dos novos casos de hanseníase globalmente, e juntamente com 23 países são considerados como prioridade pela OMS (Figura 2) (WHO, 2020a).

Figura 2 – Distribuição do número de novos casos de hanseníase notificados globalmente no ano de 2019 segundo a Organização Mundial da Saúde.



Fonte: Adaptado de WHO, 2020a.

Nas Américas os números dos casos novos de hanseníase vêm mostrando uma queda gradativa desde 2009 e, em 2019 foram notificados 29.936 novos casos representando uma diminuição de 1.021 casos em comparação ao ano anterior (WHO, 2020a, 2019a). O Brasil soma 93% dos casos em todo o continente americano e o número de novos casos de hanseníase em 2019 foi de 27.864, desses, 11.561 casos estiveram presentes na Região Nordeste, que compreende a região com maior número de casos no Brasil, e 282 no estado de Alagoas, representando uma taxa de detecção 8,28 casos a cada 100.000 habitantes, o que a caracteriza como um estado de média endemicidade para a hanseníase (BRASIL, 2021a).

A detecção de casos de hanseníase com algum tipo de incapacidade instalada é um importante indicador para avaliação da rapidez na procura por atendimento e diagnóstico. A OMS adota o grau de incapacidade física 2 (quando há danos irreversíveis no paciente) para avaliar esses parâmetros. No ano de 2019, do total dos casos reportados, 10.813 apresentaram grau de incapacidade física 2, desses, 2.351 ocorreram no Brasil, que apresentou um aumento

de casos desde 2015. A forma clínica da hanseníase também contribui para uma análise da presença de casos mais avançados da doença. Os dados globais apontam um total de 130.058 novos casos de hanseníase em 2019 com a classificação operacional multibacilar (MB), a mais grave da doença, e no Brasil esse número é preocupante: foram detectados 21.850 novos casos multibacilares. Uma vez que a forma clínica MB é mais grave e favorece a transmissão da doença, está relacionada com a demora à procura do serviço de saúde, e a uma maior disseminação do bacilo (MOET *et al.*, 2004; WHO, 2020a).

Outro dado quem tem importância para o monitoramento hanseníase são os casos que ocorrem entre menores de 15 anos, sendo um indicativo de transmissão recente e ativa da doença. Anualmente a média de casos de hanseníase entre indivíduos menores de 15 anos é de 15.000 casos globalmente, segundo a OMS. Os resultados desse indicador mostram que em 2019 foram notificados 14.981 (7,4%) novos casos de hanseníase em menores de 15 anos, no Brasil esse número compreende em 1.545 dos casos resultando em uma taxa de detecção de 3,44 casos a cada 100 000 habitantes (BRASIL, 2021a; WHO, 2020a).

O Ministério da Saúde disponibilizou alguns dados preliminares referentes ao ano de 2020, o Brasil, nesse ano, reportou 13.807 novos casos de hanseníase, desses, o estado de Alagoas registrou 170 casos. Dos novos casos notificados no Brasil em 2020, 79,5% foram classificados como MB, número que apontam para a relevância da infecção no país. Relacionado à gravidade da doença também se tem dados preliminares do grau de incapacidade física, e em 2020, 1.108 pacientes foram diagnosticados com grau de incapacidade física 2. Outro número que apresentou uma redução diz respeito aos casos novos em menores de 15, sendo notificado 672 desses casos em 2020, representando 4,86% do total de casos neste mesmo ano (BRASIL, 2021b). Esses dados preliminares devem ser interpretados com cautela pois a pandemia causada pelo SARS-CoV-2 influenciou o diagnóstico, a notificação e o acompanhamento dos casos de hanseníase no Brasil durante o ano de 2020, além disso, a OMS relata que todos os países que reportaram os dados sofreram impacto da pandemia nos seus programas de saúde segundo o relatório epidemiológico de 2020 (WHO, 2020a).

A OMS, em conjunto com os programas nacionais, lançou em 2021 uma estratégia global baseada em quatro pilares que visam combater, prevenir a hanseníase, bem como controlar as suas complicações e prevenir novas incapacidades, além disso, combater o estigma da doença até 2030. No Brasil, o Ministério da Saúde elaborou um documento seguindo os preceitos da OMS que visa um país livre de hanseníase e tem como objetivo

reduzir os casos da doença até 2022 (BRASIL, 2020b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

2.3 Características do *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*)

O agente etiológico da hanseníase foi descoberto em 1874 pelo médico norueguês Gerhard Henrick Armauer Hansen que encontrou em pacientes lepromatosos organismos que se assemelhavam a bactérias. No entanto ele falhou ao provar sua hipótese, pois não obteve sucesso na reprodução do patógeno em meios artificiais (TAN; GRAHAM, 2008). Por muito tempo a reprodução do bacilo era restrita a modelos animais, como tatus e camundongos, fazendo com que houvesse um grande obstáculo para o estudo da microbiologia do patógeno, no entanto, recentemente foi descoberto pela primeira vez, por pesquisadores brasileiros que o *M. leprae* pode ser cultivado em células provenientes de carrapatos, abrindo portas para uma nova era de estudos com o bacilo (FERREIRA *et al.*, 2018).

Em 1960, Shepard realizou um experimento no qual ele infectou o coxim plantar de camundongos com bacilos provenientes da mucosa nasal de pacientes lepromatosos e pode observar o aparecimento de lesões similares as da hanseníase após alguns meses depois de inoculados (SHEPARD, 1960). Anos depois, em 2001, dois pesquisadores dos Estados Unidos, também inoculando bacilos em coxim de camundongos, dessa vez atímicos (nude), obtiveram uma quantidade de bacilo viável que foi usada para estudos experimentais em tatus da espécie *Dasyus novemcinctus* (TRUMAN; KRAHENBUHL, 2001).

O *M. leprae* é uma bactéria Gram-positiva, intracelular, imóvel, que possui a forma de bastonete reto com suas extremidades arredondadas, que se coram devido a fucsina e não sofrem descoloração pela solução de álcool-ácido da técnica de Ziehl-Neelsen, sendo considerados bacilos álcool-ácidos resistentes (AAR), mede aproximadamente de 1 a 8 µm de comprimento e 0.3 µm de diâmetro, em imagens de microscópio os bacilos podem ser observados em aglomerados que são chamados de globias (DIÓRIO, 2014; LOWY; RIDLEY, 1954). Possui predileção por partes mais frias do corpo humano, como por exemplo, trato respiratório superior, orelhas e extremidades do corpo e nervos periféricos, não se multiplicando nas partes “quentes”, sua temperatura ideal para crescimento é de 27 °C à 30 °C, e possui um tempo de incubação de aproximadamente 12,5 dias (HASTINGS *et al.*, 1968; JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999; SHEPARD, 1965).

2.4 Transmissão

O mecanismo de transmissão da hanseníase ainda não foi totalmente esclarecido, mas a maioria dos autores apontam o ser humano como única fonte de transmissão através de gotículas provenientes do trato respiratório superior como o principal fator de propagação por meio do contato pessoa-pessoa. Foi observado que em uma população endêmica da Indonésia ocorre uma propagação do bacilo através da mucosa nasal indicando uma ocorrência disseminada do *M. leprae*. A mucosa nasal também foi considerada como um dos locais para o aparecimento das primeiras lesões mesmo antes de se tornarem visíveis na pele (KLATSER *et al.*, 1993; SUNEETHA *et al.*, 1998). Além do envolvimento da mucosa nasal, estudos sobre a mucosa oral também encontraram bacilos através da técnica de PCR que podem ser fontes secundárias de transmissão e infecção da hanseníase (MARTINEZ *et al.*, 2011; MORGADO DE ABREU *et al.*, 2014).

O contato próximo e prolongado de um indivíduo saudável com uma pessoa infectada é um dos principais fatores para o acometimento da doença, sendo esse contato próximo não só relacionado a pessoas que convivem na mesma residência, mas também a pessoas com relações de proximidade, como vizinhos e colegas de trabalho. Contatos que mantiveram uma proximidade cerca de 5 anos com uma pessoa infectada foram associados com o desenvolvimento da hanseníase em uma população brasileira, no entanto, riscos maiores são encontrados em pessoas que compartilham do mesmo material genético, como por exemplo o filho de uma pessoa infectada tem mais chances de desenvolver hanseníase quando comparado com seu cônjuge (JOYCE, 2012; SALES *et al.*, 2011).

A índice bacilar (IB) e a forma clínica da pessoa infectada também é um fator importante relacionado com a transmissão, estima-se que indivíduos multibacilares (carga bacilar maior) estão mais propensos a transmitir a hanseníase se comparados com indivíduos paucibacilares (PB) (menor carga bacilar) (FINE *et al.*, 1997; MOET *et al.*, 2004).

Até o presente momento a única fonte não humana do *Mycobacterium leprae* é o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) que pode ser encontrado no sul dos Estados Unidos. Foi encontrado uma associação, a partir de um sequenciamento genômico, entre a mesma cepa infectando pacientes com hanseníase e o tatu de nove bandas, indicando os tatus como uma fonte de infecção, podendo ser considerada uma zoonose nos Estados Unidos (TRUMAN *et al.*, 2011). O consumo desses animais já foi associado com a hanseníase nos Estados Unidos, no entanto, quando realizada uma regressão logística desses dados não foi encontrado correlação significativa com a doença (CLARK *et al.*, 2008). Embora o papel

desempenhado por esses animais e a hanseníase ainda não esteja completamente elucidado, um estudo publicado recentemente apontou que o uso de testes sorológicos em espécies de tatus encontradas no Brasil podem se tornar uma ferramenta rápida e importante para a detecção de antígenos específicos do *M. leprae* nesses animais e investigar o seu papel zoonótico na hanseníase (DA SILVA FERREIRA *et al.*, 2020). Além de tatus, outros animais que podem ser reservatórios e possíveis fontes de transmissão da hanseníase, como esquilos e carrapatos (FERREIRA *et al.*, 2018; SCHILLING *et al.*, 2019).

2.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da hanseníase é principalmente clínico, e desempenha um papel importante no controle da doença, pois a partir dele é dado início ao tratamento e a transmissão é interrompida. O exame clínico é feito através de observações dermatoneurológicas da doença, três aspectos principais são levados em consideração e o diagnóstico é dado quando o paciente apresenta dois deles: 1) área da pele esbranquiçada com perda de sensibilidade ou manchas avermelhadas; 2) acometimento dos nervos periféricos também com perda de sensibilidade; 3) baciloscopia positiva (WHO, 2017a).

A baciloscopia é um exame laboratorial complementar, de baixo custo feito através de raspados intradérmicos. E pode ser usado para auxiliar no diagnóstico clínico quando se há alguma dúvida na classificação operacional para dar início ao tratamento, suspeita de recidiva ou no diagnóstico diferencial com doenças semelhantes a hanseníase. Após a coleta dos raspados é feita a coloração através da técnica de Ziehl-Neelsen (que permite corar os bacilos e fazer uma avaliação quantitativa) e em seguida é feita uma observação dos bacilos por microscópio, a contagem é realizada por meio do Índice Baciloscópico (IB) e fundamenta-se em uma escala que varia de 0 a 6. Na forma tuberculóide (TT) a baciloscopia é negativa, no entanto, isso não exclui o diagnóstico da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Outra ferramenta complementar ao diagnóstico da hanseníase é a histopatologia, que consiste na avaliação microscópica de biópsias de lesões de pele ou de nervos, onde os bacilos álcool-ácido resistentes são corados e fixados em parafina. A biópsia de lesões é capaz de apresentar aspectos como inflamação neural e granulomas características da hanseníase auxiliando no diagnóstico clínico tanto de pacientes como dos contatos (RIDLEY, 1955; SUNEETHA *et al.*, 1998).

Testes sorológicos que detectam anti-PGL-1, anticorpos da classe IgM que são específicos para glicolípido fenólico 1 presente na parede celular do *M. leprae*, podem ser

usados como uma ferramenta rápida e fácil aplicação para a classificação da forma clínica do paciente, tendo em vista que somente ele não é adequado para o diagnóstico (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2007). A presença de anticorpos IgM para o PGL-1 e IgG para outros antígenos (NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID) refletem na carga bacilar do paciente, dado que uma sorologia positiva foi alta em pacientes MB quando comparados com PB, e seus contatos também apresentaram resultado semelhante, corroborando com a hipótese de que pacientes MB são uma fonte de transmissão ativa (FABRI *et al.*, 2015). Pode-se constatar que em áreas endêmicas o uso da sorologia para um diagnóstico diferenciado é um método eficaz para distinguir a hanseníase de outras dermatoses (FREITAS *et al.*, 2016).

Depois da descoberta do genoma do *M. leprae* e o avanço das técnicas de biologia molecular foi possível detectar o DNA do bacilo através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, em inglês), proporcionando assim uma ferramenta de diagnóstico da hanseníase mais acurada. A PCR é considerada uma ferramenta rápida e altamente específica e sensível que pode detectar uma pequena quantidade de bacilos através de raspado intradérmico e em biópsias da pele (AZEVEDO *et al.*, 2017). Esse método se mostra eficaz e produz resultados mais confiáveis nos casos nos quais é difícil o diagnóstico pelos os outros meios já mencionados, como é o caso do paucibacilar que apresenta baciloscopia negativa e pacientes que exibem a forma neural pura (NP) da doença que não manifesta lesões de pele (MARTINEZ *et al.*, 2014). Foi visto que a PCR pode auxiliar em casos de diagnóstico precoce e acompanhamento de contatos, contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase e para prevenir as incapacidades físicas (PATHAK *et al.*, 2019). Recentemente, pesquisadores brasileiros desenvolveram um novo par de primers que detectam uma sequência do genoma do *M. leprae* com mais de 90 % de especificidade para o bacilo quando comparado com outros organismos (MACHADO *et al.*, 2020).

A hanseníase é uma doença que possui cura, e em 1982 a Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu um tratamento baseado na combinação de três antibióticos chamado poliquimioterapia (PQT) ou multidrogaterapia (MDT), essa junção substituiu a monoterapia com Dapsona pois o *M. leprae* desenvolveu resistência medicamentosa. A MDT consiste na administração de Rifampicina, Clofazimina e Dapsona diminuindo a resistência e possibilitando a cura da doença (WHO STUDY GROUP, 1982).

O tratamento é dividido de acordo com a classificação operacional e no caso de crianças a dose é ministrada de acordo com o peso a idade. A duração da MDT é de seis meses para pacientes paucibacilares e de 12 meses para os multibacilares, o tratamento com esses antibióticos vem sendo eficaz e foi observado que após um mês de MDT o número de

M. leprae em biópsia da pele reduziu 54,3% em pacientes MB e 61,8% em PB quando comparados com o valor inicial (BRASIL, 2020c; KAMPIRAPAP *et al.*, 1998). O tratamento preconizado pela OMS para adultos e adotado pelo Ministério da Saúde está representado abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 – Tratamento da hanseníase para adultos adotado pelo Ministério da Saúde.

Classificação	Medicação	Dose	Duração
Paucubacilar	Rifampicina	Dose mensal de 600mg/supervisionada	Seis meses
	Dapsona	Dose mensal de 100mg/supervisionada e dose diária de 100mg/autoadministrada	
Multibacilar	Rifampicina	Dose mensal de 600mg/supervisionada	12 meses
	Dapsona	Dose mensal de 100mg/supervisionada e dose diária de 100mg/autoadministrada	
	Clofazimina	Dose mensal de 300mg/supervisionada e dose diária de 50mg/autoadministrada	

Fonte: Adaptado de Brasil, 2020c.

Segundo a OMS para pacientes paucibacilares que apresentam apenas uma lesão na pele o tratamento é diferenciado, é administrada uma dose de 600mg de Rifampicina, 400mg de Ofloxacina e 100mg de Minociclina. A alta dos pacientes é concedida logo após o término das doses preconizadas pelo esquema terapêutico. Ao final da MDT todo paciente realiza um exame dermatológico, avaliação neurológica e é verificado se há algum caso de grau de incapacidade física. Depois desses procedimentos o paciente recebe alta por cura (BRASIL, 2020c; WHO, 2020b).

Durante as reações hansênicas o tratamento é complementado com medicamentos que na reação tipo 1 controlam a inflamação aguda, diminuem a dor e reduzem o dano neural. É administrado a prednisona em doses baixas que podem ser diminuídas de acordo com a melhora do quadro reacional do paciente. Para tratar o ENH é utilizado prednisona em doses mais elevadas no começo e se os sintomas não tiverem uma melhora é administrado a talidomida (WALKER; LOCKWOOD, 2006).

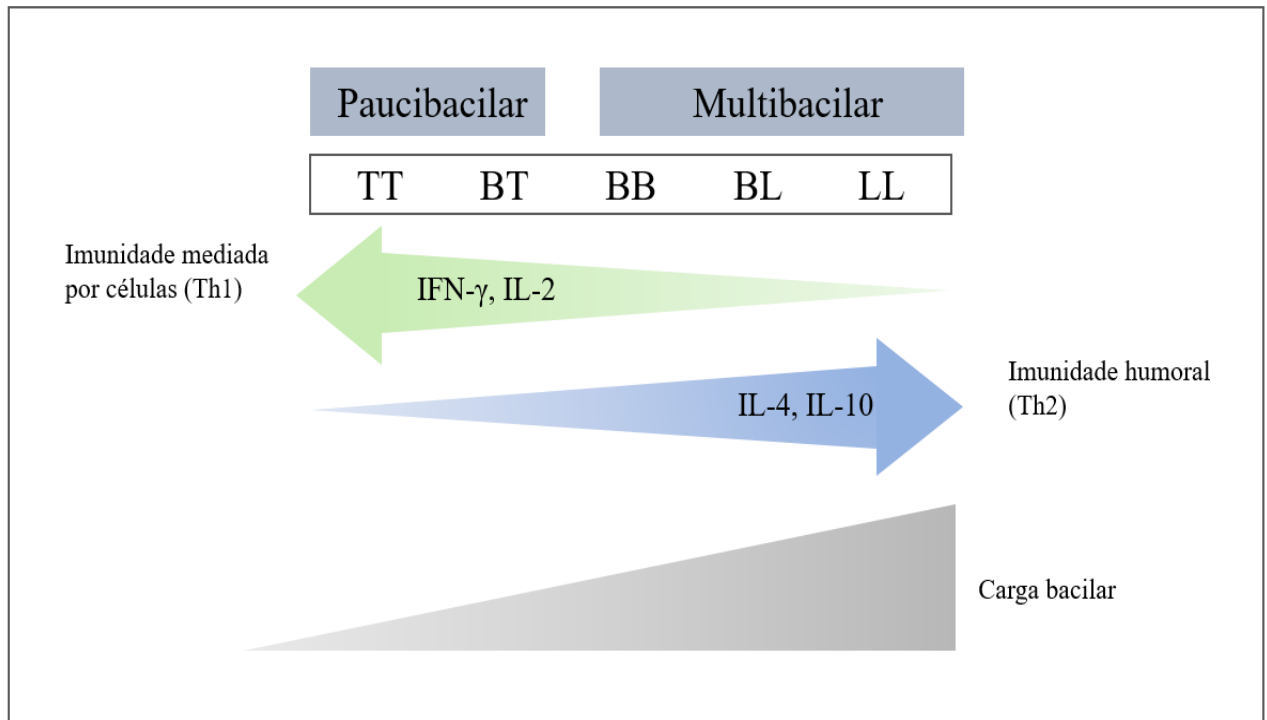
2.6 Formas clínicas

A infecção pelo *M. leprae* apresenta uma variação no curso e cada indivíduo pode diferenciar-se nesse quesito, sabendo disso, a classificação da hanseníase se torna importante para a administração do tratamento adequado. Em 1953 durante o Congresso Internacional de Hanseníase, em Madri, foi proposta uma classificação baseada em quatro grupos principais baseados em critérios clínicos e pela baciloscopia e geralmente é aceitável pela maioria das pessoas. As formas tuberculóide e lepromatosa (virchowiana) são consideradas polos opostos e imunologicamente estáveis, e as formas indeterminada e dimorfa compõem o grupo imunologicamente instável (TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

Com o avanço de estudos sobre a imunologia e a hanseníase, em 1966, Ridley e Joplin propuseram uma nova classificação baseada em nos exames clínicos, histopatológicos, baciloscópico e na imunologia dos pacientes frente a infecção avaliada através do teste de Mitsuda. Esse novo método dividiu a hanseníase em cinco grupos, que se apresentam em um espectro. Em um polo a forma tuberculóide (TT), mais branda e com baciloscopia negativa, no polo oposto a forma lepromatosa (LL), com lesões mais graves e apresentando baciloscopia positiva com numerosos bacilos. Entre essas duas formas polares existem as intermediárias, *borderline* tuberculóide (BT), *borderline* *borderline* (BB) e *borderline* lepromatosa (BL), que são imunologicamente instáveis e podem migrar para um dos polos dependendo do tempo que o indivíduo é diagnosticado. A hanseníase também pode ser classificada como indeterminada (I) e acontece com pacientes que ainda não desenvolveram a resposta imune celular e sua característica mais comum é a perda de sensibilidade térmica, sem a habilidade distinguir entre algo quente e frio (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015). Uma representação gráfica dessa descrição de formas clínicas pode ser visualizada na Figura 3.

As diferentes formas clínicas da hanseníase ativam tipos distintos de produção de citocinas da família Th1 e Th2. Indivíduos do polo tuberculóide secretam citocinas IL-2 e INF- γ (família Th1) pertencentes a resposta imune mediada por células que impedem o crescimento e proliferação do *M. leprae*, já pacientes da forma mais grave da doença, lepromatosos, exibem uma produção de citocinas IL-4 e IL-10 da família Th2 e que estão relacionados com a resposta imune humoral e produção de anticorpos (YAMAMURA *et al.*, 1991).

Figura 3 – Formas clínicas da hanseníase pela classificação de Ridley e Joplin (1966) e a classificação da Organização Mundial da Saúde.



Fonte: Adaptado de Alter *et al.*, 2011.

Nota: Tuberculóide (TT), *Borderline* tuberculóide (BT), *Borderline borderline* (BB), *Borderline* lepromatoso (BL) e lepromatoso (LL). Estão presentes também o tipo de citocina secretado por cada tipo de resposta imune e a carga bacilar apresentada nos diferentes subtipos da hanseníase.

Para fins de tratamento a Organização Mundial da Saúde classificou os pacientes em dois grupos de acordo com o resultado da baciloscopia e o número de lesões. Essa classificação resultou no grupo paucibacilar (PB) que apresenta resultado negativo na baciloscopia e poucas lesões (de uma a cinco) e multibacilar (MB) que apresentam grande carga de bacilos e mais de cinco lesões. Esse sistema proposto pela OMS é utilizado pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Além das formas clínicas clássicas da hanseníase, os pacientes podem desenvolver respostas imunológicas agudas tanto durante o tratamento quanto após, essas complicações são chamadas de reações e são divididas em dois grupos principais: reação reversa (RR) ou reação do tipo 1 e eritema nodoso hansênico (ENH), podendo acometer de 30% a 50% dos pacientes (SCOLLARD *et al.*, 2006).

A reação reversa é caracterizada pelo inchaço e vermelhidão das lesões na pele, inflamação do nervo com perda de capacidade motora e ocorre principalmente nas formas clínicas *borderline* (BT, BB e BL), sendo o tipo mais comum de reação. Durante o tratamento se caracteriza por uma melhora imunológica aumentando a resposta imune mediada por células e pode representar uma transição para TT, no entanto, é observado também uma piora

levando ao aparecimento de novas lesões semelhantes as encontradas em LL. O ENH é uma reação mais severa e está mais relacionado com as formas clínicas BL e LL no início do tratamento. Há a ocorrência de eritemas dolorosos e nódulos subcutâneos, essas lesões podem ulcerar e necrosar e são encontradas em todas as partes do corpo. Um outro tipo de reação foi recentemente descoberto, o Fenômeno de Lucio é uma reação rara que atinge indivíduos não tratados da forma lepromatosa. Uma das suas características principais é o infiltrado bolhoso e assim como o ENH as lesões podem ulcerar e necrosar. Casos como esse são mais observados na América Central, principalmente no México (FISCHER, 2017; VARGAS-OCAMPO, 2007).

Como o bacilo possui uma preferência pelas células de Schwann, a hanseníase pode ser considerada também uma neuropatia e encontrar-se na forma neural pura (NP). Considerada uma forma rara que apresenta aumento de um ou mais nervos periféricos que podem ser dolorosos, causando perda de força muscular, se diferenciada forma TT pelo não envolvimento de lesões na pele (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

2.7 Resposta imune e a hanseníase

A resposta imune inata constitui a resposta inicial à invasão de microrganismos em seres humanos, atuando na prevenção, no controle e na eliminação do patógeno. É a primeira linha de defesa do *M. leprae* com o hospedeiro, e devido a baixa patogenicidade do bacilo permite com que esse tipo de resposta desempenhe um papel significativo no estabelecimento ou não da hanseníase e suas formas clínicas. As células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) são células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*) e estão localizadas na pele e nas mucosas, sabendo que as vias aéreas superiores representam a principal via de transmissão do *M. leprae*, as DCs são as primeiras células a encontrar com os bacilos e também são consideradas uma ponte entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, é visto que a produção de IL-12, uma citocina pró-inflamatória, pelas DCs em resposta a antígenos micobacterianos pode levar a uma resposta imune adaptativa do tipo Th1 (DEMANGEL; BRITTON, 2000; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Os macrófagos são células da imunidade inata e estão predominantemente presentes no trato respiratório superior, no entanto, também são encontrados na pele, mas em menor número. Eles são divididos em dois subtipos funcionais principais, M1 e M2, que apresentam as respostas Th1 e Th2, respectivamente. Embora, para fins de simplificação sejam divididos

em apenas dois grupos, os macrófagos apresentam um espectro de diferenciação que depende do estímulo encontrado frente a um patógeno (SICA *et al.*, 2015). Na hanseníase, os macrófagos desempenham um papel importante na patogênese da doença, sendo o hospedeiro primário do *M. leprae* ele apresenta/processa antígenos e secreta citocinas, bem como podem eliminar o bacilo, no entanto, frente a uma resposta imune inata debilitada eles podem se proliferar e com isso apresentar uma característica esponjosa (do inglês, “foamy cells”) devido à grande quantidade de bacilos, característica essa que pode ser mais observada em lesões dos pacientes LL e foi descrito por Virchow em 1863 (MONTROYA; MODLIN, 2010; SCOLLARD *et al.*, 2006).

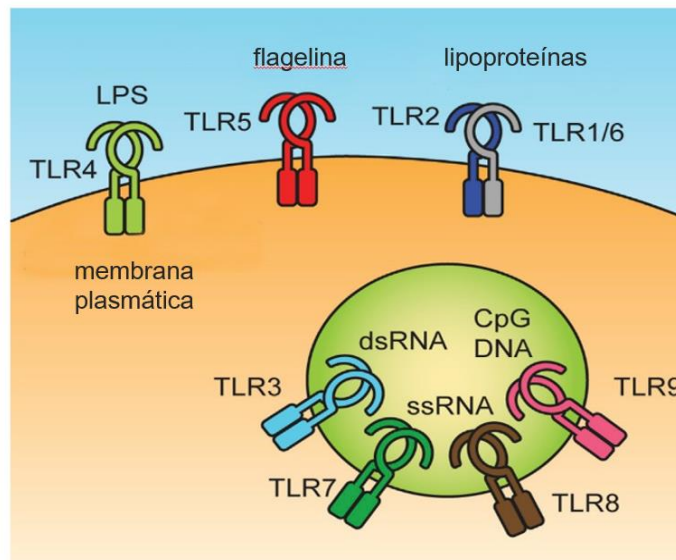
Pacientes dos polos TT e LL apresentam diferentes fenótipos de macrófagos em suas lesões quando comparados entre si, o polo TT exhibe macrófagos do tipo M1 que apresentam citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-6, IFN- γ) as quais contém a proliferação do bacilo, enquanto o polo LL apresenta uma predominância de M2 que secretam proteínas anti-inflamatórias (IL-10, IL-13). Diferença também é observada nos tipos de reações, onde os pacientes com RR exibem M1 e pacientes com ENH apresentaram o tipo M2 (DE SOUSA *et al.*, 2016; FACHIN *et al.*, 2017).

A parede celular do *M. leprae* possui vários componentes que, na interação com a imunidade inata, ativam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que por sua vez são reconhecidos através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) que são expressos em monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais do hospedeiro. Os PRRs também são capazes de reconhecer os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs do inglês, *Damage-Associated Molecular Patterns*) que são moléculas endógenas que são produzidas e liberadas por células danificadas ou mortas. Os principais PRRs descritos que atuam no reconhecimento do *M. leprae* são os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores tipo NOD (NLRs), mais precisamente o receptor NOD2 (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) (PINHEIRO *et al.*, 2018). Além da interação que ativa os PAMPs, o *M. leprae* também podem interagir com receptores que estão associados com a adesão e entrada do bacilo nos macrófagos e células de Schwann, como o MRC1 (receptor de manose), α 2-laminina e receptores do complemento.

Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês, *Toll-like receptors*) pertencem a uma família de receptores transmembrana tipo I que contém um domínio extracelular rico em leucinas, um domínio transmembrana e um domínio homólogo chamado de receptor toll/interleucina 1 que está conservado no domínio citoplasmático. A proteína Toll foi

descoberta em uma espécie de *Drosophila* adulta e foi visto que Toll desempenha uma atividade antifúngica induzindo uma resposta imune inata. Com o avanço dos estudos, foi encontrado um homólogo da proteína Toll, achada em *Drosophilas*, nos seres humanos que possui a função de um receptor do sistema imune e induz a resposta imune inata e adaptativa em vertebrados (JEONG; LEE, 2011; LEMAITRE *et al.*, 1996; MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Os TLRs são majoritariamente expressos em células do sistema imune como macrófagos e células dendríticas, no entanto, podem ser encontrados também em células epiteliais e fibroblastos. Foram descritos 13 tipos de TLRs, que são encontrados tanto em humanos quanto em camundongos; TLR1 até TLR9 é expresso em ambos, TLR10 é encontrado apenas nos seres humanos e TLR11 até TLR13 estão presentes nos camundongos. Os TLRs se diferenciam tanto na sua localização, sendo expressos no meio intra (ex.: TLR3, 7, 8 e 9) ou extracelular (TLR1, 2, 4, 5 e 6) quanto no reconhecimento dos PAMPs, nos quais alguns reconhecem lipídios e o lipopolissacarídeo (LPS) (ex.: TLR1, 2 e 6) e outros ácidos nucleicos (TLR7, 8 e 9) (MCGETTRICK; O'NEILL, 2010; OOSENBURG *et al.*, 2017). A Figura 4 ilustra a localização e variabilidade dos componentes que podem ser detectados pelos TLRs e que desencadeiam as vias de sinalização e montam a resposta imune.

Figura 4 – Localização dos Toll-like receptors no meio extra e intracelular, bem como seus ativadores.



Fonte: Adaptado de Oosenburg *et al.*, 2017.

Nota: Os TLRs extracelulares, como por exemplo o TLR1, podem detectar componentes da parede celular de bactérias, enquanto os receptores intracelulares detectam PAMPs de patógenos que entraram dentro da célula, sendo capazes de reconhecer fitas de RNA.

A rota de sinalização dos TLRs inicia-se a partir dos ligantes no domínio rico em leucinas originando uma interação com proteínas sinalizadoras/adaptadoras das famílias

MyD88/IRAK/TRAF que transmitem uma cascata de sinalização levando a ativação de fatores de transcrição (NF- κ B, IRF-3) no qual facilitam a expressão de citocinas pró-inflamatórias ou IFN (MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019). Em biópsias de pacientes com hanseníase foi observado uma maior expressão dos heterodímeros TLR1/TLR2 em lesões de indivíduos da forma polar TT quando comparado com os LL, sugerindo uma maior participação desses TLRs na contenção da infecção pelo *M. leprae* (KRUTZIK *et al.*, 2003). Examinando o papel do TLR2 na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, foi notado uma expressão de TNF- α que resultou na indução de uma resposta protetora contra a referida micobactéria (UNDERHILL *et al.*, 1999).

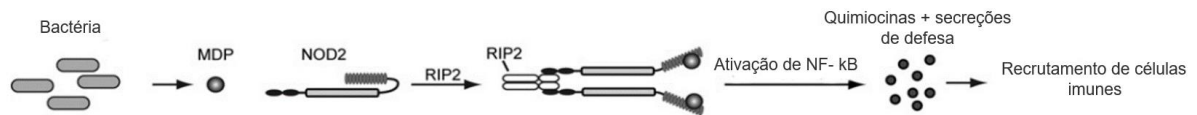
A ativação dos TLRs em macrófagos humanos, mais especificamente os heterodímeros TLR1/TLR2, estão envolvidos com o aumento da expressão do gene que codifica para o VDR (receptor de vitamina D, do inglês *vitamin d receptor*) levando à síntese da catalecidina contra o *Mycobacterium tuberculosis*, mediando a atividade antimicrobiana. Através do estímulo com ligantes diferentes de TLRs foi observado uma alta produção de catalecidina induzida por lipopolissacarídeo e por DNA do *M. tuberculosis* (LIU *et al.*, 2006; RIVAS-SANTIAGO *et al.*, 2008) Na hanseníase os níveis desse peptídeo foram mais baixos em pacientes tratados e não tratados quando comparado com indivíduos saudáveis, na comparação entre os pacientes os níveis foram mais baixos naqueles que acabaram de ser diagnosticados. Somando a esse fato, a presença da forma ativa da vitamina D na diferenciação de macrófagos induzidos por IL-15 aumentou a via anti-microbiana dependente de vitamina D incluindo a produção de catalecidina, formando uma resposta microbicida contra o *M. leprae* (MATZNER *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2018).

Os miRNAs (microRNAs) fazem parte da família de RNAs não codificantes que se ligam a 3'UTR no seu mRNA alvo, suprimindo sua tradução, e vêm sendo descritos como importantes moduladores da expressão de genes da resposta imune, participando de processos como inflamação e apoptose. Algumas proteínas sinalizadoras dos TLRs ou os próprios TLRs são alvos dos miRNAs e este último pode desencadear vários processos regulatórios, além disso, a expressão de alguns miRNAs podem diminuir a ativação dos TLRs (BAYRAKTAR; BERTILACCIO; CALIN, 2019; O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011; TAGANOV *et al.*, 2006). Em lesões de pacientes com hanseníase foi visto uma diferenciação de miRNAs entre pacientes e controles, nas formas clínicas e nos estados reacionais, além disso, a expressão de um miRNA específico foi capaz de inibir a ação da via antimicrobiana da vitamina D dos TLR1/TLR2, evidenciando o envolvimento dos miRNAs na disseminação do bacilo (LIU *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2017).

Outro PRR que tem participação na infecção pelo *M. leprae* é o receptor NOD2, que está localizado no meio intracelular citosólico e pertence à família NLRs (do inglês, *Nod-like receptors*) que é capaz de reconhecer estruturas microbianas e ativar a resposta imune inata controlando assim a inflamação. Essa família possui aproximadamente 20 membros que compartilham características semelhantes, e assim como os TLRs, também possuem um domínio rico em leucinas (MAGALHAES *et al.*, 2011; MUKHERJEE *et al.*, 2019). NOD1 e NOD2 são os receptores da família NLR que reconhecem o peptidoglicano da parede celular das bactérias e participam da defesa do hospedeiro contra invasores induzindo respostas antimicrobianas. Enquanto o NOD1 identifica o ácido D-glutamil-meso-diaminopimélico, que é encontrado majoritariamente em fragmentos de bactérias Gram-negativas, o NOD2 detecta o muramil dipeptídeo (MDP) que pode ser observado na maioria das bactérias (GIRARDIN *et al.*, 2003; MAGALHAES *et al.*, 2011).

Embora NOD1 seja expresso na maioria dos tecidos e em diferentes níveis, NOD2 é expresso majoritariamente em monócitos. Em relação aos seus domínios, em ambos os NODs, são encontrados como domínios principais o domínio CARD de ativação (do inglês, *Caspase Recruitment Domain*), no entanto, é observado dois destes no NOD2 e acredita-se que seja a primeira proteína a apresentar essa característica, diferente do NOD1 que apresenta apenas um, e o domínio NBD (do inglês, *nucleotide-binding domain*), que é seguido de sequências repetidas ricas em leucina. (OGURA *et al.*, 2001). A estimulação do domínio CARD do NOD1 e NOD2, através do reconhecimento do peptidoglicano das bactérias, leva à uma ativação de vias como NF- κ B e MAPK por meio do recrutamento de proteínas como a RIPK2 (também conhecida como RIP2) que atuam como mediadores de sinalização, e por meio disso são capazes de induzir uma produção de citocinas e quimiocinas, bem como uma resposta antimicrobiana (CARUSO *et al.*, 2014; MUKHERJEE *et al.*, 2019). A Figura 5 ilustra o reconhecimento, ativação e sinalização do NOD2 para montar uma resposta antimicrobiana. O NOD2 também demonstrou que pode induzir a autofagia em células dendríticas tratadas com MDP (muramil dipeptídeo) e com o auxílio da sinalização feita pela RIPK2 (COONEY *et al.*, 2010), além disso, em outro estudo foi observado um perfil de resposta Th2 por meio da injeção de MDP e, atuando em sinergia com a sinalização dos receptores Toll-like, o NOD2 apresentou um tipo de resposta Th1 (MAGALHAES *et al.*, 2008). Ambos os estudos exibem a importância da detecção dos PAMPs para o aprimoramento da resposta imune.

Figura 5 – Ativação da resposta imune através do reconhecimento e sinalização feito pelo receptor NOD2.



Fonte: Adaptado de Billmann-Born *et al.*, 2011.

Nota: O receptor NOD2 reconhece o MDP e muda sua conformação ao se ligar com a proteína adaptadora RIP2 que resulta na ativação do fator de transcrição NF-κB e leva à uma liberação de quimiocinas e outras moléculas antibacterianas.

Muito se tem visto sobre o papel do NOD2 na infecção bacteriana, no entanto, há estudos sobre a relação desse receptor com outros tipos de infecções, como por exemplo na infecção viral, onde ele pode agir como PRR viral e desencadear a ativação de fatores de transcrição (IRF3) que são dependentes de MAVS (do inglês, *mitochondrial antiviral signaling*) e levando a produção de INF do tipo I como IFN-β (SABBAH *et al.*, 2009; VISSERS *et al.*, 2012). Camundongos deficientes do gene *NOD2* durante uma infecção causada por um protozoário demonstraram uma diminuição da produção de IFN-γ e células T deficientes do receptor NOD2 exibiram uma baixa secreção de IL-2 resultando em uma pobre diferenciação da resposta imune pela célula T helper, esse achado sugere que NOD2 participe da promoção da diferenciação das respostas Th1 e Th2 (SHAW *et al.*, 2009).

O papel desempenhado por NOD2 na hanseníase foi observado por Schenk e colaboradores, que demonstraram a ativação de monócitos e a indução na sua diferenciação em células dendríticas através do ligante do NOD2 (MDP) a partir de um mecanismo dependente de IL-32, que se mostrou mais capaz de apresentar antígenos do MHC I quando comparado com células derivadas de monócitos (GM-CSF), onde estas foram mais expressas nos receptores TLR1/2. Além disso, os mesmos autores mostraram que a proteína IL-32 foi encontrada em abundância em lesões de pacientes da forma polar TT, enquanto poucas concentrações foram vistas em lesões provenientes de LL, sugerindo um papel importante da IL-32 via NOD2. Em outro estudo, os autores observaram que o reconhecimento do MDP pelo *M. leprae in vitro* não difere do que acontece naturalmente na maioria das bactérias (SCHENK *et al.*, 2012, 2016).

A resposta imune adaptativa se caracteriza em dois tipos principais, a resposta tipo 1 (ou celular) e tipo 2 (humoral), também chamadas de Th1 e Th2, respectivamente. Esses dois grupos de células T frente à microrganismos produzem classes diferentes de citocinas, IL-2 e IFN-γ, são produzidas pela resposta Th1, enquanto que Th2 produz citocinas como IL-4 e IL-10, e em ambas há secreção de IL-3 e TNF-α (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN; SAD, 1996). Na infecção pelo *M. leprae* os pacientes desenvolvem diferentes expressões de Th1 e

Th2 no espectro das formas clínicas e também nas reações, influenciando na susceptibilidade ou resistência à hanseníase.

A relação entre hanseníase e respostas Th1/Th2 foi observada por Yamamura e colaboradores (1991) que relataram que citocinas do perfil inflamatório Th1 (IL-2 e IFN- γ) foram vistas em lesões de pacientes do polo TT em contraste com a resposta exibida pelas lesões dos pacientes LL que foi caracterizada pela secreção de citocinas IL4, IL-5 e IL-10 (Th2). A resposta Th1 frente à infecção pelo bacilo é mais eficaz e outros estudos também confirmaram essa hipótese. No polo LL a resposta Th2 resulta na produção de anticorpos pelos linfócitos B, no entanto, como *M. leprae* é microrganismo intracelular ela se torna menos eficiente para eliminação do bacilo e assim resultando em um aumento da inflamação, o que é observado nas formas clínicas mais graves (RODRIGUES *et al.*, 2017; VENTURINI *et al.*, 2011).

Outro subgrupo de linfócitos CD4+ que participa da regulação da infecção na hanseníase é o Th17 que são células que produzem principalmente citocinas IL-17. Essas células já foram associadas à doenças infecciosas, como tuberculose e leishmaniose (GONZALEZ-LOMBANA *et al.*, 2013; TORRADO; COOPER, 2010).

Pacientes do polo TT apresentaram uma maior produção de citocinas IL-17A (tanto nas lesões, quanto no soro) e IL-6 quando comparadas com pacientes LL apresentando reação ou não, mostrando-se importante no controle da proliferação do bacilo e na sua contenção. Além disso, pacientes que tiveram um aumento na produção de INF- γ (Th1) foram propensos a apresentar reações (QUARESMA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017). Em um estudo também com o *M. leprae* os autores sugeriram que o perfil Th17 pode estar relacionado a células T não polarizadas (Th0) onde foi notado uma expressão simultânea de IFN- γ e IL-4, citocinas que são vistas nas respostas Th1 e Th2, respectivamente (SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

Embora tenha-se visto um papel protetivo do perfil Th17, em pacientes com ENH foi observado um aumento da expressão da IL-17A antes e depois do tratamento com talidomida, outras citocinas como IL-17B (IL-20) e foram vistas somente antes do tratamento, já o fator de transcrição ROR γ T, que implica na ativação de Th17, só foi detectado depois do tratamento. Resultado semelhante foi encontrado em estudo avaliando a população brasileira onde houve um aumento tanto na produção de IL-17 e de TGF- β , que é importante na diferenciação de Th17, em lesões de pacientes com ENH (COSTA *et al.*, 2018; MARTINIUK *et al.*, 2012).

Ainda, mais um subgrupo de células T vem sendo associado com a hanseníase, são as T_{reg} (T reguladoras) também chamadas de CD4⁺ CD25^{high}FoxP3⁺ por expressarem em grande quantidade CD25 e o fator de transcrição FoxP3 que é importante no seu desenvolvimento e função, podendo induzir imunossupressão e ser um bom marcador dessas células, além disso TGF-β (fator de transformação de crescimento beta, do inglês *transforming growth factor beta*) é necessário para manter a expressão de FoxP3 (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; MARIE *et al.*, 2005).

O papel das T_{reg} na hanseníase é pouco elucidado e alguns resultados podem se apresentar controversos, estudos mostraram um aumento das células T reguladoras tanto em lesões quanto no meio intracelular de LL quando comparadas com os pacientes apresentando as formas mais brandas da doença (TT e BT), como também a produção de TGF-β. Por outro lado foi vista uma redução de TGF-β e diminuição de T_{reg} nas reações hansênicas (BOBOSHA *et al.*, 2014; SAINI *et al.*, 2016). Outros estudos indicaram um aumento na frequência de T_{reg} em pacientes TT e nos que apresentaram a forma neural pura. Nos estados reacionais também foi notado um aumento, onde RR apresentou maior nível de T_{reg} em contraste com ENH, e por fim, concentrações de TGF-β no soro foram maiores em pacientes do que em controles sendo expressa também em lesões nos pacientes com ENH (ATTIA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2018). Esses resultados também apresentaram um envolvimento da resposta Th17 que é induzida pelo TGF-β, o que evidencia a complexidade da resposta imune frente a infecção pelo *M. leprae*.

2.8 A genética e hanseníase

2.8.1 Estudos de associação genética

Graças ao avanço dos estudos na área medicina moderna e biologia, hoje sabemos que a genética desempenha um papel importante no desfecho de várias doenças infecciosas. Dentre essas doenças encontra-se a hanseníase, tendo em vista que o bacilo possui pouca variabilidade em seu genoma, a genética do hospedeiro juntamente com os fatores ambientais desempenha um papel importante desfecho da hanseníase e também das suas formas clínicas (COLE *et al.*, 2001; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Os estudos de associação genética servem como uma ferramenta para analisar a existência de fatores genéticos nos hospedeiros que possam vir a contribuir para a existência de uma susceptibilidade ou proteção a determinadas doenças. Através da comparação alélica

de um marcador genético entre os indivíduos que são afetados por uma doença e pessoas saudáveis, podemos observar se um alelo é específico para determinada condição quando houver diferença significativa entre as duas populações (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

No genoma humano existem vários tipos de marcadores genéticos como os polimorfismos de microssatélite (STR, do inglês, *short tandem repeat*), de mini-satélite (VNTR, do inglês, *variable number of tandem repeats*) e polimorfismos de base única (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) que são importantes nos estudos genéticos. Devido à sua frequência nas populações e sua ampla distribuição ao longo do genoma, quando comparado com os outros dois tipos, os SNPs são os mais utilizados nos estudos genéticos de associação. Os SNPs são mutações pontuais bialélicas que estão amplamente distribuídas na população mundial e que ocorrem em uma frequência maior que 1%. Os SNPs são importantes pois quando estão localizados em regiões codificantes podem alterar a sequência de aminoácidos resultando em variações nas funções das proteínas, ou nas suas estruturas (MORAES *et al.*, 2006; PACHECO; MORAES, 2009).

Em comparação a outros tipos de investigações genéticas, os estudos de associação possuem um grande poder estatístico devido a utilização de genes candidatos em grandes populações. Os genes candidatos são escolhidos baseados no seu papel no desfecho da doença e em investigações de associações genéticas anteriores (PREVEDELLO; MIRA, 2007; RISCH; MERIKANGAS, 1996). Na hanseníase os genes candidatos são aqueles que participam de vias pró e anti-inflamatórias, bem como em receptores da resposta imune que desempenham papel importante na contenção da infecção pelo bacilo.

Um dos desenhos de estudo genético de associação mais utilizado quando se pesquisa sobre a hanseníase é o do tipo caso-controle, o qual inclui a coleta de amostras de indivíduos que foram acometidos pela doença em uma determinada população e de indivíduos saudáveis, e se observa a frequência de determinado marcador genético em ambos os grupos. Um dos desafios em estudos caso-controle é a seleção da população a ser estudada, uma vez que a escolha do grupo dos casos deve ser feita apoiada em diagnósticos médicos para assegurar que a pessoa incluída seja realmente definida como um caso. Para a escolha do grupo de indivíduos não afetados (controles) além das pessoas serem da mesma localidade que o grupo de casos é importante que tenham sido expostos ao agente causador da doença e mesmo assim não desenvolverem a doença. Vale ressaltar também a importância do tamanho amostral, que não deve ser pequena demais levando a uma não representatividade da população e a um fraco poder amostral, como também não precisa ser muito grande devido a ponto de levar custos desnecessários (LEWIS; KNIGHT, 2012; PACHECO; MORAES, 2009).

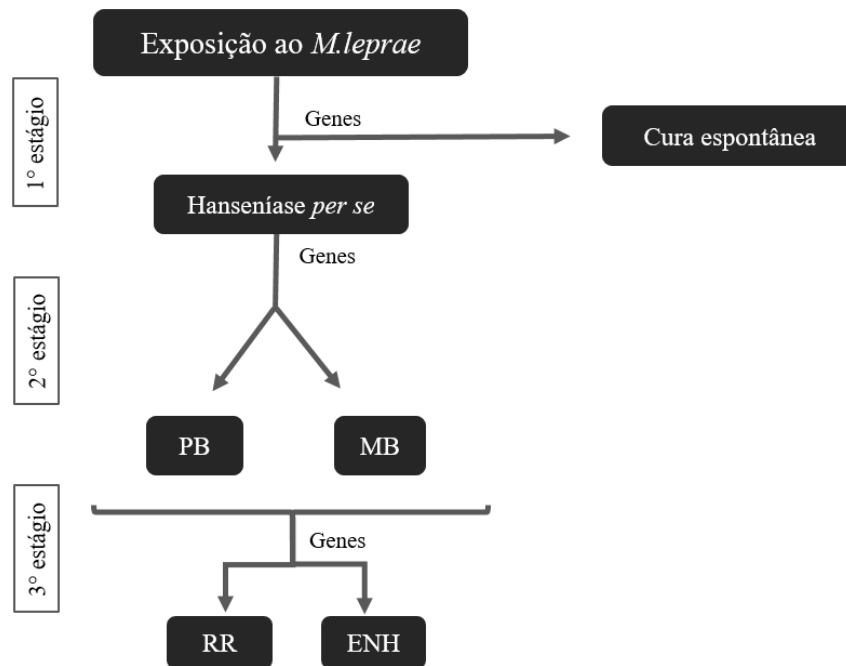
Outra ferramenta que pode ser usada em investigações de associação genética é o GWAS (do inglês, *genome-wide association study*), que pode ser considerado caso-controle, onde se avalia a variações genéticas causais de todo o genoma de muitos indivíduos em várias doenças simultaneamente sem uma hipótese anteriormente investigada, que pode detectar variantes genéticas utilizando os marcadores do tipo SNPs. Embora o GWAS seja um bom método para a identificação e mapeamento de genes que possam ser importantes no desfecho de doenças, alguns cientistas acreditam que o custo, o trabalho para realizar essa metodologia e a falta de resultados clinicamente significantes sejam problemas pertinentes (BURTON *et al.*, 2007; HIRSCHHORN; DALY, 2005; VISSCHER *et al.*, 2012).

2.8.2 Influência da genética na susceptibilidade à hanseníase

A participação da genética como fator decisivo na infecção pelo *M. leprae* foi abordada através de estudos envolvendo famílias e com gêmeos, nesse segundo, foi demonstrado que houve uma maior frequência da ocorrência da hanseníase nos monozigóticos quando comparados com os dizigóticos e foi também observado uma associação entre as formas clínicas e os gêmeos monozigóticos (ALI; RAMANUJAM, 1966; SHIELDS; RUSSELL; PERICAK-VANCE, 1987). Os componentes genéticos que estão envolvidos na susceptibilidade à hanseníase foram analisados por segregação complexa e, por meio deste foi possível observar que genes recessivos e codominantes influenciaram no desfecho da hanseníase *per se* e na forma paucibacilar (ABEL; DEMENAI, 1988).

Várias são as evidências que apontam a genética do hospedeiro como uma das causas determinantes que predispõe à hanseníase. Diante desse aspecto frente ao curso natural da doença podemos afirmar que os fatores genéticos do indivíduo podem atuar em três estágios diferentes: no controle da infecção pelo *M. leprae* independente da forma clínica, no desfecho das formas clínicas e nos episódios reacionais (MORAES *et al.*, 2006; SAUER *et al.*, 2015) (Figura 6).

Figura 6 – Genética como fator determinante no curso natural da hanseníase e nos diferentes estágios da doença.



Fonte: Adaptado de Sauer *et al.*, 2015.

Nota: PB= paucibacilar. MB= multibacilar. RR= reação reversa. ENH= eritema nodoso hansênico.

2.9 Principais genes da resposta imune e a hanseníase

2.9.1 Genes da resposta imune inata

Os primeiros estudos que relacionaram genes com a hanseníase apontaram a região 10p13 do cromossomo com risco à forma paucibacilar da doença na população indiana. Posteriormente, o mesmo tipo de estudo foi reproduzido com uma população do Vietnã e constatou que a região 10p13 no cromossomo estava associado com a forma paucibacilar e a região 6q25 relacionada com a susceptibilidade à hanseníase *per se* (independente das formas clínicas) (MIRA *et al.*, 2003; SIDDIQUI *et al.*, 2001). Na mesma região dos dois estudos (10p13) encontra-se o gene *MRC1* que codifica para o receptor de manose, outros autores constataram que o SNP rs1926736 (396G>S) associou-se com a hanseníase *per se* e com a forma multibacilar em populações do Brasil e Vietnã (ALTER *et al.*, 2010).

Os TLRs possuem um papel importante na imunidade inata frente microorganismos como o *M. leprae*, e estudos envolvendo o gene que codifica para esse receptor apontam marcadores de susceptibilidade ou proteção para a hanseníase. Em duas populações da Índia, a variante C do SNP não-sinônimo rs5743618 (1805C>A) do *TLR1* (troca de aminoácido

I602S) foi associado com proteção à hanseníase. (WONG *et al.*, 2010a). O primeiro estudo funcional que analisou o impacto do SNP rs5743618 (1805C>A) foi realizado na Turquia e demonstrou que indivíduos homocigotos para o 1805C apresentaram baixa expressão nos níveis de TLR1 estando isso relacionado à uma deficiência na sua função. Quando esse SNP foi avaliado em pacientes observou-se uma associação com proteção a hanseníase, sugerindo que essa diminuição da função tem efeito protetor (JOHNSON *et al.*, 2007). No entanto, dois estudos, um com população brasileira e outro com indiana não encontraram resultados significativos acerca desse polimorfismo e a hanseníase (DE SALES MARQUES *et al.*, 2013; SURYADEVARA *et al.*, 2017).

Um segundo SNP no gene *TLR1* que vem sendo estudado quanto sua relação com a hanseníase, é o rs4833095 (743T>C) que altera a posição do aminoácido N248S. Um estudo caso-controle em Bangladesh na Índia constatou que homocigotos 743C foram associados com risco a hanseníase *per se*. Em populações do sudeste brasileiro esse polimorfismo foi associado à hanseníase *per se* em estudos caso-controle e confirmado através de um estudo de família. Outro estudo realizado no sudeste do Brasil mostrou que a variante heterocigota desse SNP possui um efeito protetor contra a hanseníase em mulheres (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; DE SALES MARQUES *et al.*, 2013; SCHURING *et al.*, 2009).

Na família dos TLRs ainda há outros SNPs podem desempenhar um papel importante na hanseníase. Um estudo conduzido na Etiópia encontrou dois polimorfismos, o rs4986790 (896G>A) e o rs4986791 (1196C>T), no gene *TLR4* que foram associados com proteção à hanseníase. No Brasil, o alelo T do SNP rs3804099 (597T>C) no *TLR2* conferiu risco à hanseníase em uma população do nordeste (BOCHUD *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2017).

Um estudo do genoma completo realizado em 2009 na população chinesa foi o primeiro a associar variantes do *NOD2* com a hanseníase. Dois SNPs (rs9302752 e rs7194886) foram associados com doença, além disso, também foram associados à forma mais clínica mais grave (multibacilar). Esse estudo também revelou variantes nos genes *CCDC122*, *CD13orf31*, *TNFSF15*, *HLA-DR-DQ*, *RIPK2* e *LRRK2* associados com o risco ao desenvolvimento da hanseníase (ZHANG *et al.*, 2009). Uma replicação dos SNPs no *NOD2* do estudo de Zhang e colaboradores (2009) foi conduzido com populações da Índia e África Ocidental, no entanto, não foi encontrada nenhuma associação dos mesmos com a hanseníase (WONG *et al.*, 2010b). Um estudo mais detalhado avaliou vários SNPs na região cromossômica do *NOD2* no Nepal e sua relação com a hanseníase. Dos 32 polimorfismos investigados, oito foram associados com susceptibilidade a doença *per se* e 16 estiveram relacionados com os estados reacionais, sendo sete conferindo proteção à RR e os outros sete

associados ao aumento do ENH (BERRINGTON *et al.*, 2010). Os polimorfismos rs2111234 e rs3135499 no *NOD2* na população brasileira se mostraram associados à proteção em estudos com famílias e o rs8057341 também se mostrou com efeito protetor contra a hanseníase quando avaliado em casos e controles. Além disso, o SNP rs751271 se associou com o desenvolvimento de reações (LETURIONDO *et al.*, 2020; SALES-MARQUES *et al.*, 2014, 2017).

O GWAS realizado por Zhang e colaboradores (2009) encontrou uma associação dos genes *CCDC122-LACCI*, com susceptibilidade à hanseníase na população chinesa. Em seguida, um estudo caso-controle feito Wong e colaboradores (2010) também confirmou a associação desses genes com a hanseníase em duas populações, indiana e africana. Esses dois genes fazem parte do mesmo locus, no entanto, enquanto a função do *CCDC122* continua desconhecida, o gene *LACCI* que codifica para a proteína homônima está envolvida com vários processos imunológicos, dentre eles a regulação das vias MAPK e NF- κ B induzidas por *NOD2*, secreção de citocinas e atividade microbicida em monócitos derivados de macrófagos primários humanos (LAHIRI *et al.*, 2017). Três SNPs do GWAS foram replicados em um estudo envolvendo famílias do Vietnã e os autores encontraram resultados semelhantes observados na população chinesa. Investigando variantes diferentes do *CCDC122-LACCI*, foi obtido um resultado diferentes dos anteriores, os SNPs rs4942254 e rs2275252 apresentaram um efeito protetor contra a hanseníase na população brasileira tanto em estudo caso-controle, quanto com famílias (GRANT *et al.*, 2012; SALES-MARQUES *et al.*, 2014).

Um mapeamento do genoma realizado através de estudo com famílias no Vietnã teve como resultado a identificação da região 6q25 associada com a hanseníase *per se*. Essa região foi posteriormente estudada em mais detalhes, e foram encontrados os genes *PRKN* (anteriormente chamado de *PARK2*) e a sua região co-reguladora *PARCG*. Através de análise multivariada foram vistos dois SNPs do *PRKN* (rs9356058 e rs1040079) que capturavam toda a informação de associação com a susceptibilidade à hanseníase (MIRA *et al.*, 2003, 2004). A parkina é uma E3 ubiquitina ligase, uma proteína codificada por *PRKN*, é importante no metabolismo de ubiquitinação celular que atua na transferência, na modificação e sinalização para a degradação de proteínas e também se mostra importante na regulação da imunidade. Mutações nesse gene são encontradas principalmente em pessoas com a doença de Parkinson. No contexto de doenças infecciosas, a diminuição de *PRKN* nas células de Schwann e nos macrófagos estimulados com *M. leprae* prejudica a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e MCP-1 (DE LÉSÉLEUC *et al.*, 2013; SCHURR *et al.*, 2006). Um mapeamento de

associação de alta densidade nos genes *PRKN* e *PARCG* encontrou dois SNPs (rs1333955 e rs2023004) que foram associados à hanseníase *per se* em uma população do Vietnã e da Índia em dois tipos de estudos diferentes, com família e caso-controle, respectivamente. Além disso, na população vietnamita os autores observaram que o SNP rs1040079 é um fator de risco para o início precoce da hanseníase. No entanto, um estudo caso-controle conduzido na população do Amazonas não observou nenhuma associação entre os SNPs rs9356058 e rs1040079 com hanseníase, os quais foram previamente relacionados em populações do Vietnã e Índia (ALTER *et al.*, 2013; LETURIONDO *et al.*, 2020).

Por fim, a expressão do *VDR* (receptor de vitamina D, do inglês *vitamin D receptor*) induz uma resposta imune microbicida contra micobactérias através da produção de peptídeos antibacterianos, iniciando uma resposta imune efetiva. Analisando a relação entre os níveis de vitamina D e a expressão do gene *VDR* em uma população indiana, foi revelado que os pacientes que tinham uma diminuição no mRNA do *VDR* tinham apresentado ENH, e em conjunto à isso eles exibiram pouca proteína do receptor de vitamina D (MANDAL *et al.*, 2015). Em outro estudo realizado na Índia os autores observaram que a expressão do *VDR* foi menor nos pacientes quando comparado com os controles, no entanto, foi maior em pacientes com ENH, contrastando com o estudo anterior. Além disso, os polimorfismos *TaqI* (rs731236) e *FokI* (rs2228570) do *VDR* foram significativamente maiores em pacientes do que em controles, sugerindo risco à hanseníase, já com a variante *Apal* (rs7975232) não foi encontrado resultado significativo (SINGH *et al.*, 2018). Os polimorfismos *FokI* (rs2228570), *BsmI* (rs1544410), *Apal* (rs7975232), e *TaqI* (rs731236) foram investigados na população brasileira, nenhuma associação foi vista quando investigado as frequências alélicas e genotípicas, no entanto, quando avaliados os haplótipos formados por esses SNPs foi observada uma associação com proteção à hanseníase *per se* e à forma multibacilar. No Nepal, as variantes *FokI*, *BsmI* e *TaqI* não foram associadas nem proteção ou risco à doença (PEPINELI *et al.*, 2019; SAPKOTA *et al.*, 2010).

2.9.2 Genes da resposta imune adaptativa

A IL-10 é uma citocina anti-inflatória secretada em altos níveis por pacientes das formas mais graves da hanseníase. O gene *IL10*, o qual codifica essa proteína está localizado na região 1q31-q32 do cromossomo, nesse locus também estão outros genes de citocinas (*IL19*, *IL20* e *IL24*) que já foram associadas à outras doenças de pele (CHUNG *et al.*, 2007; KÖKS *et al.*, 2005). Em relação à hanseníase, o principal polimorfismo estudado é o

rs1800871 (-819C>T) que está localizado na região promotora. O alelo -819T desse SNP já foi associado com risco ao desenvolvimento da hanseníase em populações da Índia e Brasil, além disso essa associação foi confirmada através de uma meta-análise (ALVARADO-ARNEZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2009; TARIQUE *et al.*, 2015). A variante -1082G>A, também na região promotora, demonstrou estar associada ao risco da infecção pelo *M. leprae* em pacientes homozigotos para o alelo G na Índia, no entanto, contrastando com esse estudo, na população chinesa os homozigotos para o alelo A que estavam associados à infecção (CHEN *et al.*, 2013; TARIQUE *et al.*, 2015, 2020).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) nos humanos é denominado sistema HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*), e o gene do complexo está localizado no cromossomo 6 e realiza a apresentação de peptídeos para os linfócitos T durante a ativação da imunidade adaptativa. Os genes localizados no HLA são considerados os mais polimórficos em humanos (TURNER, 2004). Em 2009, Wong e colaboradores realizaram um GWAS onde foi confirmada a participação do HLA classe I no locus *HLA-B-C* e classe II no locus *HLA-DR-DQ* na hanseníase. Em estudos independentes, usando o desenho caso-controle em populações brasileiras, indianas e taiwanesas, genes localizados no HLA classe I e classe II foram associados tanto com proteção quanto com susceptibilidade à hanseníase. Ademais, o estudo de Souza-Santana e colaboradores (2015) também observou uma associação significativa com o *HLA-B*15* (classe I) e reação reversa (DE SOUZA-SANTANA *et al.*, 2015; HSIEH *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2010a).

Localizado na região HLA classe III, o gene *TNF*, principalmente o SNP rs1800629 (-308G>A) que está na região promotora, é um dos mais investigados na hanseníase devido ao papel importante da sua citocina na estabilização da formação de granuloma na infecção por *M. leprae*. Cardoso e colaboradores (2011) executaram estudos independentes de caso-controle e de família com esse SNP, além disso, foram incluídos estudos disponíveis na literatura para a realização uma meta-análise. Foi observado uma associação à proteção contra hanseníase tanto nos estudos independentes quanto na meta-análise. Em 2017, em uma meta-análise mais atualizada, os autores não encontraram nenhuma associação com a população no geral e a hanseníase, apenas na análise de subgrupo que foi visto um efeito protetivo na população da América Latina (AREESHI *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2011b). Essa variante possui resultados controversos relacionado a sua associação com a hanseníase em populações da Índia, Brasil e Nepal (LETURIONDO *et al.*, 2020; SAPKOTA *et al.*, 2010; TARIQUE *et al.*, 2015). Um estudo investigando outro SNP na região promotora do gene

TNF, o rs1799964 (-1031T>C), observou que homozigotos para -1091C estavam associados à proteção contra a hanseníase no estado do Amazonas quando comparado casos e controles (SILVA *et al.*, 2015).

O gene *INFG* localizado na região 12q14 do cromossomo codifica para a citocina INF- γ que desempenha um papel importante no controle das infecções por invasores intracelulares como *M. leprae*. Estudos do SNP rs2430561 (+874T>A) na população brasileira mostraram que a variante +874T mostrou um efeito protetivo contra a hanseníase, ademais, os autores observaram uma grande liberação de INF- γ por esses indivíduos. Na população chinesa os autores falharam ao associar esse SNP à hanseníase, no entanto, a variante rs3138557 apresentou uma repetição de alelos CA foi associada a forma clínica MB (CARDOSO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012). Posteriormente, Silva e colaboradores (2014) realizaram uma meta-análise que confirmou a associação com proteção à hanseníase do alelo +874T. Resultados semelhantes foram encontrados em outra meta-análise avaliando esse mesmo SNP e sua relação com a tuberculose (PACHECO; CARDOSO; MORAES, 2008; SILVA *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de polimorfismos genéticos em genes da resposta imune (rs4833095-*TLRI* e rs8057341-*NOD2*) e sua relação com a hanseníase *per se* e sua classificação operacional em uma população alagoana.

3.2 Objetivos específicos

- Construir um desenho do tipo caso-controle na hanseníase em uma população de Alagoas;
- Caracterizar as frequências genótípicas, alélicas e de carreadores de alelo dos SNPs rs4833095-*TLRI* e rs8057341-*NOD2* na população estudada;
- Investigar a associação dos SNPs caracterizados com a hanseníase através da comparação da distribuição de frequências em casos e controles;
- Investigar a associação dos SNPs do presente estudo com a classificação operacional dos pacientes;
- Realizar um estudo de revisão sistemática e meta-análise incluindo polimorfismos no gene *TLRI* e a associação com a hanseníase.

4. METODOLOGIA

4.1 População e desenho experimental

O presente trabalho caracteriza-se por um estudo de associação genética retrospectivo do tipo caso-controle realizado no município de Arapiraca no interior de Alagoas. Os pacientes recrutados para esse estudo foram diagnosticados no Centro de Referência Integrada de Arapiraca (CRIA), e adicionalmente pacientes que residem em Penedo e Santana do Ipanema também foram recrutados. A partir dos dados contidos nos prontuários de cada paciente foram coletadas informações sociodemográficas e clínicas, as quais foram agrupadas em uma planilha Excel do pacote Microsoft Office 2013. Depois da coleta de informações, todos os pacientes foram agrupados de acordo com forma clínica seguindo os critérios da classificação de Madri (Indeterminada, Tuberculóide, Dimorfa e Virchowiana) e a classificação operacional foi a sugerida pela OMS, sendo multibacilar (MB) e paucibacilar (PB). O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis, sem histórico de doenças infecciosas provenientes de Alagoas, que iam realizar a doação de sangue no Hemocentro de Alagoas Unidade Arapiraca (Hemoal Arapiraca). Às idas ao CRIA foram feitas nos dias de atendimento para os pacientes com hanseníase (terças e quintas-feiras), e as coletas de amostras foram realizadas no período de 14/09/2017 até 27/05/2021; no Hemoal (Arapiraca) as coletas foram feitas às quartas, quintas e sextas-feiras durante 17/04/2018 e 07/02/2020. Os pacientes de Santana do Ipanema e Penedo foram recrutados entre os dias 07/05/2019 e 27/11/2019, quando também foram realizadas as coletas de amostras. Todos os indivíduos foram informados sobre os objetivos da pesquisa e os que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o fornecimento da amostra biológica.

4.2 Coleta do material biológico

Dos indivíduos que aceitaram participar do estudo foram coletados aproximadamente 4mL de sangue total periférico um tubo de coleta à vácuo que foi destinado à extração de DNA (tubo com EDTA). As coletas de sangue foram realizadas por enfermeiros e enfermeiras responsáveis em cada um dos locais de recrutamento. Após a escolha do local a ser punccionado foi feita assepsia com álcool 70% e em seguida realizada a punção venosa. Todas as amostras foram etiquetadas e possuíam informações como o ID (número de identificação no banco de dados do estudo), abreviação do nome, sexo, data de nascimento, data de coleta e local. Cada amostra identificada foi acondicionada em recipiente térmico para a manutenção

da temperatura durante o transporte até o Laboratório de Biologia Molecular e Genética na Universidade Federal de Alagoas *campus* Arapiraca.

4.3 Extração de DNA

As amostras de sangue de pacientes e controles foram extraídas a partir do método de *salting-out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988) com algumas modificações (Apêndice A). Essa etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Genética.

Após a extração todas as amostras foram avaliadas quanto a sua pureza e qualidade pelo método de quantificação de ácidos nucleicos através da medição da razões de absorbância nos comprimentos de onda 260nm e 280nm (nanômetro) no equipamento BioMate 3S Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) e em seguida armazenada em um freezer a -20 °C.

4.4 Genotipagem

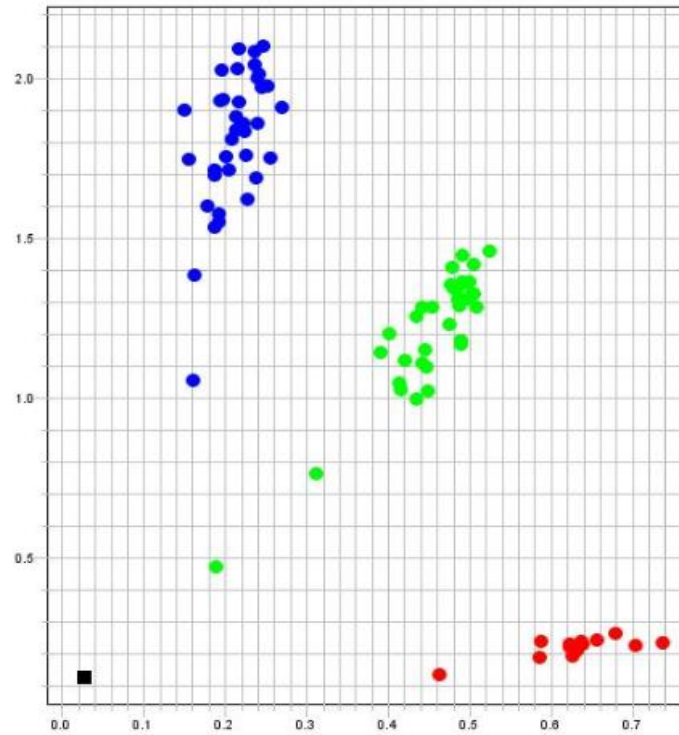
Os SNPs dos genes *TLRI* (rs4833095) e *NOD2* (rs8057341) foram genotipados aplicando a técnica de discriminação alélica por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. A escolha desses SNPs se deu pelo envolvimento dos mesmos com a hanseníase em várias populações, incluindo o Brasil (DE SALES MARQUES *et al.*, 2013; LETURIONDO *et al.*, 2020). Esses genes codificam para receptores da resposta imune inata e ativação de vias efetoras que são essenciais na defesa contra o *M. leprae* (JOHNSON *et al.*, 2007; SCHENK *et al.*, 2012).

Nesse ensaio são utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada alelo do gene que está se investigando, a inferência dos genótipos foi baseada na intensidade de fluorescência como mostra a Figura 7A e B. Em todas as reações foram utilizadas um controle negativo (reação feita apenas com os reagentes para verificar possível contaminação, sem a adição de DNA). A técnica de PCR utiliza sondas que emitem fluorescência para cada alelo específico, na Figura 7A e B podemos observar vários pontos com três cores distintas, onde cada ponto representa um indivíduo e cada cor determina o genótipo que cada pessoa amplificou, a cor azul mostra homozigose para o alelo 1, o verde significa que o sujeito é heterozigoto e o vermelho é homozigoto para o alelo 2. O quadrado preto representa o controle negativo.

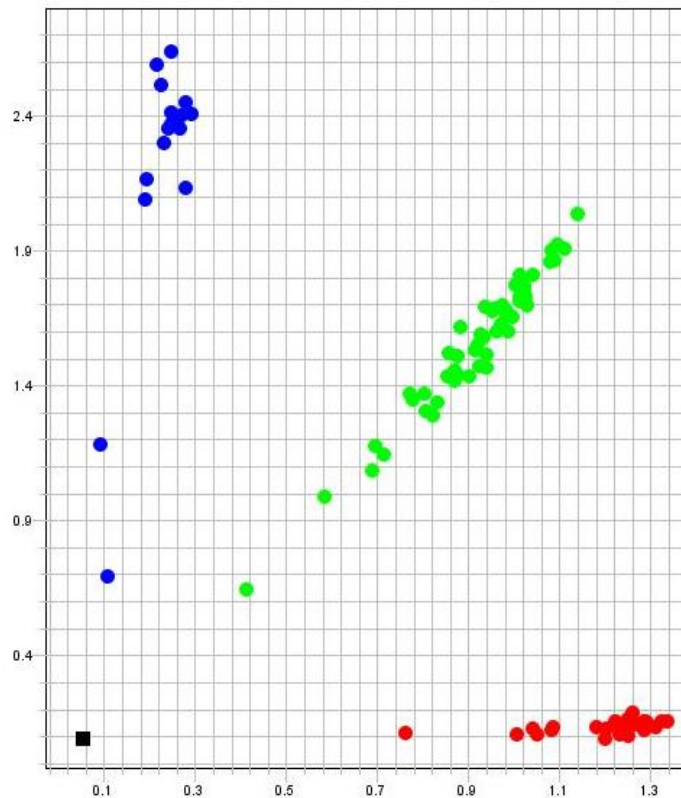
As reações de PCR em tempo real foram realizadas por meio do ensaio com sondas *TaqMan* (Applied Biosystems) de acordo com instruções sugeridas pelo fabricante, e as amplificações foram executadas no equipamento StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) do Laboratório de Biologia Molecular e Genética.

Figura 7 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real por discriminação alélica.

A



B



Fonte: dados da autora, 2021.

Nota: (A) discriminação alélica do SNP rs8057341 (gene *NOD2*), mostrando os genótipos CC (azul), TT (vermelho) e CT (verde); (B) discriminação alélica do SNP rs4833095 (gene *TLRI*), mostrando os genótipos TT (azul), CC (vermelho) e TC (verde). O quadrado preto representa o controle negativo da reação.

4.5 Análise de dados

As frequências genótípicas nos genes *TLRI* (rs4833095) e *NOD2* (rs8057341) em pacientes e controles foram avaliadas quanto a desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de qui-quadrado (χ^2). Foi-se comparado a frequência alélica, genotípica e a de carreadores de alelo (incluindo heterozigotos e homozigotos) entre os seguintes grupos de comparação: i) casos (com hanseníase) *versus* controles (sem hanseníase); ii) forma clínica operacional MB *versus* PB. A razão de chance (OR, do inglês *Odds Ratio*), e o intervalo de confiança de 95% foram calculados considerando os valores de OR <1 para proteção e >1 para risco. Para os resultados obtidos o valor de p foi estimado e valores menor do que 0,05 foram tidos como estatisticamente significativos.

Todas as análises de associação foram feitas através do ambiente R, versão 1.4.1717 para Windows utilizando os pacotes “genetics” e “SNPassoc”.

4.6 Aspectos Éticos

O presente estudo possui aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas sob o parecer número: 3.213.273 (Anexo B).

4.7 Revisão Sistemática

Com o intuito de realizar uma meta-análise dos SNPs investigados nesse estudo foi realizada uma revisão sistemática. Embora o presente projeto também contemple o gene *NOD2*, os resultados obtidos para referido gene não foram suficientes para inferir resultados com alguma significância para a realização da meta-análise (dados não mostrados), então apenas polimorfismos no gene *TLR1* compuseram a revisão. A pesquisa seguiu o roteiro proposto em Preferred Reporting of Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) de 2020 (PAGE *et al.*, 2021) que se encontra detalhado no Anexo C. Dois autores foram responsáveis por fazer a busca independentemente e aplicar os critérios de inclusão e exclusão e selecionar os estudos de interesse. A pesquisa foi realizada durante o período de 17 de junho de 2020 até 27 de junho do mesmo ano e atualizadas no dia 13 de fevereiro de 2021, as bases de dados utilizadas para resgatar os artigos publicados foram PubMed, Scopus, ScienceDirect e LILACS, utilizando uma combinação das palavras-chave “leprosy”, “mycobacterium leprae”, “toll-like receptor 1”, “TLR1”, e “polymorphism” em conjunto com os operadores Booleanos (APÊNDICE B). Para a inclusão na meta-análise os artigos deviam ser escritos na língua inglesa e realizado estudo de caso-controle com polimorfismo no gene *TLR1*, além disso possuir a frequência dos genótipos em ambos os grupos para se calcular a OR. Os estudos excluídos foram aqueles que não eram artigos científicos (ex.: monografia, capítulo de livro), revisões, que não eram caso-controle, artigos sem a frequência genotípica e duplicatas.

Para a meta-análise foi estimada a *Odds ratio* (OR) e seu intervalo de confiança 95% da junção de todos os estudos incluídos depois da filtragem pelos critérios de inclusão e exclusão e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A heterogeneidade foi medida e, também se usou o ponto de corte com $p < 0,05$ para resultados estatisticamente significativos, além disso, a inconsistência (I^2) foi obtida para quantificar a variabilidade dos estudos e aumentar a avaliação da heterogeneidade, o resultado é expresso em porcentagem e quanto maior o número mais heterogênea é a população. Para testar a sensibilidade foi retirado um estudo de cada vez para identificar o impacto que cada trabalho

apresentou na junção das ORs. Para essas estatísticas foi utilizado o ambiente R versão 1.4.1717 para Windows utilizando o pacote “meta” versão 4.8-1 e “metafor” versão 1.9-9.

5. RESULTADOS

A amostra desse estudo foi composta por 424 indivíduos alagoanos (159 casos e 265 controles), sendo 157 (37%) do sexo feminino e 267 (63%) do sexo masculino. As idades e informações clínicas de cada paciente foram obtidas no dia de seu diagnóstico e a dos controles, no dia que em foi realizada a coleta do material biológico. A idade mínima dos pacientes foi de 10 anos e a máxima de 85, com média de 48,8 anos ($\pm 16,4$). A média de idade do grupo controle foi de 32,8 ($\pm 11,6$) anos com idade máxima de 64 e mínima de 16 anos. A partir dos dados disponíveis que foram resgatados dos prontuários no CRIA, a maioria dos pacientes (73,6%) apresentaram a forma mais avançada da doença, multibacilar (MB), e 15,1% foram classificados como paucibacilares (PB). A forma clínica mais representada foi a dimorfa com 37,1% de pacientes e a que apresentou a menor porcentagem foi indeterminada com 3,1%. As informações mais detalhadas dos pacientes e controles são encontradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequência de variáveis populacionais de ambos os grupos de indivíduos incluídos no estudo e frequência das informações clínicas do grupo casos.

Variáveis	Casos (N=159)		Controles (N=265)	
	n	%	n	%
Sexo				
Masculino	98	61,6	169	63,8
Feminino	61	38,4	96	36,2
Faixa etária				
Média	47,8		32,8	
(± DP)	(±16,4)		(±11,6)	
7 a 14 anos	3	1,9	0	0
15 a 29 anos	17	10,7	119	45
30 a 54 anos	70	44	133	50,2
>55 anos	55	34,6	12	4,5
Sem informação	14	8,8	1	0,3
Classificação operacional				
Paucibacilar (PB)	24	15,1	-	-
Multibacilar (MB)	117	73,6	-	-
Sem informação	18	11,3	-	-
Forma Clínica				
Indeterminada	5	3,1	-	-
Tuberculóide	18	11,3	-	-
Dimorfa	59	37,1	-	-
Virchowiana	42	26,4	-	-
Sem informação	35	22	-	-

Fonte: dados do autor, 2021

Nota: DP: desvio padrão.

O teste de χ^2 foi feito para avaliar a frequência alélica e genotípica dos dois polimorfismos investigados na população do estudo quanto ao desvio no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e resultou nos seguintes valores para o SNP *TLR1* (rs4833095) $\chi^2= 0,31$ ($p=0,57$) e para o SNP *NOD2* (rs8057341) $\chi^2= 0,22$ ($p=0,63$) no grupo controle. Os resultados não significativos indicam que na população ambos os SNPs não desviaram do EHW e estavam dentro dos preceitos propostos. Para a realização da etapa de genotipagem foi

utilizado o DNA extraído de todos os indivíduos do presente estudo para ambos os SNPs, além disso, devido a perdas acarretadas pelo não funcionamento de algumas reações, em cada SNP pode haver diferenças quanto ao número total de indivíduos que foram genotipados tendo em vista que a genotipagem obteve um sucesso de aproximadamente 95%. A qualidade do material genético foi verificada e os valores das razões 260/280 foram próximos de 1,8, valor que indica grau de pureza das amostras, ademais, a concentração do DNA variou entre 2ng/uL e 600 ng/mL (dados não mostrados).

5.1 Frequência alélica e genotípica do SNP *TLRI* (rs4833095)

As frequências genotípicas e a associação genética para o SNP *TLRI* (rs4833095) em casos e controles se encontram detalhadas na Tabela 3. A análise da frequência alélica mostrou que o alelo C foi mais presente na amostra populacional Alagoana, com 57,5% (N=291). Quando observado a frequência genotípica nos grupos, notou-se a predominância de TC tanto nos casos (55,1%) quanto nos controles (51,0%). O genótipo menos representativo nos grupos foi o TT, estando presente em 17,3% dos casos e 17,0% dos controles. Não foi observada associação do alelo C com a Hanseníase, mesmo com correção para a covariável sexo, e ambos apresentaram o mesmo resultado (OR= 0,90; IC 95% 0,60-1,35, $p= 0,63$). Na análise dos genótipos, não foi obtido resultado significativo de associação com a Hanseníase para o genótipo CC (OR= 0,84; IC 95% 0,46-1,55; $p= 0,58$), bem como para o TC (OR= 1,06 IC 95% 0,61-1,84; $p= 0,83$). Quando ajustado para covariável sexo os resultados permaneceram sem significância estatística para os genótipos (Tabela 3).

Foram também obtidas as frequências dos carreadores do alelo C, ou seja, homozigotos e heterozigotos que possuem o alelo menos frequente, e avaliada sua associação com a Hanseníase. Os casos exibiram 82,7% de carreadores de C e os controles 83%, o que refletiu em uma ausência de associação com a Hanseníase (OR= 0,97; IC 95%= 0,57-1,66; $p= 0,93$), e que se manteve mesmo após ajuste para sexo (OR= 0,97; IC 95%= 0,57-1,66; $p= 0,93$). Os resultados para as análises do SNP rs4833095 estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição das frequências genótípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs4833095 no gene *TLRI* em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.

Genótipos	N (frequência %)		OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)*	p*
	Casos (n= 156)	Controles (n= 253)				
TT	27(17,3)	43 (17,0)			Referência	
TC	86 (55,1)	129 (51,0)	1,06 (0,61-1,84)	0,83	1,06 (0,61-1,84)	0,82
CC	43 (27,6)	81 (32,0)	0,84 (0,46-1,55)	0,58	0,84 (0,46-1,55)	0,58
Alelo T	140 (44,9)	215 (42,5)			Referência	
Alelo C	172 (55,1)	291 (57,5)	0,90 (0,60-1,35)	0,63	0,90 (0,60-1,35)	0,63
Carreador de C	129 (82,7)	210 (83,0)	0,97 (0,57-1,66)	0,93	0,97 (0,57-1,66)	0,93
EHW		$\chi^2= 0,31$ $p= 0,57$				

Fonte: dados da autora, 2021

Nota: EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. OR: odds ratio. IC: intervalo de confiança. p: valor de p. χ^2 : qui-quadrado. *Valores ajustados para co-variável de sexo.

5.2 Frequência alélica e genotípica do SNP *NOD2* (rs8057341)

Na Tabela 4 é evidenciada a distribuição dos genótipos do SNP rs8057341 no gene *NOD2* nos grupos de pacientes e controles. O alelo que se mostrou mais predominante na amostra da população de Alagoas foi o C (66,9%, N= 352). O genótipo CC apresentou maior frequência nos controles e mostrou-se em 45,6%, já o genótipo CT foi mais frequente nos casos estando presente em 45,8% do grupo. TT foi o genótipo menos frequente e foi observado em 9,7% nos casos e 11,8% em controles. Não obtivemos associação com a hanseníase para o alelo T, onde OR= 0,97 (IC 95% 0,64-1,49), $p= 0,91$, mesmo após ajuste para sexo (OR= 0,98; IC 95% 0,64-1,49; $p= 0,92$). Nos resultados da análise de associação genotípica não foi observada significância estatística para o genótipo CT (OR= 1,10; IC 95% 0,72-1,67; $p= 0,64$) e nem para o TT (OR= 0,84; IC 95% 0,42-1,66; $p= 0,62$). Após a correção os valores se mantiveram similares ao do modelo sem ajuste e não houve alteração no nível de

significância para o genótipo CT (OR= 1,10; IC 95% 0,72-1,68; $p= 0,64$), e TT (OR= 0,84; IC 95% 0,42-1,68; $p= 0,63$).

Quando analisado os carreadores de T, frequências semelhantes foram encontradas nos dois grupos (55,5% nos casos e 54,4% nos controles), e a análise de associação para os carreadores revelou ausência de associação com a hanseníase (OR= 1,04; IC 95%= 0,70-1,55; $p= 0,82$). Após a correção para sexo, ausência de associação se manteve (OR= 1,04; IC 95%= 0,70-1,56; $p= 0,81$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição das frequências genótípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs8057341 no gene *NOD2* em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.

Genótipos	N (frequência %)		OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)*	p^*
	Casos (n= 155)	Controles (n= 263)				
CC	69 (44,5)	120 (45,6)				Referência
CT	71 (45,8)	112 (42,6)	1,10 (0,72-1,67)	0,64	1,10 (0,72-1,68)	0,64
TT	15 (9,7)	31 (11,8)	0,84 (0,42-1,66)	0,62	0,84 (0,42-1,68)	0,63
Alelo C	209 (67,4)	352 (66,9)				Referência
Alelo T	101(32,6)	174 (33,1)	0,97 (0,64-1,49)	0,91	0,98 (0,64-1,49)	0,92
Carreador de T	86 (55,5)	143 (54,4)	1,04 (0,70-1,55)	0,82	1,04 (0,70-1,56)	0,81
EHW		$\chi^2= 0,22$ $p= 0,63$				

Fonte: dados da autora, 2021

Nota: EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. OR: odds ratio. IC: intervalo de confiança. p : valor de p . χ^2 : qui-quadrado. *Valores ajustados para co-variável de sexo.

5.3 Associação genética dos SNPs de acordo com a forma clínica operacional

5.3.1 SNP rs4833095 no gene *TLRI*

As frequências genótípicas, alélicas e de carreadores do alelo menos frequente para o SNP rs4833095 (*TLRI*) e sua associação com a classificação operacional (paucibacilar *versus* multibacilar) são mostradas na Tabela 5. O alelo C se apresentou na frequência de 58,3% dos pacientes PB, e em 55,3% dos pacientes MB. O genótipo TC esteve presente em 58,3% dos paucibacilares e em 54,4% dos multibacilares. TT foi o genótipo menos frequente em ambos os grupos, e os pacientes paucibacilares apresentaram uma menor frequência desse genótipo quando comparado com os multibacilares (12,5%, e 17,5%, respectivamente). Considerando as comparações de frequências entre MB *versus* PB, a nível alélico não houve associação estatisticamente significativa entre o alelo C e a hanseníase MB (OR= 0,88; IC 95% 0,36-2,15; $p= 0,78$), resultado que se manteve similar mesmo após o ajuste para covariável sexo (OR= 0,86; IC 95% 0,34-2,16, $p= 0,76$). No modelo genotípico também não foi observada associação do genótipo TC com a forma MB (OR= 0,66; IC 95% 0,17-2,54; $p= 0,55$), e nem do genótipo CC (OR= 0,68; IC 95% 0,15-2,96; $p= 0,61$). O resultado no modelo genotípico sem manteve sem associação após o ajuste (TC: OR= 0,66; IC 95% 0,16-2,66; $p= 0,56$ e CC: OR= 0,65; IC 95% 0,14-2,95; $p= 0,58$.)

A frequência de carreadores do alelo C foi de 87,5% para os paucibacilares e de 82,4% para os multibacilares. Essa diferença refletiu em valores de OR indicativos de proteção, que, no entanto, não exibiram significância estatística (OR= 0,67, IC 95% 0,18-2,46, $p= 0,54$), mesmo após correção para sexo (OR= 0,66; IC 95% 0,17-2,53; $p= 0,54$) (Tabela 5).

5.3.2 SNP rs8057341 no gene *NOD2*

Para o SNP no gene *NOD2* (rs8057341) foi observada uma maior frequência do alelo C em ambos os grupos PB e MB, com frequências de e os valores foram 66,7% e 68,1%, respectivamente. O genótipo CT foi numericamente mais frequente em multibacilares (46,0%) do que em paucibacilares (41,7%) enquanto o genótipo o TT apresentou-se com uma frequência de 12,5% em PB e de 8,9% em MB. Nos resultados obtidos de associação genética no modelo alélico não foi observada associação do alelo T com a forma clínica MB (OR= 0,93; IC 95% 0,36-2,38; $p= 0,88$) e depois do ajuste para sexo os valores permaneceram sem indicar associação (OR= 0,86; IC 95% 0,32-2,27; $p= 0,76$). A análise genotípica também não

resultou em associação com a hanseníase MB para o genótipo CT: OR= 1,12; IC 95% 0,43-2,86; $p= 0,81$) e nem para o CC (OR= 0,71; IC 95% 0,16-3,05; $p= 0,65$), mesmo após o ajuste para sexo: CT (OR= 1,10; IC 95% 0,41-2,91; $p= 0,84$) e CC (OR= 0,65; IC 95% 0,14-2,95; $p= 0,58$) (Tabela 5).

Foram encontradas frequências semelhantes dos carreadores do alelo T em ambos os grupos, 54,1% em paucibacilares e 54,8% em multibacilares. Na análise de associação não foi encontrado resultado significativo no modelo sem ajuste para sexo (OR= 1,02; IC 95% 0,42-2,49; $p= 0,95$), e nem no modelo com ajuste (OR= 0,97; IC 95% 0,38-2,42; $p= 0,95$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição das frequências genótípicas, alélicas e carreadores de alelo em pacientes paucibacilares e multibacilares nos SNPs rs4833095-*TLR1* e rs8057341-*NOD2*.

	Genótipos	N (frequência %)		OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)*	<i>p</i> *
		Paucibacilar (n= 24)	Multibacilar (n= 114)				
rs4833095 (<i>TLR1</i>)	TT	3 (12,5)	20 (17,5)			Referência	
	TC	14 (58,3)	62 (54,4)	0,66 (0,17-2,54)	0,55	0,66 (0,16-2,66)	0,56
	CC	7 (29,2)	32 (28,1)	0,68 (0,15-2,96)	0,61	0,65 (0,14-2,95)	0,58
	Alelo T	20 (41,7)	102 (44,7)			Referência	
	Alelo C	28 (58,3)	126 (55,3)	0,88 (0,36-2,15)	0,78	0,86 (0,34-2,16)	0,75
	Carreadores de C	21 (87,5)	94 (82,4)	0,67 (0,18-2,46)	0,54	0,66 (0,17-2,53)	0,54
rs8057341 (<i>NOD2</i>)	CC	11 (45,8)	51 (45,1)			Referência	
	CT	10 (41,7)	52 (46,0)	1,12 (0,43-2,86)	0,81	1,10 (0,41-2,91)	0,84
	TT	3 (12,5)	10 (8,9)	0,71 (0,16-3,05)	0,65	0,54 (0,11-2,49)	0,43
	Alelo C	32 (66,7)	154 (68,1)			Referência	
	Alelo T	16 (33,3)	72 (31,9)	0,93 (0,36-2,38)	0,88	0,86 (0,32-2,27)	0,76
	Carreadores de T	13 (54,1)	62 (54,8)	1,02 (0,42-2,49)	0,95	0,97 (0,38-2,42)	0,95

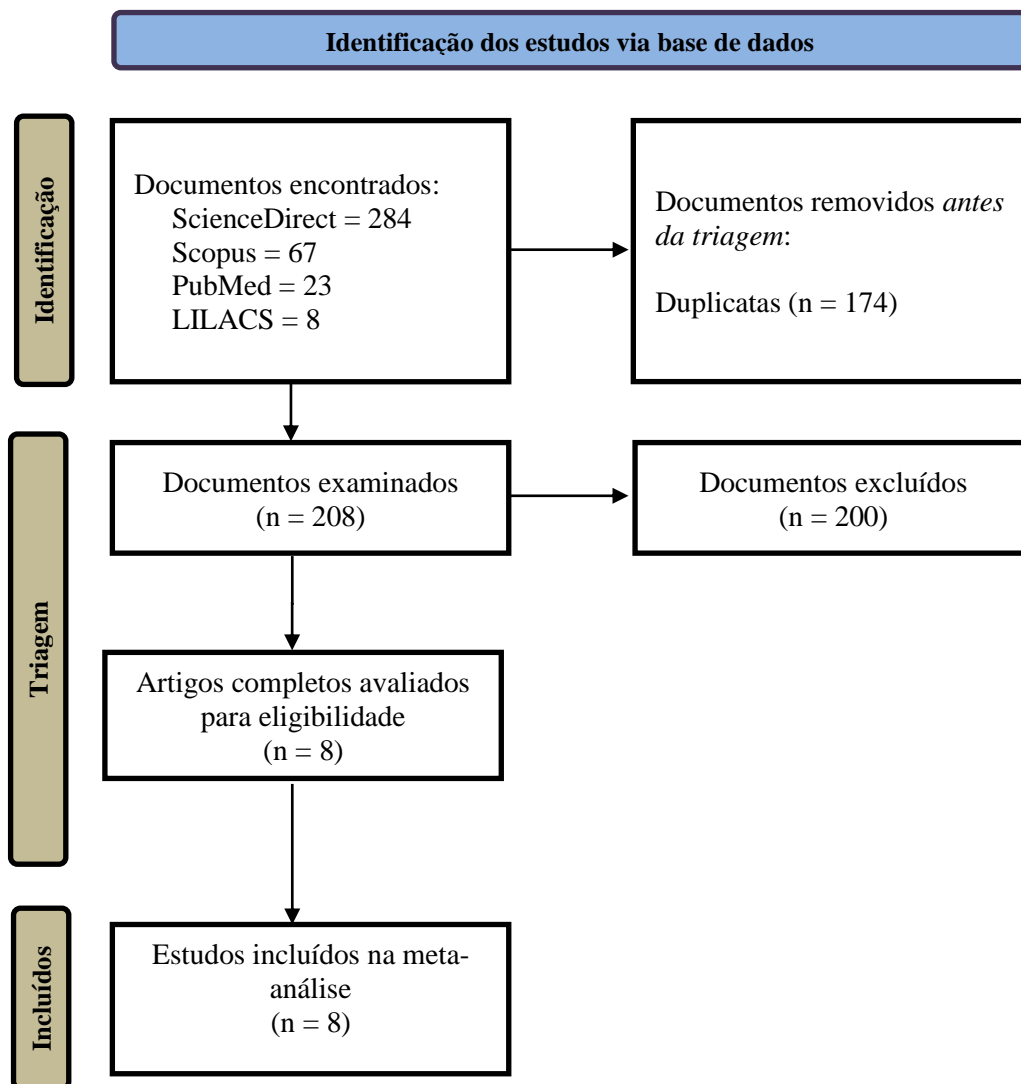
Fonte: dados da autora, 2021.

Nota: OR: odds ratio. IC: intervalo de confiança. *p*: valor de *p*. χ^2 : qui-quadrado. *Valores ajustados para co-variável de sexo.

5.4 Revisão da literatura e meta-análise

A busca por artigos publicados na literatura não restringiu a apenas o polimorfismo investigado nesse estudo e com isso, resultou em 382 documentos encontrados. Quando aplicados os critérios de inclusão e exclusão restaram oito artigos dos quais foram extraídas suas informações (Figura 8).

Figura 8 – Fluxograma da seleção dos estudos que compuseram a meta-análise.



Fonte: dados da autora, 2021.

Dentre os estudos incluídos na análise, seis avaliaram o SNP rs4833095 (T743C) e quatro o rs5743618 (C1805A), sendo que alguns autores investigaram dois polimorfismos. A Tabela 5 e 6 reúne informações das frequências genotípicas e alélicas e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg do grupo controle de cada população nos dois SNPs achados.

O estudo mais antigo foi o de Johnson e colaboradores (2007) no polimorfismo rs5743618 em uma população da Turquia envolvendo 147 indivíduos o qual indicou que o alelo C tinha um efeito protetivo nessa população. Na população da Índia foram investigados os dois SNPs que mostraram diferentes resultados, enquanto o rs4833095 se mostrou associado ao desenvolvimento de hanseníase (SURYADEVARA *et al.*, 2017), foi visto que o rs5743618 leva à proteção (WONG *et al.*, 2010a), corroborando com os achados de Johnson e colaboradores (2007). Leturiondo e colaboradores (2020) foi o estudo mais recente encontrado na busca pelas bases de dados, os pesquisadores investigaram vários polimorfismos em genes importantes para o desfecho da hanseníase em uma população do estado do Amazonas no Brasil, incluindo o *TLRI* (rs4833095), embora tenha-se observado uma tendência para o risco de desenvolvimento da hanseníase, o valor de p não foi estatisticamente significativo.

No Brasil, os dois polimorfismos foram investigados em populações do Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, e apresentam resultados conflitantes. O estudo de Sales-Marques e colaboradores (2013) que avaliou a associação do SNP rs4833095 combinou três populações de estados diferentes, o que somou 2.435 indivíduos, e seus resultados mostraram susceptibilidade à hanseníase, entretanto, um estudo na população de Minas Gerais mostrou um efeito protetivo em indivíduos do sexo feminino (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018).

Quanto aos valores para desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos indivíduos saudáveis que compuseram o grupo controle todos apresentaram um valor de $p > 0,05$ em todas as populações e se mostraram em consonância com as premissas postuladas pelo EHW.

Tabela 6 – Frequências alélicas e genotípicas e odds ratio com valor de *p* do SNP rs4833095 no gene *TLRI* das populações que compuseram a revisão sistemática.

População		Schuring <i>et al.</i> , 2009	Sales-Marques <i>et al.</i> , 2013	Santana <i>et al.</i> , 2017	Suryadevara <i>et al.</i> , 2017	Niitsuma <i>et al.</i> , 2018	Leturiondo <i>et al.</i> , 2020
		Bangladesh/Índia	SP/RJ/MT/Brasil	BA/Brasil	Telangana/Índia	MG/Brasil	Amazonas/Brazil
Pacientes N (%)	TT	212 (25)	313 (21,8)	60 (18,5)	7 (3)	59 (25,2)	102 (25)
	TC	352 (42)	667 (46,4)	148 (45,5)	45 (19, 6)	129 (55,1)	207 (50)
	CC	278 (33)	456 (31,8)	117 (36)	178(77,4)	46 (19,7)	103 (25)
	Total	842	1,436	362	230	234	412
	T	776 (46)	1,293 (45)	268 (41,2)	59(12,8)	247 (52,8)	411 (49,9)
	C	908 (54)	1,579(55)	382 (58,8)	401(87,2)	221 (47,2)	413 (50,1)
	Carreadores de C	630	1,123	265	223	175	310
Controles N (%)	TT	136 (25)	354 (26)	44 (13,4)	7 (3)	68 (29,2)	213 (22)
	CT	261 (48)	659 (49)	163 (49,5)	73 (31,8)	107 (45,9)	482 (50)
	CC	146 (27)	340 (25)	122 (37,1)	150 (65,2)	58 (24,9)	261 (27)
	Total	543	1,353	368	230	233	956
	T	533 (49)	1,367 (51)	251 (38,1)	87(19)	243 (52,2)	908 (47,5)
	C	553 (51)	1,339 (49)	407 (61,9)	373(81)	223 (47,8)	1,004 (52,5)
	Carreadores de C	407	999	285	223	165	743
	EHW	p= 0,346	p=0,343	p=0,365	p=0,597	p=0,222	p= 0,785

(Continua)

(Conclusão)

Tabela 5 – Frequências alélicas e genótípicas e odds ratio com valor de p do SNP rs4833095 no gene *TLRI* das populações que compuseram a revisão sistemática.

Casos vs. Controles	OR (IC 95%) p	OR=1,34 (1,06–1,70) p= sem valor	OR= 1,39 (1,12–1,72) p=0,03	OR=0,703 (0,44-1,11) p=0,137	OR=1,86 (1,21-2,75) p=0,003	OR= 0,54 (0,32-0,91) p=0,02	OR=1,13 (0,86–1,47) p= 0,377
Tipo de estudo		Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle

Fonte: dados da autora, 2021.

Nota: MG: Minas Gerais. BA: Bahia. SP: São Paulo. RJ: Rio de Janeiro. MT: Mato Grosso. EHW: Equilíbrio de Hardy-Weiberg. Os valores estão expressos como N (frequência %).

Tabela 7 – Frequências alélicas e genotípicas e odds ratio com valor de *p* do SNP rs5743618 no gene *TLR1* das populações que compuseram a revisão sistemática.

População	Jonhson <i>et al.</i> , 2007		Wong <i>et al.</i> , 2010		Sales-Marques <i>et al.</i> , 2013	Suryadevara <i>et al.</i> , 2017	
	Turquia	Nova Delhi/Índia	Calcutá/Índia	Nova Delhi/Calcutá	SP/Brasil	Telangana/Índia	
Pacientes N (%)	AA	32 (56)	193 (92,3)	157 (93,4)	350 (92,8)	171(38)	195(84,7)
	AC	20 (35)	16 (7,7)	10 (6)	26 (6,9)	213(47)	35(15,2)
	CC	5 (9)	0 (0)	1 (0,6)	1 (0,3)	68(15)	0(0)
	Total	57	209	168	377	452	230
	A	84 (73,7)	402 (96,2)	324 (96,7)	726 (96,4)	555(61)	425(92,4)
	C	30 (26,3)	16 (3,8)	11 (3,3)	28 (3,6)	349(39)	35(7,6)
	Carreadores de C	25	16	11	27	281	35
Controles N (%)	AA	33 (37)	184 (77)	109 (83,2)	293 (79,2)	133(35)	189(82,1)
	AC	37 (41)	48 (20,1)	22 (16,8)	70 (18,9)	191(50)	38(16,5)
	CC	20 (22)	7 (2,9)	0 (0)	7 (1,9)	55(15)	3(1,3)
	Total	90	239	131	370	379	230
	A	103 (57,2)	416 (88,3)	240 (91,6)	656 (88,6)	457(60)	416(90,4)
	C	77 (42,8)	55 (11,7)	22 (8,4)	84 (11,4)	301(40)	44(9,6)
	Carreadores de C	57	55	22	77	246	41
EHW	p= 0,128	p=0,08	p= 0,294	p=0,248	p=0,306	p=0,494	

(Continua)

(Conclusão)

Tabela 6 – Frequências alélicas e genotípicas e odds ratio com valor de p do SNP rs5743618 no gene *TLRI* das populações que compuseram a revisão sistemática.

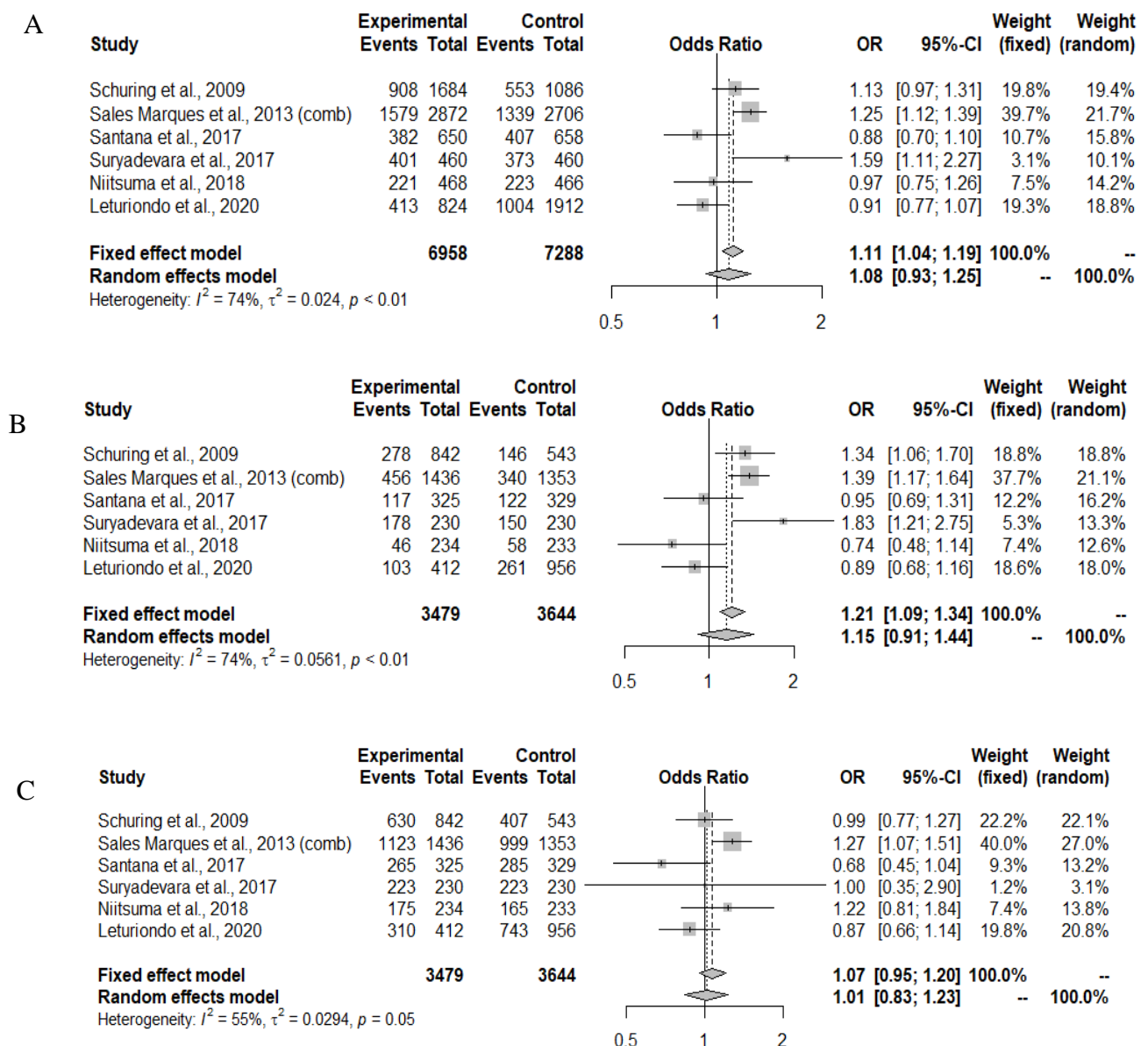
Casos vs. Controles	OR [IC 95% p.]	OR=0,48 (0,29–0,80) p=0,017	OR= 0,27 (0,15-0,47) p= 1,3x10⁻⁶	OR= 0,40 (0,20-0,83) p= 0,012	OR=0,31 (0,20-0,48) p=5,7x10⁻⁸	OR= 0,88 (0,66-1,18) p= 0,42	OR=1,2 (0,73-1,98) p= 0,45
Tipo de estudo		Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle

Fonte: dados da autora, 2021

Nota: SP: São Paulo. EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores estão expressos como N (frequência %).

Na análise estatística para a meta-análise do SNP rs4833095 no gene *TLR1* foram incluídas populações de seis estudos, no entanto, nenhuma associação com a hanseníase foi encontrada investigando o alelo C (OR= 1,08 [IC 95% 0,93-1,25], $p= 0,32$), o genótipo CC (OR= 1,15 [IC 95% 0,91-1,44], $p= 0,23$) e carreador de C (OR= 1,01 [IC 95% 0,83-1,23], $p= 0,90$). Em todos os modelos pode-se observar uma heterogeneidade maior que 50% e com valor de $p \leq 0,05$ demonstrando uma grande diversidade populacional nos estudos investigados por esse motivo os resultados expostos foram através do efeito randômico. A representação gráfica de cada resultado se encontra nas Figuras 9A, 9B e 9C, respectivamente.

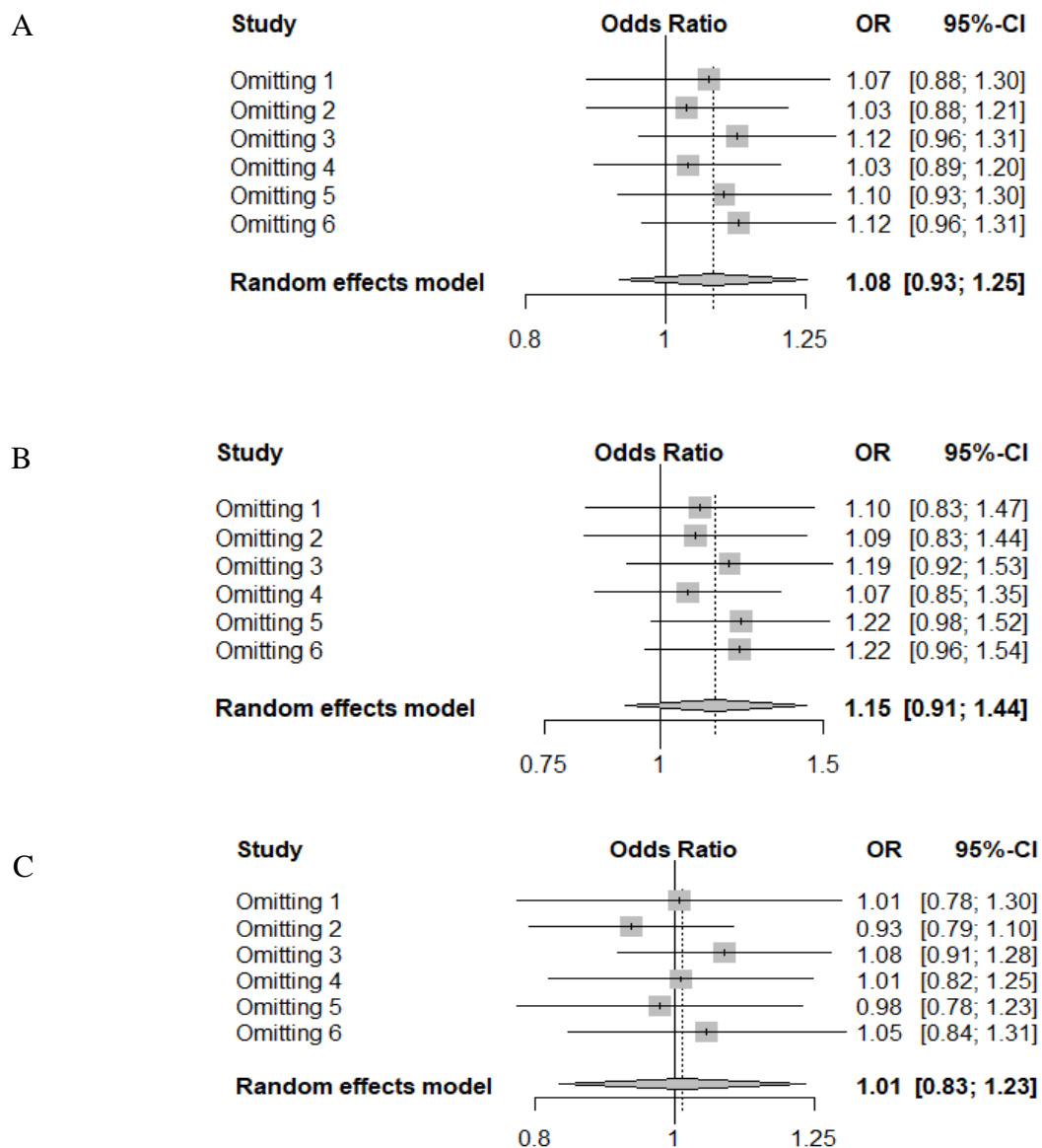
Figura 9 – Gráficos de floresta e teste de heterogeneidade dos estudos da meta-análise para o SNP rs4833095 do gene *TLR1* para o (A) alelo C, (B) genótipo CC e (C) carreador de C.



Fonte: dados da autora, 2021.

Quando omitido um estudo de cada vez na análise de sensibilidade para o alelo C, genótipo CC e carreador de C afim de observar o impacto que cada estudo incluído teria no resultado global das ORs também não foi exibida associação com a hanseníase (Figuras 10A, 10B e 10C, respectivamente). Indicando que independente de qual estudo foi removido o valor da OR consenso não sofre alteração.

Figura 10 – Gráficos de floresta do teste de sensibilidade referente a meta-análise nos estudos que investigaram o SNP rs4833095-TLRI. (A) alelo C, (B) genótipo CC e (C) carreador de C.

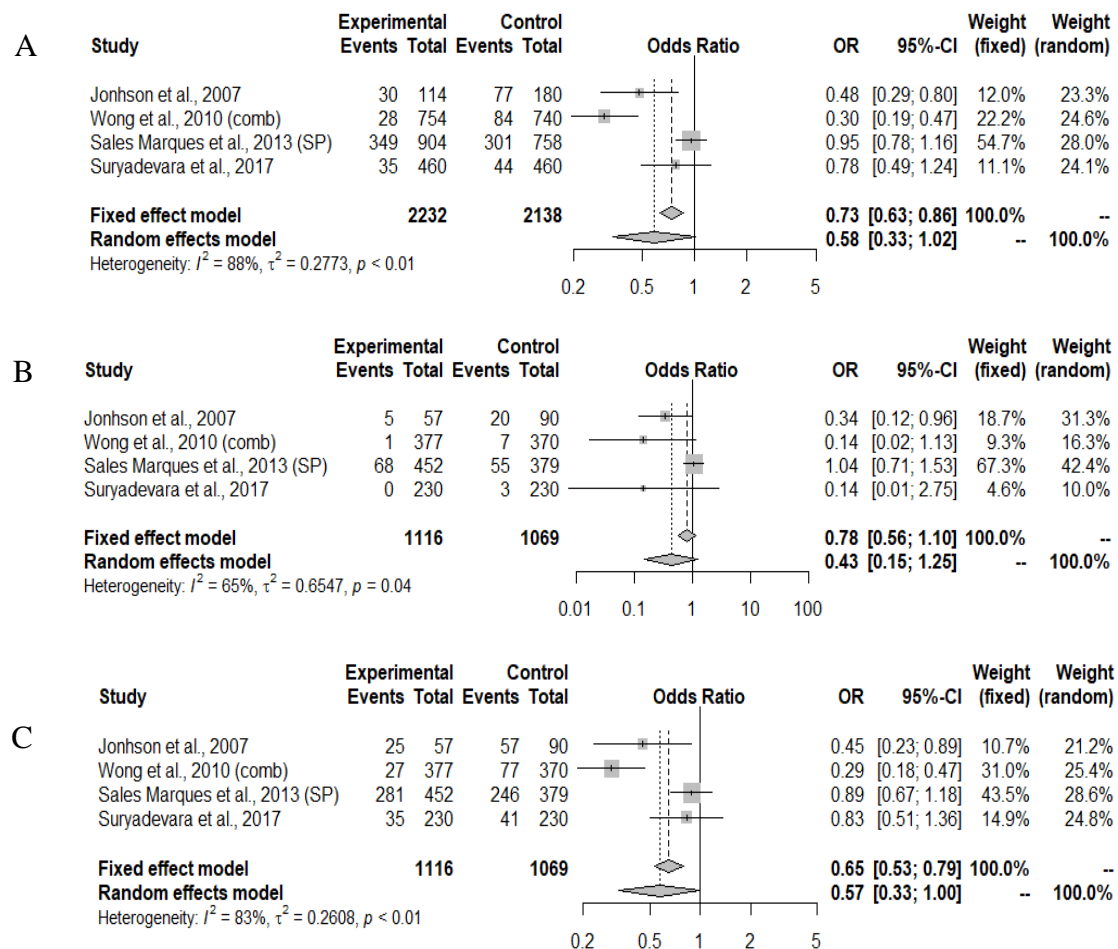


Fonte, dados da autora, 2021.

Resultados diferentes foram obtidos na análise do SNP rs5743618 através do efeito randômico, onde, para o alelo C já foi vista uma associação *borderline* para proteção à

hanseníase, com OR=0,58; IC 95% 0,33-1,02 e valor de $p=0,056$ (Figura 11A) e para os carreadores de C essa associação com efeito protetor foi confirmada exibindo uma OR= 0,57 (IC 95% 0,33-1,00; $p=0,048$) (Figura 11B). Nenhuma associação foi evidenciada na análise para o genótipo CC (OR= 0,43 [IC 95% 0,15-1,25], $p=0,12$) (Figura 11C). Em todos os modelos a heterogeneidade foi significativa apresentando valores de $p<0,05$ e sua porcentagem sendo maior que 50%.

Figura 11 – Gráficos de floresta e teste de heterogeneidade dos estudos da meta-análise para o SNP rs5743618 do gene *TLRI* para o (A) alelo C, (B) genótipo CC e (C) carreador de C.

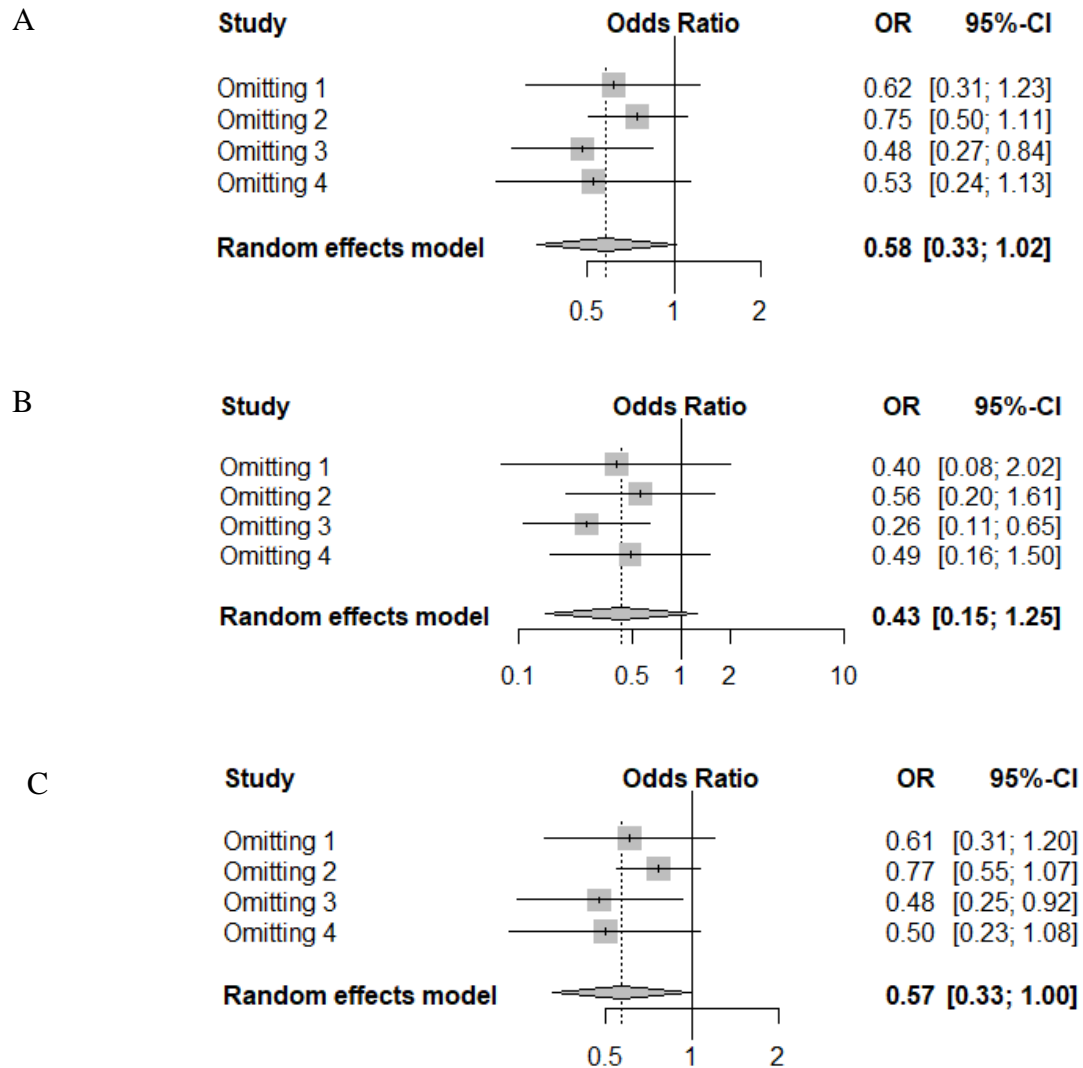


Fonte: dados da autora, 2021.

Omitindo o terceiro estudo (Sales Marques e colaboradores, 2013) o qual avaliou a influência do polimorfismo na população brasileira e possuía o maior tamanho amostral, obtivemos associação com proteção à hanseníase em todos os modelos genéticos investigados com valores de OR=0,48 (IC 95% 0,27-0,84; $p=0,010$) para o alelo C (Figura 12A), OR=0,26

(IC 95% 0,11-0,64; $p= 0,003$) para o genótipo CC (Figura 12B) e para os carreadores de C OR=0,47 (IC 95% 0,24-0,92; $p= 0,028$) (Figura 12C).

Figura 12 – Gráficos de floresta do teste de sensibilidade referente a meta-análise nos estudos que investigaram o SNP rs5743618-TLR1.



Fonte: dados da autora, 2021.

6. DISCUSSÃO

A hanseníase é considerada uma doença complexa pois não somente o ambiente desempenha um papel importante na infecção, sendo a genética do hospedeiro também essencial para entender sua fisiopatologia. Além disso muitos estudos já demonstraram a influência da genética em várias outras doenças infecciosas. Diante do exposto, estudos que investigam polimorfismos auxiliam na detecção de grupos de risco em diferentes populações e contribuem para o desenvolvimento de estratégias de prevenção (KELADA *et al.*, 2003). Nesse estudo foi avaliada a associação de polimorfismos nos genes *TLR1* (rs4833095) e *NOD2* (rs8057341) na susceptibilidade à risco ou proteção à hanseníase em uma população de Alagoas.

6.1 O SNP *TLR1* (rs4833095) e a hanseníase

Os Toll-like receptors (TLRs) são componentes imprescindíveis na formação da resposta imune inata contra micobactérias, pois possuem um vasto conjunto de mecanismos antibacterianos que são ativados mediante o reconhecimento do patógeno. O TLR1 pode ser encontrado em lesões dos dois polos da hanseníase, no entanto, com concentrações diferentes em razão da diferença de citocinas excretadas em cada polo. O primeiro estudo que mostrou a influência da expressão do TLR1 associados com uma doença foi o de Alexopoulou e colaboradores (2002), o identificou que indivíduos que apresentaram uma baixa frequência de TLR1 apresentaram poucos títulos de anticorpos contra uma lipoproteína que é necessária para a vacina contra a Doença de Lyme (KRUTZIK; MODLIN, 2004).

No presente estudo, não foram encontradas associações estatisticamente significativas para o polimorfismo rs4833095 no gene *TLR1* com a hanseníase. O alelo C apresentou frequências próximas entre casos e controles, 55,1% e 57,5%, respectivamente. O genótipo TC se apresentou numericamente mais frequente em casos (55,1%) do que em controles (51,0%), mas não refletiu em associação estatisticamente significativa. A frequência do alelo C na nossa amostra da população de Alagoas (controles) foi de 57,5%, corroborando com estudos realizados em populações brasileiras e indianas os quais apresentaram uma maior frequência do referido alelo em seus trabalhos (LETURIONDO *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2017; SCHURING *et al.*, 2009; SURYADEVARA *et al.*, 2017). Outras duas populações brasileiras apresentaram um resultado diferente e reportaram o alelo T sendo o mais frequente

em seus estudos (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; DE SALES MARQUES *et al.*, 2013).

O SNP rs4833095, que envolve a troca T743C a nível de gene é uma variante *missense* que resulta na troca de uma asparagina por uma serina na posição 248 a nível de proteína (N248S) causando a diminuição da resposta do receptor desencadeados por componentes bacterianos (OMUETI *et al.*, 2007; UCIECHOWSKI *et al.*, 2011). Estudos em várias populações já associaram esse polimorfismo com a hanseníase, na Índia dois pesquisadores investigaram o papel desse SNP e a doença. No estudo conduzido por Suryadevara e colaboradores (2017), o alelo C se encontrou mais frequente e foi observada uma associação com risco ao desenvolvimento de hanseníase quando comparado com os controles ($p=0,01$), nesse mesmo estudo o alelo T apresentou efeito protetor ($p=0,01$) se mostrando menos frequente nos pacientes. Os genótipos CC e TC foram associados com a hanseníase com valores de $p= 0,003$ e $p= 0,002$, conferindo risco e proteção respectivamente. Schuring e colaboradores (2009) não reportaram associação alélica com o desenvolvimento de hanseníase, no entanto, os autores observaram uma associação de pacientes com alelo C e o desenvolvimento de ENH (OR= 0,40 [IC 95% 0,16–0,99]). Quando verificada a associação dos genótipos com a hanseníase, ambos os estudos encontraram resultados semelhantes onde CC foi relacionado com risco (OR= 1,34 [IC 95% 1,06-1,70]) e o TC refletiu em proteção contra hanseníase (OR= 0,78 [IC 95% 0,63-0,96]).

Na população brasileira foram realizados estudos em três regiões distintas do país e com metodologias diferentes, ainda assim os resultados se mostram um pouco conflitantes. Em dois estudos recentes não foram encontradas associações do SNP rs4833095 com a hanseníase (LETURIONDO *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2017). Embora Santana e colaboradores (2017) não tenham observado associação, houve uma diferença nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40 e IL-17) excretadas nos genótipos, onde, pacientes carreadores de T (TC+TT) produziram uma grande quantidade quando comparados com pacientes CC. Houve diferenças também nos níveis de MCP-1, pacientes TC e CC produziram mais dessa quimiocina em comparação com pacientes TT.

Em Minas Gerais apenas quando estratificado para sexo que foi observado que o genótipo TC desse polimorfismo é protetivo (OR= 0,54; $p= 0,02$) contra a doença em indivíduos do sexo feminino (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018). Já no resultado combinado de três populações de caso-controle do sudeste brasileiro o alelo C, os carreadores de C (TC+CC) e o genótipo CC foram todos associados com risco mesmo depois de corrigir os resultados para sexo e etnia, esse resultado também segue a mesma tendência

quando avaliada cada população individualmente. No estudo de família desse mesmo trabalho o Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) também mostrou que o alelo C foi transmitido em excesso em indivíduos afetados, indicando a susceptibilidade ao desenvolvimento de hanseníase *per se*. Os autores afirmam de avaliar se outros SNPs na mesma região poderiam estar relacionados com a associação vista do rs4833095 e encontraram um desequilíbrio de ligação ($r^2=0,92$) com o SNP rs5743614 (A1518G/S506S) e um resultado moderado ($r^2=0,67$) foi encontrado com rs5743618 (C1805A/I602S) (DE SALES MARQUES *et al.*, 2013).

Na tuberculose a variante T foi associada com proteção em uma população indiana, além disso houve um aumento da resposta imune contra o *M. tuberculosis*. Resultado contrastante foi visto em um outro estudo, embora não se tenha encontrado associação com a tuberculose quando investigado só o SNP rs4833095, a interação do referido polimorfismo com outros no gene *TLR2* se mostrou susceptível com a tuberculose em uma população do sul da África (DITTRICH *et al.*, 2015; SALIE *et al.*, 2015). Esses resultados exibem a importância desse polimorfismo contra infecções causadas pelas micobactérias.

A classificação operacional da hanseníase é considerada um indicador de transmissão ativa da doença, uma vez que pacientes não tratados que possuem uma alta carga bacilar (multibacilares) contribuem em maior grau para transmissão da hanseníase (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014). Os multibacilares foram o mais frequentes no nosso estudo (73,6%), e acredita-se que a grande proporção desse número se dá pelo fato de que o local de coleta das nossas amostras (CRIA) é um centro de referência para o diagnóstico e acompanhamento da hanseníase para a região agreste de Alagoas, recebendo muitos casos de maior complexidade. Além disso a ocorrência de um diagnóstico ocorrendo de forma tardia na região pode estar contribuindo para a frequência aumentada de casos multibacilares no interior de Alagoas. Dados de quatro estudos, dois brasileiros e um indiano também relataram uma maior predominância de pacientes multibacilares (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; LETURIONDO *et al.*, 2020; SURYADEVARA *et al.*, 2017), no entanto, em outro estudo indiano houve uma predominância de pacientes paucibacilares (SCHURING *et al.*, 2009).

No presente estudo não foram encontradas associações estatisticamente significantes para o SNP rs4833095-*TLR1* e a classificação operacional dos pacientes diagnosticados com hanseníase. Outros estudos que fizeram análise de associação também não encontraram resultados com significância ($p>0,05$) (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; SCHURING *et al.*, 2009). Suryadevara e colaboradores (2017) investigaram a

classificação operacional em comparação com os controles e encontraram resultados significativos em PB e grupo controle e MB e grupo controle.

Em nossos resultados o alelo C esteve mais presente em paucibacilares (58,3%) quando comparado com multibacilares (55,3%). Dois autores que investigaram a população indiana observaram uma maior frequência do alelo C em paucibacilares quando comparado com multibacilares, contrastando com os achados de um estudo na população brasileira, onde foi vista uma maior frequência do alelo T em pacientes paucibacilares em comparação com multibacilares. (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; SURYADEVARA *et al.*, 2017).

6.2 O SNP *NOD2* (rs8057341) e a hanseníase

NOD2 é um importante receptor intracelular e reconhece um componente da parede celular do *M. leprae*, o muramil dipeptídeo, além de outros produtos bacterianos e promove uma resposta contra a invasão do patógeno onde há a produção de citocinas pró-inflamatórias e agentes antimicrobianos. Os sensores de componentes bacterianos dos receptores *NOD1* e *NOD2* desencadeiam uma via da resposta imune que inclui o recrutamento da proteína ATG16L1 para a membrana plasmática iniciando a autofagia bacteriana ao entrar na célula (CARUSO *et al.*, 2014; SCHENK *et al.*, 2016; TRAVASSOS *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o alelo C do SNP rs8057341-*NOD2* foi o mais frequente na população estudada, estando presente em 67,4% dos indivíduos (controles). Corroborando com os resultados aqui encontrados, dois estudos conduzidos no Brasil também observaram uma maior frequência do alelo C em controles (LETURIONDO *et al.*, 2020; SALES-MARQUES *et al.*, 2014), no entanto, em populações do Vietnã e da China foi visto uma maior frequência do alelo T (GRANT *et al.*, 2012; XIONG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2009). O genótipo CC se mostrou mais frequente no grupo controle (45,6%) e o CT no grupo casos (45,8%). O presente trabalho até o momento não identificou nenhuma associação do polimorfismo *NOD2* (rs8057341) com a hanseníase em todos os modelos estatísticos analisados e nas correções feita para a co-variável sexo.

Zhang e colaboradores (2009) foram os primeiros a encontrar polimorfismos (rs9302752 e rs7194886) no gene *NOD2* associados com a hanseníase e suas formas clínicas em um estudo de larga escala envolvendo a população chinesa. Na tentativa de replicar esses achados na Índia e África Ocidental através de um estudo caso-controle, os autores não conseguiram associar essas variantes em suas populações (WONG *et al.*, 2010b).

Anos mais tarde os mesmos polimorfismos analisados no estudo de larga escala em 2009 foram replicados em outra região geográfica da China e no Vietnã e apenas um SNP em cada estudo exibiu significância estatística. O resultado do SNP rs9302752 seguiu a mesma tendência do estudo de 2009 em relação ao subtipos clínicos, e mostrou o alelo C como associado à forma clínica multibacilar na população vietnamita (OR=1,30; $p=0,036$), também foi vista associação com a hanseníase *per se* (OR=1,27; $p=0,014$) (GRANT *et al.*, 2012). Diferente do achado anteriormente, o SNP rs3135499 obteve associação positiva com a hanseníase indicando risco ao desenvolvimento da doença em portadores do alelo A na população chinesa OR=2,55; IC 95% 1,83-3,55; $p=0,001$ (XIONG *et al.*, 2016). Os autores também investigaram o SNP rs8057341, no entanto, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos. Essas diferentes associações refletem o quanto a diversidade étnica pode participar do desfecho de doenças infecciosas como é o caso da hanseníase.

Em uma população do Nepal os autores genotiparam 32 polimorfismos, onde, apenas um SNP (rs7194886) foi também investigado no estudo de Zhang e colaboradores (2009), e apresentou associação com os episódios reacionais. Dessas 32 variantes quatro foram significativas à nível alélico, o resultado mais significativo para essa análise foi OR= 0,44 [IC 95% 0,29-0,68] $p=0,00017$ para o rs1477176 conferindo proteção. À nível de genótipo, oito SNPs foram associados com a hanseníase *per se*, e devido a diversidade populacional encontrada no Nepal os resultados foram corrigidos para co-variáveis, mesmo assim continuaram associados com o desenvolvimento da hanseníase. Quando analisada a forma clínica, apenas o polimorfismo rs1131716 foi associada com predisposição ao polo lepromatoso (OR= 2,01 [IC 95% 1,12-3,76] $p=0,013$). Além disso, os autores encontraram associações significativas em vários SNPs com os tipos de reações desenvolvidas pelos pacientes (BERRINGTON *et al.*, 2010). Embora tenha-se investigados 32 polimorfismos, nenhum deles foi o do presente trabalho.

O SNP rs8057341 foi investigado na população brasileira por dois autores. No primeiro estudo foram utilizados dois modelos experimentais, no modelo baseado em famílias encontrou-se uma sob-transmissão do alelo T para a prole afetada indicando proteção contra a hanseníase ($p=0,003$). No mesmo estudo houve uma replicação desse marcador em amostras de caso-controle em três cidades do Sudeste, e o genótipo TT conferiu resistência à doença nessas populações, esses resultados se mantiveram em acordo quando foi feita uma análise combinando todos os estudos caso-controle (OR=0,49 [IC 95% 0,36-0,65] $p=0,001$) e, na junção de todas as populações (caso-controle e baseado em família) o resultado obtido confirmou o alelo T com efeito protetor contra a hanseníase (OR=0,80; $p=0,0001$) (SALES-

MARQUES *et al.*, 2014). O segundo autor a avaliar esse polimorfismo na população brasileira encontrou resultados semelhantes ao estudo anterior, onde o genótipo TT obteve resultado com significância estatística (OR=0,56 [IC 95% 0,37-0,84] $p=0,005$) conferindo proteção à hanseníase. A análise de alelo e de carreadores de T seguiram essa mesma tendência, no entanto, apresentaram resultados considerados *borderlines* (LETURIONDO *et al.*, 2020).

Os SNPs do estudo em larga escala de Zhang e colaboradores (2009) também foram replicados em um trabalho onde se investigou o papel dos mesmos na tuberculose, no entanto, essas variantes não se mostraram associadas à doença na comparação com os controles mas, quando estratificado apenas em casos observou-se uma associação dos carreadores de T (CT/TT) do SNP rs7194886 à uma alteração de risco à tuberculose (PAN *et al.*, 2012). Além de infecções micobacterianas, polimorfismos do *NOD2* também estão envolvidos em outras doenças inflamatórias como é o exemplo a Doença de Crohn, que é uma doença do trato intestinal com uma resposta imune exacerbada. Dois SNPs (rs2066843 e rs2076756) foram associados ao risco da doença (GLAS *et al.*, 2010).

O nosso estudo observou uma maior frequência do alelo C em multibacilares (68,1%) quando comparado com os paucibacilares, em concordância com nossos achados, em outra população brasileira foi relatada também uma maior frequência do referido alelo em pacientes MB (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018). O presente trabalho não identificou nenhuma associação da classificação operacional e o SNP investigado mesmo após a correção para a variável sexo.

Em um estudo realizado com a população brasileira os autores observaram uma associação *borderline* de proteção ao desenvolvimento da forma mais grave da hanseníase (MB) em pacientes que possuíam o genótipo GG (OR= 0,56, $p= 0,046$) (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018). Grant e colaboradores (2012) investigaram a população do Vietnã e não encontraram resultados significativos para o SNP do nosso estudo, entanto, observaram um outro SNP, o rs9302752-*NOD2*, exibindo um efeito de risco em pacientes multibacilares com OR= 1,30 e $p= 0,036$ em um desenho experimental baseado em famílias. Um estudo de associação do genoma completo os autores compararam a classificação operacional e o grupo controle e observaram uma forte associação do SNP rs9302752-*NOD2* e os multibacilares (OR= 1,73, $p= 8,87 \times 10^{-41}$), ainda, os autores encontraram associação com paucibacilares (OR= 1,44, $p= 1,44 \times 10^{-19}$) (ZHANG *et al.*, 2009).

Quando comparado com outros estudos de associação genética na hanseníase, o tamanho amostral do nosso estudo (N= 424) é considerado baixo, o que pode refletir em um

baixo poder estatístico, indicando a necessidade de ampliar a quantidade de amostras para concluir sobre a associação dos SNPs estudados com a hanseníase.

6.3 Meta-análise

É notável que a presença de variantes genéticas leva ao desenvolvimento de diferentes quadros clínicos em diversas doenças, e se tratando da hanseníase que é considerada uma doença complexa a importância de estudos que investigam polimorfismos em genes da resposta imune se tornam necessários para compreender o papel dos mesmos no desfecho da doença. O papel do receptor que é codificado pelo gene *TLRI* já foi discutido ao longo deste trabalho e estudos em diferentes populações exibiram alguns desfechos conflitantes, dado a isso, foi realizada uma meta-análise com todos os estudos que foram publicados sobre variantes no gene *TLRI* e a sua associação com a hanseníase com intuito de trazer resultados para esclarecer seu papel na patogênese da doença e reduzir resultados falso-positivos.

Os dados da meta-análise feita no presente estudo não indicaram associação do SNP rs4833095 (743T>C) em nenhum dos modelos genéticos investigados no resultado global, mas, observando as populações individualmente algumas relatam susceptibilidade à hanseníase (DE SALES MARQUES *et al.*, 2013; SCHURING *et al.*, 2009; SURYADEVARA *et al.*, 2017), enquanto outras não reportaram associação com a doença (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; LETURIONDO *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2017). Essa variação nos resultados pode estar relacionada à com a diversidade populacional ou à um poder estatístico fraco.

A segunda variante a ser encontrada na busca realizada através das bases de dados, que possuía uma quantidade de estudos suficientes para a realização de uma meta-análise foi o SNP rs5743618 (1805C>A). Foi observada associação com proteção à hanseníase apenas nos carreadores de C (OR=0,57; $p=0,048$) e, quando omitido o estudo de Sales Marques e colaboradores (2013) realizado com indivíduos da população brasileira, todos os resultados dos modelos genéticos foram estatisticamente significativos conferindo proteção contra a hanseníase, diferindo do estudo de Suryadevara e colaboradores (2017) que avaliou a influência desse SNP na Índia (Telangana) e não encontrou associação em nenhum dos modelos genéticos. As outras duas populações (Índia e Turquia) individualmente exibiram um resultado que indica esse efeito protetor visto na meta-análise (JOHNSON *et al.*, 2007; WONG *et al.*, 2010a). Esses estudos em vários países mostram como a diversidade genética desempenha um papel importante frente a infecções. Como perspectiva pretende-se realizar a

genotipagem do SNP rs5743618-*TLRI* na população Alagoana, e investigar a existência de associação com a hanseníase.

Na abordagem de meta-análise os estudos se mostraram muito heterogêneos, a porcentagem somou >50% e valores de $p \leq 0,05$ em todos os modelos genéticos utilizados nas análises. Por essa razão foi escolhido utilizar o modelo de efeito randômico para estimar a OR global. Ademais, para melhor avaliar a influência da heterogeneidade observada foi conduzido o teste de sensibilidade retirando um estudo por vez para analisar o poder que cada um possuía no resultado final.

A falta de estudos em diferentes grupos étnicos que investiguem o papel dessas variantes e um maior número amostral são as principais limitações dessa meta-análise, no entanto, com a inclusão de vários estudos o poder estatístico foi maior promovendo um resultado mais robusto quando comparado com os trabalhos individualmente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A maior limitação do presente estudo foi referente a etapa de recrutamento dos pacientes, uma vez que não obtivemos o tamanho amostral desejado (de no mínimo 300 pacientes) durante o período de estudo. Como a hanseníase pode ser uma doença silenciosa e com longo período de incubação, há um impacto direto no tempo para o diagnóstico da doença. Também, a pandemia causada pelo SARS-CoV-2 e as medidas de distanciamento social dificultaram o processo de recrutamento populacional.

Estudos de investigação genética são uma ferramenta importante para compreender os fatores de risco que estão atrelados às doenças infecciosas, como é o caso da hanseníase, bem como compreender melhor as vias moleculares relacionadas ao desenvolvimento da doença. Alagoas é considerado um estado endêmico para a hanseníase e entender os mecanismos genéticos associados à doença é imprescindível para o melhoramento de políticas públicas que visam diminuir o número de casos no estado. Com os resultados do presente estudo almejamos contribuir para ações de vigilância sanitária e promoção da saúde na região, que possam futuramente empregar os marcadores genéticos em um painel de predição para o adoecimento ou agravamento da hanseníase. Como trata-se de um estudo pioneiro no estado, espera-se que ele seja base para outras abordagens, norteadas por futuros estudos genéticos e populacionais.

CONCLUSÕES

- O desenho caso-controle na hanseníase foi possibilitado a partir do recrutamento populacional com importante adesão dos pacientes e controles na coleta do material biológico;
- O alelo C do SNP rs4833095 do gene *TLRI* apresentou frequência de 57,5% da amostra populacional alagoana estudada, se assemelhando em frequências observadas em outras populações (brasileiras e indianas);
- O alelo C do SNP rs8057341 do gene *NOD2* foi o mais frequente na população investigada e apresentou frequência de 66,9%, resultado que se assemelhou com dois estudos conduzidos no Brasil;
- Não foi observada associação genética com a hanseníase nos dois SNPs (rs4833095 e rs8057341) investigados no presente estudo;
- Não foi observada associação genética entre os dois SNPs estudados (rs4833095 e rs8057341) e a forma clínica operacional multibacilar da hanseníase;
- A meta-análise do SNP rs4833095 no gene *TLRI* não apresentou associação com a hanseníase em nenhum dos modelos genéticos e nem na omissão de um estudo por vez no teste de sensibilidade;
- A meta-análise do SNP rs5743618 no gene *TLRI* resultou em uma associação dos carreadores do alelo C com proteção à hanseníase;
- Quando omitido um estudo da análise de sensibilidade realizada na meta-análise, foi vista uma associação com efeito protetor em todos os modelos genéticos do SNP rs5743618 no gene *TLRI*.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L.; DEMENAI, F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. **American Journal of Human Genetics**, v. 42, n. 2, p. 256–266, 1988.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. **Nature medicine**, v. 8, n. 8, p. 878–884, ago. 2002.
- ALI, P. M.; RAMANUJAM, K. Leprosy in Twins 1. **Internacional Journal of Leprosy**, v. 34, n. 4, p. 405–407, 1966.
- ALTER, A. et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. **Human Genetics**, v. 127, n. 3, p. 337–348, 25 mar. 2010.
- ALTER, A. et al. Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. **Human Genetics**, v. 132, n. 1, p. 107–116, 2013.
- ALVARADO-ARNEZ, L. E. et al. Association of IL10 Polymorphisms and Leprosy: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0136282, 4 set. 2015.
- ALVARENGA NIITSUMA, E. N.; FERNANDES, G. DA R.; LANA, F. C. F. The TLR1 gene is associated with higher protection from leprosy in women. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0205234, 5 out. 2018.
- AREESHI, M. Y. et al. Impact of TNF -308 G>A (rs1800629) gene polymorphism in modulation of leprosy risk: a reappraise meta-analysis of 14 case–control studies. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 5, 31 out. 2017.
- ATTIA, E. A. S. et al. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T-reg cells, as well as down regulatory cytokines. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 9, p. 793–801, 2014.
- AZEVEDO, M. DE C. S. et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 71–78, 2017.
- BARRETO, J. G. et al. Spatial Analysis Spotlighting Early Childhood Leprosy Transmission in a Hyperendemic Municipality of the Brazilian Amazon Region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.
- BAYRAKTAR, R.; BERTILACCIO, M. T. S.; CALIN, G. A. The interaction between two worlds: MicroRNAs and Toll-like receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–11, 2019.
- BERRINGTON, W. R. et al. Common Polymorphisms in the NOD2 Gene Region Are Associated with Leprosy and Its Reactive States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1422–1435, maio 2010.
- BILLMANN-BORN, S. et al. The complex interplay of NOD-like receptors and the autophagy machinery in the pathophysiology of Crohn disease. **European Journal of Cell**

Biology, v. 90, n. 6–7, p. 593–602, 2011.

BOBOSHA, K. et al. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 2–10, 2014.

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

BOKU, N. et al. Impacts of the diagnosis of leprosy and of visible impairments amongst people affected by leprosy in Cebu, the Philippines. **Leprosy Review**, v. 81, n. 2, p. 111–120, 2010.

BRASIL, M. DA S. **Descrição da doença**. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniaze/11294-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 9 fev. 2020a.

BRASIL, M. DA S. **Boletim Epidemiológico**. 1º ed. Brasília - DF: [s.n.].

BRASIL, M. DA S. **Tratamento**. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniaze/11299-tratamento>>. Acesso em: 23 fev. 2020c.

BRASIL, M. DA S. **Hanseníase: o que é, causas, sinais e sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <<http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniaze>>. Acesso em: 5 ago. 2021a.

BRASIL, M. DA S. **Leprosy Epidemiological Record 2021** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis - DCCL, 2021b. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>

BRUBAKER, M. L.; MEYERS, W. M.; BOURLAND, J. Leprosy in children one year of age and under. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 53, n. 4, p. 517–523, dez. 1985.

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

BURTON, P. R. et al. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 661–678, 2007.

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

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

CARDOSO, C. C. et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. **The Journal of infectious diseases**, v. 204, n. 8, p. 1256–63, 15 out. 2011b.

CARUSO, R. et al. NOD1 and NOD2: Signaling, host defense, and inflammatory disease. **Immunity**, v. 41, n. 6, p. 898–908, 2014.

CHEN, X. H. et al. IL-10 promoter SNPs and susceptibility to leprosy in ethnic groups from

southwest China. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2876–2885, 2013.

CHUNG, E. Y. et al. Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Genes & Immunity**, v. 8, n. 7, p. 577–589, 2007.

CLARK, B. M. et al. Case-control study of armadillo contact and Hansen's disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 962–967, 2008.

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

COONEY, R. et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. **Nature Medicine**, v. 16, n. 1, p. 90–97, 2010.

COSTA, M. B. et al. In situ T regulatory cells and Th17 cytokines in paired samples of leprosy type 1 and type 2 reactions. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–14, 2018.

DA SILVA FERREIRA, J. et al. Serological and molecular detection of infection with *Mycobacterium leprae* in Brazilian six banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 68, n. September 2019, 2020.

DAS, N. et al. A quality of life study of patients with leprosy attending the dermatology OPD of a tertiary care center of Eastern India. **Indian Journal of Dermatology**, v. 65, n. 1, p. 42, 2020.

DE LÉSÉLEUC, L. et al. PARK2 Mediates Interleukin 6 and Monocyte Chemoattractant Protein 1 Production by Human Macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

DE SALES MARQUES, C. et al. Toll-like receptor 1 N248s single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 120–129, 2013.

DE SOUSA, J. R. et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. **Acta Tropica**, v. 157, p. 108–114, maio 2016.

DE SOUZA-SANTANA, F. C. et al. Human leukocyte antigen class I and class II alleles are associated with susceptibility and resistance in borderline leprosy patients from Southeast Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.

DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: Where the action starts. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 318–324, 2000.

DIÓRIO, S. M. Aspectos microbiológicos e moleculares do *Mycobacterium leprae*. In: **Hanseníase: Avanços e Desafios**. [s.l.: s.n.]. p. 67–79.

DITTRICH, N. et al. Toll-like receptor 1 variations influence susceptibility and immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 95, n. 3, p. 328–335, maio 2015.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v. 13,

n. 2, p. 76–88, 2004.

FABRI, A. DA C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.

FACHIN, L. R. V. et al. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. **Histology and Histopathology**, v. 32, n. 4, p. 385–396, 2017.

FERREIRA, J. DA S. et al. Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1–25, 2018.

FINE, P. E. et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **American journal of epidemiology**, v. 146, n. 1, p. 91–102, 1 jul. 1997.

FISCHER, M. Leprosy – an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, v. 15, n. 8, p. 801–827, 2017.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 330–336, 3 abr. 2003.

FREITAS, A. A. et al. Application of *Mycobacterium Leprae* -specific cellular and serological tests for the differential diagnosis of leprosy from confounding dermatoses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 2, p. 163–168, out. 2016.

GIRARDIN, S. E. et al. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 8869–8872, 14 mar. 2003.

GLAS, J. et al. The NOD2 Single Nucleotide Polymorphisms rs2066843 and rs2076756 Are Novel and Common Crohn's Disease Susceptibility Gene Variants. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e14466, 30 dez. 2010.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003243, 21 mar. 2013.

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

HASTINGS, R. C. et al. Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature. **Leprosy review**, v. 39, n. 2, p. 71–74, 1968.

HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 2, p. 95–108, 2005.

HSIEH, N.-K. et al. Association of HLA-DRB1*0405 with resistance to multibacillary leprosy in Taiwanese. **Human Immunology**, v. 71, n. 7, p. 712–716, jul. 2010.

JACOBSON, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Leprosy. **The Lancet**, v. 353, n. 9153, p. 655–660, fev. 1999.

- JEONG, E.; LEE, J. Y. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. **Yonsei Medical Journal**, v. 52, n. 3, p. 379–392, 2011.
- JOHNSON, C. M. et al. Cutting Edge: A Common Polymorphism Impairs Cell Surface Trafficking and Functional Responses of TLR1 but Protects against Leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 7520–7524, 2007.
- JOYCE, M. P. Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. suppl 1, p. 17–21, dez. 2012.
- KAMPIRAPAP, K. et al. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 66, n. 1, p. 16–21, mar. 1998.
- KELADA, S. N. et al. The role of genetic polymorphisms in environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1055–1064, jun. 2003.
- KIM, E. W. et al. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2018.
- KLATSER, P. R. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2947–51, nov. 1993.
- KÕKS, S. et al. Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 5, p. 407–415, 2005.
- KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 525–532, 14 maio 2003.
- KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 35–41, fev. 2004.
- LAHIRI, A. et al. Human LACC1 increases innate receptor-induced responses and a LACC1 disease-risk variant modulates these outcomes. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–13, 2017.
- LASTÓRIA, J. C.; DE ABREU, M. A. M. M. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.
- LEMAITRE, B. et al. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973–983, set. 1996.
- LETURIONDO, A. L. et al. Association of *nod2* and *ifng* single nucleotide polymorphisms with leprosy in the amazon ethnic admixed population. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–13, 2020.
- LEWIS, C. M.; KNIGHT, J. Introduction to Genetic Association Studies. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2012, n. 3, p. pdb.top068163–pdb.top068163, 1 mar. 2012.
- LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial

- response. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5768, p. 1770–3, 24 mar. 2006.
- LIU, P. T. et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. **Nature Medicine**, v. 18, n. 2, p. 267–273, 2012.
- LOWY, L.; RIDLEY, D. . The acid-fast staining properties of *Mycobacterium leprae*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 5, p. 406–410, set. 1954.
- MACHADO, A. S. et al. Novel PCR primers for improved detection of *Mycobacterium leprae* and diagnosis of leprosy . **Journal of Applied Microbiology**, p. 0–1, 2020.
- MAGALHAES, J. G. et al. Nod2-Dependent Th2 Polarization of Antigen-Specific Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 11, p. 7925–7935, 2008.
- MAGALHAES, J. G. et al. What is new with Nods? **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 29–34, 2011.
- MANDAL, D. et al. Vitamin D receptor expression levels determine the severity and complexity of disease progression among leprosy reaction patients. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 35–39, 2015.
- MARAHATTA, S. B. et al. Perceived stigma of leprosy among community members and health care providers in Lalitpur district of Nepal: A qualitative study. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–13, 2018.
- MARIE, J. C. et al. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1061–1067, 4 abr. 2005.
- MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 1–8, 2014.
- MARTINEZ, T. S. et al. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 11, p. 1653–1658, 2011.
- MARTINIUK, F. et al. Lessons of leprosy: The emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 5, p. 626–630, 2012.
- MATZNER, M. et al. Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 56–59, 2011.
- MCGETTRICK, A. F.; O'NEILL, L. A. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 20–27, 2010.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–397, 1997.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215–1215, 1988.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase.** 1° ed. Brasília: Editora MS, 2010.
- MIRA, M. T. et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 412–415, 2003.
- MIRA, M. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 636–640, 2004.
- MOET, F. J. et al. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Leprosy review**, v. 75, n. 4, p. 310–326, dez. 2004.
- MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1040–2, 13 maio 2005.
- MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. Learning from Leprosy. Insight into the human innate immune response. In: **Advances in Immunology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 105p. 1–24.
- MORAES, M. O. et al. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v. 77, n. 3, p. 189–202, 2006.
- MORGADO DE ABREU, M. A. M. et al. Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, p. 59–64, 2014.
- MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348 LP – 2357, 1 abr. 1986.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, n. 3, p. 138–146, 1996.
- MUKHERJEE, S.; HUDA, S.; SINHA BABU, S. P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 90, n. 1, p. 1–18, 2019.
- MUKHERJEE, T. et al. NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 670, p. 69–81, jul. 2019.
- O'NEILL, L. A.; SHEEDY, F. J.; MCCOY, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 163–175, 18 mar. 2011.
- OGURA, Y. et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- κ B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4812–4818, 2001.
- OMUETI, K. O. et al. The Polymorphism P315L of Human Toll-Like Receptor 1 Impairs Innate Immune Sensing of Microbial Cell Wall Components. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6387–6394, 15 maio 2007.
- OSENBRUG, T. et al. Chemical Tools for Studying TLR Signaling Dynamics. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 7, p. 801–812, 2017.
- PACHECO, A. G.; CARDOSO, C. C.; MORAES, M. O. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis

- study. **Human Genetics**, v. 123, n. 5, p. 477–484, 2008.
- PACHECO, A. G.; MORAES, M. O. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. **Disease Markers**, v. 27, n. 3–4, p. 173–186, 2009.
- PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. **PLOS Medicine**, v. 18, n. 3, p. e1003583, 29 mar. 2021.
- PAN, H. et al. Polymorphisms of NOD2 and the risk of tuberculosis: a validation study in the Chinese population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 39, n. 3, p. 233–240, jun. 2012.
- PATHAK, V. K. et al. Utility of multiplex PCR for early diagnosis and household contact surveillance for leprosy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 3, p. 114855, 2019.
- PEPINELI, A. C. et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated With Leprosy in Southern Brazil. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. October, p. 1–6, 2019.
- PEREIRA, A. C. et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for –819C/T in leprosy susceptibility. **Genes & Immunity**, v. 10, n. 2, p. 174–180, 25 mar. 2009.
- PINHEIRO, R. O. et al. Innate Immune Responses in Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–15, 28 mar. 2018.
- PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 451–459, out. 2007.
- QUARESMA, J. A. S. et al. T-helper 17 cytokines expression in leprosy skin lesions. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 565–567, 18 ago. 2015.
- RIDLEY, D. . The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 5, p. 449–452, set. 1955.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.
- RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The Future of Genetic Studies of Complex Human Diseases. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1516–1517, 13 set. 1996.
- RIVAS-SANTIAGO, B. et al. Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 935–941, 2008.
- ROBBINS, G. et al. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5669, 27 maio 2009.
- RODRIGUES, R. W. DE P. et al. Analysis of clinical data and T helper 1/T helper 2 responses in patients with different clinical forms of leprosy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 2, p. 208–215, 2017.
- SABBAH, A. et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. **Nature**

immunology, v. 10, n. 10, p. 1073–1080, 2009.

SAINI, C. et al. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2016.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, 2013.

SALES-MARQUES, C. et al. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. **Human Genetics**, v. 133, n. 12, p. 1525–1532, 4 dez. 2014.

SALES-MARQUES, C. et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005754, 17 jul. 2017.

SALES, A. M. et al. Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e1013, 15 mar. 2011.

SALIE, M. et al. Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 34, p. 221–229, ago. 2015.

SANTANA, N. DE L. et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 4, p. 260–268, 2 mar. 2017.

SANTOS, M. B. et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 1, p. 40–49, 2017.

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

SAUER, M. E. D. et al. Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 99–107, 2015.

SCHENK, M. et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 555–563, 2012.

SCHENK, M. et al. Human NOD2 recognizes structurally unique muramyl dipeptides from *Mycobacterium leprae*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 9, p. 2429–2438, 2016.

SCHILLING, A.-K. et al. Leprosy in red squirrels in the UK. **Veterinary Record**, v. 184, n. 13, p. 416.1-416, 30 mar. 2019.

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

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

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

SHAW, M. H. et al. T cell–intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. **Nature Immunology**, v. 10, n. 12, p. 1267–1274, 1 dez. 2009.

SHEPARD, C. C. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. **The Journal of experimental medicine**, v. 112, n. 3, p. 445–54, 1 set. 1960.

SHEPARD, C. C. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. **Journal of Bacteriology**, v. 90, n. 5, p. 1271–1275, 1965.

SHIELDS, E. D.; RUSSELL, D. A.; PERICAK-VANCE, M. A. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 4, p. 1139–1143, 1 abr. 1987.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111–4126, 2015.

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

SILVA, G. A. V. et al. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: A meta-analysis. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 130–133, 2014.

SILVA, G. A. V. et al. Association of TNF -1031 C/C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. **Human Immunology**, v. 76, n. 2–3, p. 137–141, 2015.

SINGH, I. et al. VDR polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1–14, 2018.

SOARES, C. T. et al. Differential expression of microRNAs in leprosy skin lesions. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, p. 1–10, 2017.

SUNEETHA, S. et al. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. **Leprosy Review**, v. 69, n. 4, p. 358–366, 1998.

SURYADEVARA, N. C. et al. Susceptibility to Hansen’s disease is associated with TLR1 polymorphisms and down regulation of TLR1 mRNA expression. **Indian Journal of Leprosy**, v. 89, n. 2, p. 53–65, 2017.

TAGANOV, K. D. et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12481–12486, 2006.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26–37, jan. 2015.

TAN, S. Y.; GRAHAM, C. Armauer Hansen (1841-1912): discoverer of the cause of leprosy. **Singapore medical journal**, v. 49, n. 7, p. 520–1, jul. 2008.

TARIQUE, M. et al. Association of TNF- α -308(GG), IL-10-819(TT), IL-10-1082(GG) and

IL-1R1+1970(CC) genotypes with the susceptibility and progression of leprosy in North Indian population. **Cytokine**, v. 73, n. 1, p. 61–65, maio 2015.

TARIQUE, M. et al. Association of IL-10 Gene Polymorphism With IL-10 Secretion by CD4 and T Regulatory Cells in Human Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 6 ago. 2020.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 455–462, dez. 2010.

TRAVASSOS, L. H. et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 55–62, 8 jan. 2010.

TRUMAN, R. W. et al. Probable zoonotic leprosy in the Southern United States. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 17, p. 1626–1633, 2011.

TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 69, n. 1, p. 1–12, mar. 2001.

TURNER, D. The human leucocyte antigen (HLA) system. **Vox Sanguinis**, v. 87, n. s1, p. 87–90, jun. 2004.

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

UNDERHILL, D. M. et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 25, p. 14459–14463, 7 dez. 1999.

VARGAS-OCAMPO, F. Diffuse leprosy of Lucio and Latapí: a histologic study. **Leprosy review**, v. 78, n. 3, p. 248–260, set. 2007.

VENTURINI, J. et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. **Leprosy review**, v. 82, p. 25–35, 1 mar. 2011.

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

VISSERS, M. et al. Respiratory syncytial virus infection augments NOD2 signaling in an IFN- β -dependent manner in human primary cells. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 10, p. 2727–2735, out. 2012.

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

WANG, D. et al. Genetic variants of the MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. **Human Genetics**, v. 131, n. 7, p. 1251–1260, 6 jul. 2012.

WHITE, C.; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st Century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 80–94, 7 jan. 2015.

WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 36, p. 417–440, 2020a.

WHO STUDY GROUP. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. Switzerland: [s.n.]. v. No. 675

WHO, W. H. O. **Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy**. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia: [s.n.]. v. 1

WHO, W. H. O. Weekly epidemiological record. Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. **Weekly epidemiological record**, v. 35, n. 35, p. 501–520, 2017b.

WHO, W. H. O. Weekly epidemiological record. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. **Weekly epidemiological record**, v. 94, n. AUGUST 2019, p. 389–412, 2019a.

WHO, W. H. O. **Leprosy**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>>. Acesso em: 8 fev. 2020b.

WHO, W. H. O. **WHO recommended MDT regimens: MDT drugs**. Disponível em: <<https://www.who.int/lep/mdt/regimens/en/>>. Acesso em: 23 fev. 2020b.

WONG, S. H. et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1–9, 2010a.

WONG, S. H. et al. Genomewide association study of leprosy. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 15, p. 1446–7; author reply 1447–8, 15 abr. 2010b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rumo à zero hanseníase Rumo à zero hanseníase Estratégia Global de Hanseníase. p. 1–30, 2021.

XIONG, J. H. et al. Association between genetic variants in NOD2, C13orf31, and CCDC122 genes and leprosy among the Chinese Yi population. **International Journal of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 65–69, 2016.

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

ZHANG, F.-R. et al. Genomewide Association Study of Leprosy. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609–2618, 31 dez. 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Protocolo de extração de DNA por *salting out* adaptado do Laboratório de Biologia das Interações e Laboratório de Hanseníase – IOC/Fiocruz – Rio de Janeiro

Material: sangue total

Volume utilizado: 500 μ L

1. Distribuir 1,5 mL de tampão TE para lise de hemácias em tubos cônicos de 2 mL.
2. Adicionar 500 μ L de sangue total a cada tubo.
3. Deixar as amostras em banho seco a 56 °C por aproximadamente 5 minutos e depois vortexar os tubos por 1 minuto.
4. Centrifugar as amostras a 2800rpm (aprox. 1000 g) por 20 minutos.
5. Descartar o sobrenadante.
6. Completar o volume de 1,5mL com TE (lise de hemácias).
7. Homogeneizar os tubos no vórtex até desfazer o pellet, produto da centrifugação.
8. Repetir este processo 2 ou 3 vezes descartando mas agora centrifugando a 2600rpm por 15 minutos.
9. Verter o sobrenadante.
10. Adicionar 200 μ L de tampão de lise, 50 μ L de SDS 10% e 5 μ L de proteinase K (solução a 25 mg/mL) e homogeneizar no vórtex.
11. Incubar a 56°C durante a noite.
12. Adicionar 200 μ L de solução de acetato de sódio saturada e homogeneizar no vórtex.
13. Centrifugar a 2800rpm por 20 minutos a 10 °C.
14. Transferir o sobrenadante (500 μ L) para outro tubo cônico de 1,5 mL.
12. Adicionar etanol absoluto (2 vezes o volume obtido) e misturar por inversão até que o DNA precipite.
13. Centrifugar a 12000rpm por 15 minutos a 4 °C.

14. Verter o tubo para descartar o sobrenadante e deixar o tubo vertido no papel até evaporar.
15. Adicionar 1mL de etanol 70 % e com o auxílio da pipeta tentar soltar o pellet da parede do tubo.
16. Centrifugar a 12000 rpm por 15 a 20 minutos a 4 °C.
17. Descartar o sobrenadante e repetir etapa 14.
18. Ressuspender o DNA em 100 µL de TE de ressuspensão.
19. Deixar dissolver o pellet em banho-maria a 56°C por aproximadamente 20 minutos.
20. Depois armazenar o material genético a -20 °C.

APÊNDICE B – Combinações das palavras-chaves usadas para cada base de dado pesquisada.

PubMed:

leprosy OR mycobacterium leprae AND toll-like receptor 1 AND polymorphism;

leprosy OR mycobacterium leprae AND TLR1 AND polymorphism.

Scopus:

“toll-like receptor 1” AND leprosy AND polymorphism;

“toll-like receptor 1” AND “mycobacterium leprae” AND polymorphism;

TLR1 AND leprosy AND polymorphism;

TLR1 AND “mycobacterium leprae” AND polymorphism

ScienceDirect:

leprosy AND “toll-like receptor 1” AND polymorphism;

“mycobacterium leprae” AND “toll-like receptor 1” AND polymorphism;

“mycobacterium leprae” AND TLR1 AND polymorphism.

LILACS:

“mycobacterium leprae” tlr1 polymorphism;


leprosy tlr1 polymorphism;

leprosy “toll-like receptor 1” polymorphism;

“mycobacterium leprae” “toll-like receptor 1” polymorphism.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).


UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: “FATORES DE SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE EM ALAGOAS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, GENÉTICOS E IMUNO-INFLAMATÓRIOS”.

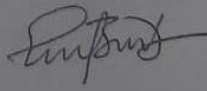
Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, residente e domiciliado na _____, profissão: _____, portador da cédula de identidade (RG) _____ (SSP/.....), inscrito no CPF _____ e nascido em ____ / ____ / _____, abaixo assinado, concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário do estudo **“FATORES DE SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE EM ALAGOAS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, GENÉTICOS E IMUNO-INFLAMATÓRIOS”**. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo tem como propósito avaliar a resposta imuno-inflamatória em pacientes hansênicos, bem como a influência genética associada à susceptibilidade e severidade da doença. Para tal, também serão necessários indivíduos saudáveis para servirem como grupo controle para o estudo.
- II) A participação neste projeto não tem o objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;
- III) De acordo com a resolução CNS 466/12, o presente estudo pode acarretar incômodo mínimo, devido a doação de amostra sanguínea por profissionais não-médicos, mas sem representar nenhum tipo de risco à minha saúde;
- IV) Conforme resolução CNS 466/12, caso hajam danos morais ou quaisquer transtornos decorrentes da participação neste estudo, uma indenização em dinheiro está assegurada;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

- IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética da Instituição e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim: () Sim ou () Não.
- X) Poderei contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas no Prédio da Reitoria, 1º andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária, Maceió ou através do telefone 3214-1041, assim como poderei contatar o responsável pelo projeto, Prof. Emiliano Barreto, através do email emilianobarreto@icbs.ufal.br ou telefone (82) 32141704 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- XI) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – assinando na última página do referido Termo.
- XIII) Resolução CNS 466/12 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

..... de de 2019.

.....
Assinatura do participante ou representante legal

Testemunha 1: _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Prof. Emiliano de Oliveira Barreto
Laboratório de Biologia Celular. Instituto de Ciências Biológicas e da
Saúde. Universidade Federal de Alagoas.
Campus A.C. Simões. Av. Lourival Melo Mota, s/n. Maceió-AL, Brasil.
CEP 57072-970. Telefone Institucional: (82) 3214-1704.

ANEXO B – Parecer de aprovação da pesquisa pelo comitê de ética e pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Fatores de susceptibilidade à hanseníase em Alagoas: aspectos epidemiológicos, genéticos e imuno-inflamatórios.

Pesquisador: Emiliano de Oliveira Barreto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57828716.0.0000.5013

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.213.273

Apresentação do Projeto:

Desenho:

Este projeto tem por objetivo investigar fatores de risco associados com a hanseníase em populações do Estado de Alagoas. Para isso, pacientes com hanseníase (n = 100) diagnosticados nas Unidades de Saúde do município de União dos Palmares-AL e Arapiraca, a partir do ano de 2010, e indivíduos sem hanseníase (n = 100), que não apresentem doenças infecciosas serão convidados a participar. Informações sobre dados epidemiológicos e sociodemográficos serão obtidas mediante consulta às planilhas de bancos de dados do SINAN. Amostras de sangue serão doadas por estes pacientes para o Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (UFAL) para análises bioquímicas e avaliações imuno-inflamatórias. Além disso, será realizado um estudo do tipo caso-controle para identificar os marcadores de susceptibilidade genética à hanseníase (nos genes TLR1, NOD2, CCDC122, miR146, CCL2, IL10, LTA, PARK2 e PACRG) na população de União dos Palmares e Arapiraca. Neste aspecto, polimorfismos de base única (SNPs) em genes já considerados de risco para a hanseníase em outras populações (TNF, IFN, IL10, TLR1 e NOD2) serão investigados na população em estudo utilizando ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real (StepOne Applied Biosystems) no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica da UFAL-Arapiraca.

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900

UF: AL **Município:** MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

ANEXO C – Roteiro para revisões sistemáticas e meta-análises proposto em Transparent Reporting of Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) de 2020.



PRISMA 2020 Checklist

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	
ABSTRACT			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	
METHODS			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	p.54
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	p. 54
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	p.97
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	p.53
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	p.53
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	p.65-68
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	Não se aplica
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	p.54
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	p.54
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	p.54
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	Não se aplica
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	p.54
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	p.54
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	Não se aplica
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	p.54
Reporting bias	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	Não se

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
assessment			aplica
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	p.54
RESULTS			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	p.59
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	Não se aplica
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	p. 61-64
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	Não se aplica
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	p. 66 e 68
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	Não se aplica
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	p.65 e 67
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	p.65 e 67
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	p.66 e 68
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	Não se aplica
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	p.66 e 68
DISCUSSION			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	p.74 e 75
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	p.75
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	Não se aplica
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	Não se aplica
OTHER INFORMATION			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	Não se aplica
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	Não se aplica

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	Não se aplica
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	Não se aplica
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	Não se aplica
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	Não se aplica

From: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71

For more information, visit: <http://www.prisma-statement.org/>