



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

SUSANA PAIVA OLIVEIRA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES *IL10*, *IL6* E *APOE* E A HANSENÍASE
EM UMA POPULAÇÃO DO AGRESTE DE ALAGOAS

MACEIÓ, AL
2022

SUSANA PAIVA OLIVEIRA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES *IL10*, *IL6* E *APOE* E A HANSENÍASE EM
UMA POPULAÇÃO DO AGRESTE DE ALAGOAS**

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, AL
2022

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

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

- O48e Oliveira, Susana Paiva.
Estudo de associação entre os genes *IL10*, *IL6* e *APOE* e a hanseníase em uma população do agreste alagoano / Susana Paiva Oliveira. – 2021.
64 f. : il., graf., tabs. color.
- 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.
- Bibliografia: f. 54-59.
Apêndices: f. 60-61.
Anexos: f. 62-64.
1. Citocinas. 2. Genética. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único. 4. Alergia e imunologia. I. Título.

CDU: 616-002.73

Folha de Aprovação

SUSANA PAIVA OLIVEIRA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES IL10, IL6 E APOE E A
HANSENÍASE EM UMA POPULAÇÃO DO AGRESTE DE ALAGOAS**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 29 de agosto de 2022.

Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente

CAROLINNE DE SALES MARQUES
Data: 01/09/2022 18:46:15-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.^a Dr.^a CAROLINNE DE SALES MARQUES - (Orientador)



Documento assinado digitalmente

JAMYLLÉ NUNES DE SOUZA FERRO
Data: 05/09/2022 07:56:48-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.^a Dr.^a JAMYLLÉ NUNES DE SOUZA FERRO – (UFAL)



Documento assinado digitalmente

ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS
Data: 05/09/2022 16:16:55-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.^a Dr.^a ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* e afeta principalmente a pele e os nervos periféricos. O Brasil é o segundo país no mundo em número de casos de hanseníase. No período de 2014 a 2019 foram notificados cerca de 164.000 novos casos da hanseníase no país. No estado de Alagoas em 2019, a taxa de incidência da doença foi de 6,95/100 mil habitantes, sendo considerada de alta endemicidade. Assim, destaca-se a importância de investigar os possíveis fatores de risco relacionados à ocorrência da doença na região de Alagoas. Um dos fatores relacionados ao desenvolvimento da hanseníase é o componente genético do hospedeiro, especialmente Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) em genes relacionados a citocinas da resposta imune na fisiopatologia da doença. Estudos já realizados em outras populações mostraram associação dos polimorfismos nos genes das citocinas *IL10*, *IL6* e *APOE*. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar associações de SNPs nos genes *IL10*, *IL6* e *APOE* com a hanseníase e suas formas clínicas e operacionais. Foi realizado um estudo do tipo caso- controle incluindo pacientes com hanseníase diagnosticados no Centro de Referência Integrado de Arapiraca (CRIA). Para compor o grupo controle foram recrutados voluntários sem histórico de doenças infecciosas no Hemocentro de Arapiraca-AL (HEMOAL). Após isso foram coletadas amostras biológicas (sangue total periférico) das quais foi realizada a extração do DNA pelo método de salting-out (ou método de precipitação do DNA). A partir do DNA extraído foi realizada a genotipagem de SNPs nos referidos genes, utilizando ensaios de discriminação alélica por Reação de cadeia polimerase (PCR) em tempo real. As análises foram realizadas através do modelo de regressão logística, que permite também incluir possíveis co-variáveis que possam introduzir algum tipo de viés nas análises, gerando medidas de associação genética com a hanseníase. Todas as análises foram realizadas em ambiente R, versão (2021-05-18), com auxílio do software R studio. Como resultado do recrutamento populacional na região agreste de Alagoas, foram recrutados 445 indivíduos, sendo 181 casos (15,8% PB e 66,2% MB) e 264 controles. A frequência dos polimorfismos na população de Alagoas (controles) foi de 48% para o genótipo CT para o SNP rs1800871-*IL10*, 48% para o genótipo AG para o SNP rs2069845- *IL6* e 48% para o genótipo GT do SNP rs405509-*APOE*. A análise de associação genética com a hanseníase resultou nas seguintes estimativas: OR=1,75 (p=0,08) para o genótipo TT do SNP rs1800871- *IL10*, OR=1,31 (p=0,36) para o GG do SNP rs2069845- *IL6* e OR=1,13 (p=0,67) para o TT do SNP rs405509-*APOE*. Os resultados demonstram que os SNPs estudados não possuem associação com a hanseníase *per se* na população estudada, mesmo após a correção para a covariável sexo. A análise de acordo com a classificação operacional mostrou associação do SNP rs2069845- *IL6* com aumento do risco para a hanseníase MB comparado com PB, que se manteve mesmo após a correção para sexo (genótipo GG, OR= 2,91; p=0,03). Os resultados obtidos no presente estudo, colaboram nas informações a respeito da influência genética na hanseníase em uma população de Alagoas, podendo posteriormente ser utilizado para compor um painel de marcadores para a doença, principalmente para gravidade clínica, possibilitando monitorar os pacientes e verificar as chances de desenvolverem a forma mais grave da hanseníase.

Palavras-chave: citocinas, genética, SNPs, imunologia.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium leprae* and mainly affects the skin and peripheral nerves. Brazil is the second country in the world in number of leprosy cases. In the period from 2014 to 2019, about 164,000 new cases of leprosy were reported in the country. In the state of Alagoas in 2019, the incidence rate of the disease was 6.95/100 thousand inhabitants, being considered highly endemic. Thus, the importance of investigating the possible risk factors related to the occurrence of the disease in the region of Alagoas is highlighted. One of the factors related to the development of leprosy is the genetic component of the host, especially Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in genes related to cytokines of the immune response in the pathophysiology of the disease. Studies already carried out in other populations showed an association of polymorphisms in the cytokine genes IL10, IL6 and APOE. Thus, the aim of the present study was to investigate associations of SNPs in the IL10, IL6 and APOE genes with leprosy and its clinical and operational forms. A case-control study was carried out including patients with leprosy diagnosed at the Centro de Referência Integrado de Arapiraca (CRIA). To compose the control group, volunteers with no history of infectious diseases were recruited at the Blood Center of Arapiraca-AL (HEMOAL). After that, biological samples were collected (peripheral whole blood) from which DNA extraction was performed by the salting-out method (or DNA precipitation method). From the extracted DNA, the genotyping of SNPs in these genes was performed, using allelic discrimination assays by Polymerase Chain Reaction (PCR) in real time. The analyzes were performed using the logistic regression model, which also allows the inclusion of possible covariables that may introduce some type of bias in the analyses, generating measures of genetic association with leprosy. All analyzes were performed in R environment, version (2021-05-18), with the aid of R studio software. As a result of population recruitment in the rural region of Alagoas, 445 individuals were recruited, being 181 cases (15.8% PB and 66.2% MB) and 264 controls. The frequency of polymorphisms in the population of Alagoas (controls) was 48% for CT genotype for SNP rs1800871-IL10, 48% for AG genotype for SNP rs2069845-IL6 and 48% for GT genotype for SNP rs405509-APOE. The analysis of genetic association with leprosy resulted in the following estimates: OR=1.75 (p=0.08) for the TT genotype of SNP rs1800871-IL10, OR=1.31 (p=0.36) for the GG of the rs2069845-IL6 SNP and OR=1.13 (p=0.67) for the TT of the rs405509-APOE SNP. The results demonstrate that the SNPs studied are not associated with leprosy per se in the population studied, even after correction for the covariate sex. The analysis according to the operational classification showed an association of SNP rs2069845-IL6 with an increased risk for MB leprosy compared to PB, which remained even after correction for sex (genotype GG, OR= 2.91; p=0, 03). The results obtained in the present study, contribute to the information about the genetic influence on leprosy in a population of Alagoas, and can later be used to compose a panel of markers for the disease, mainly for clinical severity, making it possible to monitor patients and verify the chances of developing the most severe form of leprosy.

Keywords: cytokines, genetics, SNPs, immunology

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição do número de novos casos de hanseníase notificados globalmente no ano de 2019 segundo a Organização Mundial da Saúde.	13
Figura 2 - Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase no Brasil entre os anos de 2009 a 2018.	15
Figura 3 - Formas clínicas da hanseníase, ilustradas por lesões dermatológicas que se apresentam com diminuição ou ausência de sensibilidade.	18
Figura 4 - Componentes da prevenção de incapacidades em hanseníase.	22
Figura 5 - Em pacientes com hanseníase tuberculóide (TT), a resposta imune inata é ativada pelo <i>M. leprae</i> por meio de receptores toll-like (TLR2/1). Em pacientes com hanseníase tuberculóide (TT), a resposta imune inata é ativada pelo <i>M. leprae</i> por meio de receptores toll-like (TLR2/1).	24
Figura 6 - Genética como fator determinante na hanseníase em seus diferentes estágios da doença.	26
Figura 7 - Representação gráfica dos resultados obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real por discriminação alélica.	39

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1996) e da OMS adotadas para a hanseníase (1982).	20
Tabela 2 - Frequência da variável sexo de ambos os grupos de indivíduos no estudo.	37
Tabela 3 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs1800871 no gene <i>IL10</i> em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.	40
Tabela 4 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs2069845 no gene <i>IL6</i> em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.	41
Tabela 5 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs405509 no gene <i>APOE</i> em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.	42
Tabela 6 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo em pacientes paucibacilares e multibacilares nos SNPs rs1800871- <i>IL10</i> , rs2069845- <i>IL6</i> e rs405509- <i>APOE</i> .	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 Aspectos gerais da hanseníase	12
2.2 Epidemiologia da hanseníase	13
2.3 Agente etiológico	16
2.4 Aspectos clínicos da hanseníase	18
2.5 Transmissão, tratamento e diagnóstico da hanseníase	21
2.6 Incapacidades físicas da hanseníase	22
2.7 Imunologia da hanseníase	23
2.8 Influência genética na hanseníase	25
2.9 Influência genética na hanseníase	26
3. OBJETIVOS	32
OBJETIVO GERAL:	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Aspectos éticos	33
4.2 População de estudo e desenho experimental	33
4.3 Coleta de amostras	34
4.4 Acondicionamento das amostras	35
4.5 Extração de DNA	35
4.6 Genotipagem	35
4.7 Análises estatísticas	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Frequência alélica e genotípica do SNP	39
5.2 Frequência alélica e genotípica do SNP	40
5.3 Frequência alélica e genotípica do SNP	41
5.4 Associação genética dos SNPs de acordo com as formas clínicas operacionais	43
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICES	60
ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele e o sistema nervoso periférico (FREITAS *et al.*, 2019). Sua forma de transmissão é através das vias aéreas superiores de pessoa a pessoa através do convívio de suscetíveis com doentes bacilíferos sem tratamento (MEER, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017), a hanseníase ocorre em todas as idades, porém é observada com mais frequência em adultos e idosos. É curável, e o diagnóstico seguido de tratamento precoce quebra o ciclo de transmissão e evita a maioria das incapacidades físicas que podem ocorrer em decorrência da doença.

O Brasil ocupa a segunda posição entre os países com maior número de casos novos de hanseníase, onde também se concentra mais de 90% de todos os casos da doença nas Américas (WHO, 2019). Em 2019, foram registrados 27.863 novos casos, apresentando uma taxa de detecção de novos casos de 13,20 por 100.000 habitantes (WHO, 2021). No estado de Alagoas, no ano de 2019, foram notificados 348 casos novos da doença, que representa uma taxa de detecção de 6,95/100 mil habitantes, considerada de média a alta endemicidade (DATASUS, 2019).

O patógeno causador dessa doença é o bacilo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e o ser humano é o seu hospedeiro, podendo transmitir através das vias aéreas superiores. O período de incubação é longo, sendo necessário um contato prolongado para haver a infecção, sendo os indivíduos sem tratamento os principais disseminadores da hanseníase (WHO, 2017). Existe uma dificuldade no manejo clínico de pacientes devido ao desenvolvimento de reações, episódios agudos que ocorrem no curso da doença crônica, sendo um fenômeno imune inflamatório, podendo gerar incapacidades físicas irreversíveis no mesmo (HUNGRIA *et al.*, 2019)

A doença manifesta-se por manchas eritematosas que apresentam limites imprecisos na pele. Essas lesões podem ser acompanhadas de perda de sensibilidade térmica, queda de pelos e perda de tônus muscular. O acometimento neural pode levar a alteração de sensibilidade. O não tratamento da doença pode, progressivamente, levar à deformação dos membros e danos físicos irreversíveis (BEZERRA, 2015).

Existem os fatores naturais e sociais que estão associados à distribuição espacial da hanseníase. Entre as premissas naturais, encontram-se o clima, o relevo, tipos de vegetação e determinados ecossistemas. Entre os fatos sociais, destacam-se condições desfavoráveis de vida, desnutrição, movimentos migratórios e outras (MAGALHÃES; ROJAS, 2007). Além disso, outros fatores podem estar relacionados, tais como o perfil genético do hospedeiro,

vacinação com BCG (Vacina de Calmette e Guérin) e taxas de exposição a *Mycobacterium leprae* ou outras microbactérias (MORAES *et al.*, 2006).

O bacilo causador da hanseníase, o *M. leprae*, possui a capacidade de infectar muitas pessoas, mas poucas adoecem, a depender da interação entre fatores do hospedeiro (genéticos e não genéticos) e do ambiente, o que justifica a importância de se conhecer os fatores genéticos do hospedeiro associados à doença (CARDOSO *et al.*, 2011). Assim, a hanseníase depende da interação entre fatores ambientais, do patógeno e do hospedeiro.

Polimorfismos de base única (SNPs), do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, em genes relacionados com o sistema imunológico do hospedeiro têm sido consistentemente sugeridos como participantes na suscetibilidade à hanseníase (ALVARADO-ARNEZ *et al.*, 2015). Os SNPs, mutações que apresentam uma frequência maior que 1% na população, foram associados com a hanseníase em populações distintas, podendo influenciar o perfil inflamatório dos indivíduos e o desenvolvimento da doença (PACHECO; MORAES, 2009).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais da hanseníase

A hanseníase é uma das doenças mais antigas da humanidade, com relatos de casos que datam de 3000 anos atrás (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014). Sua origem é pré-histórica, visto que há evidências arqueológicas provenientes da África e da Ásia, porém, as teorias sobre a sua origem são controversas (ROBBINS *et al.*, 2009), pois os primeiros registros textuais sobre a doença apareceram nos papiros egípcios datados de 1550 a.c. (HULSE, 1972). Estudos baseados em genômica comparativa e análise filogenética, mostram que a doença se originou no Oeste africano e foi propagada para outras regiões do mundo pelo fluxo de migrações contínuas durante a história da humanidade (MONOT *et al.*, 2009). No Brasil, acredita-se que a doença foi introduzida por europeus e Africanos durante o comércio de escravos no século XVIII (MONOT *et al.*, 2005).

No passado, a principal estratégia utilizada para evitar a propagação da hanseníase era o isolamento obrigatório de pacientes em colônias, que foram estabelecidas no Brasil em 1923. Com a introdução da sulfona na década de 1940 e seu uso no tratamento devido à eficácia, o isolamento deixou de ser obrigatório, mas só foi oficialmente anulado em 1962. No entanto, até meados da década de 1980, muitos pacientes ainda permaneceram isolados por várias razões, dentre elas a resistência à monoterapia com sulfona. A OMS sugeriu o uso de regimes de múltiplos fármacos e desde o início da década de 1980 a doença foi tratada com medicamentos, regimes em ambulatório e os doentes considerados curados após o tratamento (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

Na história provavelmente nenhuma doença gerou estigma social tão intenso quanto a hanseníase, sempre associada a conceitos relacionados ao pecado, impureza e punição dos que eram infectados. Na era pré-microbiológica, contribuía para o fortalecimento do estigma a noção de que a hanseníase era hereditária, já que agregação familiar de casos era observada com frequência (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

A falta de conhecimentos clínico-imunológicos motivou, hipóteses que apontavam o caráter hereditário da hanseníase (SANTOS; FARIA; MENEZES, 2008). O componente genético da suscetibilidade à hanseníase foi sugerido pela primeira vez por estudos observacionais, incluindo estudos de gêmeos, agregação familiar e análises de segregação (CARDOSO *et al.*, 2011). Estes estudos não contrariaram a hipótese de que os elementos dos gêmeos monozigóticos são mais propensos a manifestar a mesma forma da doença, corroborando com a ideia da participação de um componente genético no risco da doença e

formas clínicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.2 Epidemiologia da hanseníase

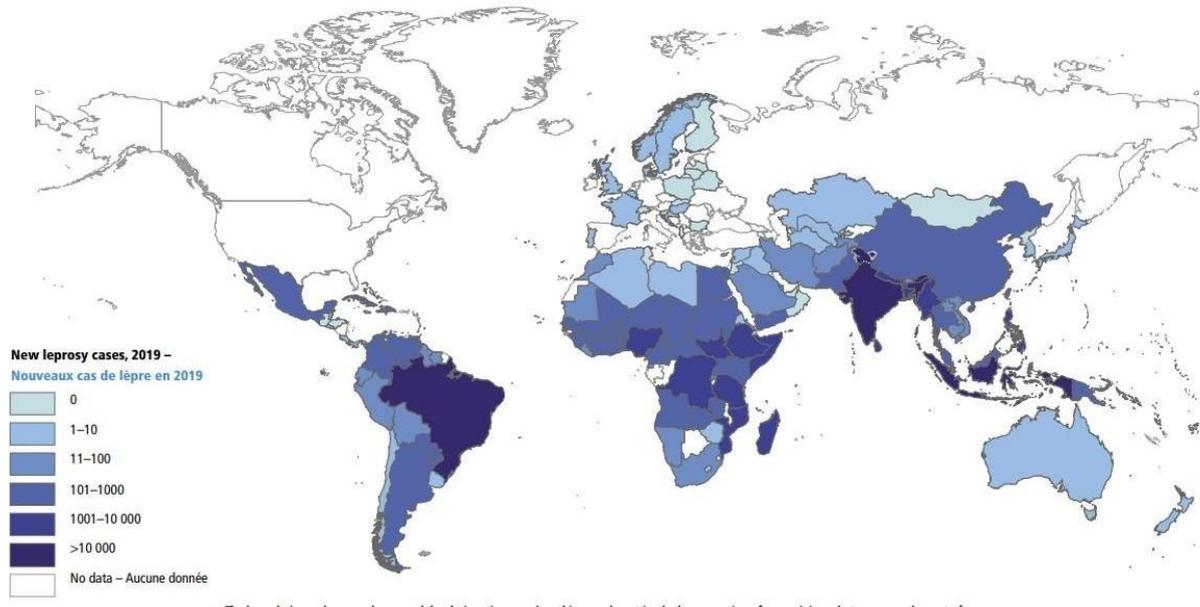
De acordo com um estudo sobre o perfil epidemiológico da hanseníase no Brasil, no período de 2014 a 2019 foram notificados cerca de 164.000 novos casos da doença no país. No período analisado, a taxa de incidência foi entre 11,14 e 15, 2 nas regiões. Com relação ao número de casos, em 2014 foram realizadas 31.064 notificações de casos, ocorrendo em 2019 uma redução das notificações em aproximadamente 24% em comparação ao ano de 2014, com 23.612 novos casos notificados (OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

A prevalência da doença foi reduzida para menos de 1/10.000 na população global devido às medidas de controle da hanseníase. No entanto, a hanseníase persiste enquanto importante problema de saúde pública nos focos subnacionais. A incidência de novos casos tem mostrado apenas um declínio gradual nos últimos 10 anos e em 2015 era de 210.758 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em 2019, o número de novos casos de hanseníase foi de 202.185 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 (Figura 1, p.) (WHO, 2019).

O Brasil é o segundo país no mundo em número de casos de hanseníase. Em 2016, de acordo com a OMS, foram identificados no Brasil 25.218 casos novos de hanseníase, perfazendo uma taxa de detecção de 12,2/100 mil hab. Esses parâmetros classificam o país como de alta carga para a doença, sendo o segundo com o maior número de casos novos registrados no mundo. Entre os anos de 2003 a 2018, foram registrados um total de 586.112 casos novos. Neste mesmo período, foram notificados 43.479 casos novos em menores de 15 anos e 37.790 casos novos com grau 2 de incapacidade física no diagnóstico (WHO, 2019).

Figura 1 - Distribuição do número de novos casos de hanseníase notificados globalmente no ano de 2019 segundo a Organização Mundial da Saúde.

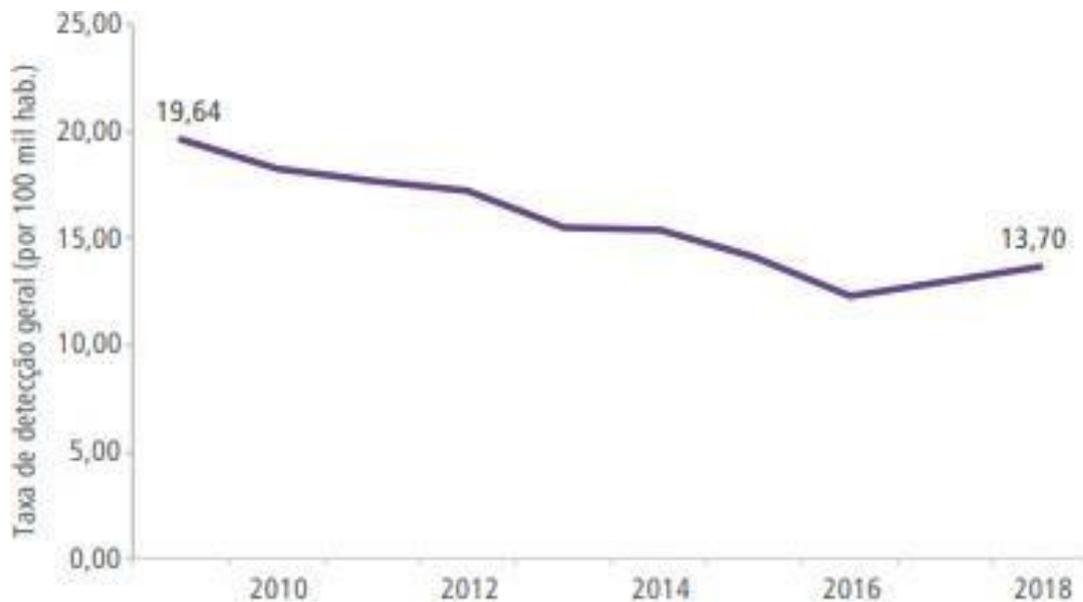


Fonte: adaptado WHO, 2019a.

No Brasil, entre os anos de 2003 a 2018, a taxa de casos novos apresentou redução, com variação ao longo do período. Em 2003, houve 14,50 casos novos por 1 milhão de habitantes, chegando a 8,80 por 1 milhão de habitantes em 2016. Nos anos de 2017 e 2018, foi observado aumento das taxas em relação ao ano anterior, sendo 9,39 e 10,10 casos novos por 1 milhão de habitantes, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No ano de 2018, o Brasil apresentou endemicidade “alta” tanto na população de menores de 15 anos de idade quanto na população geral. Quando analisado o período de 2009 a 2018, a taxa de detecção geral passou de 19,64 para 13,70 casos por 100 mil habitantes, com uma redução de 30,20% (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Figura 2 - Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase no Brasil entre os anos de 2009 a 2018.



Fonte: Ministério da Saúde, 2020.

Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil altas taxas de incidência em algumas regiões, a magnitude e o alto poder incapacitante, mantêm a hanseníase como um problema de saúde pública no país. Entre os anos de 2014 a 2018, foram diagnosticados no Brasil 140.578 casos novos de hanseníase. Entre estes, 77.544 casos novos ocorreram no sexo masculino, o que corresponde a 55,2% do total. O maior número foi identificado nos indivíduos entre 50 a 59 anos, totalizando 26.245 casos novos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Esses parâmetros classificam o Brasil como de alta carga para a hanseníase, sendo o segundo com o maior número de casos novos registrados no mundo. Apesar de ser uma doença de notificação compulsória que afeta várias partes do Brasil, ainda é bastante negligenciada em sua fase de detecção e de notificação nos serviços de saúde (MELO *et al.*, 2017).

Entre os brasileiros, a hanseníase é um problema de saúde pública cujo programa de eliminação está entre as ações prioritárias do Ministério de Saúde. A distribuição geográfica da doença no Brasil é estudada, geralmente, por suas macrorregiões e Estados, não havendo um conhecimento sistematizado de sua distribuição espacial (MAGALHÃES; ROJAS, 2007)

Em um estudo epidemiológico realizado no período 2005 a 2015 mostrou que o coeficiente de prevalência dos casos de hanseníase manteve-se num valor médio, ou seja,

de 1,00 a 4,99/10 000 habitantes, com tendência nacional decrescente, no grupo etário <15 anos ou > 15 anos. Essa prevalência não foi observada nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste (RIBEIRO, 2018).

Em Alagoas, de acordo com o DATASUS, esse número foi um total de 482 novos casos, onde o sexo masculino apresentou um valor de 250 e o sexo feminino de 232 em 2021 (DATASUS, 2021). O estado de Alagoas está localizado na região Nordeste, possui 102 municípios e uma população de aproximadamente 3.120,494 habitantes, com extensão de 27.848,140 km². O clima predominante no estado é semiárido e tropical úmido (IBGE, 2021).

Em um estudo do tipo descritivo, bibliográfico e retrospectivo de abordagem quantitativa, realizado no ano de 2016 e analisando o período de 2010 a 2014, em um distrito de referência do município de Maceió-AL, a hanseníase teve uma maior incidência no ano de 2012. O estudo revelou que nesse período houveram 48 novos casos confirmados de hanseníase em mulheres e 45 novos casos em homens, com maior incidência no ano de 2012, demonstrando que ainda persistem altos os índices de acometimento da população. Os resultados desse trabalho, demonstraram que a hanseníase continua sendo um grave problema de saúde pública, ainda negligenciado (MELO *et al.*, 2017).

Um estudo ecológico de novos casos de hanseníase na população de Arapiraca no período de 2008 a 2017, mostrou que foram registrados 292 novos casos de hanseníase, ocorrendo principalmente no sexo feminino, numa faixa etária de 46 a 59, com menos de oito anos de escolaridade e residentes em áreas urbanas. Nesses novos casos predominava a forma tuberculóide e da classificação paucibacilar. Quase um terço das pessoas apresentavam algum grau de deficiência física, principalmente ao grupo de 60 anos ou mais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020).

2.3 Agente etiológico

A hanseníase é uma doença bacteriana crônica para a qual o agente etiológico é *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Esse patógeno é intracelular obrigatório que infecta macrófagos e células Schwann do sistema nervoso periférico, resultando em danos severos e irreversíveis nos tecidos nervosos. Pelo fato dela ter um longo período de incubação, acaba dificultando o diagnóstico e tornando-se um problema de saúde pública (SANTOS *et al.*, 2017; SILVA e BELISLE, 2018).

O *M. leprae* é uma bactéria Gram-positiva, intracelular e imóvel, possui a forma de bastonete reto com extremidades arredondadas (DIÓRIO, 2014). É um bacilo álcool-ácido resistente, não cultivável em laboratório e de multiplicação lenta (11-21 dias), com um período de incubação de em média 5 anos (GOULART; PENNA; CUNHA, 2005; MISCH *et al.*, 2010). Apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou um pouco encurvado, com extremidades arredondadas, medindo aproximadamente de 1 a 8 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro (MADEIRA, 2000). É um parasita intracelular obrigatório com afinidade pelo sistema nervoso periférico, ou seja, ramos nervosos sensitivos cutâneos e troncos nervosos. Tal característica confere ao bacilo um grande potencial para causar incapacidades físicas que podem, inclusive, evoluir para deformidades (LANA, 2005).

Tem mais afinidade em locais do corpo mais frios, como o trato respiratório superior, orelhas e extremidades do corpo, sendo a temperatura de 27 °C à 30°C ideal para o seu desenvolvimento (HASTINGS *et al.*, 1968). Afeta principalmente macrófagos da pele e células Schwann de nervos periféricos, nos quais a presença do bacilo evoca como resposta uma forte inflamação que pode levar a danos nos nervos (CARDOSO *et al.*, 2011).

A reprodução do *M. leprae* ocorre pelo processo de divisão primária. Sua parede celular possui cerca de 20 nm de espessura e uma estrutura química constituída de peptídeoglicanos entrelaçados e ligados a cadeias polissacarídicas, que servem de suporte para os ácidos micólicos. Os lipopolissacarídeos dessas micobactérias podem atuar de forma importante para a sobrevivência no interior da célula do hospedeiro e patogênese da doença. O bacilo apresenta uma cápsula e sua superfície externa é caracterizada pela presença de uma grande quantidade de componentes lipídicos, sendo provavelmente responsáveis pela "zona elétron transparente" e pelo aspecto espumoso do material visto no interior dos macrófagos de pacientes virchovianos (MADEIRA, 2000).

A estrutura da parede do bacilo é constituída por peptídeoglicanos entrelaçados e ligados covalentemente a cadeias polissacarídeos, servindo de suporte para os ácidos micólicos. Esses ácidos possuem um alto peso molecular, tornando-se responsáveis pela natureza hidrofóbica da micobactéria sendo provavelmente responsáveis pela zona elétron-transparente (DIÓRIO, 2014). Quando uma radiação contínua atravessa um material transparente, parte dessa radiação pode ser absorvida, caso isso aconteça, ao atravessar um prisma irá produzir um espectro com intervalos transparentes (espectro de absorção), com essa absorção, átomos ou moléculas passam de um estado de energia mais baixa para uma energia maior, havendo assim uma excitação dos elétrons (PAVIA *et al.*, 2010).

2.4 Aspectos clínicos da hanseníase

A hanseníase apresenta-se em um espectro de formas clínicas, indo de uma forma mais branda até uma mais grave. Mediante a exposição ao patógeno a infecção pode ocorrer e a doença pode apresentar-se na forma indeterminada, que se caracteriza em uma forma latente que posteriormente pode evoluir para qualquer das outras formas clínicas. Além disso, a doença ainda pode permanecer latente por anos sem manifestar sinais clínicos (MISCH *et al.*, 2010). Alguns pacientes que não têm resistência ao *M. leprae* apresentam um alto número de lesões elevadas ou nodulares em todas as partes do corpo, e que são reveladas, através de biópsias ou macrófagos espumosos na derme contendo muitos bacilos e micro colônias (Figura 3) (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Figura 3 - Formas clínicas da hanseníase, ilustradas por lesões dermatológicas que se apresentam com diminuição ou ausência de sensibilidade.





A) Lesão hipopigmentada (redução da coloração da pele) bem definida e sem sensibilidade ao toque no local da mancha (PB). B) Mancha hipopigmentada (PB). C) Mancha na porção inferior do antebraço que aumentou ao longo de um período de dois meses de observação e por fim detectou a perda de sensibilidade (PB). D) Superfície da lesão ligeiramente áspera e seca com perda de sensibilidade (PB). E) Perda muito evidente de sensibilidade (PB). F) Várias manchas hipopigmentadas. Paciente com mais de 5 lesões e com alguns nervos comprometidos (MB) G) Paciente com lesões, dois nervos periféricos comprometidos e perda de sensibilidade ao toque leve (MB). H) Várias lesões no corpo do paciente, baciloscopia positiva e perda de sensibilidade ao toque leve e três nervos periféricos comprometidos (MB). I) Manchas na face e no pescoço e vários nódulos (MB)

Fonte: ATLAS DA HANSENÍASE, 2019

Existem episódios inflamatórios conhecidos como reações hansênicas aos quais os pacientes com hanseníase podem ser acometidos antes, durante ou após o tratamento, existindo duas formas principais, as quais apresentam diferentes mecanismos imunológicos (FOSS, 2003). A primeira, Tipo 1, que também é denominada reação reversa, possui um quadro clínico caracterizado pelo agravamento de lesões pré-existentes e ao aparecimento de novas lesões. O segundo tipo de reação, Tipo 2 ou eritema nodoso, ocorre apenas nos pacientes multibacilares e é manifestado com nódulos subcutâneos eritematosos, dolorosos, mais palpáveis do que visíveis. Cada nódulo pode durar de uma a duas semanas, mas outros podem aparecer (CARNEIRO, 2006).

Para a classificação das formas clínicas da hanseníase, Ridley e Jopling 1962 adotaram subgrupos dentro do espectro, obedecendo critérios clínicos e bacteriológicos, enfatizando os aspectos imunológicos e histopatológicos. São utilizadas siglas que indicam as formas polares e borderlines: a) tuberculóide - tuberculóide (TT), onde o paciente possui lesões cutâneas ou neurais localizadas e predomínio de resposta imune celular, com pouco ou nenhum bacilo; b) lepromatosolepromatoso (LL), possuindo deficiência de resposta imune celular, com a dispersão da doença e c) os três subgrupos borderline- tuberculóide (BT), borderline- borderline (BB), borderline- lepromatosa (BL), representando as formas borderlines da doença, que apresentam respectivamente redução da resposta imune celular, lesões na pele e nervos e

aumento da carga bacilar e níveis de anticorpos (RIDLEY; JOPLING, 2015). Uma outra proposta de classificação da hanseníase, classificação de Madri, adota critérios de polaridade, baseados nas características clínicas da doença (SOUZA, 2013) que se ampliaram pelos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, dividindo a hanseníase em dois grupos instáveis: hanseníase indeterminada e dimorfa e dois grupos estáveis: tuberculóide e virchowiana.

Tabela 1 - Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1996) e da OMS adotadas para a hanseníase (1982).

Madri	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Borderline (B)	Virchowiana (V)
Ridley & Jopling		TT	BT* BB BL	LL
OMS	Paucibacilares	Multibacilares		

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

Fonte: SOUZA (1997).

Foi proposta pela OMS em 1982 uma classificação simplificada e operacional para a hanseníase, na qual os pacientes são classificados em paucibacilar (PB – presença de até cinco lesões de pele com baciloscopia de raspado intradérmico negativo, quando disponível) ou multibacilares (MB – presença de seis ou mais lesões de pele ou baciloscopia de raspado intradérmico positiva). A classificação da OMS é utilizada para fins de tratamento, e por isso se faz de extrema importância no controle da hanseníase (“Chemotherapy of leprosy for control programmes”, 1982). Os pacientes com as formas multibacilares da hanseníase são considerados a principal fonte de transmissão, porém o papel dos paucibacilares na cadeia de transmissão já ter sido demonstrado (GROSSI ARAÚJO, 2003).

Sabe-se que o aparecimento das reações possui alta relação com a ocorrência das incapacidades nos pacientes com hanseníase (FAVA *et al.*, 2017). A agressão aos nervos na hanseníase pode se estabelecer de dois modos: um inicial, que ocorre na ausência de células inflamatórias e é comum tanto à forma paucibacilar como à multibacilar; e, um tardio com presença de processo inflamatório (CHACHA *et al.*, 2009). O dano neural é atribuído a proliferação bacteriana ou a resposta imune do hospedeiro em nervos periféricos e áreas da derme adjacentes (GOULART; PENNA; CUNHA, 2005).

2.5 Transmissão, tratamento e diagnóstico da hanseníase

Pouco se sabe sobre a distribuição e transmissão da infecção e os fatores que conduzem ao adoecimento, principalmente pela impossibilidade de cultivar o *Mycobacterium leprae* (DE MOURA *et al.*, 2008). A hipótese aceita é que, para que a transmissão do bacilo ocorra, é necessário um contato direto e prolongado com o paciente na forma multibacilar e que não esteja em tratamento (BRASIL, 2002). De acordo com o Ministério da Saúde, normalmente, a fonte da doença é um parente próximo que não sabe que está doente, como avós, pais, irmãos, cônjuges, etc. O bacilo é transmitido pelas vias respiratórias superiores, e não através de objetos utilizados pelo paciente.

Ao longo da doença, o paciente tratado, não tratado ou que esteja em tratamento, poderá apresentar episódios reacionais, caracterizado por inflamações agudas que podem levar ao comprometimento sistêmico, cutâneo e neurológico (SILVA, 2011). Esses episódios podem ser classificados como Reação tipo 1 ou reação reversa (RR), ocorrendo de forma mais frequente em pacientes paucibacilares e parece estar associada ao aumento repentino da resposta imune mediada por célula contra antígenos do *M. leprae* ou Reação tipo 2 ou reação de eritema nodoso hansênico (ENH), ocorrendo principalmente em pacientes multibacilares, sendo caracterizado por reação inflamatória sistêmica, com uma imunopatologia mais complexa. A maior ocorrência é em pacientes sob tratamento, podendo ser recorrente (CARVALHO *et al.*, 2017)

Para o tratamento da hanseníase é utilizada a poliquimioterapia (PQT), onde os pacientes PB e MB recebem um tratamento através da associação dos medicamentos Rifampicina, Dapsona e Clofazimina. O tempo de tratamento para pacientes PB é de 6 meses (6 cartelas) e para MP o tempo de tratamento é de 12 meses (12 cartelas) (BRASIL, 2017). O diagnóstico e o reconhecimento precoce da doença garantem o início do tratamento e a interrupção da cadeia de transmissão, prevenindo as incapacidades físicas (GROSSI ARAÚJO, 2003).

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, realizado através do exame físico onde procede-se uma avaliação dermatoneurológica, buscando-se identificar sinais clínicos da doença. Antes, porém, de dar-se início ao exame físico, deve-se fazer a anamnese colhendo informações sobre a sua história clínica, ou seja, presença de sinais e sintomas dermatoneurológicos característicos da doença e sua história epidemiológica (BRASIL, 2002). Existem formas complementares de diagnóstico que são: intradermorreação, baciloscopia, histopatologia, sorologia, reação de imunohistoquímica e identificação molecular do *M. leprae* (LASTÓRIA *et al.*, 2012).

Na intradermorreação de Mitsuda, injeta-se na derme o antígeno lepromina. Esse teste de imunidade celular é o único que o resultado não é analisado em 24 horas, mas após 28, quando ocorre a formação de um granuloma e hipersensibilidade (PINHO *et al.*, 1998). No exame baciloscópico é utilizado o microscópio como equipamento de leitura de amostras obtidas das lesões dos pacientes. A leitura dos resultados é realizada de acordo com o Índice Baciloscópico (IB), proposto por Ridley em 1962, que se baseia em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6. É o método de avaliação quantitativa mais utilizada na leitura da baciloscopia em hanseníase (BRASIL, 2017).

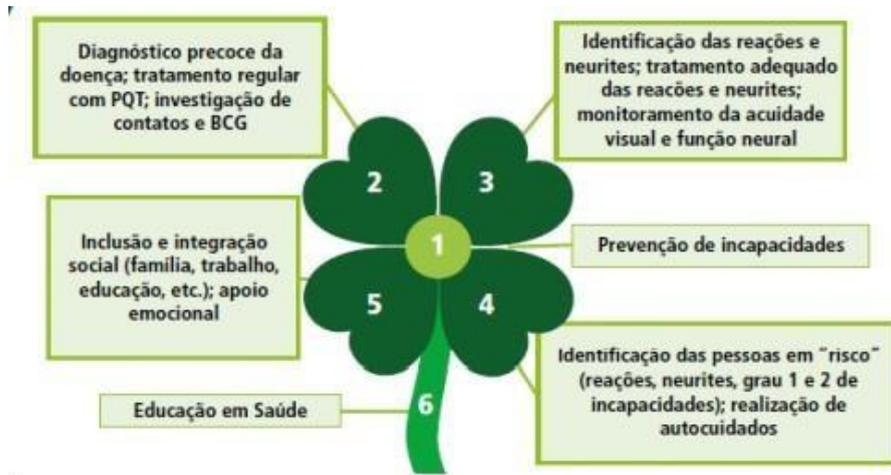
O exame histopatológico é realizado pelas colorações de hematoxilina-eosina e Faraco-Fite, que evidencia bacilos álcool-ácido-resistentes (LASTÓRIA; DE ABREU, 2012). O diagnóstico molecular, por sua vez, detecta o *M. leprae* através da reação de PCR, permitindo quantificar e determinar a viabilidade da bactéria. A Reação em cadeia da polimerase (PCR) identifica porções específicas do DNA do *M. leprae* através da amplificação de sequências genômicas do bacilo (GOULART; GOULART, 2008).

Em 2021, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o uso do Kit-NAT HANS para a hanseníase. É um teste de biologia molecular para ser empregado em biópsias de lesões cutâneas e de nervos, tem como objetivo auxiliar no diagnóstico da hanseníase, quando a baciloscopia de raspado intradérmico for negativa (BRASIL, 2021).

2.6 Incapacidades físicas da hanseníase

Na abordagem clínica da hanseníase as incapacidades físicas são consideradas como um agravamento que impacta os pacientes, por levar a incapacidades, deformidades físicas, preconceito e estigma (MONTEIRO *et al.*, 2013). Em 2002, o Ministério da Saúde classificou os graus de incapacidade como grau III ao grau II, com o objetivo de facilitar a avaliação nos centros de atenção básica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). O grau de incapacidade está relacionado com o tempo de doença, permitindo uma avaliação indireta da efetividade das atividades de detecção precoce e tratamento adequado dos casos (ALVES *et al.*, 2010). A prevenção de incapacidades na hanseníase inclui um conjunto de medidas visando evitar a ocorrência de danos físicos, emocionais e socioeconômicos (Figura 5). A principal forma de prevenir as deficiências e as incapacidades físicas, é o diagnóstico precoce. O objetivo geral da prevenção de incapacidades é proporcionar ao paciente, durante o tratamento e após alta, a manutenção ou melhora de sua condição física, socioeconômica e emocional (BRASIL, 2018).

Figura 4 - Componentes da prevenção de incapacidades em hanseníase.



Fonte: Guia Prático de Hanseníase – Ministério da Saúde, (2018).

2.7 Imunologia da hanseníase

Por se tratar de um bacilo intracelular obrigatório, a resposta imune eficaz é mediada por células, sendo representada pela fagocitose dos bacilos pelos macrófagos, pela ocorrência do antígeno e apresentação dos antígenos aos linfócitos T auxiliares (Th). Se houver um desequilíbrio nesta interação ou a resposta não seja eficiente, poderá favorecer uma multiplicação do bacilo, dessa forma, contribuindo para o desenvolvimento da doença (UCIECHOWSKI *et al.*, 2011).

A interação inicial entre o *M. leprae* e o ser humano envolvem os macrófagos e células dendríticas (CDs) que atuam no sítio de invasão do bacilo durante a resposta imune inata (MENDONÇA *et al.*, 2008). Nelas e em outras células de defesa, como neutrófilos e linfócitos B, além de outros grupos celulares envolvidos na resposta imune inata, estão presentes receptores, dentre estes os do tipo toll-like (TLRs), que são essenciais para o reconhecimento de patógenos, desencadeando uma resposta pró- inflamatória (SILVA, 2013).

A imunidade natural tem um papel crucial no resultado da infecção, através da tentativa inicial de contenção da infecção e da produção de citocinas. Grande parte das células dendríticas são ativadas durante o primeiro contato com o patógeno, fagocitando, processando e apresentando o antígeno aos linfócitos T e B distantes do sítio da infecção. Além disso, há a produção de citocinas como IL-12, TNF, *IL10* e *IL6* (DEMANGEL; BRITTON, 2000).

A liberação de citocinas pode levar à resistência ou à progressão da doença. Citocinas do tipo Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18) têm alta produção local nas lesões em

pacientes paucibacilares. Já indivíduos multibacilares possuem um padrão de citocinas do tipo Th2 nas lesões (*IL-4* e *IL10*), com alta produção de anticorpos, porém, não são efetivos para a doença visto que o *M. leprae* é bacilo intracelular obrigatório (FRANCHESCHI *et al.*, 2009).

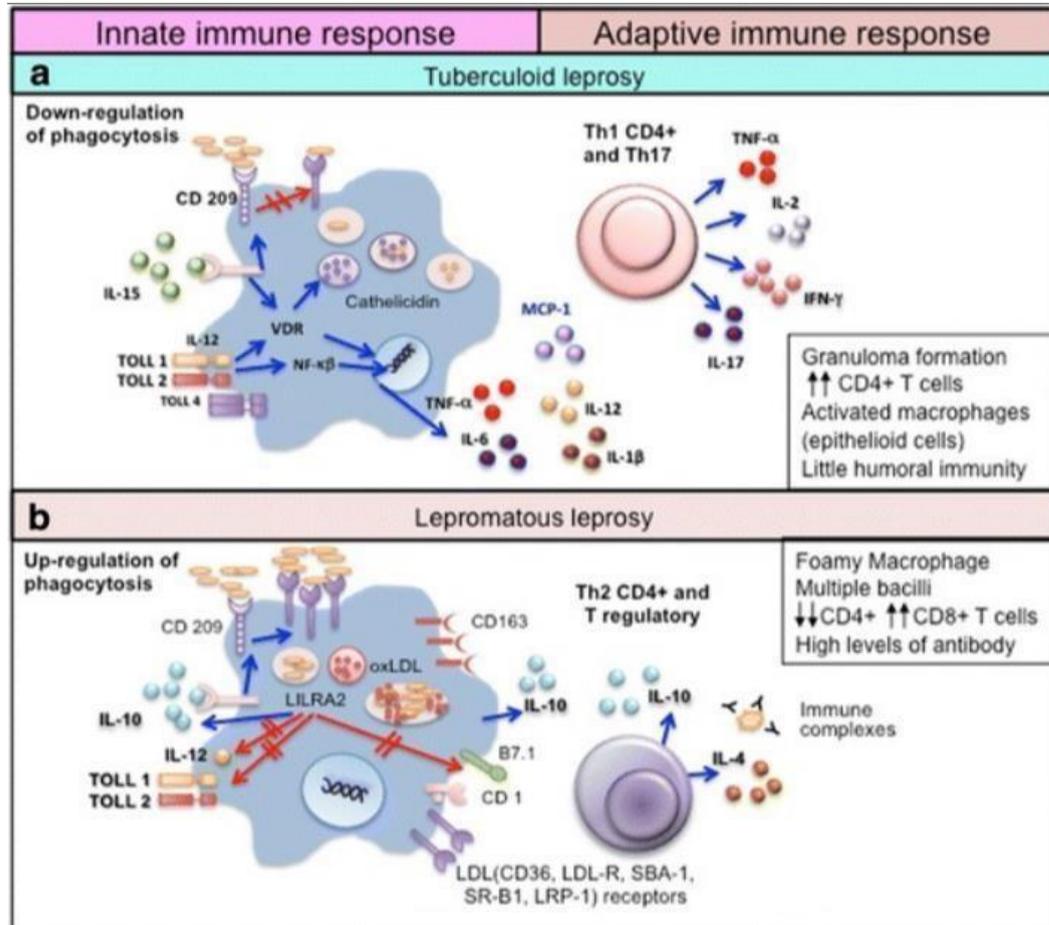


Figura 5 - Em pacientes com hanseníase tuberculóide (TT), a resposta imune inata é ativada pelo *M. leprae* por meio de receptores toll-like (TLR2/1). Em pacientes com hanseníase tuberculóide (TT), a resposta imune inata é ativada pelo *M. leprae* por meio de receptores toll-like (TLR2/1). A *IL-15* estimula o programa antimicrobiano dependente de vitamina D em macrófagos e inibe a fagocitose de micobactérias. Esses eventos promovem uma resposta de citocinas de células T Th1 (IFN-γ, *IL-2*, TNF e *IL-15*) que contém a infecção em granulomas bem formados e uma resposta Th17 (*IL-17A*, *IL-17F*, *IL-21* e *IL-22*) que leva à inflamação e destruição do tecido, recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos e aumento de células efetoras Th1. b Em pacientes com hanseníase virchowiana (LL), *IL-4*, *IL10*, membro 2 do receptor tipo imunoglobulina leucocitária da subfamília A (LILRA2) e fosfolípidios oxidados inibem as respostas de citocinas induzidas por TLR2/1, mas preservam a liberação de *IL10*. Além disso, os imunocomplexos desencadeiam a produção de *IL10* e aumentam a fagocitose do *M. leprae*, ApoB, complexo haptoglobina-hemoglobina e fosfolípidios oxidados pelos macrófagos através dos receptores CD209 e CD163, sem ativar a via antimicrobiana dependente da vitamina D. A aparência espumosa dos macrófagos se deve ao acúmulo de gotículas lipídicas (LD) no interior dessas células. Há uma regulação positiva da perilipina e da proteína relacionada à diferenciação adiposa no complexo retículo endoplasmático-Golgi com a formação de vesículas contendo lipídios, fosfolípidios, éster de colesterol e colesterol. Além disso, há um aumento tanto na síntese de receptores de LDL (como CD36, LDL-R, SBA-1, SR-B1 e LRP-1) quanto na captação de colesterol endógeno que se acumula intracelularmente. Isso induz um perfil imune Th2 e Treg, com produção de *IL-4* e *IL10*, produção de anticorpos, ausência de granulomas e falha em restringir o crescimento do *M. leprae* (Fonseca *et al.*, 2017).

Observações clínicas indicaram que não bastava o contato com o bacilo para se desenvolver a hanseníase, e que a mesma ocorria com maior ou menor frequência em diferentes populações e que a doença se manifestava de diferentes maneiras em diferentes indivíduos (PREVEDELLO *et al.*, 2007). De fato, evidências epidemiológicas e genéticas têm implicado genes principais que contribuem para o desenvolvimento de doenças micobacterianas (ALTER, 2011). Resultados gerais de análises de segregação complexa sugerem um modelo de susceptibilidade à hanseníase, com alguns principais genes que influenciam a doença e vários genes e variações causando efeitos sutis no resultado da doença (CARDOSO *et al.*, 2011).

A hanseníase fornece um excelente modelo para investigar os mecanismos pelos quais o sistema imune inato, através da influência do background genético, determina o desfecho em doenças infecciosas humanas (MODLIN, 2010). Dentre todos os genes que participam da imunidade frente a doenças infecciosas, é plausível que os genes de citocinas e de moléculas associadas à inflamação e resposta imune desempenham um papel crucial (PACHECO; MORAES, 2009). Estudos genéticos já confirmaram a influência genética no desenvolvimento da hanseníase (BEZERRA *et al.*, 2019).

Em trabalhos realizados com o objetivo de detectar a citocina TNF- α na hanseníase, foi observado que esta citocina está presente no soro de pacientes com hanseníase tuberculóides e ausente em soro de virchovianos. Estes resultados estavam correlacionados com a produção de TNF- α por células mononucleares, de doentes com as formas polares da doença, indicando que a destruição do *M. leprae* e a formação de granuloma estão associadas à presença de TNF- α . Além disso, observou-se que em estado reacional, que é comum em virchovianos, há uma crescente produção de TNF- α , sugerindo que essa citocina pode estimular a reação inflamatória aguda (FOSS, 1997). Além desse estudo, outro do tipo caso controle realizado no Brasil, mostrou que o aumento da produção de TNF α podem também resultar de uma diminuição da produção de *IL10*, citocina anti inflamatória que inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (SANTOS *et al.*, 2002).

2.8 Influência genética na hanseníase

Compreender os fatores genéticos de risco que o hospedeiro apresenta ajuda na compreensão dos mecanismos biológicos que estão presentes em diversas doenças infecciosas. Evidências oriundas de estudos genéticos realizados em várias populações apontam conclusivamente para a influência da genética em doenças infecciosas, incluindo a hanseníase, onde o contato com o patógeno é necessário, mas não é suficiente para o desenvolvimento da

doença. (MIRA *et al.*, 2022).

Estudos relacionados à associação genética são uma ferramenta para investigar os fatores genéticos nos hospedeiros podem contribuir na suscetibilidade ou proteção de muitas doenças, utilizando comparação alélica de um marcador genético entre os indivíduos que foram afetados por alguma doença e pessoas saudáveis, observando se um alelo é específico para determinada condição quando houver diferença significativa entre duas populações (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

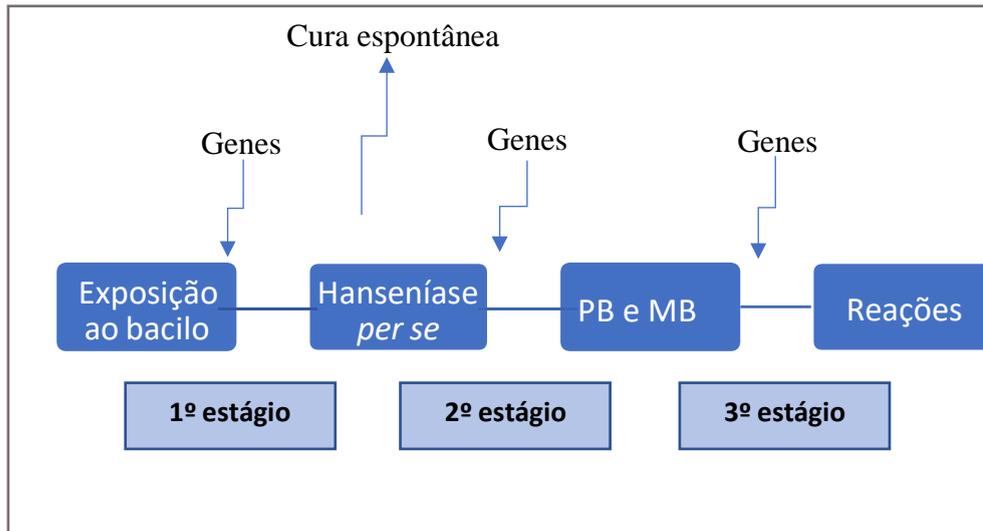
Existem vários tipos de marcadores no genoma humano, como os polimorfismos de microssatélite (STR; do inglês, short tandem repeat), de mini- satélite (VNTR, do inglês, variable number of tandem repeats) e polimorfismos de base única (SNP, do inglês, single nucleotide polymorphism), com uma grande importância nos estudos genéticos (MORAES *et al.*, 2006). Nos estudos genéticos de associação, os SNPs são os mais utilizados devido à sua frequência nas populações e sua ampla distribuição no genoma. Eles são mutações pontuais bialélicas distribuídas mundialmente e ocorrem em uma porcentagem maior que 1% na população. Quando estão localizados em regiões codificantes, os SNPs podem alterar a sequência de aminoácidos e isso resultará em variações nas funções das proteínas ou em suas estruturas (PACHECO, MORAES, 2009).

Os genes candidatos na hanseníase são aqueles que participam de vias pró e anti-inflamatórias e receptores da resposta imune que desempenham papel importante para conter a infecção pelo bacilo (SANTOS, 2021). Nas pesquisas sobre hanseníase, um dos desenhos mais utilizados é do tipo caso- controle, necessitando de coleta de amostras de indivíduos com a doença em uma população (casos) e indivíduos saudáveis (controles), analisando a frequência de determinado marcador genético. (LEWIS; KINIGHT, 2012).

2.9 Influência genética na hanseníase

A genética é um fator importante na hanseníase, estando envolvidos na suscetibilidade ou proteção. Diante desse aspecto frente ao curso natural da doença, pode-se afirmar que os fatores genéticos 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 (SAUER *et al.*, 2015).

Figura 6 - Genética como fator determinante na hanseníase em seus diferentes estágios da doença.



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

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

Um estudo do genoma completo do tipo GWAS (Genome-Wide Association Study), realizado em uma população chinesa e que envolveu um grande número de pacientes com hanseníase (grupo casos) e pessoas não afetadas (grupo controles) encontrou associação da hanseníase com 16 SNPs mostrando uma forte associação dentro de sete genes de suscetibilidade: *HLA- DR- DQ*, *RIPK2*, *TNFSF15*, *LRRK2*, *CCDC122*, *C13orf31* e *NOD2* (ZHANG *et al.*, 2009). Três desses genes tiveram associação em uma pesquisa de base familiar na aldeia da Prata, Pará, Brasil: *NOD2* (rs8057341 - A, rs2111234- G, rs3135499- C) e *CCDC122-LACCI* (rs4942254- C e rs2275252- A), confirmando a associação com a hanseníase na população brasileira (SALES-MARQUES *et al.*, 2014).

Um mapeamento do genoma que foi realizado em um estudo com famílias no Vietnã, obteve como resultado a identificação da região 6q25 associada com a hanseníase *per se*. Posteriormente essa região foi estudada com mais detalhes e foram encontrados os genes *PRK2* que antes que chamado de *PARK2* e a sua região co-reguladora *PARCG*. Foram vistos dois SNPs do *PRKN* (rs9356058 e rs1040079) que obtinham toda a informação de associação com a suscetibilidade à hanseníase (MIRA *et al.*, 2003, 2004). Dentro das doenças infecciosas, a diminuição de *PRKN* nas células de Schwann e nos macrófagos estimulados com *M. leprae* prejudica na produção das citocinas pró- inflamatórias *IL6* e *MCP-1* (DE LÉSÉLEUC *et al.*, 2013; SCHURR *et al.*, 2006).

Um estudo realizado na população chinesa avaliando um genoma completo, foi o

primeiro a associar variantes do *NOD2* com a hanseníase. Dois SNPs rs9302752 e rs7194886 foram associados com a doença e a sua forma mais clínica mais grave (multibacilar). Além disso, nesse estudo 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).

Foi conduzido com populações da Índia e África Ocidental uma replicação dos SNPs no *NOD2*, mas não foi encontrada nenhuma associação dos mesmos com a hanseníase (WONG *et al.*, 2010). Outro estudo avaliou SNPs na região cromossômica do *NOD2* no Nepal e a sua relação com a hanseníase. Dos 32 polimorfismos que investigaram, oito foram associados com a suscetibilidade a doença per se e 16 estiveram relacionados com os estados reacionais, conferindo proteção `RR e os outros sete associados ao aumento do ENH (BERRINGTON *et al.*, 2010).

Na população brasileira, os polimorfismos rs2111234 e rs3135499 no *NOD2*, tiveram associação à proteção em estudos com famílias e o rs8057341 também mostrou essa associação quando avaliado em casos e controles. O SNP rs751271 foi associado com o desenvolvimento de reações (LEITURIONDO *et al.*, 2020; SALES-MARQUES *et al.*, 2014, 2017).

Na imunidade inata, os TLRs possuem um papel importante, estudos envolvendo o gene que codifica para esse receptor apontam marcadores de suscetibilidade ou proteção para a hanseníase. Na Turquia foi realizado o primeiro estudo funcional, analisando o primeiro impacto do SNP rs5743618 (1805C>A), e mostrou que os indivíduos homocigotos para 1805C apresentaram baixa expressão nos níveis de TLR1, estando relacionado à uma deficiência em sua função (JOHNSON *et al.*, 2007).

No sudeste do Brasil, o polimorfismo rs4833095 no gene *TLR1* foi associado a hanseníase per se e confirmado através de um estudo de família (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; DE SALES MARQUES *et al.*, 2013).

Existem outros SNPs que podem desempenhar um papel importante na hanseníase. Na Etiópia foi encontrado 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).

No estudo do genoma completo também foi descoberto variantes nos genes *CCDC122*, *CD13orf31*, *TNFSF15*, *HLA-DR-DQ*, *RIPK2* e *LRRK2*, associados com o risco ao desenvolvimento da hanseníase (ZHANG *et al.*, 2009). Outra associação nos genes *CCDC122-LACCI* foi encontrada, mostrando suscetibilidade à hanseníase na população chinesa (ZHANG

et al., 2009). Na Índia e África esses genes também estiverem associados à susceptibilidade (WONG *et al.*, 2010). Na população brasileira mostrou proteção (rs4942254 e rs2275252) (SALES-MARQUES *et al.*, 2014).

O gene do receptor *VDR* (Vitamin D Receptor) também é outro gene que já foi associado com a hanseníase, conferindo suscetibilidade na população da Índia (ROY S *et al.*, 1999). Em um trabalho do tipo caso-controle (pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis), realizado no Pará, Brasil, foi analisada a frequência alélica por meio de dois haplótipos do gene *NRAMP1* (Resistência Natural Associada à Proteína na Macrofágica), um com a inserção de quatro pares de bases (pb) (CAAA) com 163 pb e outro com a deleção de quatro pares de base com 159 pb, obtendo como resultado uma forte associação com hanseníase MB, comparada com a PB e com o grupo de controles (SILVESTRE *et al.*, 2016).

A linfotóxina alfa, por sua vez, é uma citocina importante na modulação da resposta inflamatória, ela é codificada pelo gene *LTA* (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Em um estudo que envolveu mais de 400 marcadores genéticos da região HLA, foi encontrado uma associação entre alelos do gene *LTA* e suscetibilidade à hanseníase per se em amostras da população do Vietnam (ALCAÏS *et al.*, 2005). Juntamente com os demais genes identificados como relacionados com a hanseníase, os estudos de associação contribuem para enriquecer a lista de marcadores associados com a doença, em diversas populações.

2.10 *IL10, IL6 e APOE* no contexto da hanseníase

A citocina *IL10* é secretada em altos níveis por pacientes das formas mais graves da hanseníase. O gene *IL10* que codifica essa proteína está localizado na região 1q31-q32 do cromossomo, na qual também outros genes de citocinas nesse locus já foram associados a doenças de pele (CHUNG *et al.*, 2007; KÓKS *et al.*, 2005).

Na hanseníase o polimorfismo mais estudado é o rs1800871 (-819 C>). O alelo - 819T desse SNP já foi associado com risco ao desenvolvimento da hanseníase na Índia e no Brasil (ALVARADO- ARNEZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2009; TARIQUE *et al.*, 2015). Outra variante também na região promotora (-1082G>A) mostrou associação a risco em pacientes homocigotos para o alelo G na população indiana, já na população indiana, os homocigotos para o alelo A que estavam associados à infecção (CHEN *et al.*, 2013; TARIQUE *et al.*, 2015, 2020).

Pacientes com diagnóstico confirmado e que atenderam a Unidade de Referência ambulatorial Souza Araújo, Fiocruz, Rio de Janeiro, os indivíduos com o genótipo rs751271-GT no gene *NOD2* apresentaram uma associação genética com a hanseníase, estando o genótipo relacionado com uma menor produção de *IL6* (MARQUES *et al.*, 2017).

Investigações feitas sobre mecanismos de modulação da imunidade inata apoiam uma

ideia de que após a forma Indeterminada de hanseníase, ocorrem eventos imunorregulatórios, os quais determinam o espectro da doença (FRANCHESCHI *et al.*, 2009). A *IL10* atua como imunomoduladora da resposta inflamatória, e desloca a resposta imune para produção de anticorpos; assim, quanto menor a produção de *IL10*, maior a resposta celular inflamatória que protege contra a hanseníase (GARCIA *et al.*, 2013). Acredita-se que ela seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória (MOORE *et al.*, 2001).

Em uma meta-análise foi constatado que diversos estudos avaliaram a influência de polimorfismos no gene *IL10* com a hanseníase em diferentes populações, encontrando associação com proteção a doença. Todos os estudos foram do tipo caso controle, conduzidos em brasileiros, indianos, mexicanos, malauianos, colombianos e em populações chinesas (ALVARADO-ARNEZ *et al.*, 2015).

A citocina *IL6* é uma citocina pró-inflamatória, atuando sobre o hepatócito, estimulando a produção das proteínas da reação inflamatória, entre elas a proteína C-reativa (FOSS, 1999). Em outras populações, o SNP rs2069845 do gene *IL6*, que atua na imunopatogênese da hanseníase, mostrou um aumento da citocina *IL6* e também de outras citocinas pró-inflamatórias em indivíduos que exibem uma resposta imune predominantemente humoral. Isso gera as reações mais graves da hanseníase (LOCKWOOD *et al.*, 2008).

Pacientes com hanseníase virchoviana, ao longo do tempo apresentam alterações na pele e seus exames histológicos mostram numerosos macrófagos carregados de material lipídico (DIRCEU, 2017). A Apolipoproteína E (*APOE*) tem uma importância no transporte lipídico, estando associada a distúrbios neurodegenerativos. É uma proteína glicosilada multifuncional, tendo uma ampla distribuição tecidual. Entre outras funções, o papel da *APOE* na modulação da inflamação e oxidação é necessária na apresentação dos fatores de risco de doenças neurodegenerativas, visto que sua função está ligada tanto às citocinas pró-inflamatórias, quanto anti-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2011). Além disso, as propriedades fisiológicas, como antioxidante, antioptótico e imunomodulatório, são significativamente influenciadas pelo polimorfismo rs405509- *APOE* (ZHANG *et al.*, 2010).

Em um trabalho realizado no sudoeste da China em que cinco SNPs de *APOE* foram analisados em 1110 indivíduos (527 pacientes e 583 controles) foi demonstrado que SNPs (rs405509 e rs439401) aumentaram o risco de hanseníase *per se* e hanseníase multibacilar ($p < 0,005$). *APOE* e genes lipídicos estão envolvidos em uma rede de interação com genes de suscetibilidade à hanseníase, provavelmente pela regulação de genes que estão relacionados ao metabolismo lipídico (WANG *et al.*, 2017).

Diante disso, levantamos a hipótese de que podem existir correlações entre as vias

envolvendo os genes *IL10*, *IL6* e *APOE* na hanseníase, uma vez que a infecção pelo bacilo *M.leprae* ativa vias imunológicas envolvendo os genes dessas citocinas, bem como vias lipídicas relacionadas com o *APOE*. O gene *APOE*, por apresentar polimorfismos e uma ampla distribuição tecidual, pode influenciar em sua conformação e vinculações a partículas de lipoproteínas e receptores celulares, além disso sua função está ligada às citocinas tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias, podendo alterar as respostas do hospedeiro diante de infecções. Com isso, citocinas como *IL6* e *IL10*, por já terem sido analisadas em outros estudos e encontrado relação com o metabolismo lipídico, realizado pelo gene *APOE*, e associação à proteção ou susceptibilidade da doença, achou-se importante analisar polimorfismos nesses genes em Alagoas, visto que ainda não foi investigado nessa população.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Investigar a associação de SNPs nos genes *IL10* e *IL6* e *APOE* com a Hanseníase e suas formas clínicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Construir um desenho do tipo caso-controle na Hanseníase em uma população do agreste de Alagoas;
- Caracterizar as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs rs1800871, rs2069845 e rs405509 nos genes *IL10*, *IL6* e *APOE* respectivamente;
- Investigar a associação dos SNPs caracterizados com a Hanseníase em uma população do agreste de Alagoas;
- Analisar a associação dos SNPs caracterizados com as formas clínicas operacionais da Hanseníase.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

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

4.2 População de estudo e desenho experimental

A pesquisa foi realizada no município de Arapiraca, situada no estado de Alagoas, Brasil, que consiste no principal município da região do agreste, sendo a cidade com o segundo maior número de habitantes do estado e a segunda economia do mesmo. É um estudo retrospectivo e as atividades desenvolvidas basearam-se no recrutamento de indivíduos com hanseníase (casos) e indivíduos saudáveis (controles). A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica da UFAL – Arapiraca (LABMEG). O recrutamento de indivíduos com hanseníase foi desenvolvido no Centro de Referência Integrado de Arapiraca (CRIA), localizado à Rua Lino Roberto, nº 998 - Santa Edwiges, Arapiraca – AL, e adicionalmente, com os pacientes que residem nas cidades de Santana do Ipanema e Penedo, sendo descartadas àqueles que tinham algum grau de parentesco.

O Centro de Referência Integrado de Arapiraca (CRIA) é considerado uma entidade que concentra o diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos casos de hanseníase do município de Arapiraca, sendo essa a justificativa ao fato de ser selecionado para o recrutamento de casos. A presença do centro na mesma cidade da instituição executora (UFAL Arapiraca) contribuiu com o andamento da pesquisa, assinalando vantagem e gerenciamento logístico das atividades desenvolvidas. Através dos dados que foram obtidos nos prontuários, foram coletadas informações clínicas e sociodemográficas e os pacientes foram agrupados de acordo com a forma clínica seguindo os critérios de classificação de Madri (indeterminada, tuberculóide, dimorfa e virchowiana) e a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (paucibacilar e multibacilar).

A atividade de recrutamento de controles foi realizada no Hemocentro Regional de Arapiraca (HEMOAR), localizado na Rua Padre Cícero, nº 16, Centro, Arapiraca – AL. A justificativa para a escolha deste centro para compor a rede de suporte ao desenvolvimento da pesquisa se deve ao fato de que os doadores são enquadrados como indivíduos sem quaisquer comorbidades infecciosas, e pela ampla distribuição desses doadores na região de Arapiraca e municípios vizinhos. Pensou-se nessa abordagem devido à triagem clínica multiprofissional pela qual os doadores são submetidos antes da doação, assegurando confiabilidade à sua

participação na pesquisa. A estratégia pensada para o recrutamento dos controles, foi de aliar-se aos profissionais de serviço durante dois momentos: o da sala de espera e a triagem médica.

No primeiro momento, na medida em que a educação em saúde no contexto da doação dos hemocomponentes era realizada pelos profissionais habilitados, estes forneciam um momento de fala para apresentação da pesquisa, seus objetivos e participantes. Foi tratado também da importância da adesão dos doadores para concretização do estudo caso-controle, de modo a contribuir com a caracterização da hanseníase em Alagoas.

No segundo momento, enquanto os doadores aguardavam o chamado à triagem médica, estes foram recrutados à respeito do interesse em ser integrante do estudo. Foi realizada nova explicação a respeito da forma de participação: doação de um total aproximado de 10 mL de sangue, colhidos em dois tubos apropriados para coleta, sendo que em um destes tubos havia gel separador de soro, o EDTA, para a dosagem de citocinas em estudos futuros.

Ressaltou-se que essa doação não traria riscos, visto que seria da mesma sangria inicial. Em caso de concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (presente no apêndice A) foi preenchido em duas vias para os doadores participantes, sendo uma para o resguardo de seus direitos.

4.3 Coleta de amostras

Os pacientes já diagnosticados com hanseníase e atendidos pelos agentes do CRIA, entre eles crianças, adultos e idosos, foram convidados a participar do estudo, a partir do momento de fala e escuta fornecido pelos profissionais deste serviço, a equipe de profissionais da área de Hanseníase forneceu suporte adequado à apresentação da pesquisa, dos pesquisadores, bem como dos objetivos do estudo. Tais pacientes foram recrutados por intermédio da abordagem que enfoca a importância da pesquisa para caracterização epidemiológica e genética da infecção em Arapiraca. A linguagem direcionada aos pacientes foi adequada à sua realidade e contexto de convivência, ressaltando-se a relevância de saber abordar e recrutar o paciente, através da empatia e respeito à sua individualidade. Mediante a concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi preenchido e assinado em duas vias para os pacientes participantes, sendo uma para o resguardo de seus direitos e para a participação de menores de 18 anos, foi solicitado a autorização ao responsável, sendo assinado pelo mesmo.

Foram coletados 4 mL de sangue total periférico dos indivíduos que aceitaram participar, utilizando um tubo à vácuo (tubo com EDTA), destinado à extração de DNA. As coletas foram realizadas por enfermeiros e enfermeiras responsáveis em cada local de

recrutamento. Após a coleta do material biológico, todas as amostras foram etiquetadas com informações como ID (número de identificação no estudo), iniciais do nome, sexo, data de nascimento, data da coleta e local.

4.4 Acondicionamento das amostras

As amostras foram levadas ao LABMEG em transporte individual, acondicionadas em caixa térmica com trava apropriada para o transporte, garantindo a segurança das amostras e do transportador. Após a coleta, todos os tubos para extração de DNA foram vertidos, de forma a evitar a coagulação do sangue periférico. As amostras para extração foram armazenadas em freezer a -20 °C.

4.5 Extração de DNA

A extração de DNA a partir das amostras de sangue total periférico foi realizada através do protocolo de extração por *salting out*. Foram feitas algumas adaptações ao protocolo original para melhores resultados. Em resumo, foram distribuídos 1,5 mL de tampão de TE (Tris- HCL 10mM, EDTA 1mM e Água ultrapura Mili-Q) para a *lise* de hemácias em cubos cônicos de 2 mL e em seguida foi adicionado 500 µL de sangue total em cada tubo. Essa etapa foi repetida 3 vezes, ou até obtenção de um depositado celular (*pellet*) de cor clara. Ao final desta primeira etapa, foi adicionado ao *pellet* 200 µL de tampão de *lise nuclear* (desfazendo o *pellet* no vórtex), completados com 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 5 µL de Proteinase K (25 mg/ mL), incubando posteriormente a 56 °C em banho seco por pelo menos 12 horas. Na segunda etapa do protocolo, foi separada por centrifugação a porção da solução equivalente a suspensão de ácidos nucléicos (2.800 rpm por 20 minutos a 10 °C) e adicionada solução saturada de sal (acetato de sódio). Posteriormente, foi adicionado 1 mL de etanol a 70% para precipitação do DNA, o qual foi separado por centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e lavado com etanol absoluto (95%). Após isolamento do DNA, o mesmo foi seco e por fim ressuspenso em 50 µL de tampão TE de ressusensão (3 mM/L, acetato e EDTA a 1 mM/L em pH 8,0) previamente aquecido em estufa. Foi verificada a quantidade e a qualidade do DNA extraído através de espectrofotometria em equipamento espectrofotômetro BioPhotometer Plus. Os parâmetros 260/280 e 230/280 nanômetros (nm) foram utilizados para inferir a qualidade/pureza do DNA.

4.6 Genotipagem

A partir do DNA extraído foi realizada a genotipagem utilizando o método de discriminação alélica por PCR em tempo real, seguindo o protocolo do fabricante (*Applied*

Biosystems). É uma técnica qualitativa, em que o gene escolhido passa por um processo de amplificação do DNA, utilizando ensaio do tipo *Taqman*. Os SNPs estudados foram os: *rs1800871* do gene *IL10*, *rs2069845* do gene *IL6* e *rs405509* do gene *APOE*., já associados com a hanseníase em estudos prévios.

A genotipagem foi realizada com as amostras de DNA em concentração de 10 - 50 ng/ μ L e as reações realizadas no equipamento StepOne Plus (*Applied Biosystems*). Os gráficos de discriminação alélica foram gerados pelo software StepOne Plus do mesmo fabricante. Neste ensaio foram utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada alelo do gene que está sendo investigado, a presença do genótipo se dá pela intensidade de fluorescência como mostra na figura 8 (ver seção resultados). Em todas as reações foi utilizada um controle negativo para verificar se possível de contaminação, utilizando apenas reagente e água ultrapura, sem adicionar DNA.

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas de associação genética foram realizadas no ambiente R, versão 4.2.1.1 para *Windows*, utilizando os pacotes “genetics” e “SNPassoc”. Nessa análise foram obtidas as frequências genotípicas nos genes *IL10*, *IL6* e *APOE* nos controles e casos, as quais foram verificadas quanto ao desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de qui-quadrado (X^2). A estimativa de associação genética entre os SNP e a hanseníase baseou-se na comparação das frequências entre casos e controles, através de regressão logística, com ajuste para sexo. As análises também foram realizadas considerando como subgrupos as formas clínicas operacionais da hanseníase, sendo eles: i) paucibacilar (PB), ii) multibacilar (MB). Assim, foram comparadas as frequências dos SNPs entre o grupo PB *versus* o grupo MB. As estimativas foram realizadas através da OR (*Odds Ratio*) e seus respectivos valores de p e intervalo de confiança a 95%, sendo considerado os valores de OR <1 para proteção e >1 para risco. Para os resultados obtidos o valor de $p < 0,05$ foi considerado como estaticamente significativo. A variável sexo foi utilizada como co-variável no modelo, gerando valores de OR ajustados.

5. RESULTADOS

A partir do recrutamento populacional incluindo pacientes diagnosticados com hanseníase do agreste alagoano e indivíduos saudáveis, foi realizada a abordagem de genética epidemiológica através de estudo caso-controle. O recrutamento resultou em amostras compostas de 445 indivíduos atendidos no município de Arapiraca-AL, incluindo 264 controles e 181 pacientes.

No grupo de controles, observou-se uma maior frequência nos indivíduos do sexo masculino (dos 264 indivíduos, 172, representando 65,1% do total) apresentando uma média de idade de 32,84 ($\pm 11,60$) anos com idade máxima de 64 e mínima de 16 anos (Tabela 1). Em relação ao grupo de pacientes (casos), também houve uma frequência maior de indivíduos do sexo masculino (N= 111, 61,3%). Nesse mesmo grupo, a idade mínima foi de 12 anos e a máxima de 88, apresentando uma média de 52,5 anos ($\pm 16,6$). A maioria dos pacientes dos casos (N= 181, 68,5%) apresentaram a forma clínica operacional mais avançada da doença, a forma multibacilar (MB), enquanto 15,8% foram classificados como paucibacilar (PB), e demais 18% estavam sem informação. A forma clínica de Madri mais representada foi a dimorfa (32,0%), seguida das formas virchoviana (25%), tuberculóide (9,4) e indeterminada (4,4%). As informações sociodemográficas e clínicas dos casos e controles incluídos no estudo estão resumidas na Tabela 1. A classificação “sem informação” são os pacientes que não constava a forma clínica em seu prontuário.

Tabela 2 - Frequência da variável sexo de ambos os grupos de indivíduos no estudo.

Variáveis	Casos (N=181)		Controles (N=264)	
	n	%	n	%
Sexo				
Masculino	111	61,3	172	65,1
Feminino	70	38,7	92	34,9
Faixa etária				
Média	52,6		32,8	
(\pm DP)	($\pm 16,6$)		($\pm 11,6$)	
<60 anos	127	70,3	260	98,2
>60 anos	49	27,0	4	1,5
Sem informação	5	2,7	1	0,3

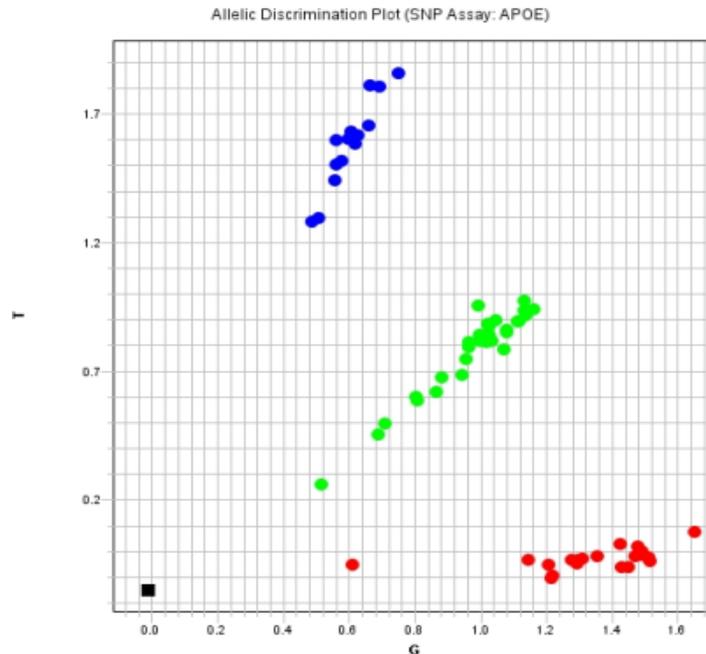
Classificação operacional				
Paucibacilar (PB)	28	15,8	-	-
Multibacilar (MB)	122	66,2	-	-
Sem informação	31	18,0		
Forma Clínica				
Indeterminada	8	4,4	-	-
Tuberculóide	17	9,4	-	-
Dimorfa	58	32,0	-	-
Virchowiana	45	25,0	-	-
Sem informação	49	27,0	-	-

Fonte: Dados da autora, 2022 Nota: DP: desvio padrão

Nota: DP: desvio padrão

Na técnica de genotipagem, é possível observar que cada ponto representa um indivíduo e a cor determina o genótipo que foi amplificado de cada pessoa. A cor azul representa os indivíduos homocigotos para o alelo T, a cor verde heterocigoto e a cor vermelha homocigoto para o alelo G. O quadrado representa o controle negativo.

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



Fonte: dados da autora, 2022. Discriminação alélica do SNP rs405509 (gene *APOE*), mostrando os genótipos TT (azul), GG (vermelho) e TG (verde), O quadrado preto representa o controle negativo.

5.1 Frequência alélica e genotípica do SNP *IL10*-rs1800871 e a associação com a hanseníase

A análise da frequência alélica para o polimorfismo rs1800871 no gene *IL10*, mostrou que o alelo C foi o mais frequente na amostra populacional alagoana, com uma porcentagem de 66% (N= 342) no grupo controle, enquanto no grupo de pacientes foi 60% (N=214). Quando observada a frequência genotípica nos grupos, notou-se a predominância do genótipo CT no grupo controles (48%). TT foi o genótipo menos frequente nos dois grupos, casos e controles respectivamente (14% e 10%) (Tabela 2). Quando analisada a associação do alelo T com a hanseníase foi observado valor indicativo de risco, porém sem significância estatística (OR= 1,28, IC 95% = 0,86- 1,91; p= 0,21). Mesmo após o ajuste para sexo não foi observada associação significativa com a hanseníase no modelo alélico para o SNP no gene *IL10* (OR=1,28; IC 95% = 0,86- 1,90; p=0,22). No modelo genotípico as análises não mostraram diferenças significativas entre as frequências dos casos e controles, resultando na ausência de associação com a hanseníase tanto para o genótipo CT (OR=1,27; IC = 95% 0,84- 1,92; p=0,24) quanto para o TT (OR=1,75; IC 95% = 0,93- 3,32; p= 0,08). Após a correção, os valores se mantiveram similares ao do modelo sem ajuste e não houve alteração no nível de significância para os genótipos CT, como detalhado na Tabela 2 (OR=1,26; IC 95% = 0,83 – 1,91; p= 0,26)

e TT (OR= 1,74; IC 95% = 0,92 – 3,30; p= 0,08).

Quanto aos valores para desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, todos apresentaram um valor de $p > 0,05$ se mostraram em consonância com as premissas postuladas pelo EHW ($X^2 = 1,14$; $p = 0,28$, Tabela 2).

Em relação aos carreadores de T, foram caracterizadas frequências semelhantes em ambos os grupos (64,7% nos casos e 72,5% nos controles), e a análise de associação para os carreadores não apresentou associação com a hanseníase (OR= 1,35; IC 95% = 0,91- 2,01; $p = 0,13$), estando ausente mesmo após a correção para sexo (OR= 1,34; IC 95% = 0,90- 2,00; $p = 0,13$) (Tabela 2).

Tabela 3 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs1800871 no gene *IL10* em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.

Genótipos	N (Frequência%)		OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%) *	p*
	Casos (n=177)	Controles (n= 258)				
CC	62 (35)	109 (42)			Referência	
CT	90 (51)	124 (48)	1,27 (0,84- 1,92)	0,24	1,26 (0,83 – 1,91)	0,26
TT	25 (14)	25 (10)	1,75 (0,93- 3,32)	0,08	1,74 (0,92 – 3,30)	0,08
Alelo C	214 (60)	342 (66)			Referência	
Alelo T	140 (40)	174 (34)	1,28 (0,86- 1,91)	0,21	1,28 (0,86- 1,90)	0,22
Carreador de T	115 (64,7)	129 (72,5)	1,35 (0,91- 2,01)	0,13	1,34 (0,90- 2,00)	0,13
EHW		$X^2 = 1,14$ $p = 0,28$				

Fonte: dados da autora, 2022

Nota: EHW: Equilíbrio de Hardy- Weinberg. OR: odds ratio. IC: intervalo de confiança. p: valor de p. x2: qui-quadrado. *Valores ajustados para co-variável sexo.

5.2 Frequência alélica e genotípica do SNP *IL6* (rs2069845)

A Tabela 4 mostra a distribuição no grupo casos e controles dos alelos e genótipos do SNP rs2069845 no gene *IL6*. O alelo A foi o mais frequente na população alagoana $N = 262$ (65%).

O genótipo AG do SNP *rs2069845* foi o mais frequente na população alagoana (48%) e o genótipo GG o menos frequente (11%). Não houve associação com a hanseníase para o alelo G. Para a análise de associação genotípica, não houve significância estatística para o genótipo AG (OR= 0,83; IC 95% = 0,54 – 1,25; p= 0,37), nem para GG (OR= 1, (OR= 1,05; IC 95% = 0,70- 1,56; p=0,79), mesmo após ajuste para sexo (OR= 1,05; IC 95% = 0,71- 1,5; p=0,77). Quanto aos valores para desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, todos apresentaram um valor de $p > 0,05$ se mostraram em consonância com as premissas postuladas pelo EHW ($X^2 = 0,45$; $p = 0,49$).

Tabela 4 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP *rs2069845* no gene *IL6* em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.

Genótipos	N (Frequência%)		OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)*	<i>p</i> *
	Casos (n=156)	Controles (n= 264)				
AA	75 (42)	106 (40)		Referência		
AG	74 (42)	126 (48)	0,83 (0,54 – 1,25)	0,37	0,83 (0,55 – 1,2)	0,39
GG	28 (16)	30 (11)	1,31 (0,72 – 2,38)	0,36	1,33 (0,73 – 2,41)	0,34
Alelo A	224(63)	338 (65)		Referência		
Alelo G	130 (37)	186 (35)	1,05 (0,70- 1,56)	0,79	1,05 (0,71- 1,5)	0,77
Carreador de G	102 (57,3)	156 (87,6)	0,92 (0,6 – 1,36)	0,68	0,93 (0,6-1,37)	0,71
EHW		$X^2 = 0,45$ $P = 0,49$				

Fonte: dados da autora, 2022.

5.3 Frequência alélica e genotípica do SNP *APOE* (*rs405509*)

A análise da frequência alélica para o polimorfismo *rs405509* no gene *APOE*, mostrou uma maior frequência do alelo G na amostra populacional alagoana, com 58,2% (N=259). Quando observado a frequência genotípica nos grupos, notou-se a predominância do genótipo GT tanto nos casos (45%) quanto nos controles (48%). O genótipo menos representativo nos grupos foi TT, estando presente em 17% em casos e 15% em controles (Tabela 4). Não foi

observada associação com a hanseníase para o alelo T, onde OR= 1,03 (IC 95% = 0,69- 1,52; p= 0,87), mesmo após o ajuste para sexo (OR=1,02; IC 95% = 0,68- 1,51; p=0,91). Nos resultados genotípicos, não houve significância para o genótipo GT (OR=0,91; IC 95% = 0,60 – 1,39; p=0,69) e nem para o TT (OR=1,13; IC 95% = 0,63 – 2,00; p= 0,74). Após a correção, os valores se mantiveram similares ao do modelo sem ajuste e não houve alteração no nível de significância para o genótipo GT (OR=0,91; IC 95% = 0,60 – 1,39; p= 0,69) e TT (OR= 1,10; IC 95% = 0,62 – 1,95; p= 0,74), favorecendo as premissas de EHW.

Em relação aos carreadores de T, houve um percentual de 110, (61,8%) nos casos e 259, (91,5%) nos controles e a análise de associação para os carreadores não apresentou associação com a hanseníase (OR= 1,03; IC 95% = 0,69- 1,52; p= 0,87), continuando ausente após a correção para sexo (OR= 0,96; IC 95% = 0,64- 1,42; p=0,84) (Tabela 4).

Tabela 5 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo do SNP rs405509 no gene *APOE* em pacientes e controles e sua associação com a hanseníase.

Genótipos	N (Frequência%)		OR (IC 95%)	p	OR (IC95%)*	p*
	Casos (n=177)	Controle s (n= 259)				
GG	67 (38)	96 (37)				Referência
GT	80 (45)	125 (48)	0,91 (0,60 – 1,39)	0,68	0,91 (0,60 – 1,39)	0,69
TT	30 (17)	38 (15)	1,13 (0,63 – 2,00)	0,67	1,10 (0,62 – 1,95)	0,74
Alelo G	214 (60)	317 (61)				Referência
Alelo T	140 (40)	201 (39)	1,03 (0,69- 1,52)	0,87	1,02 (0,68- 1,51)	0,91
Carreador de T	110 (61,8)	163 (91,5)	0,96 (0,65- 1,43)	0,86	0,96 (0,64- 1,42)	0,84
EHW		X ² = 0,01 P= 0,89				

Fonte: dados da autora, 2022

Nota: EHW: Equilíbrio de Hardy- Weinberg. OR: odds ratio. IC: intervalo de confiança. p: valor de p. x2: qui-quadrado. *Valores ajustados para co-variável sexo.

5.4 Associação genética dos SNPs de acordo com as formas clínicas operacionais

As frequências genotípicas, alélicas e de carreadores do alelo menos frequente para o SNP rs1800871-*IL10*, rs2069845- *IL6* e rs405509-*APOE* e sua associação com a classificação operacional (paucibacilar e multibacilar) são mostradas na tabela 5. Para o SNP no gene *IL6* (rs2069845) foi observada uma maior frequência do alelo G no grupo MB comparado ao grupo PB (40% e 21%), mas não mostrou significância, mesmo após ajuste para sexo (OR= 2,71; IC 95% = 0,97- 7,53; p= 0,05). O genótipo AG também foi mais frequente no grupo MB do que no PB (44% e 29%), resultando em associação deste genótipo com risco a forma MB da hanseníase (OR= 2,55; IC 95% = 1,01-6,42; p= 0,04), mantendo resultados semelhantes após o ajuste para sexo (OR= 2,91; IC 95% = 1,08-7,01; p= 0,03). O genótipo GG, mostrou uma porcentagem de 11% no grupo PB e 14% no grupo MB, também resultando em associação com susceptibilidade a forma MB da hanseníase, permanecendo essa associação mesmo após o ajuste para sexo (OR= 5,14; IC 95% = 1,02- 25,85; p= 0,04). Em relação ao carreador de G, houve um percentual de (N=117,61,5%) no grupo MB e a análise de associação para os carreadores também apresentou associação com a hanseníase (OR= 2,88; IC 95% = 1,22-6,79; p= 0,01), continuando presente após a correção para sexo (OR= 03,35; IC 95% = 1,33-8,40; p=0,009). Nos resultados obtidos de associação genética no modelo alélico, foi observada associação do alelo G após o ajuste para sexo (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição das frequências genotípicas, alélicas e carreadores de alelo em pacientes paucibacilares e multibacilares nos SNPs rs1800871- *IL10*, rs2069845- *IL6* e rs405509- *APOE*.

	Genótipos	N (frequência %)		OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)*	p*
		Paucibacilar (n=28)	Multibacilar (n=117)				
rs1800871 (<i>IL10</i>)	CC	10 (36)	42 (36)			Referência	
	CT	15 (54)	59 (50)	0,93 (0,38- 2,28)	0,88	0,89 (0,35- 2,29)	0,82
	TT	3 (11)	16 (14)	1,26 (0,30- 5,21)	0,74	1,26 (0,28- 5,53)	0,75
	Alelo T	35 (62)	91 (39)	1,06 (0,45- 2,48)	0,89	1,04 (0,42- 2,56)	0,91
	Alelo C	21 (38)	143 (61)				
	Carreadores de T	18 (15,4%)	75 (64,1)	0,99 (0,14-2,34)	0,98	0,95 (0,38-	0,92

		2,36_					
		Paucibacilar	Multibacilar	OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i> *
Genótipos		(n=28)	(n=117)	(IC 95%)		(IC 95%)*	
rs2069845 <i>(IL6)</i>	AA	18 (64)	45 (38)				
	AG	8 (29)	51 (44)	2,55 (1,01-6,42)	0,04	2,91 (1,08-7,81)	0,03
	GG	2 (7)	21 (18)	4,20 (0,89-19,77)	0,06	5,14 (1,02-25,85)	0,04
	Alelo A	44 (79)	141 (60)				
	Alelo G	12 (21)	93 (40)	2,41 (0,91- 6,41)	0,07	2,71 (0,97-7,53)	0,05
	Carreadores de G	10 (35,8)	72 (61,5%)	2,88 (1,22-6,79)	0,01	3,35 (1,33-8,40)	0,009
	Genótipos	Paucibacilar (n=28)	Multibacilar (n=117)	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)*	<i>p</i> *
rs405509 <i>(APOE)</i>	GG	7 (25)	49 (42)				
	GT	16 (57)	50 (43)	0,44 (0,16- 1,17)	0,10	0,38 (0,13-1,09)	0,07
	TT	5 (18)	18 (15)	0,51 (0,14-1,82)	0,30	0,76 (0,20-2,89)	0,69
	Alelo G	30 (54)	148 (63)				
	Alelo T	26 (46)	86 (37)	0,67 (0,29- 1,54)	0,34	0,77 (0,32-1,86)	0,56
	Carreadores T	21 (75)	68 (58,1)	0,46 (0,18-1,17)	0,10	0,47 (0,17-1,24)	0,13

Fonte: dados da autora, 2022

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

Para o SNP no gene *IL10* e *APOE* não foi observada associação estatisticamente significativa com a forma MB da hanseníase, considerando os modelos alélicos, genotípicos e de carreadores de alelo (Tabela 5). O alelo C apresentou um percentual de 61% nos pacientes MB e 38% nos pacientes PB. O genótipo CT esteve presente em 54% nos PB e 50% nos MB. TT foi o genótipo menos frequente em ambos os grupos, 11% nos paucibacilares e 14% nos

multibacilares. Considerando as comparações de frequência genotípica, a nível alélico não houve associação estatisticamente significativa entre o alelo T e a forma hanseníase MB (OR=1,26; IC 95% = 0,45-2,48, p= 0,89). O resultado foi similar após o ajuste para covariável sexo (OR=1,04; IC 95% = 0,42-2,56, p=0,91). No modelo genotípico também não foi observada associação do genótipo CT com a forma MB (OR= 0,93; IC 95% = 0,38- 2,28; p=0,88), do genótipo TT (OR= 1,26; IC 95% = 0,30- 5,21; p= 0,74) e nem no carreador T (OR=0,99 (IC 95% = 0,14-2,34; p=0,98). O resultado de ambos se manteve após o ajuste (OR= 0,89; IC95% = 0,35-0,29; p=0,82), (OR= 1,26; IC 95% = 0,28-5,53; p=0,75).

Para o SNP no gene *APOE* (rs405509) não foi observada associação com a forma clínica MB da hanseníase, em todos os modelos analisados (tabela 5). O genótipo GT foi menos frequente em MB do que em PB (43% vs 57%), mas a tendência de proteção a forma MB não apresentou uma significância estatística (OR= 0,44; IC 95% = 1,16 -1,17; p= 0,10), mantendo resultados sem significância após o ajuste para sexo (OR= 0,38; IC 95% = 0,13- 1,09; p= 0,07). GG, foi o genótipo menos frequente entre os grupos, com uma porcentagem de 18% no grupo PB e 15% no grupo MB, também não mostrando significância (OR= 0,51; IC 95% = 0,14 – 1,82; p= 0,30), permanecendo sem resultado significativo mesmo após o ajuste para sexo (OR= 0,76; IC 95% = 0,20-2,89; p=0,69). E para o carreador T, apresentou OR=0,46 (IC 95% = 0,18- 1,17; p=0,10). Nos resultados obtidos de associação genética no modelo alélico, não foi observada associação do alelo T, mesmo após o ajuste para sexo (OR= 0,77; IC 95% = 0,32- 1,86; p= 0,56) (Tabela 5).

6. DISCUSSÃO

A magnitude e o alto poder incapacitante da hanseníase a mantêm como um problema de saúde pública no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). O presente estudo recrutou pacientes com hanseníase diagnosticados em Arapiraca- AL e indivíduos saudáveis residentes no mesmo estado para compor um estudo do tipo caso-controle de associação genética.

Na hanseníase, não apenas o ambiente desempenha um papel crucial na infecção, pois a genética do hospedeiro já mostrou ser essencial para entender sua fisiopatologia. Polimorfismos que auxiliam na detecção de grupos de risco em diferentes populações, contribuem para o desenvolvimento de estratégias de prevenção (KELADA *et al.*, 2003). Nesse estudo foi investigada a associação dos SNPs *IL10*-rs1800871, *IL6*-rs2069845 e *APOE*-rs405509 com a hanseníase na população de Arapiraca- AL.

Neste estudo, foram coletadas amostras de 181 participantes, sendo 156 pacientes com hanseníase, com idade média de 52,6 anos, sendo a maioria do sexo masculino, isso indica um diagnóstico tardio. Outros estudos epidemiológicos tiveram resultados semelhantes a esse, onde observou que nos estados de Minas Gerais, Pará, Rio de Janeiro, Amazonas e Alagoas (SOUZA *et al.*, 2020; CUNHA *et al.*, 2019; MENEZES *et al.*, 2019; LETURIONDO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2019).

No presente estudo, foram recrutados para o grupo controle 264 voluntários, sendo 65,1% do sexo masculino, um resultado em relação ao sexo em outro estudo foi semelhante a este no estudo de Liberato e colaboradores (2013), onde a participação feminina foi menor nas doações de sangue para o grupo de controles. Um dos principais motivos que justificam esse valor inferior no sexo feminino são: a anemia e o peso menor que 50kg, o que justifica ser menor em quantidade de indivíduos do sexo feminino no grupo de controle do presente estudo (ROHR; BOFF; LUNKES, 2012).

Com relação aos SNPs, que são variações de uma única base na sequência de DNA no cromossomo, podendo alterar a expressão gênica, a ativação de receptores, sítios de *splicing* e quantidade de citocinas produzidas pela célula, sendo responsáveis por variações fenotípicas associadas a várias doenças. O gene da *IL10* está localizado no cromossomo 1 e é altamente polimórfico (VISENTAINER *et al.*, 2008). A *IL10* regula a inflamação reduzindo a produção de citocinas e quimiocinas a partir de macrófagos ativados (LANG *et al.*, 2002). Na hanseníase, o papel imunoregulador da *IL10* foi evidenciado em estudos mostrando que pacientes com a forma mais grave da doença possuem uma maior produção de *IL10* (FRANCHISCHI *et al.*, 2009).

No presente estudo não foram encontradas associações estatisticamente significativas

para o polimorfismo rs1800871 no gene *IL10*. Na distribuição dos genótipos do SNP rs1800871-*IL10* na população alagoana, o genótipo TT esteve presente em 10% dos controles recrutados, o que está similar a frequência alélica nas demais populações brasileiras já caracterizadas para esse SNP (GARCIA *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que no SNP rs1800871 no gene *IL10*, o alelo T foi o menos frequente na amostra populacional alagoana, com uma porcentagem de 34% (N= 258) no grupo de controle e 4% (N=177) no grupo de casos. Os resultados das análises genéticas do genótipo TT não demonstraram um indicativo para proteção a hanseníase, enquanto houve uma frequência maior do genótipo rs1800871-CT no grupo de casos (OR=1,26; IC 95% = 0,83 – 1,91; p= 0,26).

Em outros trabalhos utilizando outras populações, esse SNP já foi associado com a hanseníase, mostrando a suscetibilidade ou proteção. Em um estudo realizado no norte do Brasil, os SNPs - 1082A>G, -819C>T e - 592C>A do gene *IL10*, forneceram proteção significativa para o desenvolvimento da hanseníase (GARCIA *et al.*, 2013). Já em um trabalho realizado no sul do Brasil, o homozigoto -819 TT do SNP rs1800871 foi associado com suscetibilidade a hanseníase (OR= 1,58; P-valor = 0,05) (PEREIRA *et al.*, 2009).

Em um trabalho do tipo caso e controle realizado com indivíduos da Colômbia mostrou que os genótipos CC e CT no SNP *IL10*-819 foram associados com a hanseníase (CASTRO *et al.*, 2012). Em uma revisão sistemática incluindo estudos caso-controle mostrou proteção para o SNP rs1800871 genótipo TT na população indiana (OR= 0,59; P-valor= 0,005) (MAZINI *et al.*, 2016). Já na população mexicana, o mesmo SNP distribuiu-se de forma homogênea em ambos os grupos, não tendo nenhuma significância estatística (FÉLIX *et al.*, 2012). Os diferentes resultados de associação genética entre as populações podem ser atribuídos a diferentes perfis de ancestralidade genética, sendo a população brasileira peculiar devido ao alto grau de miscigenação (MANTA *et al.*, 2013).

Em relação a distribuição alélica do gene *IL6* (rs2069845) na população alagoana, o alelo A predominou, com 65% nos controles e 63% nos casos e o genótipo AG teve um maior percentual entre os grupos, resultando em 48% no grupo controle e 42% no grupo de casos, mas não mostrou significância de acordo com as análises (OR= 0,83; IC 95% = 0,55– 1,2; p=0,39), enquanto o genótipo GG foi o menos representativo. Em um estudo realizado no estado do Ceará e do tipo caso e controle, o genótipo GG foi o mais frequente tanto no grupo de pacientes, quanto no grupo de controles, sendo o genótipo CC o menos frequente entre os grupos (LIMA, 2009). Em Goiânia, um trabalho do tipo caso-controle foi desenvolvido a partir de uma coorte de 409 pacientes com hanseníase, observando evidências positivas de associação entre as reações hansênicas tipo 2 e os marcadores do gene da *IL6*, SNP rs2069832 (p=0,002) (SOUZA,

2009).

No Rio de Janeiro, foi realizado um estudo em que foi observado a partir dos resultados obtidos de uma amostragem de 447 pacientes com hanseníase, dos 15 polimorfismos nos 8 genes candidatos (TNF/LTA, IFNG, *IL10*, TLR1, NOD2, SOD2e *IL6*) foi observado curvas de sobrevivência estatisticamente diferentes para SNP NOD2-rs751271 e *IL6*-rs2069845 (log-rank, p-valor = 0,002 e 0,023, respectivamente), sugerindo uma influência na quantidade de tempo antes de desenvolver reações de hanseníase. A partir desses resultados, observou que os SNPs nos genes NOD2 e *IL6* estão associados às reações de hanseníase (MARQUES *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado na Índia, pacientes com hanseníase virchowiana tinham níveis mais altos da citocina *IL6* comparando com indivíduos saudáveis. O índice bacteriológico demonstrou correlação negativa e positiva com os níveis de INFg e *IL6*, respectivamente. Pacientes com reações tipo I e tipo II tinham níveis mais elevados de INFg e *IL6*, respectivamente, em comparação com os pacientes não reativos (BELGAUMKAR *et al.*, 2007).

O SNP rs2069845- *IL6* mostrou associação à risco no grupo multibacilar, onde o genótipo AG apresentou valor de OR=2,55 (IC 95% = 1,01-6,42; p= 0,04) e permaneceu associado após ajuste para sexo (OR=2,91; IC 95% = 1,08-7,81; p= 0,03). Esse e outros SNPs nesse gene já foram associados com os episódios reacionais em outros estudos, visto que as reações hansênicas estão relacionadas com as formas clínicas, sendo a forma multibacilar a mais grave, ou seja, mais episódios de reações (BELGAUMKAR *et al.*, 2007).

Em um estudo onde foram estudadas 2.447 amostras de Orissa na Índia, esse SNP mostrou uma forte associação com o grupo PB quando comparado ao grupo MB com os pacientes do norte da Índia (CHOPRA *et al.*, 2011). Já em outro estudo com 447 pacientes recrutados de uma Unidade de Referência ambulatorial Souza Araújo, Rio de Janeiro, foram analisados 15 polimorfismos em 8 genes onde concluíram que os SNPs nos genes NOD2 e *IL6* estão associados às reações da hanseníase. Os pacientes com *IL6* rs2069845- G desenvolveram reações mais rápidas do que aqueles com outros genótipos/alelos, isso sugere que esse SNP é um bom marcador prognóstico para episódios reacionais (SALES- MARQUES, 2017). Em um estudo na população indiana, foi observado que existem associações significativas entre *IL6* e a hanseníase, sendo considerado também um fator de risco para a doença (CHOPRA, 2011).

Um estudo conduzido por Costa e colaboradores (2012), mostrou uma associação entre a variante funcional (CC) do SNP rs1800795 do gene *IL6* e a ocorrência de eritema nodoso hansênico (ENH). O alelo G de outro SNP (rs2069840) foi associado à proteção contra o ENH, mas não foi encontrada associação entre as variantes no gene *IL6* (COSTA *et al.*, 2012).

Também foi observado uma correlação da *IL6* e pacientes com reações tipo 2 da região central do Brasil (SOUSA *et al.*, 2012).

A Apolipoproteína E (*APOE*) é uma proteína glicosilada multifuncional, tendo uma ampla distribuição tecidual. Entre outras funções, o papel da *APOE* na modulação da inflamação e oxidação é necessária na apresentação dos fatores de risco de doenças neurodegenerativas, visto que sua função está ligada tanto às citocinas pró-inflamatórias, quanto anti-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2011).

Os níveis de citocinas foram avaliados para investigar se SNPs estavam relacionados ao perfil inflamatório em pacientes com hanseníase. De acordo com os resultados e comparando com achados na literatura, na dosagem de *IL6*, *IL10* e IFN- γ foi confirmado que os pacientes exibiram uma maior atividade pró-inflamatória e os níveis de citocinas anti-inflamatória foram baixos, sendo que as citocinas *IL6* e IFN- γ exibiram maiores níveis nos pacientes com reação (MARQUES *et al.*, 2017).

Na China cinco SNPs de *APOE* foram analisados em 1110 indivíduos (527 pacientes e 583 controles) foi demonstrado que SNPs (rs405509 e rs439401) aumentaram o risco de hanseníase *per se* e hanseníase multibacilar ($p < 0,005$) (WANG *et al.*, 2017).

Existem três isoformas principais de *APOE* humano, o *APOE2*, *APOE3* e *APOE4*, onde seus alelos estão distribuídos em todo mundo (CORBO & SCACCHI, 1999). As respostas do hospedeiro diante de infecções, envolvem mudanças nos níveis lipídicos e metabolismo lipídico no plasma. Essas alterações podem ser mediadas por três citocinas, a IL-1, *IL6* e pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), induzindo níveis elevados de triglicerídeos e a produção de lipoproteína de baixa densidade (VLDL), diminuição dos níveis de colesterol, HDL e LDL e o aumento dos níveis de colesterol no soro, a depender dos agentes infecciosos (POLGREEN *et al.*, 2004).

A lipoproteína de alta densidade (HDL) de pacientes multibacilares, em alguns estudos não ficou claro, possivelmente isso poderá favorecer o acúmulo de fosfolipídeos oxidados nas células Virchow, visto que uma das funções dessa lipoproteína é transportar colesterol, fosfolipídeos e ácidos graxos, tendo a capacidade de reverter a formação de células Virchow, reduzindo o volume de placas ateroscleróticas, conseqüentemente, diminuindo a inflamação presente (GILLARD *et al.*, 2018).

Alterações no perfil funcional e composicional das partículas HDL são resultados principalmente do déficit de Apolipoproteína A-I, e mostraram-se ligadas à resposta inflamatória em vários contextos, como na inflamação sistêmica que é desencadeada por infecções (NARDO *et al.*, 2014). A análise da frequência alélica e genotípica no presente

estudo, para o polimorfismo rs405509 no gene *APOE*, não mostrou associação com a hanseníase ou forma clínica MB, diferente de outros estudos realizados em outras populações. Em um estudo com múltiplas populações, agrupadas por etnia auto-identificadas (europeus-americanos, asiáticos-orientais, africanos-americanos, nativos-havaianos do pacífico e índios-americanos), foi demonstrado que uma das variantes em *APOE* (rs439401 e rs11208712) foram associadas com adiposidade e inflamação em uma população (ANWAR *et al.*, 2022).

No sudoeste da China, um estudo de caso-controle observou que os SNPs rs405509 e rs439401 no gene *APOE* aumentaram o risco de hanseníase per se e hanseníase multibacilar ($P < 0.005$) e concluíram que o gene *APOE* está associado à hanseníase, provavelmente regulando genes relacionados ao metabolismo lipídico (WANG *et al.*, 2017). Em outro estudo, também na China, o gene *APOE* foi analisado com rs405509·rs439401, e houve associação estatisticamente significativo, estando associado com tipos de hanseníase em pessoas coreanas afetadas pela hanseníase (PARCK, *et al.*, 2020).

Os resultados para SNPs promotores de *APOE* dependem do histórico heterogeneidade e critérios de seleção da amostra, parâmetros importantes para avaliação. É importante outros estudos em coortes multiétnicas de pacientes de idades variadas para a validação e avaliar o seu potencial. Além disso, o papel da *APOE* na condução da resposta imune humoral em pacientes com a doença LL deve ser investigado, visto que houve uma associação entre SNPs *APOE* e hanseníase MB na população chinesa (ABREU, 2018).

Na hanseníase, os pacientes que não estão em tratamento apresentam alta carga bacilar (MB), contribuindo em maior grau para a transmissão da hanseníase, dessa forma, a classificação operacional é considerada um indicador de transmissão ativa da doença (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014). Nessa forma da doença, geralmente são encontrados macrófagos carregados de lipídios, que são conhecidos como células espumosas ou células Virchow (MATTOS *et al.*, 2014). Estudos mostram que essas células encontradas em lesões dérmicas de pacientes multibacilares, são altamente positivas para proteína relacionada à diferenciação adiposa. O acúmulo de gotículas lipídicas favorece a sobrevivência do *M. leprae*. A maioria dos lipídios presentes em organelas celulares chamadas de gotículas lipídicas, são derivados do hospedeiro humano, sendo revelado uma maior expressão de genes envolvidos no metabolismo e síntese de lipídios em lesões cutâneas (CRUZ *et al.*, 2008).

No presente estudo, o grupo multibacilar é o mais frequente (66%), levando em consideração que as amostras são coletadas no centro de referência para diagnóstico e acompanhamento para a região agreste de Alagoas. Outros estudos, na população brasileira e indiana, também relataram uma predominância de pacientes multibacilares (ALVARENGA

NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; LETURIONDO *et al.*, 2020; SURYADEVARA *et al.*, 2017). A grande ocorrência de casos multibacilares ocorre em consequência do diagnóstico tardio e a inexistência de métodos eficazes de diagnóstico para a doença junto aos serviços de saúde, podendo estar subnotificado o número de pacientes paucibacilares (PEREIRA, 2018).

No SNP rs1800871-*IL10* não foram encontradas associações estatisticamente significativas com a classificação operacional dos pacientes diagnosticados com hanseníase. No Brasil foi realizado um estudo de dosagem de citocinas nas formas e complicações clínicas da hanseníase em 107 pacientes e foram identificados, em relação ao perfil anti-inflamatório, níveis mais elevados das citocinas IL-4, IL-9, *IL10* e IL-27 ($p < 0,05$) nos pacientes MB quando comparados aos demais grupos (CUNHA, 2020).

Em relação ao SNP rs405509- *APOE*, não foram encontradas associações estatisticamente significantes com a classificação operacional dos pacientes diagnosticados com hanseníase. Na China, variações genéticas em todos os éxons APE foram triadas em 798 pacientes e 990 controles e observaram em seus resultados que os SNPs rs405509 e rs439401 aumentaram o risco de hanseníase paucibacilar e multibacilar ($p < 0,005$) e concluíram que o *APOE* está associada à hanseníase, provavelmente regulando genes relacionados ao metabolismo lipídico (WANG *et al.*, 2017). Em outro estudo realizado na população coreana, os SNPs rs405509 e rs439401 no gene *APOE* apresentou associação a risco, estando mais presente no grupo multibacilar (JIN- HO, JI-KIM, PILL KIM, 2020).

Quando comparado com outros estudos de associação genética na hanseníase, o tamanho amostral deste estudo ($N = 445$) é considerado baixo. Devido às medidas de distanciamento social causada pelo SARS-CoV-2, houve dificuldade em ampliar o tamanho amostral. Com isso, há uma perspectiva de ampliar o número total de pacientes para enriquecer o N de ambos os grupos, paucibacilar e multibacilar.

7. CONCLUSÃO

- 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 T foi o menos frequente na amostra populacional alagoana, com uma porcentagem de 34% (N= 258) no grupo controles e o genótipo TT do SNP *IL10*- rs1800871 foi o menos frequente (10%);
- O alelo G foi o menos frequente na amostra populacional alagoana, com uma porcentagem de 35% (N= 264) no grupo controles e o genótipo GG do SNP *IL6*-rs2069845 foi o menos frequente (11%);
- O alelo T foi o menos frequente na amostra populacional alagoana, com uma porcentagem de 39% (N= 259) no grupo controles e o genótipo TT do SNP *APOE*-rs405509 foi o menos frequente (15%);
- Não foi observada associação genética entre os SNPs rs1800871-*IL10*, rs2069845-*IL6* e rs405509- *APOE* e a hanseníase na amostra populacional alagoana investigada.
- Não foi observada associação genética nos SNPs rs1800871- *IL10* e rs405509- *APOE* e a forma clínica operacional multibacilar da hanseníase;
- Foi observada associação genética entre o SNP rs2069845- *IL6* com a hanseníase na forma MB, indicando este SNP como um marcador da forma clínica MB da doença.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Estudos realizados na temática de hanseníase, no contexto da área de investigação genética, são de grande importância na compreensão de fatores de risco envolvendo doenças infecciosas, além de melhorar o entendimento das vias moleculares que estão relacionadas ao desenvolvimento da doença.

É necessário melhorar as políticas públicas para diminuir o número de casos de hanseníase, visto que o estado de Alagoas, que é considerando um estado endêmico. Através dos resultados obtidos nesse estudo, almejamos contribuir com ações de saúde na região, para que futuramente possa ser empregado marcadores genéticos em um painel de predição para o adoecimento ou ao avanço da doença.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. **Association of *APOE* polymorphisms with multibacillary leprosy.** 2018

ANWAR, M. Y. *et al.* Genetic pleiotropy underpinning adiposity and inflammation in self-identified Hispanic/Latino populations. **BMC medical genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2022.

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.

*APOE**4 é um alelo "econômico"? *Anais da Genética Humana*. 1999; 63(4):301-310.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis.

CARDOSO, C. C. *et al.* TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Bra- 540 zilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. **J Infect Dis**. 2017.

CHUNG, E. Y. *et al.* Differential expression in lupus-associated *IL10* promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Genes & Immunity**, v. 8, n. 7, p. 577–589, 2007.

COSTA, M. T. *et al.* Genetic and Immunological Evidence Implicates Interleukin 6 as a Susceptibility Gene for Leprosy Type 2 Reaction, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. 1417–1424, may 2012.

CHOPRA, R. *et al.* Genetic Variations and Interactions in Anti-inflammatory Cytokine Pathway Genes in the Outcome of Leprosy: A Study Conducted on a MassARRAY Platform. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 204, p. 1264–1273, oct., 2011.

CORBO RM, S. R. Apolipoprotein E (*APOE*) distribuição de alelo no mundo.

CRUZ, D. *et al.* Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in

human leprosy. **J Clin Invest.** 2008;118(8):2917–28.

CUNHA, M. W. D. N. **Análise dos perfis séricos de citocinas e formação de clusters associados com as formas e complicações clínicas da hanseníase.** 2020.

DALPINO, D. **Avaliação dos níveis de lipídeos, lipoproteínas, apoproteínas e o papel da lipoproteína (a) no desenvolvimento de aterosclerose e alterações fibrinolíticas nos pacientes portadores de hanseníase virchoviana.** 2017

DIÓRIO, S. M. Aspectos microbiológicos e moleculares do *Mycobacterium leprae*. In: **Hanseníase: Avanços e Desafios.** [s.l: s.n.]. p.67–79. 2014.

DE NARDO, D. *et al.* High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. **Nat Immunol.** 15(2):152–60. 2014.

GILLARD, B. K. *et al.* Rethinking reverse cholesterol transport and dysfunctional high-density lipoproteins. **Journal of clinical lipidology.** 12(4):849–56. 2018.

GONG, J. S.; MORITA, S. Y.; KOBAYASHI, M. *et al.* Novel action of apolipoprotein e (*APOE*): *APOE* isoform specifically inhibits lipid-particle-mediated cholesterol release from neurons. **Molecular Neurodegeneration.** 2007.

GRACIE, R. *et al.* "Análise da distribuição geográfica dos casos de hanseníase. Rio de Janeiro, 2001 a 2012." **Ciência & Saúde Coletiva** 22 : 1695-1704. 2017.

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.

KELADA, Samir N. *et al.* Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and Parkinson's disease. **Neuroscience letters**, v. 337, n. 1, p. 5-8, 2003.

KERR-PONTES, L. R.; MONTENEGRO, A. C.; BARRETO, M. L.; WERNECK, G. L.; FELDMIEIER, H. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. **Int J**

Epidemiol; 33(2):26. 2004.

KÖKS, 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.

LANG, R. *et al.* Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by *IL10*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 5, p. 2253-2263, 2002.

LASTÓRIA, J. C.; 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.

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.

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

MAHLEY RW. Apolipoproteína E: proteína de transporte de colesterol com papel em expansão na biologia celular. **A ciência**. 1988; 240(4852):622-630.

MARQUES, C. S. *et al.* Genetic polymorphisms of the *IL6* and *NOD2* genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, vol. 11, n.7. p. e0005754, jul, 2017. Disponível em: 10.1371 / journal.pntd.0005754.

MARTELLI CMT, Stefani MMA, Penna GO, Andrade ALSS. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. **Rev Bras Epidemiol**. 2002 dez;5(3):273-85.

MATTOS, K. A. *et al.* Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cell Microbiol**. 2014;16(6):797–815.

MATSUDA T, HIRANO T. Cytokine Reference: A compendium of cytokines and other

mediators of host defense. 1. **San Diego: Academic Pr**, 2000. p. 537-563.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hanseníase no Brasil : caracterização das incapacidades físicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis, 2020.

MIRA, M.T., Fava, V.M., Sartori, P.V.U. (2022). Genética da Hanseníase. In: Nunzi, E., Massone, C., Portaels, F. (eds) *Leprosy e Buruli Ulcer*. **Springer**, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-89704-8_3

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.

PARK, Jin-Ho; KIM, Yun-Ji; KIM, Jong-Pill. The Study of Association between Leprosy's Type and Apolipoprotein E Gene in Korean Persons Affected by Leprosy. **Korean Leprosy Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 23-34, 2020.

PARK, J. *et al.* The Study of Association between Leprosy's Type and Apolipoprotein E Gene in Korean Persons Affected by Leprosy. **Korean Leprosy Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 23-34, 2020.

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.

PEDERSEN, B K, and A. D. Toft. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **British journal of sports medicine**, v. 34, n.4, 2000.

POLGREEN, P. M.; FULTZ, S. L.; JUSTICE, A. C. *et al.* Association of hypocholesterolaemia with hepatitis C virus infection infectd. **Medicina do HIV**. 2004; 5(3):144-150. 2010:12 pages. Article ID 357412.

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

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy free world. **Weekly Epidemiological Record**, Genebra, n. 94, p. 389-412, ago., 2019.

ROCHA, A. P. da. *et al.* Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 723-730, jul. 2007.

RODRIGUES-JÚNIOR, T. *et al.* Spatial and temporal study of leprosy in the state of São Paulo (Southeastern Brazil), 2004-2006. **Rev Saude Publica** 2008; 42(6):1012-1020.

ROHR, J. I.; BOFF, D.; LUNKES, D. S. Perfil dos candidatos inaptos para doação de sangue no serviço de hemoterapia do Hospital Santo Ângelo, RS, Brasil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 41, n. 1, 2012.

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**, vol. 11, n.7. p. e0005754, jul, 2017.

SALES-MARQUES C. *et al.* Polimorfismos genéticos dos genes *IL6* e *NOD2* são fatores de risco para reações inflamatórias na hanseníase. **PLoS Negl Trop Dis** 11(7): e0005754. 2017.

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.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.

SILVA, W. L. **Epidemiologia genética em hanseníase: estudo de associação da região gênômica candidata 6p21 e do gene TLR1**. 2013.

SOUSA, A. L. M. *et al.* Genetic and Immunological Evidence Implicates Interleukin 6 as a

Susceptibility Gene for Leprosy Type 2 Reaction. **O Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. 1417-1424, may., 2012;

SOARES, L. B. C. **Hanseníase e condições de vida no município de Ji, Paraná-Rondônia/2001-2009**. 2011.

VISENTAINER, Jeane Eliete Laguila *et al.* Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 739-748, 2008.

WANG, D. *et al.* A pleiotropic effect of the *APOE* gene: association of *APOE* polymorphisms with multibacillary leprosy in Han Chinese from Southwest China. **British Journal of Dermatology**, v. 178, n. 4, p. 931-939, 2018.

ZHANG, H.; WU, L.; WU, J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. **Mediators of inflammation**, v. 2011, 2011.

ZHANG, H.; WU, J.; ZHU, J. The role of apolipoprotein E in Guillain-Barré syndrome and experimental autoimmune neuritis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

APÊNDICES

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: 500µL

1. Distribuir 1,5 mL de tampão TE para lise de hemácias em tubos cônicos de 2 mL.
2. Adicionar 500uL 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 centrigugando a 2600rpm por 15 minutos.
9. Verter o sobrenadante.
10. Adicionar 200 µL de tampão de lise, 50 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (solução a 25 mg/mL) e homogeneizar no vórtex.
11. Incubar a 56°C durante a noite.
12. Adicionar 200 µL 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 (500µL) 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. 97 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.

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".

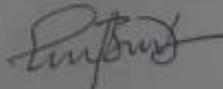
Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo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

Eu,
 profissão: residente e domiciliado na 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