

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

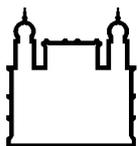
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Estudo de Associação entre o Gene *VDR* e a Hanseníase**

Carolinne de Sales Marques

**Rio de Janeiro**

**2010**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Autora: Carolinne de Sales Marques

## **Estudo de Associação entre o Gene *VDR* e a Hanseníase**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

**Rio de Janeiro**

**2010**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M357

Marques, Carolinne de Sales.

Estudo de Associação entre o Gene VDR e a Hanseníase / Carolinne de Sales Marques. – Rio de Janeiro, 2010.

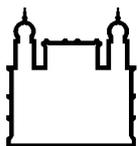
xvi, 86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.

Bibliografia: f. 71-82

1. Hanseníase. 2. Polimorfismos. 3. VDR. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Autora: Carolinne de Sales Marques

### **Estudo de Associação entre o Gene *VDR* e a Hanseníase**

**Orientador:** Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

**Aprovada em:** 13/07/2010

#### **EXAMINADORES**

Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani – Fundação Oswaldo Cruz - Presidentes

Dr. Antônio Guilherme Fonseca Pacheco – Fundação Oswaldo Cruz – Titular/Revisor

Dr. Ana Carla Pereira - Instituto Lauro de Souza Lima – Titular

Dr. Harrison Magdinier Gomes – Fundação Oswaldo Cruz – Suplente

Dr. Danuza de Almeida Esquenazi – Fundação Oswaldo Cruz – Suplente

Rio de Janeiro, 13 de Julho de 2010

Aos meus pais Washington e Célia, pelo apoio e amor incondicionais.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais por constituírem o meu alicerce, e o maior exemplo de vida que me guia em todas as decisões. Graças ao incentivo eterno de vocês cheguei até aqui, e se depender dele o meu sucesso será sem limites. Mesmo distantes geograficamente, sempre carinhosos e presentes, agradeço por formarem essa família na qual eu me sinto tão amada.

Aos meus irmãos Cari, Gui e Gu, que são meu grande tesouro. Levo-os comigo sempre. Espero que todo esse meu esforço sirva como guia para que possam trilhar um caminho maravilhoso, seja ele qual for.

Ao meu querido orientador Dr. Milton Moraes, pela confiança, oportunidade e pelo exemplo como cientista. Agradeço por todo o apoio na realização desse trabalho, um dos muitos que ainda virão. Agradeço também pela atenção que sempre teve comigo, ajudando a responder todos os meus questionamentos, e pela contribuição imensurável no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Antônio Pacheco, por toda a contribuição neste trabalho, sobretudo nas análises estatísticas, e pela revisão tão cuidadosa dessa dissertação.

À Cynthia Chester pela tamanha colaboração direta nesse trabalho, que eu considero uma espécie de co-orientação. Agradeço pela imensa paciência e sabedoria em esclarecer as minhas infundáveis dúvidas durante todo o mestrado. Obrigada também pela amizade, ouvindo sempre minhas lamentações sobre a vida e tendo sempre uma boa resposta pra tudo.

Às amigas desde o primeiro dia em que entrei no laboratório, Cláudia e Matilde. Claudinha não teria palavras para agradecer toda a sua amizade e pela nossa sintonia, que para mim chega a ser inexplicável. Obrigada por conseguir me fazer rir sempre, até nos piores momentos, o que certamente será uma saudade constante no laboratório. Agradeço a Matilde por ser sempre uma companheira tão fiel, nunca esquecerei suas palavras tão tranquilas sempre nos momentos certos. Obrigada por tudo, inclusive pelas caronas e “coca-colas”.

Às especiais amigas de laboratório Suelen, Lucía, Luana, Paula, Xuxu, Flávia e Alejandra que sempre me apoiaram seja na bancada ou fora dela. Agradeço pela amizade e por estarem sempre dispostas a ajudar, não esquecendo também dos agradáveis momentos de descontração.

À Sidra, que me ajudou pacientemente na realização do sequenciamento.

Aos demais amigos do laboratório de hanseníase, Dioguinho, Marcelo, Sandro, Valcemir, Carlos Diego, Thiago, Alice, Tiana e Carolzinha, agradeço pelos bons momentos de convívio.

Aos meus amigos do Rio, especialmente Renata, Grazi (e família), Livia e Leonardo, por todo o apoio e compreensão nos momentos difíceis durante essa jornada, e é claro por todos os momentos bons em que brindamos juntos.

Aos demais amigos do Pavilhão de Hanseníase, em especial ao André, pelo convívio agradável e pelas divertidas conversas durante o almoço e cafezinho.

A todos os funcionários do Departamento, em especial a Cristiane, cujas atividades são essenciais para viabilizar o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Aos meus amigos da Bahia, em especial a Juçaria. Apesar da saudade, cada um de vocês contribuiu de alguma forma para que eu concluísse este trabalho.

Seria impossível citar todos nesse espaço, assim gostaria de agradecer carinhosamente a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para esta conquista.

Por fim, agradeço especialmente ao meu grande amor Fabrício. Você é minha fonte de inspiração. Obrigada POR TUDO.

## Índice

Lista de siglas e abreviaturas.....	ix
Lista de Figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. Hanseníase.....	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2. Epidemiologia.....	2
1.3. Transmissão e diagnóstico .....	5
1.4. Formas clínicas, classificação e tratamento.....	7
1.5 Episódios reacionais.....	9
1.6 A neuropatia na hanseníase.....	10
1.7 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	10
2. Relação Hospedeiro- <i>M. leprae</i> .....	12
2.1 Resposta Imune ao <i>M. leprae</i> .....	13
2.1.1 Resposta Imune Inata .....	13
2.1.2 Resposta Imune Adaptativa.....	16
3. Epidemiologia genética nas doenças infecciosas e a hanseníase.....	18
3.1. Estratégias para estudos genéticos em doenças infecciosas.....	20
3.2 Desenhos de estudos genéticos.....	21
3.3 Influência genética na hanseníase.....	23
3.4 Regiões e genes de ligação/associação com a hanseníase.....	24
4. A vitamina D e o VDR.....	29
4.1 Aspectos gerais.....	29
4.2 VDR e a resposta imune.....	31
4.3 Polimorfismos no gene <i>VDR</i> .....	33
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
1. Objetivo geral.....	36
2. Objetivos específicos.....	36
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>

1. População e desenho de estudo.....	37
2. Extração de DNA.....	39
3. Genotipagem.....	39
3.1 Genotipagem por RFLP.....	41
3.1 Genotipagem por PCR em tempo real.....	43
4. Revisão sistemática.....	43
5. Análise estatística.....	44
5.1 Estudo caso-controle.....	44
5.2 Estudo familiar.....	45
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
1. Análise do SNP Fok em casos e controles e a hanseníase.....	46
2. Análise do SNP rs4760658 em casos e controles e a hanseníase.....	48
3. Análise do SNP Taq em casos e controles e a hanseníase.....	49
4. Análise dos haplótipos no gene <i>VDR</i> em casos e controles e a hanseníase.....	50
5. Análise dos polimorfismos Fok e Taq e dos haplótipos no <i>VDR</i> em famílias.....	52
6. Revisão sistemática.....	54
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
1. Considerações Gerais.....	56
2. Associação de SNPs no gene <i>VDR</i> e a hanseníase: estudo caso-controle.....	60
3. Associação de SNPs no gene <i>VDR</i> e a hanseníase: estudo baseado em famílias.....	63
4. Revisão sistemática.....	64
5. Considerações finais.....	66
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
1. Conclusões.....	69
2. Conclusão geral.....	70
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO I. Sequenciamento do polimorfismo Fok no <i>VDR</i>.....</b>	<b>83</b>

## Lista de siglas e abreviaturas

1,25D<sub>3</sub>: do inglês “1,25-dihydroxyvitamin D”

25D<sub>3</sub>: do inglês “25-dihydroxyvitamin D”

3’UTR: região 3’ não traduzida de um gene.

5’UTR: região 5’ não traduzida de um gene.

BAAR: bacilo álcool-ácido resistente.

BB: borderline-bordeline

BL: borderline-lepromatosa

BT: borderline-tuberculóide

CDX2: do inglês “caudal-related homeobox 2”

CYP: enzimas da família do Citocromo P450

DC-SIGN: receptor de células dendríticas, do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion

DN: dano neural.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

ENH: Eritema nodoso Hanseniano, também denominada Reação do Tipo 2.

HLA: antígeno leucocitário humano, do inglês “human leukocyte antigen”.

EHW: equilíbrio de Hardy & Weinberg

I: Hanseníase indeterminada.

IFN- $\gamma$ : interferon-gama.

IgM: imunoglobulina M

IL: interleucina.

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta.

LAM: lipoarabinomanana

LL: lepromatosa.

LT- $\alpha$ : linfoxina alfa.

MB: multibacilar.

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MRC1: receptor de manose lectina tipo C1

MSMD: suscetibilidade mendeliana a doenças micobacterianas.

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NK: do inglês “natural killer”

NLR: do inglês “Nod-like receptor”

NP: neural pura

NRAMP: proteína associada a resistência natural de macrófagos, do inglês “natural resistance associated macrophage protein”.

NOD: do inglês “Nucleotide-binding Oligomerization”

OR: razão de chances, do inglês “Odds Ratio”

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAC: Programa de Aceleração do Crescimento

PACRG: gene que compartilha o promotor do gene PARK2, do inglês “parkin co-regulated gene”.

PAMP: do inglês “Pathogen-associated molecular patterns”

PARK2: gene que codifica a proteína parkina.

PB: paucibacilar.

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGL-1: glicolípídeo fenólico 1.

PN: forma neural pura, também conhecida como hanseníase neurítica.

PNCH: Programa Nacional de Controle da Hanseníase

PQT: poliquimioterapia.

RLEP: do inglês “*M. leprae*-specific repetitive element”

RNA: ácido ribonucleico.

RR: Reação reversa, também denominada Reação do Tipo 1.

RXR: Receptor Retinóide X

ORF: do inglês “open reading frame”

SLC11A1: gene que codifica a proteína conhecida como NRAMP1. Do inglês “solute carrier family 11, member 1”.

SNPs: polimorfismos de base única, do inglês “single nucleotide polymorphisms”.

STRs: polimorfismos do tipo microssatélite, do inglês “short tandem repeats”.

SUS: sistema único de saúde

TDT: teste de desequilíbrio de transmissão

TGF- $\beta$ : fator de crescimento e transformação beta, do inglês “transforming growth factor beta”.

Th1/Th2: linfócitos T auxiliares 1 e 2, do inglês “T helper”.

TDT: teste de desequilíbrio de transmissão

TLR: receptores Toll, do inglês “Toll-like receptors”.

TNF: fator de necrose tumoral

TT: tuberculóide.

VD: Vitamina D

VDR: receptor da vitamina D

VDREs: elementos responsivos a vitamina D

WHO: do ingles “World Health Organization”

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Taxas de prevalência da hanseníase no mundo.....	2
<b>Figura 1.2:</b> Número de novos casos de hanseníase de 2002 a 2008.....	3
<b>Figura 1.3:</b> Formas clínicas da hanseníase.....	8
<b>Figura 1.4:</b> Interação hospedeiro-ambiente no curso das doenças infecciosas.....	19
<b>Figura 1.5:</b> Estratégias de estudo para investigar a associação genética em genes candidatos.....	20
<b>Figura 1.6:</b> Influência genética no curso da hanseníase.....	24
<b>Figura 1.7:</b> Esquema das moléculas protagonistas na infecção macrofágica pelo <i>M. leprae</i> ...	28
<b>Figura 1.8:</b> Mecanismo esquemático da ação da vitamina D e seu receptor.....	30
<b>Figura 1.9:</b> Estrutura do gene <i>VDR</i> e a localização dos principais polimorfismos.....	33
<b>Figura 3.1:</b> Esquema de localização dos polimorfismos em estudo no gene <i>VDR</i> .....	40
<b>Figura 3.2:</b> Genotipagem por RFLP.....	42
<b>Figura 3.3:</b> Ilustração gráfica da genotipagem por PCR em tempo real.....	43
<b>Figura 5.1:</b> Representação esquemática do modelo contínuo de influência genética a doenças infecciosas.....	57
<b>Figura 5.2:</b> Esquema do modelo da sobreposição dos eixos de influência genética a doenças micobacterianas.....	67

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 3.1:</b> Características gerais da população recrutada para o estudo caso-controle.....	38
<b>Tabela 3.2:</b> Características gerais da população recrutada para o estudo de famílias (TDT)...	38
<b>Tabela 3.3:</b> Primers e sondas utilizados para as genotipagens dos SNPs no gene <i>VDR</i> .....	41
<b>Tabela 4.1:</b> Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Fok no gene <i>VDR</i> em pacientes e controles e o estudo de associação com a hanseníase.....	47
<b>Tabela 4.2:</b> Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs4760658 no gene <i>VDR</i> em pacientes e controles e o estudo de associação com a hanseníase.....	48
<b>Tabela 4.3:</b> Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Taq no gene <i>VDR</i> em pacientes e controles e o estudo de associação com a hanseníase.....	49
<b>Tabela 4.4:</b> Distribuição de frequências dos haplótipos dos polimorfismos no gene <i>VDR</i> em casos e controles e o estudo de associação com a hanseníase.....	51
<b>Tabela 4.5:</b> Distribuição de frequências dos haplótipos dos polimorfismos Fok e Taq no gene <i>VDR</i> em casos e controles e a associação com a hanseníase.....	52
<b>Tabela 4.6:</b> Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) dos polimorfismos Fok e Taq no desenho familiar e a associação com a hanseníase.....	53
<b>Tabela 4.7:</b> Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) do haplótipo Fok/Taq no desenho familiar e a associação com a hanseníase.....	53
<b>Tabela 4.8:</b> Revisão sistemática: estudos genéticos de associação com o polimorfismo Taq- <i>VDR</i> e a hanseníase.....	55

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE *VDR* E A HANSENÍASE

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolinne de Sales Marques

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada por uma bactéria intracelular obrigatória, a *Mycobacterium leprae*. O sucesso da infecção se dá pela capacidade da bactéria em subverter o sistema imune, proliferando-se lentamente em macrófagos de pele e células de Schwann nos nervos periféricos. Sabe-se que a maioria das pessoas expostas ao bacilo não desenvolve a hanseníase, e evidências epidemiológicas têm demonstrado conclusivamente que genes influenciam o desfecho da doença. Nesse sentido, diversos estudos têm buscado variações presentes em genes envolvidos na resposta imune ao *M. leprae*, que poderiam explicar a susceptibilidade/resistência de determinados indivíduos à hanseníase. O presente estudo teve como objetivo analisar a possível associação entre marcadores genéticos no gene do *VDR* (Receptor da Vitamina D) e a hanseníase. Esse gene tem sido relacionado a doenças infecciosas, devido a sua importante participação em vias antimicrobianas mediadas pela vitamina D. Para tal fim, foi utilizado um estudo populacional do tipo caso-controle em 416 pacientes e 587 controles, bem como um estudo replicativo utilizando-se famílias em 365 indivíduos, formado por 90 núcleos familiares. Foram avaliados os polimorfismos Fok, Taq e rs4760658, obtendo-se as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas, que foram comparadas entre casos e controles. No estudo familiar, foi utilizado o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), avaliando-se a transmissão dos alelos dos SNPs Fok e Taq bem como dos haplótipos para filhos afetados e a associação com a hanseníase. Através de uma revisão sistemática foram reunidos os estudos informativos de associação entre o polimorfismo Taq no *VDR* e a hanseníase, visando um estudo de meta-análise. Nossos resultados indicam que o genótipo CT do SNP Fok está associado com proteção a hanseníase, exibindo valor de OR (Odds Ratio) igual a 0,77, mas com nível de significância considerado “borderline” ( $p=0,05$ ). Para os SNPs rs4760658 e Taq as frequências entre pacientes e controles não foram estatisticamente diferentes, com valores de OR iguais a 0,96 ( $p=0,85$ ) e 0,79 ( $p=0,35$ ) respectivamente. Em concordância, o estudo TDT indicou não haver associação entre os marcadores Taq e Fok com a hanseníase, este último exibindo um p-valor igual a 0,09. Entretanto, no estudo caso-controle, a análise dos haplótipos da combinação Fok/rs4760658/Taq indicou que o haplótipo C/C/C possui associação a proteção com a hanseníase (OR=0,46,  $p=0,02$ ), ao passo que o haplótipo T/T/T mostrou proteção “borderline” (OR=0,62,  $p=0,04$ ). O estudo do haplótipo Fok/Taq no TDT embora tenha indicado associação “borderline” do haplótipo T/T ( $p=0,05$ ), seguiu na mesma direção que o haplótipo do caso-controle, sugerindo proteção à doença. Embora tenham sido encontrados quatro estudos na revisão sistemática todos foram excluídos, seja por desviarem do equilíbrio de Hardy-Weinberg ou por possuírem desenho experimental diferente, impossibilitando a meta-análise. Assim, esse trabalho permite concluir uma associação do haplótipo C/C/C do *VDR* com proteção a hanseníase, bem como associações marginais a proteção do haplótipo T/T/T com a doença, o que requer ainda confirmação seja por novos estudos genéticos ou por avaliação de um maior número de marcadores ao longo do locus.

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## STUDY OF ASSOCIATION BETWEEN THE *VDR* GENE AND LEPROSY

### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolinne de Sales Marques

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the obligate intracellular bacterium *Mycobacterium leprae*. The success of infection occurs due to the ability of the bacteria to subvert the immune system, slowly proliferating in skin macrophages and Schwann cells in peripheral nerves. It is known that the majority of exposed people do not develop leprosy bacillus, and epidemiological evidence has shown conclusively that genes influence the outcome of the disease. Accordingly, several studies have searched for variations in genes involved in immune response to *M. leprae*, which could explain the susceptibility/resistance of certain individuals to disease. This present study aimed to analyze the possible association between genetic markers in *VDR* gene (Vitamin D Receptor) and leprosy *per se*. The *VDR* gene has been related to infectious diseases, due to its important role in antimicrobial pathways mediated by vitamin D. To this end, we used a population-based case-control study with 416 patients and 587 controls as well as a replication study using families in 365 individuals, comprising 90 nuclear families. Fok, rs4760658 and Taq polymorphisms were evaluated, resulting in the allele, genotype and haplotype frequencies that were compared between cases and controls. In the family study, we used the transmission disequilibrium test (TDT) to evaluate the transmission of alleles and haplotypes of the above mentioned SNPs to offspring affected and the association with leprosy. Through a systematic review were gathered informative studies of association between the Taq *VDR* polymorphism and leprosy, aiming a meta-analysis study. Our results show that the CT genotype of Fok SNP was associated to protection to leprosy with a value of OR (Odds Ratio) equal to 0.77, but with the significance level considered "borderline" when adjusted for the covariates gender and ethnicity ( $p = 0.05$ ). For SNPs rs4760658 and Taq, frequencies between patients and controls were not statistically different, with values of OR 0.96 ( $p=0,85$ ) and 0.79 ( $p=0,35$ ) respectively. Accordingly, the TDT study indicated no significant association between Taq and Fok SNPs and leprosy, the latter exhibiting a p-value 0,09. However, in the case-control study analysis of the haplotypes indicated that the combination Fok/rs4760658/Taq haplotype C/C/C has a protective association with leprosy (OR = 0.46,  $p = 0.02$ ), whereas the T/T/T haplotype was "borderline" associated with protection (OR = 0.62,  $p = 0.04$ ). The study of haplotype Fok/Taq in TDT association while it indicated "borderline" of the haplotype T/T, followed the same direction as the haplotype case-control, suggesting the disease protection. Although four studies were found after the systematic review, all needed to be excluded, either to deviate from Hardy-Weinberg equilibrium or due to different experimental design, precluding meta-analysis. Thus, this work lets us conclude an association of haplotype C/C/C of *VDR* with protection to leprosy as well as borderline protection association from the haplotype T/T/T with the disease, which requires confirmation either by new genetic studies or by increasing the number of markers along the locus.

# I. INTRODUÇÃO

## 1. Hanseníase

### 1.1 Aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, sistêmica e com repercussão relevante nos nervos periféricos. O acometimento nervoso se dá pela predileção do seu agente infeccioso, o *Mycobacterium leprae* em proliferar-se nos macrófagos de pele e células de Schwann nos nervos. Essa predileção pode causar danos neurais e deformações, com expressivo impacto para o paciente e sua relação com a sociedade, tornando a hanseníase um sinônimo de estigma para muitas pessoas.

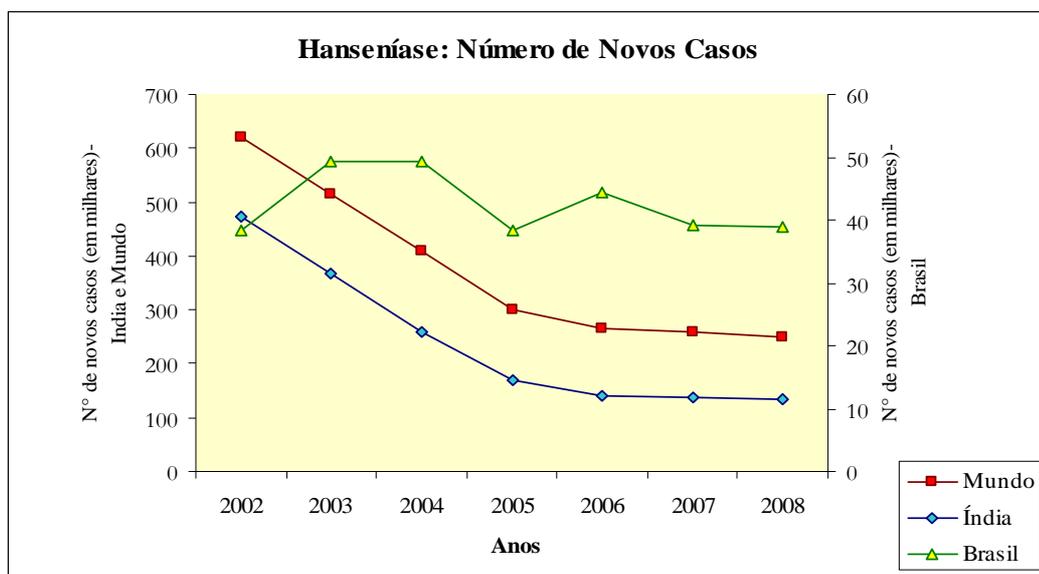
A identificação de uma bactéria como o agente causador da doença por Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873, intensificou os estudos acerca dos eventos ocorridos na patologia – denominada hanseníase em sua homenagem. No entanto, a incapacidade do *M. leprae* em se desenvolver em um meio de cultura, tem dificultado os estudos *in vitro* bem como os ensaios clínicos. Esse fato torna lenta a elucidação das vias que participam na infecção, e o aprimoramento do diagnóstico precoce, levando a dificuldade de se entender claramente como funciona a cadeia de transmissão da hanseníase.

O balanço entre a resposta imune deflagrada pelo hospedeiro e a capacidade do bacilo em subvertê-la é crucial no desfecho da hanseníase, e várias evidências demonstram que a genética do hospedeiro é um dos fatores a influenciar nesse processo. Diante disso, muitos estudos têm buscado, através de ferramentas genéticas, identificar um painel de marcadores capazes de inferir precocemente a susceptibilidade à doença. Acredita-se que esses marcadores possam servir como suporte ao diagnóstico e até mesmo ao prognóstico clínico da doença, contribuindo para a redução no número de novos casos que ainda fazem da hanseníase um problema sério de saúde pública no Brasil.

## 1.2 Epidemiologia

A hanseníase é uma antiga patologia que atinge o ser humano, contendo evidências fósseis e moleculares que sugerem sua existência há milhares de anos. Acredita-se que ela tenha surgido no leste da África, se espalhando pela Ásia, Europa, e posteriormente para as Américas, ocorrendo principalmente em países subdesenvolvidos localizados em regiões tropicais (Robbins e col., 2009). A hanseníase ainda é considerada um preocupante problema de saúde pública até os dias de hoje, tendo sido reportados 249.007 novos casos no mundo em 2008 (Organização Mundial de Saúde - OMS, 2009). Segundo a OMS, dos casos novos totais em hanseníase 82% concentram-se em apenas 5 países: Índia, Brasil, Indonésia, República Democrática do Congo e Bangladesh (OMS, 2009).

A partir da implementação da poliquimioterapia (PQT) em 1981, a prevalência mundial (número total de casos a cada 100.000 habitantes da população) vem sofrendo redução, passando de 520/100.000 em 1981 (Murthy e col., 2004) para valores abaixo de 10/100.000 em 2008 (OMS, 2009). Porém, em muitos países a redução na prevalência não foi acompanhada pela redução no número de novos casos o que ocorre, por exemplo, no Brasil. O gráfico apresentado na figura 1.1 ilustra a tendência no número de novos casos de hanseníase no mundo, na Índia e no Brasil entre 2002 e 2008. A Índia, embora seja responsável pelo maior número de novos casos de hanseníase no mundo segundo a OMS (134.184 novos casos em 2008) mostrou um declínio nesses números ao longo desses 7 anos (redução de 71%).

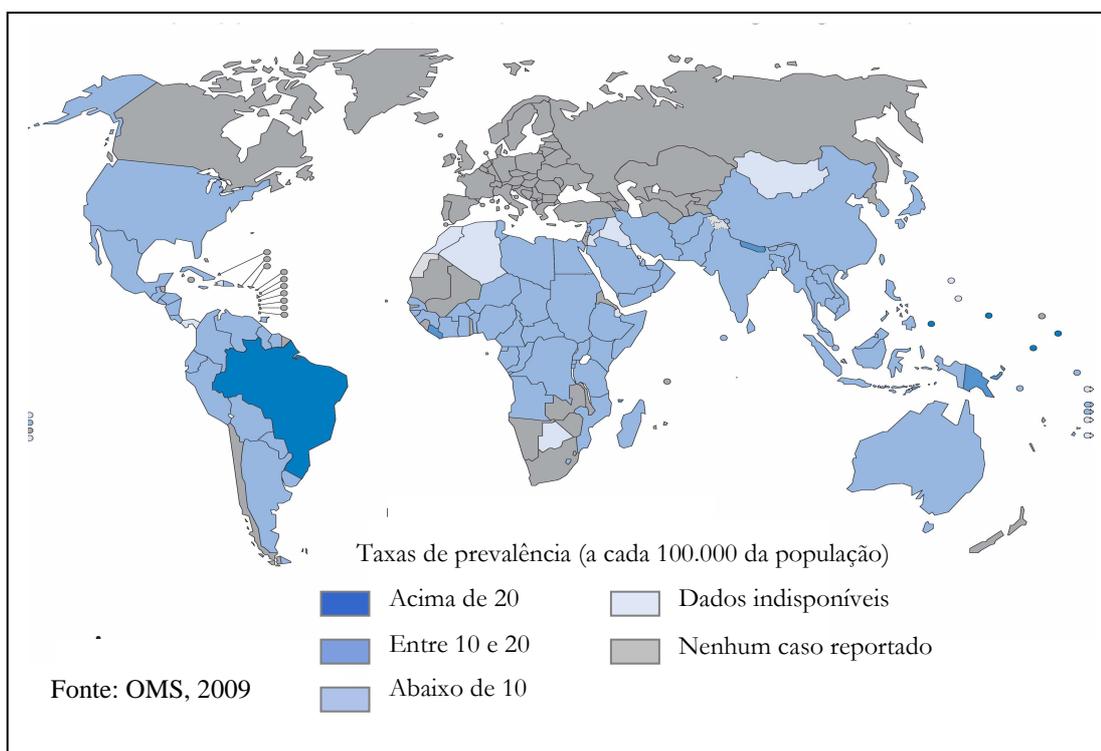


**Figura 1.1.** Número de novos casos de hanseníase de 2002 a 2008. Na Índia houve uma redução no número de novos casos em torno de 70%, enquanto que no Brasil esses números permaneceram no mesmo patamar. Fonte OMS, 2009.

No entanto, o número de novos casos de hanseníase no Brasil permaneceu praticamente no mesmo patamar, sendo registrados 38.365 novos casos em 2002 e 38.914 novos casos em 2008 (figura 1.1). Esse perfil demonstra a necessidade de intensificar os esforços para que o Brasil reduza a incidência e conseqüentemente o número de novos casos de hanseníase.

Acredita-se que a redução na prevalência venha sendo influenciada muito mais pela diminuição no tempo de tratamento e pela remoção dos registros de pacientes curados do que pela redução nos níveis de transmissão do *M. leprae*. O diagnóstico tardio e o longo período de incubação da doença são fatores que contribuem para a transmissão ativa da hanseníase, dificultando a redução significativa no número de novos casos.

O Brasil registra números preocupantes em relação a hanseníase. Segundo a OMS, em 2008 o Brasil foi o país que ocupou o primeiro lugar em prevalência da doença, com valor acima de 20 casos a cada 100.000 habitantes (Figura 1.2). Nesse mesmo ano, ao Brasil cabe ainda o segundo lugar no ranking em número de novos casos (38.914), e o primeiro lugar em número de casos com grau 2 de incapacidade (1.433 casos). Como esse grau de incapacidade representa um dano neural avançado, esses números podem ser considerados mais um reflexo do diagnóstico tardio.



**Figura 1.2.** Taxas de prevalência de hanseníase no mundo. Os dados são reportados pela OMS e correspondem ao início de 2009. As taxas referem-se a cada 100.000 habitantes da população. Adaptado da OMS, 2009.

O Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase 2006-2010 através da intensificação das ações de vigilância contínua teria como meta a eliminação da doença, reduzindo a taxa de prevalência abaixo 10 casos a cada 100.000 habitantes no Brasil até 2010. Porém o atual Programa Nacional de Controle da Hanseníase (PNCH) assume como objetivo o controle da doença, privilegiando o acompanhamento por meio do coeficiente de detecção de casos novos (a cada 100.000 da população) em substituição ao indicador de prevalência (Guia de Vigilância Epidemiológica/ Ministério da Saúde- MS). Dessa forma, o Brasil tem agora como meta diminuir em 10% o número de novos casos em menores de 15 anos até 2011 (Plano Nacional de Saúde- PAC Mais Saúde). Segundo o PNCH, esses casos possuem relação com a doença recente e fontes de transmissão ativas, e o seu acompanhamento se faz relevante para o controle epidemiológico da hanseníase.

Outro ponto que merece destaque é a inclusão da hanseníase no grupo das doenças negligenciadas, associadas às condições sócio-econômicas e a falta de acesso ao tratamento adequado. Isso pode ser claramente constatado pela distribuição desigual da doença no Brasil, que acompanha a desigualdade sócio-econômica regional. Em 2009, a região Nordeste foi responsável por 40,8% do número de novos casos no país, seguida da região Norte que possuiu 21,1% (Departamento de Informática do SUS - DATASUS, 2010). Nesse mesmo ano, a região Sudeste continha 17% do número de novos casos da doença, enquanto que o Sul, região onde os índices de prevalência já são menores do que 10 a cada 100.000 habitantes, contribuiu com apenas 4,1% (DATASUS, 2010).

Fatores históricos, tais como a política de controle do isolamento compulsório, e sociais contribuem para explicar o acúmulo de pessoas infectadas com a hanseníase em determinadas regiões, sobretudo pelo seu longo período de incubação. Os dados no país em relação à doença demonstram a necessidade de reforçar a vigilância epidemiológica na áreas mais endêmicas, dando continuidade a execução de atividades que impactem a transmissão da hanseníase.

### 1.3 Transmissão e Diagnóstico

Acredita-se que a transmissão do *M. leprae* ocorra diretamente de pessoa para pessoa, provavelmente pela propagação de aerossóis provenientes de secreções nasais, e da captação através da mucosa nasal ou respiratória (Katser e col., 1993). O contato estreito e contínuo de um indivíduo saudável com um paciente é o principal determinante na transmissão da hanseníase, não sendo esta proximidade limitada apenas a contatos domiciliares, mas também a vizinhos e pessoas com relações sociais próximas. Van Beers e col. em 1999, mostraram que em uma população endêmica da Indonésia, o risco estimado para hanseníase foi cerca de nove vezes maior em famílias de pacientes e quatro vezes maior em pessoas com relações diretas com pacientes, comparativamente às famílias que não tinham tido qualquer tipo de contato com os doentes.

Outro fator importante na transmissão da hanseníase é o tipo de forma clínica e a carga bacilar do paciente. Foi demonstrado que contatos com maior risco de contrair hanseníase são próximos a pacientes que apresentam a forma mais grave da doença que exibe alta carga bacilar (formas multibacilares ou MB) (Moet e col., 2004). Estudos baseados em amostras de lavados de pele e de secreção nasal sugerem que, além das vias aéreas, a pele também poderia ser uma potencial via de transmissão do *M. leprae* a partir de pacientes MB não tratados (Job e col., 2008).

Sabe-se que o ser humano é o único reservatório natural significativo do *M. leprae* e o único capaz de desenvolver a hanseníase, embora no tatu o bacilo consiga se multiplicar e até provocar infecção dos nervos periféricos (Scollard e col., 1996). Muitos aspectos envolvidos no processo de transmissão da hanseníase ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns trabalhos sugerem que reservatórios no ambiente poderiam participar da dinâmica de transmissão da doença. Essa possibilidade foi levantada após a detecção de *M. leprae* em amostras de água (Matsuoka e col., 1999) e do solo (Lavania e col., 2008) provenientes de áreas endêmicas.

O diagnóstico da hanseníase é crucial no controle da doença, pois a partir dele inicia-se o processo de tratamento. Ele é essencialmente realizado através de exames clínicos e laboratoriais buscando-se os sinais dermatoneurológicos da doença. Resumidamente, o diagnóstico clínico consiste no conhecimento da história clínica do paciente, seguido de

avaliações dermatológicas e neurológicas, diagnóstico diferencial em relação a outras doenças e verificação de algum tipo de incapacidade física.

Como suporte ao diagnóstico clínico, no diagnóstico laboratorial se observa microscopicamente a presença do *M. leprae* em amostras obtidas diretamente da pele ou de lesões, e avalia-se a integridade dos nervos cutâneos. Dessa forma, para ser caracterizado como caso de hanseníase, o indivíduo deve possuir ao menos uma das seguintes características: i) uma ou mais lesões de pele com alteração da sensibilidade; ii) acometimento dos nervos com espessamento neural; iii) baciloscopia positiva. Embora a identificação precoce de pacientes com hanseníase seja de grande importância para evitar a transmissão, ela é dificultada pelo longo período de incubação da doença.

Uma importante complementação ao diagnóstico da hanseníase foi dada a partir da proposta de utilização de técnicas sorológicas para detecção do *M. leprae*, através de uma molécula específica do bacilo, o PGL-1 (glicolípido fenólico<sup>1</sup>). Essa molécula é majoritária na parede celular do *M. leprae*, e possui poder antigênico por induzir a produção de anticorpos IgM específicos em pacientes com hanseníase. Os níveis de produção do IgM anti PGL-1 indicam exposição ao *M. leprae*, são característicos de cada forma clínica da doença, e mostram correlação positiva com a baciloscopia. Assim podem contribuir para avaliar o nível de exposição dos contatos, auxiliar na classificação dos pacientes, e ainda no monitoramento da eficácia do tratamento (Moura e col., 2008). A detecção e dosagem do anticorpo anti PGL-1 pode ser feita utilizando a técnica ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”).

No entanto, considera-se que o maior avanço no diagnóstico laboratorial de hanseníase nos últimos 15 anos tenha sido o desenvolvimento de métodos para extração, amplificação e identificação do DNA do *M. leprae* em amostras clínicas através da reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) e outras técnicas moleculares (Scollard e col., 2006). A identificação molecular do *M. leprae* consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do *M. leprae*, tais como a seqüência não codificante RLEP, a partir de uma grande variedade de amostras clínicas de pacientes. Amostras como biópsia de pele, muco nasal, amostra de nervo e sangue podem ser utilizadas para essa identificação (Scollard e col., 2006).

Os ensaios moleculares para diagnóstico podem ser realizados através de PCR convencional ou PCR em tempo real, este último com algumas vantagens como alta

sensibilidade e versatilidade. Martinez e colaboradores mostraram que além de detectar e quantificar o DNA do *M. leprae*, a PCR também é útil para determinar a viabilidade do bacilo (Martinez e col., 2006, Martinez e col., 2009). A PCR vem sendo utilizada como método de suporte ao diagnóstico convencional, sendo importante em manifestações da doença com poucas ou nenhuma lesão de pele, como é o caso da forma neural pura (NP) (Martinez e col., 2006). Nesse contexto, foi sugerido também o uso da PCR atrelado à detecção do PGL-1 através de anticorpos como auxílio laboratorial no diagnóstico da forma NP (Jardim e col., 2005).

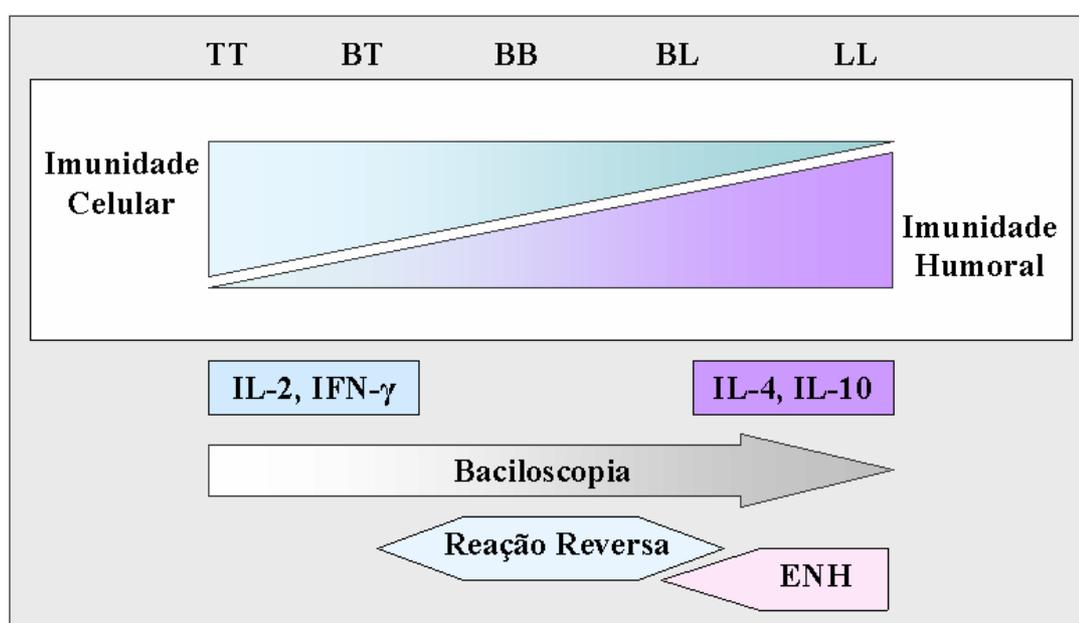
#### **1.4 Formas clínicas, classificação e tratamento**

Os pacientes com hanseníase exibem um amplo espectro de manifestações clínicas e histopatológicas. No VI Congresso Internacional de Hanseníase (Madri, 1953), a hanseníase foi classificada clinicamente com base nos critérios de polaridade propostos por Rabello em 1938. Desse modo, a doença foi interpretada tendo pólos extremos, indo de uma forma mais localizada (tuberculóide), passando por formas intermediárias, até assumir uma forma mais grave e disseminada (virchowiana). Esse perfil espectral da hanseníase, a princípio bastante intrigante, foi sendo melhor entendido com o avanço do conhecimento na área da imunologia, o que possibilitou compreender que a ocorrência dessas manifestações dependem do comportamento do sistema imune do hospedeiro frente à infecção pelo *M. leprae*.

Na década de 60, Ridley e Jopling sugeriram uma classificação para as formas clínicas da hanseníase. Essa classificação está esquematizada na figura 1.3, e baseia-se em critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos. A resposta imunológica ao *M. leprae* pode ser medida pelo teste cutâneo de lepromina (reação de Mitsuda). Segundo Ridley e Jopling, em um dos extremos da hanseníase observam-se pacientes com lesões localizadas e bem demarcadas, contendo poucos bacilos, exibindo resposta inflamatória e reação positiva à lepromina, caracterizando a hanseníase tuberculóide (TT). No outro extremo encontram-se pacientes com reação negativa para a lepromina, apresentando lesões mal delimitadas, disseminadas pelo corpo e contendo numerosos bacilos, caracterizando a hanseníase lepromatosa (LL). Existem ainda, formas clínicas intermediárias entre esses extremos, denominadas borderline tuberculóide (BT), borderline borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL) (Ridley & Jopling, 1966). Supõe-se que os pacientes também possam

apresentar uma forma indeterminada da hanseníase, caracterizada por um estágio inicial e transitório que evolui para uma das cinco formas clínicas.

Em 1982, foi proposta pela OMS uma classificação baseada na carga bacilar, classificando como paucibacilares (PB) os pacientes com índice baciloscópico negativo, ou em multibacilares (MB) aqueles com índice baciloscópico positivo. No entanto, atualmente utiliza-se uma classificação operacional visando a identificação simplificada e rápida de pacientes através do critério clínico. Essa classificação baseia-se apenas no número de lesões, classificando como PB os pacientes com uma a cinco lesões, e como MB os pacientes contendo acima de cinco lesões (OMS, 2010).



**Figura 1.3.** Formas clínicas da hanseníase. Esquema demonstra o perfil espectral da doença. Representação baseada na classificação de Ridley e Jopling: TT (tuberculóide), BT (borderline tuberculóide), BB (borderline), BL (borderline lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente em cada forma clínica (produção de citocinas), baciloscopia, e episódios reacionais (reação reversa e eritema nodoso hansênico-ENH). Adaptado de Britton and Lockwood, 2004.

O tratamento dos pacientes com hanseníase é fundamental para fechar a fonte de infecção e interromper a cadeia de transmissão, sendo assim estratégico para o controle epidemiológico da doença. Desde 1981 a OMS introduziu a poliquimioterapia (PQT) para tratamento da doença em substituição a monoterapia com dapsona, essa última a qual havia

resultado em resistência ao bacilo pelos pacientes (Scollard e col., 2006). A PQT é constituída pelos antibióticos rifampicina, dapsona e clofazimina, associação que dificulta o desenvolvimento de resistência medicamentosa. Essa combinação elimina os bacilos, impedindo o paciente de transmitir a doença logo no início do tratamento, garantindo a cura da doença caso o esquema terapêutico seja administrado de forma correta.

Para os pacientes PB, a medicação é administrada durante 6 meses, através da ingestão mensal supervisionada de 600mg de rifampicina e 100mg de dapsona, com uma dose autoadministrada diária de dapsona. Já os pacientes MB devem realizar o tratamento durante 12 meses, com doses mensais supervisionadas de 600mg de rifampicina, 300mg de clofazimina e 100mg de dapsona, e doses diárias de clofazimina e dapsona autoadministradas (Guia de Vigilância Epidemiológica- MS).

### **1.5 Episódios reacionais**

Durante o curso da hanseníase os pacientes tratados ou não, e mesmo após o término do tratamento, podem apresentar os chamados estados reacionais. Esses estados consistem em episódios de inflamação aguda que podem levar ao comprometimento cutâneo, neurológico e sistêmico. As reações podem afetar entre 30-50% dos pacientes com hanseníase, e devem ser consideradas como uma complicação emergencial, visto que o dano ao nervo pode ocorrer rapidamente e levar a perda da sensibilidade, paralisia e até deformidades.

Os eventos ou condições que levam ao desenvolvimento de reações ainda não estão completamente esclarecidos, mas sabe-se que os pacientes na faixa borderline ou multibacilares são mais susceptíveis, e que fatores genéticos ou não, tais como carga bacilar, imunizações, co-infecções, estresse e gravidez poderiam também influenciar. Esses estados reacionais podem ser classificados como reação tipo 1 ou reação reversa (RR), que ocorrem nos pacientes borderline (BT, BB, BL), e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), que ocorre no pacientes multibacilares (BL e LL) (Figura 1.3). Além disso, na hanseníase pode ocorrer um quadro isolado de neuropatia, sem o aparecimento de lesões cutâneas, conhecido como forma neural pura. Essa manifestação clínica traz problemas para o diagnóstico, e requer como auxílio a biópsia de nervo (Britton & Lockwood, 2004).

## 1.6 A neuropatia na hanseníase

A hanseníase poderia ser interpretada apenas como uma infecção dermatológica capaz de elicitar uma ampla resposta imune no hospedeiro, não fosse a peculiar predileção do *M. leprae* pelos nervos periféricos. Esse fato acrescenta a hanseníase caráter de neuropatia, onde a infecção das células de Schwann nos nervos pelos bacilos pode acarretar complicações tais, capazes de levar ao comprometimento neural, deformações e atrofia, principais agravos relacionadas à doença. Vale ressaltar ainda que a neuropatia resulta não apenas da infecção, mas também das respostas imunológicas e processo inflamatório desencadeados contra o *M. leprae*.

Os processos envolvidos no acometimento neural não estão completamente esclarecidos, e muitos estudos têm buscado entendê-los, abordando aspectos como localização e movimento do *M. leprae* até os nervos periféricos, entrada nas células de Schwann e o mecanismo de lesão neural. O entendimento destas etapas seria crucial para uma possível intervenção terapêutica ou preventiva no processo de infecção.

Em relação ao mecanismo de lesão neural, por exemplo, existem hipóteses divergentes. Foi sugerido que a infecção de células de Schwann pelo *M. leprae* viável não provoque apoptose, mas favoreça a multiplicação e sobrevivência dessas células (Rambukkana e col., 2002). Em contrapartida, foi reportado que células de Schwann estimuladas com uma fração do *M. leprae* ligante de TRL2 (Toll-like Receptor 2), são induzidas à apoptose (Oliveira e col., 2003). Divergências também são observadas em relação ao processo de desmielinização. Estudos realizados com o modelo de co-cultura de axônios e células de Schwann mostraram que a infecção pelo *M. leprae* não afeta a estrutura da mielina (Hagge e col., 2002). Porém, Rambukkana e colaboradores demonstraram tanto *in vitro* como *in vivo* a existência de um processo inicial de desestruturação da mielina perante a aderência do *M. leprae* (Rambukkana e col., 2002).

## 1.7 *Mycobacterium leprae*

O *Mycobacterium leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, de crescimento lento, e álcool-ácido resistente. Similarmente a todos os organismos dessa espécie, é uma bactéria

gram-positiva, com um envelope celular complexo e com uma estrutura única, rica em lipídeos. O envelope compreende uma membrana celular, uma parede celular formada principalmente por peptidoglicanos e ácidos micólicos, e uma cápsula rica em PGL-1 (Daffé & Draper, 1998). Muitas moléculas do envelope celular são essenciais para a patogênese do *M. leprae*, tais como as adesinas que parecem mediar a interação do bacilo tanto com células de Schwann, como com células epiteliais e endoteliais do hospedeiro (Pessolani e col., 2003).

O *M. leprae* não é capaz de crescer em um meio de cultura conhecido, e como resultado a sua multiplicação para fins experimentais tem sido restrita a modelos animais incluindo tatus, camundongos normais, atímicos e nocautes. O crescimento do *M. leprae* no coxim plantar de camundongos, por exemplo, tem fornecido quantidades suficientes de bacilos viáveis para esse fim (Truman e col., 2001), enquanto o tatu de nove listas (*Dasypus novencinctus*) vem sendo utilizado para inoculação experimental.

Estudos comparativos conduzidos após o sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* (Cole e col., 2001) mostraram existir um caso extremo de redução evolutiva nesse genoma. A critério de comparação, o *M. tuberculosis* possui genoma de 4,4 Mb, contendo 3.993 genes e 6 pseudogenes (genes inativados por algum processo ao longo da evolução), enquanto que o *M. leprae* possui apenas 1.605 genes (49,5% do genoma), e um surpreendente número de 1.133 pseudogenes (Scollard e col., 2006). Isso, somado ao fato de que o genoma do *M. leprae* parece ter sofrido deleções de genes inteiros, acarretou em uma perda maciça de genes funcionais no bacilo (Marri e col., 2006). Acredita-se que eventos como rearranjos e deleções no genoma, perda de fatores sigma, e a presença de seqüências Shine- Delgarno alteradas ou degeneradas sejam responsáveis por esse acúmulo de pseudogenes (Williams e col., 2009).

Apesar dos estudos genômicos comparativos indicarem caminhos para realização de estudos funcionais referentes ao *M. leprae*, a dificuldade em cultivá-lo dificulta também a obtenção e purificação de proteínas. Mesmo assim, estudos têm buscado avaliar o perfil de expressão protéica do *M. leprae*, como o conduzido por Marques e col., que identificou 218 novas proteínas do bacilo (Marques e col., 2008). A análise do transcriptoma do *M. leprae*, pode fornecer respostas relevantes sobre os níveis de expressão gênica durante a infecção, e análises do genoma completo do bacilo, por exemplo, mostraram que os pseudogenes podem ser tão transcritos quanto as regiões codificantes (Akama e col., 2009).

Foi sugerido que a organização gênica em *clusters* (operons) associada à perda de sítios de terminação da transcrição em ORFs funcionais levariam a transcrição de pseudogenes através de uma leitura contínua entre as ORFs (Williams e col., 2009). No entanto foi demonstrado que muitos pseudogenes transcricionalmente ativos possuem um *start códon* não funcional, o que parece ter sido um mecanismo de silenciamento da tradução de proteínas sem sentido, com conseqüente economia de energia em favorecimento do bacilo (Williams e col., 2009). Mesmo assim, ainda é desconhecido porquê ocorre a transcrição de seqüências a princípio não funcionais do *M. leprae*, tanto em sistemas de cultivo experimental quanto em biópsias de pacientes. Sugere-se também que os pseudogenes tenham participação em vias de regulação gênica, o que poderia explicar a capacidade de sobrevivência do *M. leprae* mediante o número tão limitado de seqüências codificantes.

A redução no genoma do *M. leprae* resultou na eliminação de diversas vias fundamentais, o que implica em respostas limitadas perante o estresse do ambiente intracelular. O acúmulo de pseudogenes pode ter promovido uma evolução adaptativa do *M. leprae*, que possivelmente avançou de um modo de vida livre para um nicho extremamente especializado nos macrófagos e nas células de Schwann dos nervos periféricos (Monot e col., 2009).

## **2. Relação hospedeiro - *M. leprae***

Após o contato do *M. leprae* com o hospedeiro através das vias aéreas superiores, o bacilo pode penetrar no corpo e posteriormente espalhar-se, alojando-se preferencialmente em macrófagos de pele e em células de Schwann nos nervos periféricos. Porém, observa-se que na maioria dos casos de contato, ocorra uma infecção subclínica sem nenhum sintoma evidente. Nos poucos casos em que a infecção se estabelece, a propagação do bacilo é lenta, com período de incubação durando em média 5 anos, caracterizando uma infecção vagarosa de um bacilo que se divide apenas a cada 14 dias (van Beers e col., 1996).

Um dos principais fatores determinantes no desfecho da hanseníase é o resultado do balanço entre resposta imune deflagrada pelo hospedeiro e a capacidade de escape pelo *M. leprae* através de mecanismos de evasão desta resposta imunológica. A associação estreita

entre a resposta imune do hospedeiro e o quadro clínico da hanseníase faz dela um excelente modelo para o estudo da relação patógeno-hospedeiro em infecções microbianas.

## **2.1 Resposta Imune ao *M. leprae***

### **2.1.1 Resposta Imune Inata**

A resposta imune conhecida como inata se constitui no primeiro nível de interação do *M. leprae* com o hospedeiro e é considerada crucial para o padrão de resposta frente ao bacilo, pois está diretamente ligada ao perfil de resposta adaptativa. Além disso, a imunidade inata possui requisitos que podem ser suficientes para reconhecer e restringir a infecção, podendo ser relevante no estágio inicial onde se define o estabelecimento ou não da doença.

Uma das primeiras células a participar da modulação inicial desempenhada pela resposta imune inata na hanseníase são as células dendríticas (Demangel e col., 2000). A maior parte dessas células são derivadas de linhagem monocítica, e são ativadas durante o primeiro contato com patógeno, passando a ser eficientes em fagocitar, processar e apresentar o antígeno aos linfócitos T e B distantes do sítio da infecção. Além disso, a célula dendrítica ativada participa na modulação do curso da resposta imune adaptativa, produzindo moléculas co-estimulatórias e citocinas como IL-12, TNF, IL-10 e IL-6 (Demangel e col., 2000). Entretanto, o *M. leprae* mostrou ser capaz de interferir no funcionamento da célula dendrítica, seja inibindo sua interação com a célula T através da participação do PGL-1, ou suprimindo sua própria maturação, possivelmente via inibição de IL-12 (Nigou e col., 2001), indução de IL-10 (Geijtenbeek e col., 2003) e de IL-1 $\beta$  (Scollard e col., 2006, Makino e col., 2006).

Da parcela de monócitos circulantes que são ativados pelo patógeno, 25% são diferenciados em células dendríticas e os 75% restantes são diferenciados em macrófagos (Makino e col., 2006). Os macrófagos também são células fagocíticas que participam da interação inicial com o *M. leprae*, e possuem uma ação diretamente efetora na restrição do crescimento e proliferação do bacilo. Após ser reconhecido pelo macrófago, o patógeno será fagocitado e em seguida serão ativadas vias que tentarão impedir o sucesso da infecção, tais como a produção de óxido nítrico, de radicais superóxido, e de peptídeos antimicrobianos como catelicidina e  $\beta$ -defensinas (Liu e col., 2006).

Foi sugerido que as atividades fagocíticas e antimicrobianas nos macrófagos sejam moduladas por citocinas em vias divergentes, e que o desequilíbrio entre essas vias pode favorecer a suscetibilidade ou a resistência ao *M. leprae* (Montoya e col., 2009). Monócitos estimulados por IL-10 induziram um perfil fagocítico, que se fez presente em pacientes MB, enquanto o perfil antimicrobiano foi induzido em macrófagos diferenciados por IL-15 e apresentou-se em lesões de pacientes PB (Montoya e col., 2009). A convergência entre as atividades fagocíticas e microbicidas poderiam controlar a proliferação do patógeno, visto que os macrófagos têm uma produção limitada dos fatores antimicrobianos e precisam limitar a taxa entrada dos bacilos. Acredita-se que o desequilíbrio entre esses eventos possa ser induzido pelas próprias micobactérias (Montoya e col., 2009).

O macrófago assim como todas as células apresentadoras de antígeno produzem citocinas relevantes que participam de um dos principais eixos da imunidade inata/adaptativa em micobactérias: o eixo IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  (Langrish e col., 2004). Diante do contato com o patógeno, essas células passam a sintetizar várias citocinas, dentre elas IL-12, IL-23 e IL-27, que atuam estimulando os linfócitos e as células NK a produzir suas próprias citocinas que vão mediar a resposta imune. Dentre elas merece destaque o IFN- $\gamma$ , que ativa mecanismos microbicidas e aumenta a expressão de moléculas do MHC e de moléculas co-estimulatórias (van de Vosse e col., 2004). O TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória, também é produzida em resposta ao estímulo dos macrófagos e, em sinergia com a produção de IFN- $\gamma$  constituem o principal mecanismo efetor da imunidade celular (van de Vosse e col., 2004). O TNF- $\alpha$  também participa da ativação do macrófago, induzindo-o a controlar o *M. leprae*, tendo papel importante na manutenção dessa ativação e na formação do granuloma (Goulart e col., 2002).

Foi descrito por Virchow, em 1863, que macrófagos infectados pelo *M. leprae* possuem como característica clássica o acúmulo de vacúolos lipídicos, o que junto aos vacúolos infectados dá a essas células o aspecto esponjoso (do inglês “foam-cells”). Análises histoquímicas dessas células (conhecidas também como células de Virchow) mostraram que esses vacúolos contêm ácidos graxos e fosfolipídeos, os quais indicam ter origem não só micobacteriana como também do hospedeiro (Cruz e col., 2008). Demonstrou-se também que essas células são abundantes em lesões de pacientes com hanseníase LL, mas não em pacientes TT, e que esse predomínio está ligado à indução de genes do hospedeiro envolvidos com o metabolismo lipídico, levando ao acúmulo de fosfolipídios oxidados (Cruz e col., 2008). Esse acúmulo exibiu efeito inibitório na imunidade inata contra o bacilo, interferindo nas funções

das células dendríticas e na atividade antimicrobiana mediada pelos TLRs (Montoya e col., 2009). Assim, sugere-se que o acúmulo lipídico no sítio da infecção forneça ao *M. leprae* substratos metabólicos essenciais para o seu crescimento, contribuindo também para sua patogênese.

O reconhecimento do *M. leprae* pelas células do hospedeiro é possibilitado pelos PRRs (receptores de reconhecimento padrão, do inglês “Pattern Recognition Receptors”), receptores que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), e que variam dependendo da natureza do PAMP e da sua localização na célula.

Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês “Toll-like receptors”) estão presentes em monócitos, macrófagos e células dendríticas, e especificamente os TLR1 e TLR2 reconhecem lipopeptídeos da parede bacteriana do *M. leprae* (Walker and Looockwood, 2006). Em geral, após ativados pelos seus ligantes os TLRs iniciam uma cascata de sinalização que culmina na ativação de fatores tais como o NF- $\kappa$ B, levando a indução da resposta inflamatória, e modulação da imunidade inata e antígeno-específica (Kumar e col., 2009). No caso da hanseníase, demonstrou-se que os TLR1 e TLR2 foram mais expressos em amostras de lesões provenientes de pacientes TT quando comparado a lesões de LL, indicando que a ativação dos TLR no sítio da doença contribui para conter a infecção (Krutzik e col., 2003). A ativação do heterodímero TLR1/2 mostrou-se relevante na ativação da via antimicrobiana em macrófagos, reduzindo a viabilidade de *M. tuberculosis* intracelular (Liu e col., 2006).

Foi descrito recentemente o envolvimento de uma classe de PRRs intracelulares conhecidos como NLRs (Nod-like receptors) com a resposta imune inata contra bactérias. Dentre eles, os receptores NOD1 e NOD2 (do inglês Nucleotide-binding oligomerization) são capazes de se ligar a fragmentos de peptideoglicanos do citosol, ou até mesmo a algumas bactérias intracelulares íntegras (Le Bourhis e col., 2007). Apesar de se replicar preferencialmente em vesículas, acredita-se que o *M. leprae* seja reconhecido pelos NODs, possivelmente através de componentes do bacilo que podem ser secretados para o citoplasma (van der Wel e col., 2007, Berrington e col., 2010). Ao reconhecer um PAMP micobacteriano o NOD1 e NOD2 levam à indução de NF- $\kappa$ B e de fatores antimicrobianos, atuando também em sinergia com TLRs para induzir principalmente um perfil inflamatório da imunidade adaptativa (Le Bourhis e col., 2007, Ferwerda e col., 2005). Um papel importante para o NOD2 no reconhecimento de *M. tuberculosis* foi demonstrado em células mononucleares de

indivíduos homozigotos para a mutação *3020insC-NOD2*. Frente à estimulação com *M. tuberculosis*, essas células exibiram uma resposta de citocinas que variou negativamente de 60-80% em comparação aos heterozigotos ou selvagens (Ferwerda e col., 2005).

É importante ressaltar que os eventos precoces desencadeados pela imunidade inata mediante a infecção por *M. leprae* demonstram exercer crucial influência na determinação da resposta imune adaptativa, modulando a resposta antígeno-específica. Por outro lado, o perfil da resposta adaptativa potencializa os efeitos da imunidade inata, e esses eventos se somam atuando de maneira altamente dinâmica para controlar a infecção.

### **2.1.2 Resposta imune adaptativa**

A relevância da imunidade adaptativa na resposta imune ao *M. leprae* se dá principalmente pelo direcionamento do curso da infecção bem como das diversas formas clínicas da hanseníase. Estudos utilizando camundongos atímicos mostraram que esses animais não foram capazes de responder ao *M. leprae*, sugerindo que os linfócitos, principais células da imunidade adaptativa, são essenciais na contenção bacilar (Scollard e col., 2006).

Apesar de estarem simultaneamente presentes a imunidade celular e humoral na resposta a hanseníase, a resposta mediada por células assume maior destaque, visto que o *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, e portanto protegido da ação dos anticorpos. Dada a importância da imunidade celular, percebeu-se inclusive que havia uma distinção no comportamento dessa resposta em pacientes com diferentes formas polares da hanseníase. Os pacientes TT, por exemplo, apresentam proporções CD4:CD8 comparável aos controles (2:1) e níveis normais de células dendríticas, enquanto que os pacientes LL mostram proporção CD4:CD8 invertida na lesão e células dendríticas em menor número (Modlin e col., 1983). Isso sugere que o perfil imunológico nos pacientes TT contribua em algum nível para o recrutamento, ativação e maturação de macrófagos para controlar a infecção (Modlin e col., 1983)

Estudos conduzidos por Mossmann e col. em 1986 revelaram o que seria um marco no estudo dos mecanismos de resposta imune na hanseníase, com a identificação de pelo menos dois subgrupos de linfócitos T auxiliares: os linfócitos T auxiliar 1 e T auxiliar 2 (ou Th1 e

Th2, h do inglês “helper”). As células Th1 estariam predominantemente envolvidas em um perfil de resposta imune inflamatória, enquanto as células Th2 em uma resposta anti-inflamatória, com inibição macrófagica e ativação da resposta humoral.

Sugeriu-se então que a hanseníase se comportasse de acordo com os padrões de resposta Th1 x Th2, e experimentos utilizando amostras de lesões de pacientes, avaliando a expressão de RNA mensageiro de citocinas características de cada perfil indicaram a confirmação dessa hipótese. Pacientes TT exibiram majoritariamente um perfil de citocinas relacionadas à resposta Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) enquanto indivíduos LL mostraram predomínio da resposta Th2 (IL-10, IL-4, IL-5) (Yamamura e col., 1991). Outro estudo descreveu que pacientes TT possuem aumento dos níveis de IFN $\gamma$  e TNF no soro, com correlação negativa com o índice baciloscópico (IB), ao passo que os LL mostraram altos níveis de IL-10, com significativa correlação positiva com o IB (Moubasher e col., 1999).

Em síntese, sugere-se que os pacientes do pólo tuberculóide tenham um padrão de resposta imune protetora mediada pelas células T parcialmente eficientes, com produção de citocinas que contribuem na maturação e ativação dos macrófagos, levando ao controle da multiplicação dos bacilos e a sua posterior eliminação. Já os pacientes do pólo lepromatoso, parecem possuir um perfil de citocinas que induz a redução da resposta inflamatória, com inibição macrófagica e perfil característico da resposta humoral, padrões imunológicos que, somados a outros fatores, seriam insuficientes para conter o *M. leprae*.

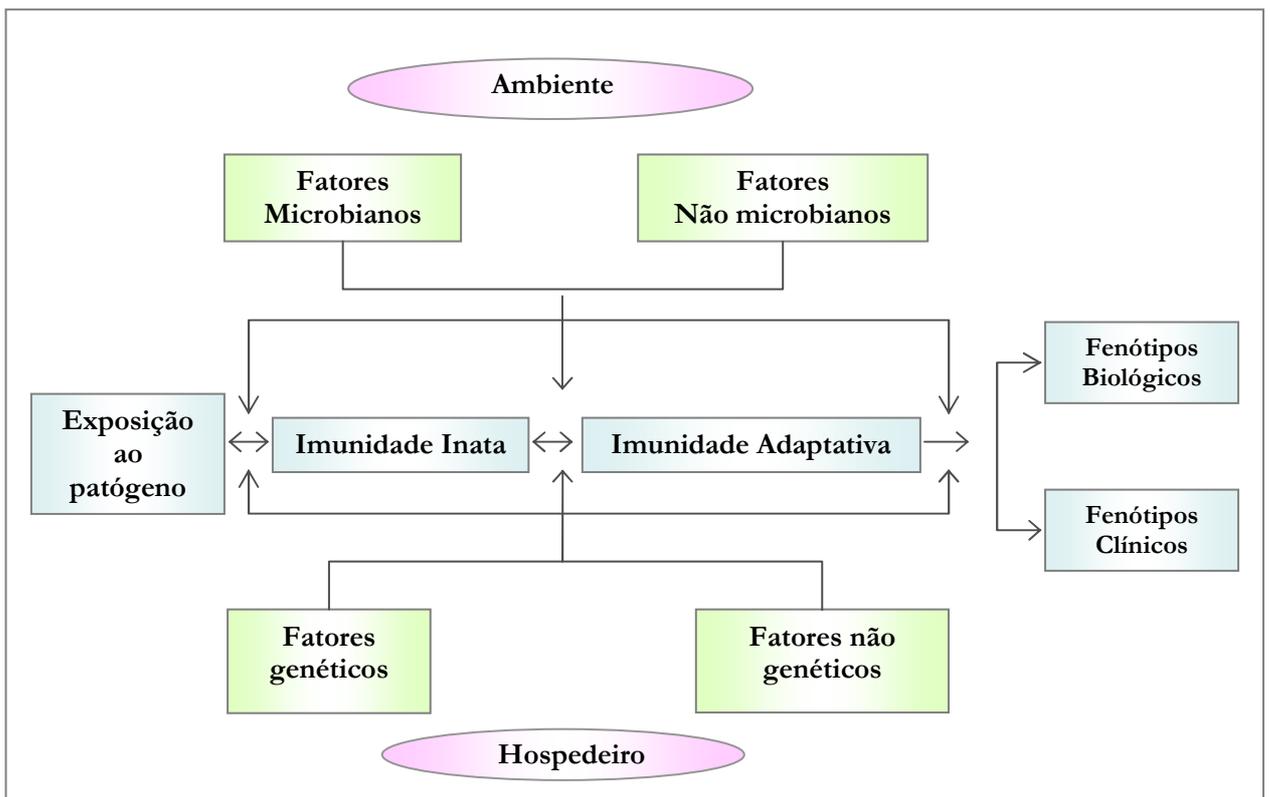
No entanto, muitos pacientes (em torno de 40%) podem exibir um perfil de resposta mista, ou seja, produzem citocinas do perfil Th1 e Th2, tais como IFN $\gamma$ , IL12 e IL4. Isso mostra que o predomínio de uma resposta não implica na anulação da outra, e pode sugerir ainda que em alguns pacientes a resposta imune ao *M. leprae* possa não satisfazer completamente o modelo Th1/Th2. Nesse contexto vale ressaltar que novos subgrupos de células T auxiliares já foram descritos, tais como as células T reguladoras (Treg) e as células T produtoras de IL-17 (Th17), indicando que a resposta celular não é tão dicotômica como se pensava. A participação das Treg, células imunoreguladoras que podem inibir a célula T efetora, vindo sendo estudada na hanseníase, e pode ter um papel importante na determinação da forma lepromatosa da doença (Scollard e col, 2006).

### 3. Epidemiologia genética nas doenças infecciosas e a hanseníase

As doenças infecciosas ainda constituem a principal causa de morte na maior parte do mundo. Isso reflete, por exemplo, na expectativa de vida em torno de 45 anos observada na maioria dos países da África sub-Sahariana (Casanova & Abel, 2004). Em contrapartida, na Europa houve um expressivo aumento na expectativa de vida, que era em torno de 40 anos no século XIX e agora chega aos 80 anos (Casanova & Abel, 2005). Assim, acredita-se que esse aumento na expectativa de vida deva-se muito mais ao controle das doenças infecciosas pelo estabelecimento da higiene, vacinas e de drogas do que por um ajuste do nosso sistema imunológico (Casanova & Abel, 2005).

Inicialmente, as doenças infecciosas foram consideradas de ordem puramente ambiental. Entretanto, mesmo após a publicação da teoria microbiana de Pasteur entre 1865 e 1870, ainda permanecia sem explicação a causa do alto nível de variabilidade clínica observada entre os indivíduos infectados pelo o mesmo microorganismo. Várias teorias foram propostas para explicar esta heterogeneidade clínica, e evidências epidemiológicas acumuladas desde 1930, através de estudos genéticos e de segregação familiar, demonstram conclusivamente a influência do *background* genético do hospedeiro na susceptibilidade a doenças infecciosas (Alcáis e col., 2007). Um estudo realizado em 1952 demonstrou claramente essa influência genética ao identificar uma criança com uma mutação no gene da enzima tirosina quinase, apresentando várias infecções e ausência das células B e de anticorpos, caracterizando uma imunodeficiência primária (Hitzig e col., 2003).

É importante ressaltar que para o estabelecimento de uma doença infecciosa, a exposição ao agente infeccioso é requerida, mas não suficiente. A figura 1.4 mostra que o curso e desfecho da doença envolvem uma interação complexa que inclui vários fatores além da genética do hospedeiro. Partindo do contato com o patógeno, o evento central de combate à infecção se inicia na imunidade inata, que por si só poderia controlar a infecção, ou avançar até a imunidade adaptativa, direcionando o fenótipo biológico e clínico da doença. Cada etapa desse processo pode ser influenciada tanto por fatores ambientais, que envolve fatores do meio ou do patógeno, quanto por fatores genéticos (como mutações) e não genéticos do hospedeiro (Casanova & Abel, 2004).



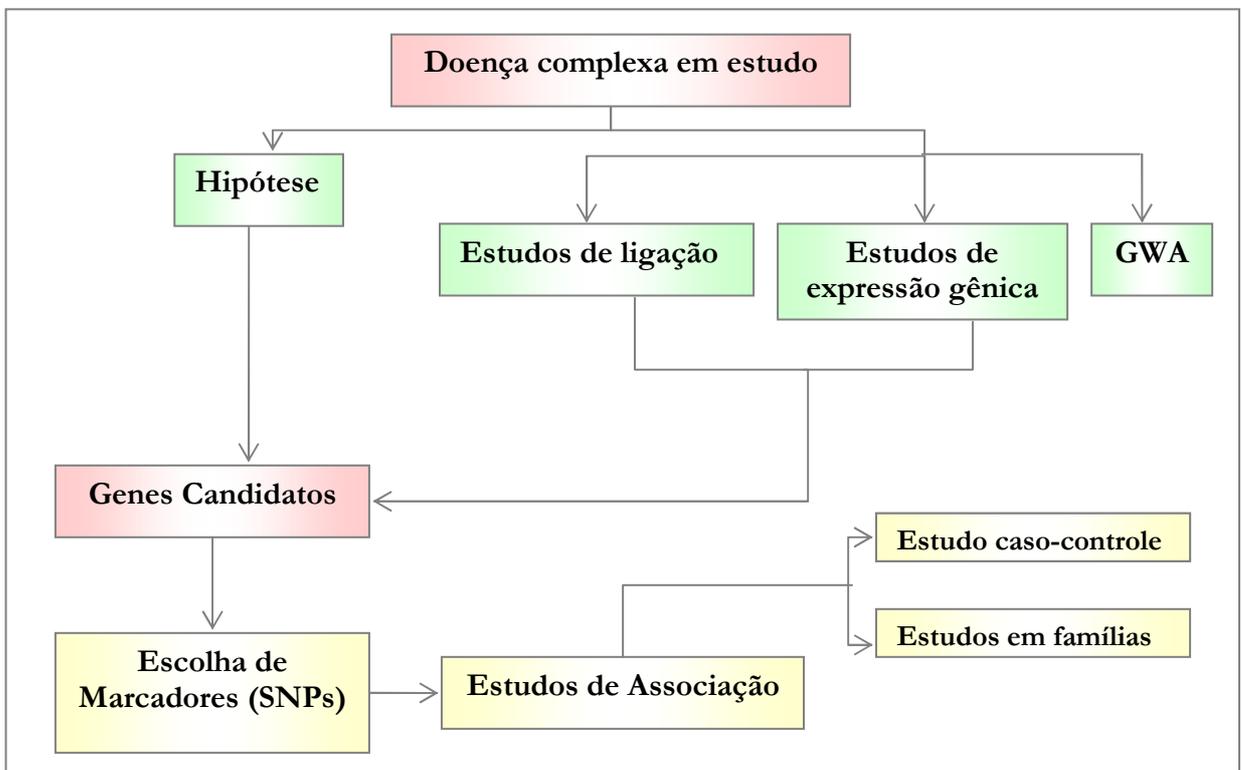
**Figura 1.4.** Interação hospedeiro-ambiente no curso das doenças infecciosas. O complexo processo que vai desde a exposição ao patógeno até o desfecho da doença envolve tanto fatores do hospedeiro quanto do ambiente. Adaptado de Casanova & Abel, 2004.

### 3.1 Estratégias para estudos genéticos em doenças infecciosas

Os estudos genéticos possibilitam investigar uma possível relação entre variantes genéticas e doenças, utilizando correlações estatísticas para identificar o efeito dessas variantes no desfecho em estudo, o que pode permitir encontrar marcadores capazes de refletir a relação genótipo-fenótipo. No caso de patologias complexas como a hanseníase, onde vários genes podem estar envolvidos nos diversos desfechos que a doença pode assumir, espera-se que a identificação de variantes ao longo desses genes possa explicar a susceptibilidade ou proteção à doença.

Dentro das estratégias para o estudo genético em doenças infecciosas encontra-se avaliar a contribuição de variantes em determinados genes, conhecidos como genes candidatos, para o desfecho da doença (Figura 1.5). A escolha de genes candidatos pode ser feita a partir de hipóteses, tais como plausibilidade do mesmo em vias biológicas relevantes na doença e

evidências de associação encontradas em estudos anteriores. Por outro lado, essa escolha pode ser baseada na identificação dos genes em estudos de ligação e em estudos de expressão gênica (Figura 1.5). Nos genes candidatos serão escolhidos ainda os marcadores genéticos candidatos a serem estudados. Os tipos de marcadores genéticos mais avaliados são os polimorfismos de base única (SNPs), mutações em uma única base nucleotídica com frequência maior do que 1% na população. A presença de SNPs poderia, por exemplo, modificar sítios de *splicing*, alterar a afinidade de fatores de transcrição pela região promotora, e ainda resultar em uma troca de aminoácidos que leva a alteração da estrutura protéica e até mesmo da sua função (Moraes e col., 2006).



**Figura 1.5.** Estratégias de estudo para investigar a associação genética em genes candidatos. Pode-se escolher o gene candidato baseado em hipóteses (plausibilidade biológica) ou partindo de estudos posicionais ou de expressão gênica. GWA: estudo de associação do genoma completo, SNPs: polimorfismos de base única, TDT: teste do desequilíbrio de transmissão. Adaptado de Casanova & Abel, 2004.

A escolha do marcador a ser avaliado no gene candidato requer análises cuidadosas. Faz-se importante verificar a localização do marcador no gene, avaliando a possibilidade de modificações na proteína e consequentemente alterações funcionais, sendo interessante o

posicionamento em regiões codificantes, reguladoras e promotoras (Tabor e col., 2002). Outro importante critério na escolha de marcadores genéticos é verificar a existência de desequilíbrio de ligação com outros marcadores. O desequilíbrio de ligação refere-se à presença de alelos em um locus, segregando juntos na população mais freqüentemente do que se poderia esperar de acordo com a distância genética entre eles. Esse conjunto de alelos forma blocos haplotípicos conhecidos como “tags”. Assim, caso existam polimorfismos organizados em *tags* haplotípicos, a presença de um deles nos permite inferir sobre a presença dos demais, constituindo uma estratégia que possibilita otimizar o mapeamento de marcadores em uma determinada região gênica (Stram e col., 2004).

### 3.2 Desenhos de estudos genéticos

Um tipo de estudo utilizado em genética de doenças é o estudo de ligação, o qual assume que componentes genéticos em doenças multifatoriais sejam transmitidos de maneira não-aleatória. Esse tipo de estudo permite avaliar se uma determinada região do cromossomo possui efeito genético com a doença em questão, ou seja, se um locus gênico está ligado ao desfecho. O estudo de ligação compreende uma análise de segregação em famílias, avaliando o quanto uma determinada região desvia-se da segregação independente e co-segrega com a doença (Cardon & Bell, 2001). A identificação da região em estudo é feita utilizando marcadores específicos para os loci gênicos, tais como os microsátélites. Esses marcadores podem inclusive ser distribuídos ao longo de todos os cromossomos, caracterizando a estratégia conhecida como “rastreamento genômico” (do inglês “genome scan”). Após a identificação de uma região ligada à doença, pode-se realizar uma extensão dos marcadores naquela região através de estudos de clonagem posicional, e esse mapeamento fino pode permitir a identificação de genes ligados ao desfecho (Cardon & Bell, 2001). Genes identificados em estudos de ligação são importantes candidatos para a condução de estudos de associação genética (Figura 1.5).

Outra alternativa amplamente utilizada em estudos genéticos são os estudos populacionais de associação, que oferecem uma ferramenta poderosa para mapear genes de risco com efeitos modestos, tendo nesse caso maior poder estatístico do que os estudos de ligação (Möller e col., 2010). Nesse tipo de estudo avalia-se a associação de um determinado gene escolhido *a priori* com um determinado desfecho, utilizando desenhos experimentais do tipo caso-controle ou

familiar (Figura 1.5). Em outra vertente encontram-se os estudos de associação do genoma completo (GWA, do inglês “Genome-Wide Association”) os quais não necessitam de uma hipótese anterior, sendo interessantes na identificação de genes em vias onde não se esperava ter relação com a doença. Os estudos GWA permitem estudar milhares variações genéticas simultaneamente ao longo de todo o genoma (Hirschhorn & Daly, 2005), mas a densidade da análise e as extensivas correções estatísticas atreladas ao modelo, podem aumentar o potencial de se encontrar falsos positivos e negativos, bem como erros de genotipagem (Pearson & Manoliol, 2001). A figura 1.5 ilustra a inserção dos estudos de associação dentro das possíveis estratégias de estudo genético em doenças complexas.

Um dos principais desenhos utilizados em estudos de associação genética é o caso-controle. Em síntese, nesse tipo de desenho são recrutados pacientes e controles (indivíduos saudáveis) de uma determinada população e obtidas as frequências de uma determinada variante genética nesses dois grupos. A comparação entre as frequências nos dois grupos pode indicar se existe uma predisposição a susceptibilidade (maior em pacientes) ou a resistência (maior em controles) a doença.

O desenho caso-controle deve ser feito de maneira bastante criteriosa para que não sejam encontradas associações espúrias. A escolha do grupo controle, por exemplo, deve ser feita com o cuidado para que os indivíduos tenham um grau de exposição ao agente infeccioso semelhante a dos pacientes. Se não for assim, torna-se difícil inferir se os controles não ficaram doentes simplesmente porque eles possuem menos contato com o agente infeccioso (Pacheco & Moraes, 2009). Outro cuidado importante a ser tomado é em relação ao tamanho da amostra, que deve ser o suficiente para possibilitar poder estatístico na detecção de uma significativa diferença, e para evitar efeitos tais como falso-positivos devido a flutuações de frequência (Cardon & Bell, 2001). Deve-se avaliar também a possibilidade de estratificação populacional, ou seja, se existe a influência de variáveis de confusão que possam alterar as frequências dentro do grupo, tais como background étnico, sexo ou idade, que devem ser evitadas ou de alguma forma corrigidas durante a análise (Thomas & Witte, 2002, Pacheco & Moraes, 2009).

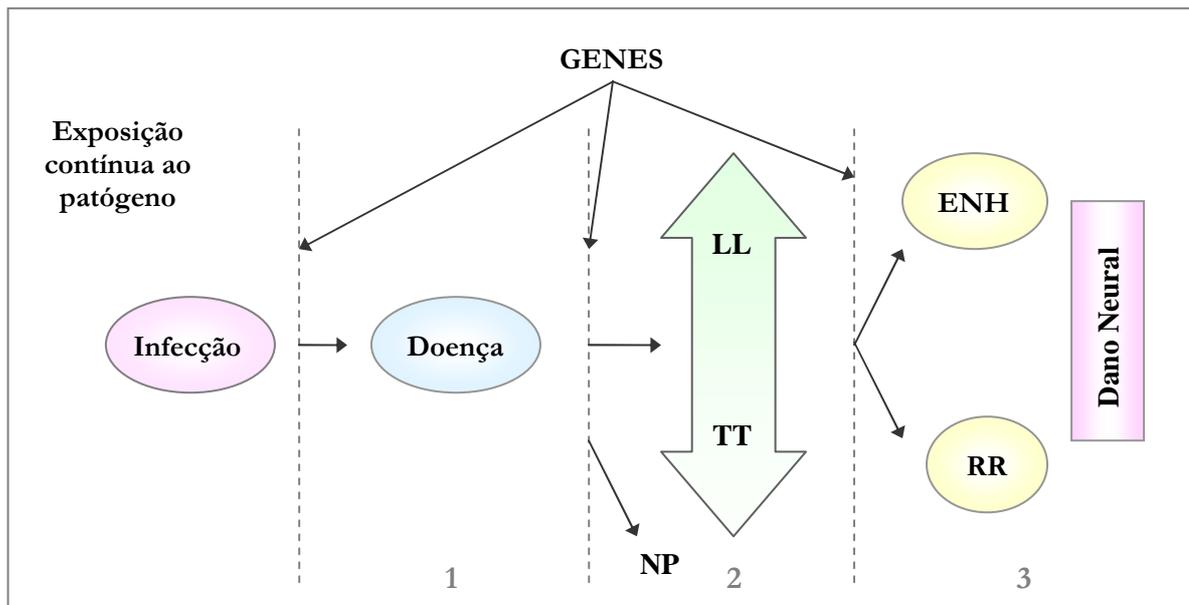
Os estudos de associação em famílias também são alternativa interessante, sendo considerados mais estridentes do que o caso-controle por utilizar um controle genético interno, eliminando assim a influência da estratificação populacional. Esse desenho utiliza

como princípio o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), que avalia o desvio da transmissão alélica aos filhos afetados em relação ao esperado (50%), utilizando o alelo não transmitido como controle (Schaid e col., 1998). Uma desvantagem relacionada a essa metodologia é justamente a dificuldade em recrutar as famílias informativas, que devem ser organizadas em trios contendo pelo menos um filho afetado e pais heterozigotos.

### 3.3 Influência genética na hanseníase

A influência genética na hanseníase foi demonstrada inicialmente em estudos utilizando gêmeos, onde a doença mostrou-se mais freqüente em monozigóticos quando comparados a dizigóticos. Posteriormente, estudos de segregação familiar exibiram fortes evidências para a presença de um gene principal de susceptibilidade à doença (Abel & Demenais, 1988). Somado a essas, outras evidências clínicas e epidemiológicas confirmam que a hanseníase possui influência genética, e algumas delas merecem destaque: i) apesar da baixa diversidade genética do patógeno a doença pode se apresentar em várias formas clínicas; ii) contatos domiciliares consanguíneos exibiram maior risco para desenvolver a doença; iii) dentre as pessoas infectadas, somente de 0,1-1% são susceptíveis à doença; iv) populações com diferentes *backgrounds* étnicos vivendo na mesma área geográfica exibiram taxas de prevalência distintas (Moraes e col., 2006).

Diante disso, acredita-se que durante o seu curso natural, a hanseníase seja influenciada pelo *background* genético do hospedeiro em três momentos distintos. Resumidamente, esses momentos incluem a infecção independente da forma clínica (hanseníase *per se*), o direcionamento das formas clínicas, e ainda a ocorrência e gravidade dos episódios reacionais (Figura 1.7). Em conjunto, os fatores genéticos podem ainda sofrer influência um do outro, seja por adição, redução ou anulação dos seus efeitos. Toda essa dinâmica da influência genética do hospedeiro frente ao *M. leprae* pode ser determinante no desfecho doença.



**Figura 1.6.** Influência genética no curso da hanseníase. Fatores genéticos podem contribuir na ocorrência da hanseníase *per se* (1), na gravidade das formas clínicas (2) nos episódios reacionais e no dano neural (3). LL: lepromatosa, TT: tuberculóide, NP: neural pura, ENH: eritema nodoso hanseniano, RR: reação reversa. Adaptado de Moraes e col., 2006.

### 3.4 Regiões e genes de ligação/associação com a hanseníase

Estudos envolvendo genes candidatos a associação com a hanseníase têm dado grande contribuição ao conhecimento da genética na doença. Além dos estudos de ligação, os estudos de associação, sejam do tipo caso-controle ou desenho familiar, são largamente utilizados como forma de avaliar o grau de associação de genes à doença, reportando investigações em diversas populações. Muitos desses estudos exibem resultados animadores, demonstrando a relevância de regiões/genes na genética da hanseníase, que podem estar associados a susceptibilidade ou proteção com a doença ou suas formas clínicas. Têm sido avaliados principalmente genes de citocinas e de outras moléculas com papel relevante na resposta imunológica, estando localizados na região do complexo antígeno leucocitário humano - HLA (do inglês “Human Leukocyte Antigens”) ou não.

O primeiro estudo genético na hanseníase, utilizando como desenho estudos de ligação, identificou uma região no cromossomo 10p13 que mostrou ligação com a forma paucibacilar da doença (Siddiqui e col., 2001). Essa região contém o gene que codifica para o receptor de manose presente em macrófagos (MRC1), que atua no reconhecimento de padrões bacterianos, em especial resíduos de manose presentes na parede celular do *M. leprae*. Um estudo de

associação conduzido em vietnamitas e brasileiros confirmou a participação do gene *MRC1* na suscetibilidade a hanseníase, onde o polimorfismo G396S mostrou associação com suscetibilidade à hanseníase *per se* e com a forma multibacilar (Alter e col., 2010). Esse estudo tentou estender a análise para avaliar o papel funcional do G396S, no entanto as células carreadoras e não carreadoras do mesmo não foram capazes de realizar a fagocitose, levantando a necessidade de se aprofundar as investigações funcionais sobre o papel desse polimorfismo na hanseníase.

Estudos de ligação conduzidos por Mira e colaboradores, avaliaram seis regiões cromossômicas relacionadas a hanseníase, e identificaram um locus associado às formas clínicas da doença, correspondente a região HLA/TNF no cromossomo 6 (Mira e col., 2003). Esse mesmo grupo realizou um estudo de ligação do tipo rastreamento genômico e encontrou ligação da região 6q25 com susceptibilidade a hanseníase (Mira e col., 2003). O mapeamento fino desta região através de estudos de clonagem posicional e desequilíbrio de ligação identificou uma variante de susceptibilidade em um gene chamado *PARK2*, o qual codifica uma ubiquitina-E3 ligase, e um gene regulador da parkina, o *PARKG*. Foram identificados dois SNPs localizados na região promotora da parkina e organizados em blocos haplotípicos, e que demonstraram associação com a susceptibilidade a hanseníase tanto em famílias vietnamitas quanto na população brasileira (Mira e col., 2004). Esse estudo é considerado o primeiro a ter sucesso em uma clonagem posicional de um locus associado a uma doença infecciosa, e abriu caminhos para a identificação de uma nova via da resposta imune contra o *M. leprae*.

A parkina foi primeiramente identificada em estudos que a relacionaram a doença de Parkinson, e acredita-se que possa participar na regulação de proteínas de degradação envolvidas na resposta imune, em vias apoptóticas e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROI). Assim, foi sugerido que na hanseníase a parkina possa participar na resposta celular anti-oxidante nas células de Schwann, prevenindo a apoptose induzida por ROI nessas células, e favorecendo o sucesso do estabelecimento da infecção e a susceptibilidade à doença (Schurr e col., 2006).

Investigações posteriores do mesmo grupo de pesquisa, com base no rastreamento genômico realizado em vietnamitas, estenderam a análise na região cromossômica 6p21, onde também foi encontrada uma relevante associação (Alcais e col., 2007). Através do mapeamento nessa região, foi identificada a associação do gene da linfotóxina- $\alpha$  (*LTA+80*)

com a susceptibilidade a hanseníase em jovens (antes dos 25 anos), o que foi demonstrado por estudos caso-controle feitos em indianos e em estudos baseados em famílias de vietnamitas. Os dados de replicação do desenho de estudo caso-controle em brasileiros foi apenas marginalmente significativo no grupo de jovens, embora nessa população a média de idade seja alta (em torno de 40 anos), com baixo número de indivíduos menores de 25 anos, o que pode ter reduzido o poder estatístico e dificultado a análise (Alcais e col., 2007).

Um amplo estudo de associação do tipo GWA, visando mapear polimorfismos em associação com a hanseníase, foi realizado recentemente em 1.931 indivíduos da população chinesa, envolvendo também três estudos de replicação independentes com 3.254 pacientes e 5.955 controles no total (Zhang e col., 2009). Esses estudos replicativos avaliaram a associação entre a hanseníase e os marcadores mais fortemente associados no GWA. Como resultado, foi observada a associação entre polimorfismos em seis genes e a susceptibilidade à hanseníase, especialmente nos genes que codificam para NOD2, TNF e HLA. Foi sugerida assim, a existência de uma via de sinalização que regula a imunidade inata na hanseníase mediada pelo NOD2, e que ela esteja associada com a susceptibilidade ao *M. leprae* (Zhang e col., 2009). Posteriormente, um estudo do tipo caso-controle e familiar (TDT) realizado em indianos, embora tenha replicado a associação observada no gene *HLA*, não observou associação dos genes *NOD2* e *TNF* com a hanseníase, sugerindo a existência de heterogeneidade entre as populações (Wong e col., 2010). Recentemente, o gene *NOD2* foi também associado com a hanseníase *per se* e com o desenvolvimento de episódios reacionais em uma população do Nepal (Berrington e col., 2010).

Os genes *HLA* estão intimamente ligados em um locus no cromossomo 6p21, e são altamente polimórficos. Participam do processo de apresentação antigênica para as células T em humanos, o que implica na influência que os diferentes haplótipos de HLA podem exercer no perfil de ativação dos linfócitos. O *HLA* pode ser dividido em *HLA* classe I (A, B e C) e *HLA* classe II (DR, DQ e DP), e estudos têm descrito a associação de vários haplótipos com a hanseníase em regiões de ambas as classes, conferido susceptibilidade ou proteção. Um dos resultados mais consistentes envolve os alelos *HLA-DRB1\*04* e *DRB1\*10*, que na populações brasileira e vietnamita foram associados à resistência e susceptibilidade, respectivamente (Vanderborgh e col., 2007).

Um dos genes candidatos com maior número de trabalhos na hanseníase, tanto em estudos funcionais quanto genéticos, é o gene *TNF*, com destaque para a troca G/A na posição -308 da região promotora. Isso se justifica pela grande importância da citocina TNF na hanseníase, a qual protagoniza a resposta inflamatória na pele, a formação do granuloma e a lesão tecidual. Inicialmente, foi demonstrada maior frequência do marcador *TNF-308A* em pacientes LL do que em controles, sugerindo susceptibilidade (Roy e col., 1999). No entanto, um segundo estudo do tipo caso-controle realizado em brasileiros indicou o oposto, relatando associação desse marcador com proteção a hanseníase *per se* (Santos e col., 2000).

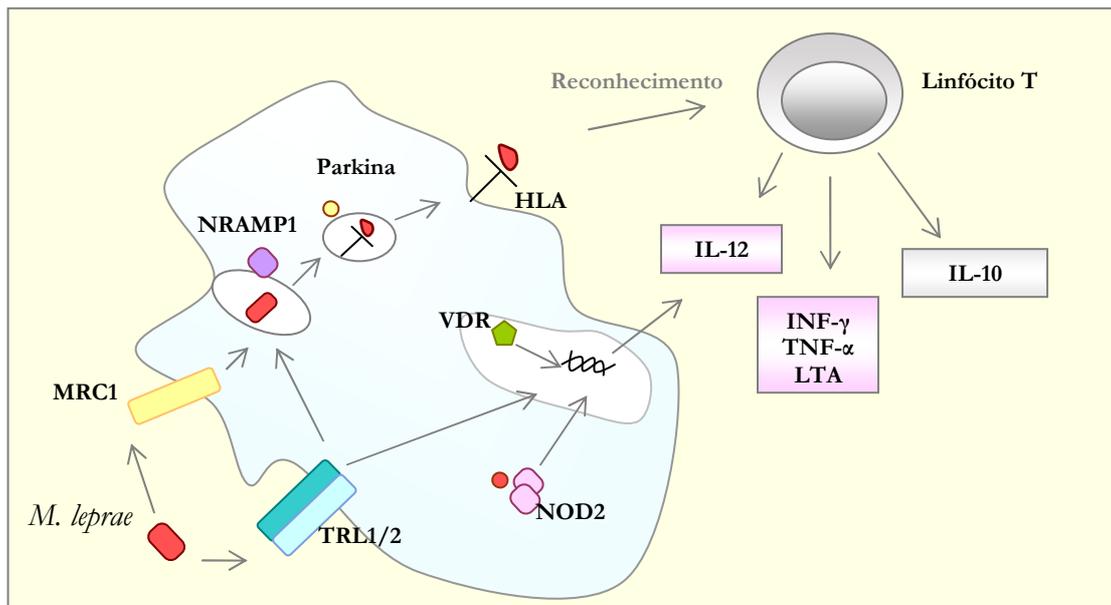
O estudo seguinte envolvendo o *TNF-308A*, também realizado em brasileiros, replicou o resultado anterior, sugerindo a associação desse marcador com proteção à hanseníase *per se*. Esse estudo foi realizado utilizando desenhos de segregação familiar e TDT, sendo feito também um estudo de ligação entre os genes da região do *TNF* (*TNF* e *LTA*) e os genes da região do *HLAII* que mostraram estar em desequilíbrio de ligação (Shaw e col., 2001). Mais recentemente o estudo de alguns SNPs em uma população do Sul do Brasil confirmou os resultados observados em brasileiros (Francheschi e col., 2009). A avaliação conjunta desses dados em um estudo de meta-análise sugere que há um efeito específico em brasileiros da associação de *TNF -308A* na proteção à hanseníase (Cardoso, 2009). Foi demonstrado ainda ocorrer aumento de reatividade ao teste de Mitsuda em pacientes paucibacilares carreadores desse marcador no *TNF* (Moraes e col., 2001). Isso reforça a hipótese original que sugere uma possível associação entre a presença do alelo -308A com níveis elevados de produção da citocina em pacientes com hanseníase tuberculóide, indicando tendência à proteção.

A gene da citocina anti-inflamatória IL-10 também mostrou estar associado à hanseníase. O alelo T do polimorfismo -819 em *IL-10* foi associado à susceptibilidade na população brasileira em dois estudos diferentes, com confirmação na população indiana (Santos e col., 2002, Malhotra e col., 2005, Pereira e col., 2009). Para demonstrar a associação, Pereira e colaboradores realizaram um estudo caso-controle combinado a uma meta-análise, somado a um estudo biológico do papel desse marcador, onde foram observados menores níveis de IL-10 nos carreadores do alelo -819T comparado com os não carreadores (Pereira e col., 2009). Segundo os autores, esses achados somados aos anteriores sugerem uma participação definitiva do alelo *IL-10 -819T* na susceptibilidade a hanseníase.

O eixo IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$ , um dos principais envolvidos na ativação da resposta imune a micobactérias, já foi relacionado geneticamente com a hanseníase. Inicialmente, não foi verificada associação dos genes do receptor da IL-12 (*IL12RB1* e *IL12RB2*) e do IFN- $\gamma$  (*INFGRI*) com a hanseníase (Lee e col., 2003), mas estudos seguintes verificaram associação de um haplótipo na região promotora do *IL12RB2* com proteção a forma LL da doença (Ohyama e col., 2005), assim como tendência protetora a hanseníase *per se* de um marcador no gene que codifica a porção p40 da IL-12 e da IL-23 (Morahan, 2007). Foi demonstrado também, que o alelo A do polimorfismo 1188, na região 3' UTR do gene que codifica a porção p40 da IL-12 possui associação de forma a conferir susceptibilidade à forma LL da hanseníase (Alvarado-Navarro e col., 2008).

No contexto da resposta imune inata, foi lançado como gene candidato à associação com a hanseníase o gene do receptor da vitamina D (VDR), que se mostrou crucial na via antimicrobiana da resposta imune no combate a micobactérias (Modlin, 2009). O gene *VDR* tem sido abordado em vários estudos do tipo caso-controle, que encontraram resultados de associação com a hanseníase, mas muitos deles inconclusivos ou contraditórios. Abordaremos posteriormente com maior detalhamento a participação desse gene na hanseníase.

Como foi mostrado, vários genes e regiões do genoma foram associados com a hanseníase, com suas formas clínicas ou episódios reacionais. Entretanto, muitas dessas associações não foram replicadas, possivelmente por fatores que afetam a qualidade dos desenhos tais como inadequado tamanho amostral. Esses achados em conjunto indicam que a susceptibilidade à hanseníase é oligogênica, com um alto grau de heterogeneidade entre diferentes populações, sugerindo um complexo modelo genético de influência a susceptibilidade à doença (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Esquema das moléculas candidatas a protagonistas na infecção macrofágica pelo *M. leprae*. Essas moléculas já tiveram seus genes descritos em associação com a hanseníase em trabalhos anteriores.

## 4. A Vitamina D e o VDR

### 4.1 Aspectos gerais

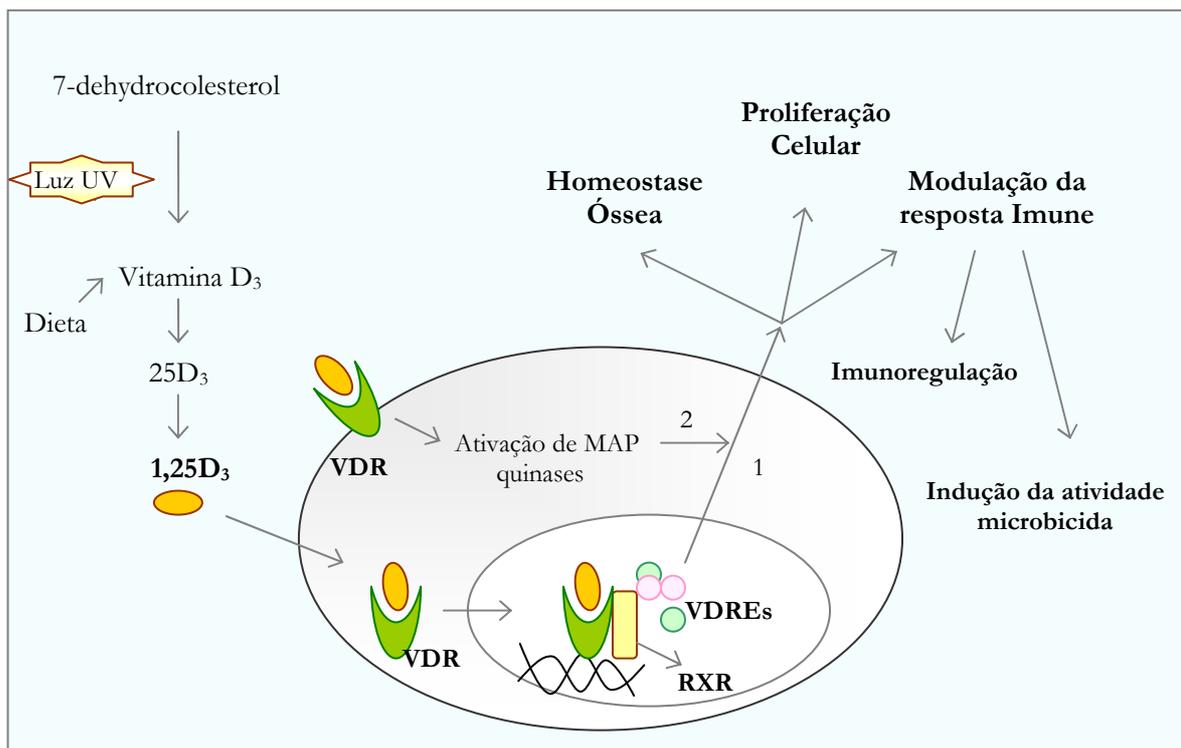
A vitamina D foi inicialmente relacionada com o metabolismo ósseo e regulação de cálcio. No início do século XX foi demonstrado que o raquitismo clínico podia ser curado através da exposição solar, e que isso se devia à participação dessa vitamina (Holick e col., 2004). O isolamento e identificação da estrutura esteróide da vitamina D rendeu o prêmio Nobel de química em 1928 ao Dr. Adolf Windaus, e a fortificação de alimentos com a forma ativa dessa vitamina a partir de 1930 contribuiu para a erradicação do raquitismo. No entanto, a partir da década de 40, percebeu-se que baixos níveis de vitamina D associados à baixa exposição solar estavam envolvidos com aumento de risco à doenças infecciosas tais como tuberculose, e a outras doenças como câncer (Borradale & Kimlin, 2009). Isso abriu os horizontes para que a atuação da vitamina D fosse interpretada como pleiotrópica em muitas doenças, e hoje se sabe que essa vitamina possui ação reguladora em mais de 900 genes (Wang e col., 2005). A importância da vitamina D como moduladora da resposta imune destacou-se consideravelmente com a identificação do seu receptor, o VDR (do inglês “Vitamin D

Receptor”), o qual demonstrou através de vários estudos mediar a ação da vitamina D na resposta imune à doenças infecciosas, inclusive micobacterianas.

O VDR é um membro da superfamília de proteínas que atuam como receptores nucleares, podendo localizar-se no núcleo, na membrana plasmática ou no citoplasma (Normane col., 2004). Possui como ligante natural o calcitriol ou 1,25-dihydroxyvitamina D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>), forma ativa da vitamina D que é originada por duas hidroxilações na pró-vitamina D<sub>3</sub> (Figura 1.8). A pró-vitamina D<sub>3</sub> por sua vez pode ser obtida pela conversão fotoquímica a partir do 7-dehydrocolesterol na pele ou através da dieta (Lehmann & Meurer, 2010). O processo de ativação da vitamina D compreende uma hidroxilação na pró-vitamina D<sub>3</sub> que vai a 25-dihydroxyvitamina D<sub>3</sub> (25D<sub>3</sub>), seguida por mais uma hidroxilação que resulta na 1,25D<sub>3</sub> como produto final (Lehmann & Meurer, 2010), sendo essas hidroxilações catalizadas por enzimas da classe CYP (do inglês “cytochrome P450”).

Essas reações de ativação acontecem no fígado e rim, de maneira que os metabólitos da vitamina D são transportados para esses órgãos com o auxílio da DBP (do inglês “*Vitamin D Binding Protein*”). Após ser originada no fígado a 25D<sub>3</sub> cai na corrente sanguínea, podendo ser transportada pela DBP para o rim onde é convertida na 1,25D<sub>3</sub> (Lehmann & Meurer, 2010). A forma ativa da vitamina D pode atuar localmente, ou ser transportada com o auxílio da DBP para outras células onde pode atuar através do seu receptor.

O VDR possui uma estrutura molecular caracterizada por um domínio altamente conservado de ligação ao DNA, uma região de ligação à vitamina D, e um domínio de ativação transcricional dependente de ligante (Rochel e col., 2000). O mecanismo sugerido para ação molecular do VDR está esquematizado na Figura 1.8. Ao se ligar a 1,25D<sub>3</sub>, o VDR adquire uma conformação ativa capaz de interagir com o receptor retinóide X (RXR), formando um heterodímero que pode se ligar ao DNA e atuar como fator de transcrição (Haussler e col., 1997).



**Figura 1.8.** Mecanismo esquemático da ação da Vitamina D e seu receptor. Ao se ligar à forma ativa da vitamina D (1,25D<sub>3</sub>), o VDR pode atuar como fator de transcrição, recrutando proteínas acessórias. O VDR está envolvido em vários eventos celulares tanto por vias genômicas (1) quanto não-genômicas (2), e na resposta imune pode ter um papel regulador ou de indução da ação microbicida.

A ação do VDR como fator transcricional depende do recrutamento de várias proteínas co-reguladoras, tais como os elementos de resposta à vitamina D (VDREs), que em conjunto formarão uma estrutura que facilita a abertura da cromatina e a interação VDR/RXR, contribuindo para a ligação na região promotora do DNA (Campbell e col., 2010). Em consequência disso, serão ativados ou reprimidos genes envolvidos nas mais diversas atividades celulares como absorção intestinal de cálcio e regulação óssea, crescimento e diferenciação celular, imunomodulação, dentre outros (Borradale & Kimlin, 2009). Além disso, a interação do VDR com a vitamina D pode levar a ativação de vias não genômicas, através da ativação direta de vias de sinalização citoplasmáticas que desencadeiam eventos tais como o aumento do influxo de cálcio e a ativação de quinases citosólicas (Ordóñez-Morán & Muñoz, 2009).

Tanto a vitamina D como o VDR, estão distribuídos em diversos tipos celulares, e os seus efeitos podem diferir funcionalmente de acordo com cada tipo de célula ou tecido, o que tem sido atribuído principalmente ao balanço entre as vias genômicas e não-genômicas. Um exemplo disso ocorre no câncer, onde a 1,25-D<sub>3</sub> exibe ação anti-proliferativa sobre células

neoplásicas em alguns tipos de câncer como o de colo-retal, mas foi associada ao aumento do risco a câncer de esôfago, possivelmente por facilitar a invasão celular nesse tecido (Campbell e col., 2010). O envolvimento de vias mediadas pela vitamina D em doenças infecciosas como tuberculose e hanseníase, e em doenças auto-imunes tem sido demonstrado, o que se relaciona com a participação dessa vitamina e do seu receptor na resposta imunológica.

#### **4.2 VDR e a resposta imune**

As primeiras investigações sobre o envolvimento da vitamina D com o sistema imune iniciaram-se com observações de que a exposição solar aumentava a resistência a *Mycobacterium tuberculosis*. O prêmio Nobel de medicina em 1903 foi devido à descoberta de um tratamento para tuberculose cutânea (lupus vulgaris) à base de radiação luminosa concentrada (Liu e col., 2006). O envolvimento da vitamina D no combate a infecção só foi demonstrado em 1987, onde se observou a inibição da multiplicação desses bacilos em cultura de macrófagos humanos frente à adição de 1,25D<sub>3</sub> (Crowle e col., 1987).

Estudos posteriores observaram que havia uma redução nos níveis de vitamina D em pacientes com doenças auto-imunes tais como a esclerose múltipla, e que a implementação de terapia com essa vitamina reduziu os efeitos da doença, sugerindo uma participação da vitamina D como imunoreguladora (Albert e col., 2009). Além disso, a 1,25D<sub>3</sub> mostrou efeito inibidor sobre a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos de sangue periférico de maneira dose-dependente (Reichel e col., 1997), bem como inibição preferencial do perfil Th1 (Lemire e col., 1995) e ativação do perfil Th2 na maioria dos estudos (Boonstra e col., 2001). Esses estudos, dentre outros, explicariam a ação anti-inflamatória da vitamina D nas doenças auto-imunes. Assim, surgia uma nova vertente de pesquisas indicando o envolvimento da vitamina D na modulação do sistema imune.

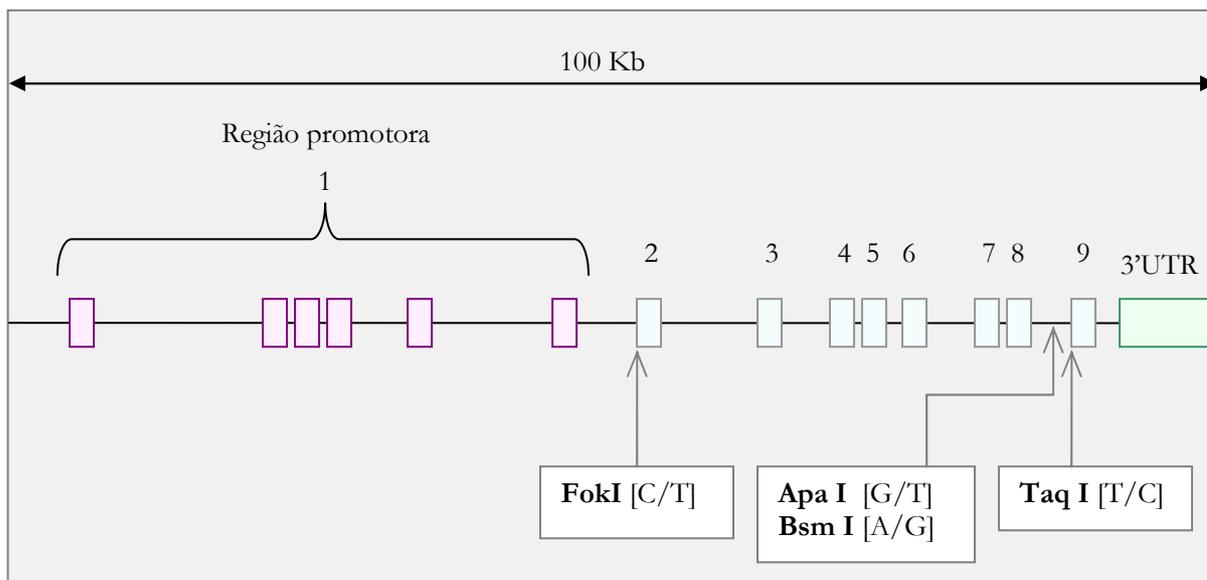
Entretanto, cerca de 100 anos depois do envolvimento da fototerapia no combate a infecções o seu mecanismo começa a ser conhecido, não deixando de envolver mais uma das ações pleiotrópicas da vitamina D. Foi demonstrado inicialmente que a ativação do TLR1/2 reduziu a viabilidade de *M. tuberculosis* em monócitos humanos, através da ativação da via antimicrobiana ativada por esses receptores (Thoma-Uszynski e col., 2001). Posteriormente, a análise da expressão gênica de monócitos estimulados com lipopeptídeo sintético de *M.*

*tuberculosis* específicos para TLR1/2 identificou dentre outros genes o *VDR* com aumento da expressão, sugerindo uma participação importante na via antimicrobiana (Liu e col., 2006). O mesmo grupo demonstrou a redução da viabilidade de *M.tuberculosis* via indução do *VDR*, de forma dependente da produção do peptídeo antimicrobiano Catelicidina. Esse peptídeo foi mais expresso em monócitos infectados estimulados com a 1,25D<sub>3</sub>, de uma maneira dose-dependente (Liu e col., 2007). Mais recentemente, mostrou-se que além da participação do *VDR*, a indução das citocinas IL-15 (Krutzik e col., 2008) e IL-1-β (Liu e col., 2009) atuam sinergicamente para ativar a via anti-microbiana induzida pelo TLR contra patógenos intracelulares.

Já no contexto da imunoregulação, altos níveis de 1,25D<sub>3</sub> mostraram suprimir a autoimunidade e a destruição decidual pela inibição do perfil Th17 (Tang e col., 2009), e facilitar a indução de células T regulatórias Foxp3 positivas (Kamen & Tangpricha, 2010). Considerando toda a complexidade de ação da Vitamina D e do *VDR* nos eventos celulares, muitos estudos genéticos e funcionais ainda são necessários para definir claramente o papel das vias mediadas por essa vitamina nas doenças infecciosas.

#### **4.3 Polimorfismos no gene *VDR***

O gene *VDR* localiza-se na região 12q12–q14, e foi caracterizado por Miyamoto e col. contendo nove regiões codificantes, incluindo uma região promotora passível de *splicing* alternativo, e por isso considerada pelos autores como éxon 1 (Miyamoto e col., 1997). O *VDR* possui vários SNPs localizados em sítios de enzimas de restrição, gerando RFLPs (do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphisms”), e os mais estudados estão esquematizados na figura 1.9



**Figura 1.9.** Estrutura do gene *VDR* e a localização dos principais polimorfismos. O gene possui 9 regiões consideradas como exons (representados de 1 a 9), sendo o éxon 1 passível de *splicing* alternativo. Adaptado de Uitterlinden e col., 2006.

Próximo a região 3'UTR as variantes polimórficas mais estudadas são as específicas para as enzimas *TaqI*, *ApaI* e *BsmI*, as quais já foram relacionadas funcionalmente à atividade do *VDR* e a expressão gênica (Morrison e col., 1992). O polimorfismo *Taq* [T/C] é uma variação sinônima localizada na posição +352 do éxon 9, de forma que a troca de bases não altera a sequência de aminoácidos (Valdivielso and Fernandez, 2006). Esse polimorfismo já foi associado a várias doenças como diabetes tipo I (Panierakis e col., 2009), diabetes tipo II (Dilmeç e col., 2009), queratose solar (Carless e col., 2008), e a ocorrência de metástases (Valdivielso and Fernandez, 2006). Em relação à hanseníase, o polimorfismo *Taq* já foi associado a risco nas populações brasileira, mexicana, africana e indiana (Goulart e col., 2006, Félix e col., 2009, Fitness e col., 2004, Roy e col., 1999).

As variantes *Apa* [G/T] e *Bsm* [A/G] são localizadas no intron 8, e também já foram associadas a diversas doenças. O SNP *Apa* exibiu associação com câncer colo-retal (Mahmoudi e col., 2009) e de ovário (Lurie e col., 2007), a asma (Saadi e col., 2009) e a tuberculose em uma população africana (Bornman e col., 2004). O *Bsm* por sua vez mostrou-se associado ao aumento da densidade óssea e a baixos níveis do hormônio da paratireóide (Valdivielso and Fernandez, 2006), bem como recentemente relacionado à artrite reumatóide (Ghelani e col., 2010). No contexto de doenças infecciosas, estudos funcionais conduzidos por Selvaraj e col., utilizando macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, sugerem que a presença dos polimorfismos *Bsm* e *Taq* e do haplótipo formado por *Bsm/Apa/Taq* exerça influência no

potencial fagocítico de maneira a reduzi-lo (Selvaraj e col., 2004). O polimorfismo Fok [C/T] é considerado o caso mais interessante de SNP-RFLP, devido a sua localização na região do códon de iniciação (ATG). A presença do alelo T do Fok acarreta no uso de um códon de iniciação alternativo que leva a produção de uma proteína menor (Miyamoto e col., 1997). Esse polimorfismo é o que leva a maior alteração protéica no VDR, e exibiu associação com diversas doenças tais como câncer de mama (Sinotte e col., 2008, Bretherton-Watt) e do colo uterino (Ochs-Balcom), e a ocorrência da hepatite B (Li e col., 2006). Foi conduzido recentemente um estudo de meta-análise contemplando todos os estudos informativos já publicados que avaliam a associação dos polimorfismos em *VDR* com a tuberculose, mostrando uma associação com proteção do genótipo TT do Fok bem como uma associação do genótipo GG do Bsm com a susceptibilidade na população asiática (Gao e col., 2010). Até o momento, estudos de associação envolvendo os polimorfismos Apa, Bsm e Fok com a hanseníase ainda não foram reportados na literatura.

Além dos polimorfismos relacionados a RFLP, existem inúmeros outros localizados ao longo do gene *VDR*. Uma das formas utilizadas para identificar esses SNPs é através do sequenciamento da região gênica, o que permitiu identificar, por exemplo, o polimorfismo Cdx2 [G/A] na região promotora do *VDR*, no sítio de ligação com o fator de transcrição CDX2 (do inglês “caudal-related homeobox 2”), SNP esse que foi posteriormente associado a diminuição da densidade óssea na população japonesa (Valdivielso and Fernandez, 2006). No entanto, ferramentas de bioinformática possibilitam o acesso a informações sobre os SNPs já identificados em várias populações, especialmente através de banco de dados como o “dbSNP” do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Uma estratégia interessante é buscar polimorfismos que estejam em organizados em “tags” haplotípicos para utilização em estudos de associação, o que é possível utilizando o banco disponível no “International HapMap Project” (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essa estratégia foi utilizada inclusive, na escolha de um dos polimorfismos avaliados no presente estudo (rs4760658).

Como foi ilustrado, vários estudos avaliaram a presença de polimorfismos no gene *VDR* e sua associação com doenças em diferentes populações, podendo incluir a hanseníase ou outra micobacteriose. Não obstante, os resultados dessas investigações foram inconclusivos ou contraditórios, o que justifica a intensificação de estudos que busquem compreender o real papel do VDR na hanseníase, contribuindo para avaliar a associação desse receptor com a doença.

## II. OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo consiste em avaliar a associação entre polimorfismos no gene *VDR* e a hanseníase, através de estudos do tipo caso-controle e familiar.

### 2. Objetivos específicos

- Avaliar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos Fok, rs4760658 e Taq no gene *VDR* em uma população do Rio de Janeiro e analisar a associação entre os referidos marcadores e a hanseníase, através da comparação da distribuição de frequências em casos e controles;
- Realizar o estudo do haplótipo formado pelos marcadores Fok/ rs4760658/Taq, determinando a frequência dos mesmos em casos e controles e a associação com a hanseníase e avaliar se existe desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos genotipados;
- Determinar a transmissão alélica dos SNPs Fok e Taq no gene *VDR* em um estudo replicativo utilizando famílias através do teste de desequilíbrio de transmissão;
- Efetuar uma revisão sistemática do Taq-*VDR* e a hanseníase, visando a realização de um estudo de meta-análise.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1. População e desenho de estudo**

Um dos desenhos utilizados no presente trabalho foi o estudo do tipo caso-controle em uma população do Rio de Janeiro, composta por 1003 indivíduos (670 casos e 598 controles). Os pacientes foram diagnosticados no Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz/RJ (ASA-FIOCRUZ) credenciado como centro de referência no controle da hanseníase. O diagnóstico seguiu os critérios estabelecidos por Ridley & Jopling (1966), e como recomendado pela OMS, os pacientes foram agrupados como multibacilares (MB) ou paubacilares (PB). Os controles, residentes na mesma área geográfica dos pacientes, foram obtidos a partir de um banco de doadores de medula óssea do INCA-RJ (Instituto Nacional do Câncer). Pacientes e controles foram etnicamente classificados como caucasóides, mestiços ou negros, de acordo com características morfológicas dos indivíduos e dos seus familiares. Esta classificação foi realizada sempre pelo mesmo profissional, através de uma inspeção cuidadosa de atributos dessas pessoas, tais como características morfológicas da face, tipo de cabelo e cor de pele. As características gerais das populações utilizadas no estudo caso controle estão listadas na tabela 3.1.

Em paralelo, foi realizado um estudo replicativo na população do Rio de Janeiro, que consiste em um estudo de associação familiar. Utilizou-se para tal fim uma população de 365 indivíduos contendo 90 núcleos familiares com pelo menos um filho afetado cada. Essas famílias foram oriundas do bairro Jardim Primavera no município de Duque de Caxias-RJ, o qual apresenta alta endemicidade para hanseníase. As famílias foram organizadas formando trios, composto por um filho afetado e pelos pais. Foram incluídos também os trios em que um dos pais esteve ausente, mas que o genótipo deste pôde ser inferido pelo genótipo dos irmãos. Na tabela 3.2 estão as características gerais referentes às famílias utilizadas nesse estudo.

**Tabela 3.1:** Características gerais da população recrutada para o estudo caso-controle\*.

		<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Idade (média ± SD)</b>		38.66 ± 16.92	33.49 ± 9.62
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	239 (36)	314 (45)
	<b>Masculino</b>	431 (64)	386 (55)
<b>Etnia</b>	<b>Caucasóide</b>	305 (55)	393 (57)
	<b>Mestiços</b>	191 (34)	195 (28)
	<b>Negros</b>	64 (11)	105 (15)
<b>Classificação OMS</b>	<b>Paucibacilar</b>	244 (36)	-
	<b>Multibacilar</b>	426 (64)	-

\*Resultados expressos como N (frequência%). O número total de indivíduos em cada parâmetro pode ser diferente do número total genotipado devido a perdas durante o processo.

**Tabela 3.2:** Características gerais da população recrutada para o estudo de famílias\*.

		<b>Afetados</b>	<b>Não afetados</b>
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	109 (54)	122 (57)
	<b>Masculino</b>	94 (46)	93 (43)
<b>Etnia</b>	<b>Caucasóide</b>	81 (48)	75 (35)
	<b>Mestiços</b>	50 (30)	64 (30)
	<b>Negros</b>	37 (22)	75 (35)
<b>Classificação OMS</b>	<b>Paucibacilar</b>	76 (61)	-
	<b>Multibacilar</b>	48 (39)	-

\*Resultados expressos como N (frequência%). O número total de indivíduos em cada parâmetro pode ser diferente do número total genotipado devido a perdas durante o processo.

## 2. Extração de DNA

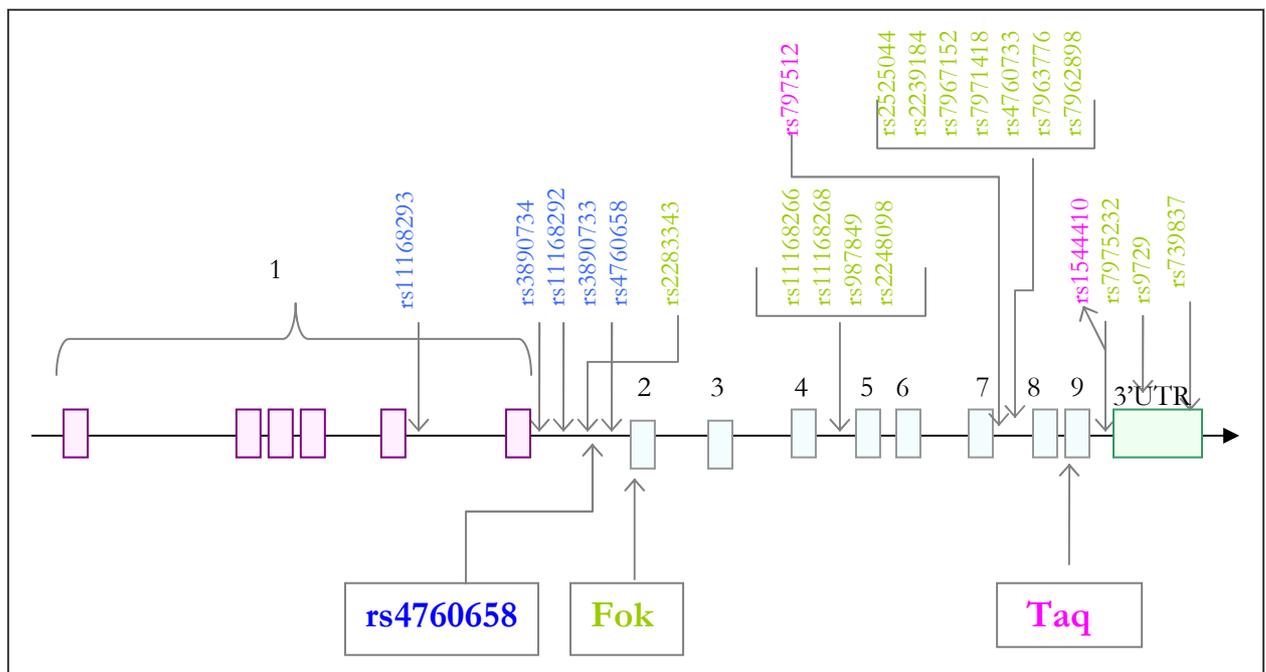
A coleta das amostras realizada no ASA-FIOCRUZ (pacientes) ou no INCA (controles) ocorreu perante a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido por escrito, de acordo com as normas do Comitê de Ética da FIOCRUZ (protocolo CEP /FIOCRUZ 151/01). A partir de amostras de sangue total foi realizada a extração de DNA utilizando o método *salting out* (MILLER *e col.*, 1988) com algumas modificações. Primeiramente foram adicionados 10 mL de tampão TE (Tris.Cl 10 mM; EDTA 1 mM) a um tubo de 15 mL contendo 2 mL de amostra de sangue total. Misturou-se por inversão e centrifugou-se a 2.500 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e ao *pellet* foi adicionado mais tampão TE até completar o volume de 10 mL. Posteriormente, o material foi homogeneizado no vórtex até que o *pellet* estivesse completamente dissolvido, e em seguida o tubo foi centrifugado a 2.500 rpm durante 20 minutos. Esse último passo foi repetido, e após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Após esse descarte foi adicionado ao *pellet* 600 µL de tampão de lise (Tris.Cl 10 mM, NaCl 400 mM e EDTA 2 mM), 80 µL de uma solução de SDS a 10% e 9 µL de proteinase K (solução a 25 mg/mL). O material foi homogeneizado no vórtex por 2 segundos e incubado a 37 °C durante a noite. Em seguida foram acrescentados 200 µL de uma solução de acetato de sódio saturado (6,83 M) e o material foi então centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos. Foi feita a coleta do sobrenadante e sua transferência para outro tubo, ao qual foi também acrescentado etanol absoluto (2 vezes o volume recuperado). A solução foi misturada por inversão até que o DNA precipitasse. O *pellet* de DNA foi coletado e transferido para outro tubo, adicionando-se a ele 200 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi cuidadosamente mantido invertido por 30 minutos para que o etanol evaporasse completamente. Finalmente, foram adicionados 200 µL de tampão TE (Tris.Cl 5 mM; EDTA 0,1 mM) ao *pellet* de DNA, e o material foi incubado a 56 °C até que o *pellet* estivesse dissolvido.

## 3. Genotipagem

A fim de tentarmos reproduzir na população brasileira estudos da literatura que reportam associação do *VDR* com a hanseníase, para genotipagem nesse gene foram escolhidos inicialmente os polimorfismos Taq (rs731236) e Fok (rs2228570), esse último devido a sua

implicação funcional e ao histórico de associação com *M. tuberculosis*, micobactéria considerada semelhante ao *M. leprae* em termos de resposta imunológica do hospedeiro. Estendendo a região genotipada no *VDR*, foi realizada uma busca no banco de dados do “International HapMap Project” a procura de SNPs que estivessem organizados em “tags” haplotípicos, ou seja, que estivessem em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos distribuídos ao longo de todo gene. Dessa forma foi escolhido mais um polimorfismo a ser genotipado, o rs4760658, caracterizado por uma troca T/C no intron 1. Verificou-se ainda que tanto o Fok quanto o Taq encontram-se em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos ao longo do *VDR*. A figura 3.1 esquematiza a localização dos polimorfismos genotipados no gene *VDR*, bem como outros marcadores estimados como em desequilíbrio de ligação.

Os polimorfismos utilizados no desenho familiar (Taq e Fok) foram genotipados através da técnica PCR-RFLP (do inglês “polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism”), ao passo que os polimorfismos utilizados no desenho do tipo caso-controle (Fok, rs4760658 e Taq) foram genotipados por PCR em tempo real.



**Figura 3.1.** Esquema de localização dos polimorfismos no gene *VDR*. Os polimorfismos rs4760658, Fok e Taq foram genotipados nesse trabalho. Os polimorfismos com as mesmas cores encontram-se em desequilíbrio de ligação. Fonte: *Hapmap Project*

### 3.1 Genotipagem por RFLP

Para as genotipagens realizadas através de PCR-RFLP, as amplificações por PCR foram realizadas em reações com volume final de 25 µL, utilizando entre 50 a 100 ng de DNA genômico como molde. Em cada reação foram utilizados 1.0 U de *Taq* DNA polimerase com 1X de tampão de reação fornecidos pelo fabricante (Invitrogen, CA, USA), 1,5-2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP e 0,3 µM de cada iniciador. As sequências nucleotídicas de cada primer utilizado nas reações de PCR estão ilustrados na tabela 3.3.

**Tabela 3.3:** Sequências de iniciadores e sondas utilizados para as genotipagens dos SNPs no gene *VDR*

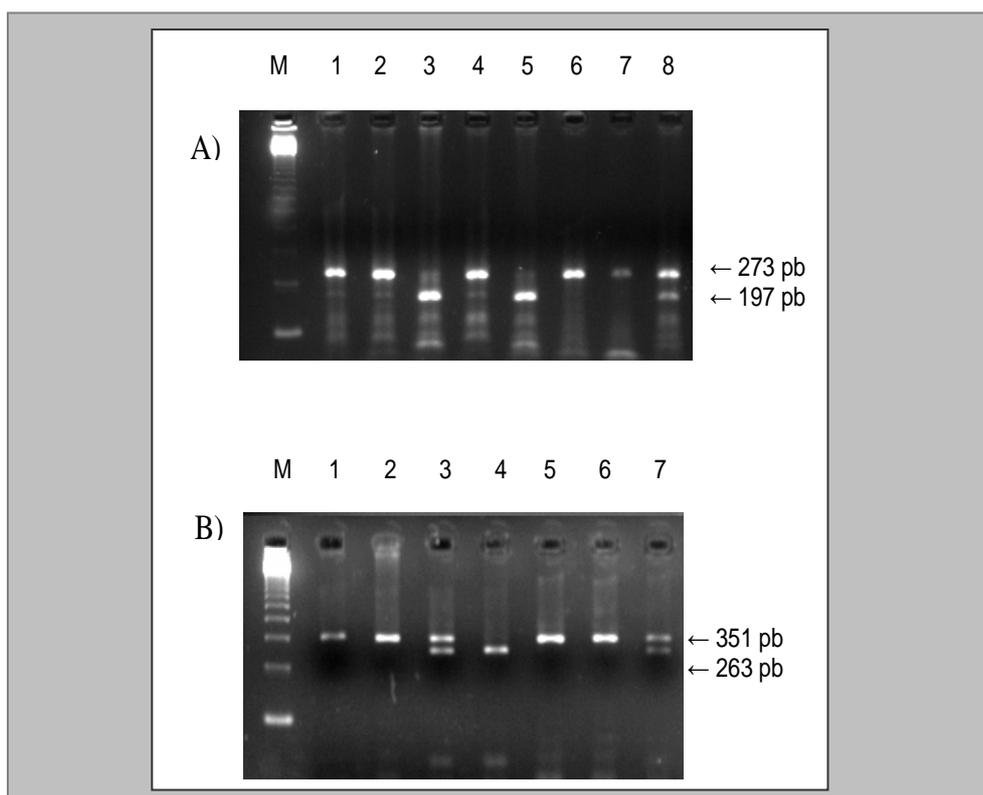
SNP	Localização, troca de base	Método de genotipagem	PCR primers/sondas*
<b>Taq</b> (rs731236)	Exon 9 [T/C]	PCR-RFLP (enzima <i>TaqI</i> )	Primers: senso: 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCA -3' antissenso: 5'-GGTGGCGGCAGCGGATGTACGT-3'
		PCR-RFLP (enzima <i>FokI</i> )	Primers: senso: 5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG -3' antissenso: 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'
<b>Fok</b> (rs2228570)	<i>Start codon</i> [C/T]	PCR em tempo real	Primers: senso: 5'-TGGCCTGCTTGCTGTTCTTA-3' antissenso: 5'-GGGTCAGGCAGGGAAGTG-3' Sondas: <i>VIC</i> - 5'-ATTGCTCCGTCCTG -3' <i>FAM</i> - 5'-TTGCTCCATCCCTG-3'
		PCR em tempo real	Primers: senso: 5'-GGCCCCTAGGACCTGACT-3' antissenso: 5'-GCATCTGGAACCTCTGCTAGAAA -3' Sondas: <i>VIC</i> -5'-CTCGCTGTTGCCTGTG-3' <i>FAM</i> - 5'-TCGCTGTCGCCTGTG-3'
<b>rs4760658</b>	Intron 1 [T/C]	PCR em tempo real	Primers: senso: 5'-GGCCCCTAGGACCTGACT-3' antissenso: 5'-GCATCTGGAACCTCTGCTAGAAA -3' Sondas: <i>VIC</i> -5'-CTCGCTGTTGCCTGTG-3' <i>FAM</i> - 5'-TCGCTGTCGCCTGTG-3'

\* VIC e FAM: fluoróforos ligados às sondas

As condições de ciclagem do PCR foram as seguintes: 94 °C por 5 min (desnaturação), 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, com uma etapa de extensão final de 72 °C durante 5 min. As sequências de todos os iniciadores usados estão

listados na tabela 3.3. Os amplicons dos PCRs foram digeridos em 20  $\mu$ L de reação, contendo 3U de enzima de restrição (Invitrogen, CA, USA), tampão de digestão 1X (Invitrogen, CA, USA), e 15  $\mu$ L do produto de PCR.

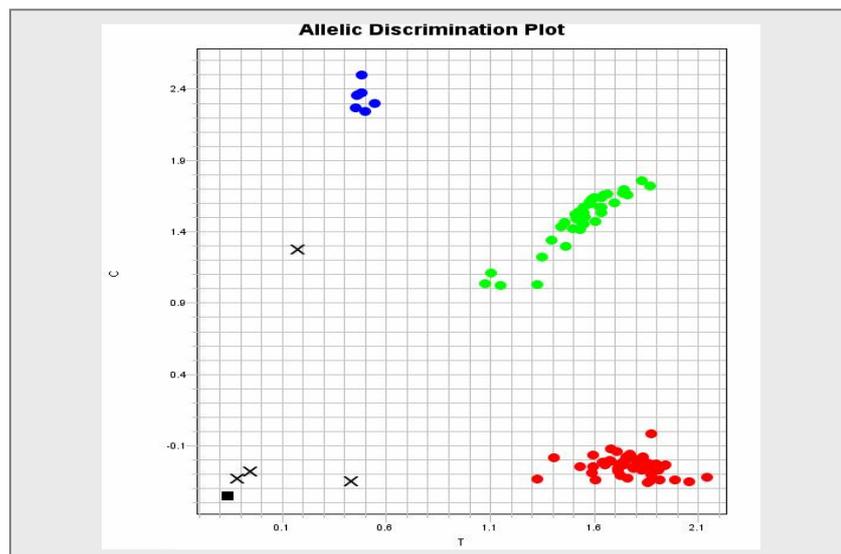
Para o SNP Fok, a presença do alelo T cria um sítio específico para a enzima de restrição *FokI*, gerando fragmentos de restrição que permitem a análise dos alelos (fragmentos de 197 e 76pb para o alelo T e fragmento de 273 pb para o alelo C). Em relação ao SNP Taq, a enzima *TaqI* digere em presença do alelo C gerando fragmentos de 263pb e 88pb, e um fragmento de 351pb em presença do alelo T. A figura 3.2 mostra o perfil das bandas produzidas após digestão para os dois sistemas. Os produtos de restrição foram submetidos à eletroforese em um gel de agarose 3,0%, que foi corado com SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Ao final as bandas foram visualizadas através da luz UV.



**Figura 3.2.** Genotipagem por RFLP dos SNPs no gene *VDR* analisados neste estudo. Produtos de digestão dos amplicons contendo os SNPs Fok (A) e Taq (B) no gene *VDR*. A) Digestão com enzima *FokI*, ilustrando os genótipos CC (1, 2, 4, 6 e 7), CT (8) e TT (3 e 5). B) Digestão com enzima *TaqI* ilustrando os genótipos TT (1, 2, 5 e 6), TC (3 e 7) e CC (4). M: marcador de peso molecular 123pb.

### 3.2 Genotipagem por PCR em tempo real

Os SNPs rs4760658 e Fok, foram genotipados através da técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real. Nesta técnica, são utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada alelo, e a inferência dos genótipos são baseadas na intensidade de fluorescência (figura 3.3). As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando o ensaio *TaqMan* (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante, e as amplificações foram realizadas utilizando o aparelho StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Os ensaios (combinação de iniciadores e sondas) foram desenhados utilizando o serviço Assay-by-Design<sup>SM</sup> oferecido pela Applied Biosystems (São Paulo/SP-Brasil). Os ensaios utilizados para as genotipagens por discriminação alélica estão listados na tabela 3.3.



**Figura 3.3.** Ilustração gráfica da genotipagem por PCR em tempo real. A separação dos grupos genotípicos é feita através da discriminação alélica pelos diferentes fluoróforos. Exemplo da genotipagem do rs4760658, mostrando os genótipos CC (azul), TC (verde), TT (vermelho), e as amostras indeterminadas.

### 4. Revisão sistemática

Foi realizada uma pesquisa por estudos que avaliassem a associação entre o polimorfismo Taq e a Hanseníase, visto que dentre os marcadores utilizados nesse trabalho esse é o único que possui estudos de associação à Hanseníase reportados na literatura. O resultado dessa busca servirá como base para possibilitar a realização do estudo de meta-

análise. A pesquisa de trabalhos já publicados na literatura foi realizada no MEDLINE utilizando citações do PubMed, para identificar estudos informativos (de Dezembro de 2002 a Junho 2010) nos quais o Taq teve associação com a hanseníase avaliada. Sem restrições de linguagens, foram utilizadas combinações com as seguintes palavras-chave para efetuar a busca: ‘VDR Taq’, ‘rs731236’, ‘Receptor of Vitamin D’, Polymorphism, ‘SNP’, ‘leprosy’. O resultado dessa busca servirá como base para a realização de um estudo de meta-análise, caso os estudos estejam de acordo com os critérios necessários para tal fim. Para ser incluído na meta-análise o estudo deve ter sido publicado antes de Junho de 2010, não estar relacionado a publicações anteriores e possuir dados genéticos suficientes para se calcular a OR (razão de chances - do inglês “Odds Ratio”). Como critérios de exclusão não devem ser utilizados estudos com dados sobrepostos, com desenho experimental distinto do caso-controle ou com estratificações que impossibilitem a análise, e ainda aqueles nos quais as frequências genotípicas da população controle desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## **5. Análise estatística**

### **5.1 Estudo caso-controle**

As frequências genotípicas dos polimorfismos no *VDR* em casos e controles foram testadas com o auxílio do teste de qui-quadrado, para avaliar os desvios do Equilíbrio de Hardy e Weinberg (EHW). As análises das frequências alélicas e genotípicas foram realizadas em casos e controles e comparadas entre esses grupos utilizando o modelo de regressão logística, com ou sem o ajuste para as covariáveis sexo e etnia. Esta metodologia foi utilizada tanto para as análises de cada polimorfismo em isolado quanto para os haplótipos. As análises foram realizadas em referência a contagem alélica, dos carreadores do alelo (incluindo heterozigotos e homozigotos) e contagem genotípica. As frequências haplotípicas foram estimadas através de máxima verossimilhança, e também foram comparadas entre casos controles. Além disso, foi realizada a análise de desequilíbrio de ligação entre os marcadores utilizando os parâmetros estatísticos  $D'$  e  $r^2$ . A estimativa do risco foi realizada utilizando a OR, com 95% de intervalo de confiança (CI) para cada estudo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software estatístico R para o Windows versão 2.10, utilizando os pacotes “genetics” e “haplo.stats”.

## 5.2 Estudo familiar

No estudo familiar foi realizado o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), o qual é baseado na transmissão de um alelo marcador dos pais heterozigotos para o filho afetado. No TDT são examinadas as probabilidades de transmissão de cada alelo dos genótipos, para determinar os desvios da porcentagem de transmissão esperada para o filho afetado (50%). Caso o alelo esteja transmitido em uma proporção significativamente maior do que o esperado para o filho afetado, considera-se que seja alelo de risco. Se ocorrer o inverso, alelo sendo transmitido em uma proporção significativamente menor, o alelo é considerado de proteção. Inicialmente foi obtido o número de alelos e de haplótipos transmitidos e não transmitidos aos filhos afetados utilizando o programa estatístico R para o Windows versão 2.10 com o pacote “tdthap”. Em seguida foram obtidas as frequências dos alelos e haplótipos nas famílias, e estimado o desvio das transmissões através do teste estatístico Z. As análises referentes ao estudo familiar foram feitas utilizando o programa estatístico Fbat.

## IV RESULTADOS

### 1. Análise do SNP Fok (rs2228570) em casos e controles e a hanseníase

Foram realizadas as genotipagens por PCR em tempo real para o polimorfismo Fok (rs2228570) em 670 pacientes e 596 controles, totalizando 1266 indivíduos. Todas as frequências obtidas a partir da genotipagem estão descritas na tabela 4.1. Em relação à frequência alélica do SNP Fok em pacientes, o alelo T apresentou-se em 29% dos indivíduos, enquanto que nos controles esse alelo exibiu frequência de 31%. Foram calculadas também as frequências dos carreadores do alelo T, que engloba os homozigotos e heterozigotos que contém o alelo, e as mesmas exibiram os valores 48% em pacientes e 52% em controles. O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi calculado na população controle resultando em valor  $\chi^2 = 0,32$  ( $p = 0,55$ ), o que significa adequação da população de acordo com as premissas do EHW (Tabela 4.1).

Através do modelo de regressão logística, foram feitas as comparações entre as frequências em casos e controles. A OR (Odds Ratio), com intervalo de confiança (IC) de 95%, foi utilizada como medida de risco, e o p-valor para medida dos níveis de significância estatística. Valores de OR acima de 1 indicam associação a risco com a doença, e abaixo de 1 indicam proteção, ao passo que quanto maior a proximidade da OR do valor 1 maior o indicativo de que não exista associação.

Os resultados das regressões para o Fok utilizando o genótipo CC como base nas comparações, mostraram que o genótipo heterozigoto CT está associado à proteção com a hanseníase, embora o p-valor seja marginal (OR= 0,78 e p-valor = 0,04), ao passo que o genótipo TT não apresenta associação (OR=0,97, p=0,90). No entanto, após a correção para as co-variáveis sexo e etnia o genótipo CT perde significância estatística, passando a ter valor de OR igual a 0,77 e p-valor igual a 0,05, considerado “borderline”. Já as comparações alélicas em casos e controles utilizando como base o alelo C mostraram que o alelo T, ajustado ou não para as co-variáveis, exibe um p-valor não significativo (tabela 4.1). Em relação aos carreadores do alelo T, as análises indicam uma tendência à proteção, mas sem significância estatística (OR=0,82, p=0,08), perfil que se mantém mesmo após o ajuste com co-variáveis.

**Tabela 4.1:** Distribuição de freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo Fok do gene *VDR* em pacientes e controles e o estudo de associação com a hanseníase.

	N (frequência%)		OR	OR**
	Casos	Controles		
<b>CC*</b>	344 (51)	277 (46)	referência	referência
<b>CT</b>	258 (39)	263 (45)	<b>0,78</b> (IC: 0,62 – 0,99; p= 0,04)	<b>0,77</b> (IC: 0,60 – 1,00; p= 0,05)
<b>TT</b>	68 (10)	56 (9)	0,97 (IC: 0,66 – 1,44; p= 0,90)	1,00 (IC: 0,66 – 1,51; p= 0,99)
<b>Fok (rs2228570)</b>	670	596		
<b>Alelo C*</b>	946 (71)	817 (69)	referência	referência
<b>Alelo T</b>	394 (29)	375 (31)	0,90 (IC: 0,71 – 1,15; p= 0,42)	0,91 (IC: 0,70 – 1,18; p= 0,48)
<b>Carreadores de T</b>	326 (48)	185 (53)	0,82 (IC: 0,65 – 1,02; p= 0,08)	0,81 (IC: 0,64- 1,04; p= 0,10)

Valores de OR calculados com intervalo de confiança (IC) de 95%. P-global = 0,14. \* Utilizados como base para as comparações no modelo de regressão logística \*\* Valores ajustados para as co-variáveis sexo e etnia.

Vale ressaltar aqui algumas observações sobre o polimorfismo Fok. De acordo com o banco de polimorfismos do NCBI-Pubmed (dbSNP), esse polimorfismo possuía a codificação rs10735810. No entanto, um “merge” em bancos do dbSNP indicou que o polimorfismo Fok corresponde ao rs2228570, sugerindo ainda que nesse polimorfismo poderia ocorrer uma troca não apenas C/T, mas também C/T/A/G. Para verificar a possibilidade de ocorrência dessas trocas na nossa população, 45 amostras foram submetidas a sequenciamento (Anexo I). O resultado demonstrou a existência apenas de trocas C/T, inclusive com todos os genótipos concordantes com a genotipagem por PCR em tempo real.

## 2. Análise do SNP rs4760658 em casos e controles e a hanseníase

Foram genotipados 622 pacientes e 598 controles (1220 indivíduos) por PCR em tempo real para avaliar a presença do SNP rs4760658. Os resultados das frequências genotípicas e alélicas são mostrados na Tabela 4.2. O teste  $\chi^2$  para o EHW mostrou que a população controle encontra-se em acordo com as premissas ( $\chi^2 = 0,05$ ,  $p = 0,82$ ).

**Tabela 4.2:** Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs4760658 do gene *VDR* em pacientes e controles e estudo de associação com a hanseníase.

	N (frequência%)		OR	OR**
	Casos	Controles		
<b>TT*</b>	319 (51)	287 (48)	referência	referência
<b>TC</b>	241 (39)	257 (43)	0,84 (IC: 0,66 – 1,06; p= 0,16)	0,84 (IC: 0,65 - 0,84; p=1,09)
<b>CC</b>	62 (10)	55 (9)	1,03 (IC: 0,69 – 1,53; p= 0,87)	0,96 (IC: 0,61 – 1,49; p= 0,85)
<b>rs4760658</b>	<b>Total</b>	622	598	
<b>Alelo T*</b>	879 (71)	831 (69)	referência	referência
<b>Alelo C</b>	365 (29)	365 (31)	0,94 (IC: 0,70 – 1,20; p= 0,25)	0,92 (IC: 0,70 – 1,21; p= 0,57)
<b>Carreadores de C</b>	326 (48)	185 (52)	0,87 (IC: 0,70 – 1,09; p= 0,25)	0,86 (IC: 0,67 – 1,11; p= 0,25)

Valores de OR calculados com intervalo de confiança (IC) de 95%. P-global = 0,46. \* Utilizados como base para as comparações no modelo de regressão logística. \*\* Valores ajustados para as co-variáveis sexo e etnia.

O alelo C desse polimorfismo mostrou frequência de 29% em pacientes e 31% em controles, e as análises comparativas realizadas através de regressão logística não detectaram associação com a hanseníase, com valores de OR próximo do valor 1. Em relação aos genótipos, observa-se o mesmo comportamento, com valores de OR iguais a 0,84 para o genótipo TC ( $p=0,16$ ) e 1,03 para o genótipo CC ( $p=0,87$ ). Os valores após o ajuste para as co-

variáveis não mudaram de maneira relevante (tabela 4.2), indicando ausência de associação dos genótipos do rs4760658 com a doença.

### 3. Análise do SNP Taq em casos e controles e a hanseníase

O polimorfismo Taq, genotipado através de RFLP, foi avaliado em 309 pacientes e 588 controles, em um total de 897 indivíduos (tabela 4.3). A população controle do SNP Taq mostrou estar em equilíbrio de HW, com valor de  $\chi^2 = 1,17$  ( $p = 0,29$ ). Utilizando como base o genótipo TT para comparar casos e controles, o modelo de regressão logística indicou valores de OR próximos a 1 tanto para o genótipo TC (0,91,  $p = 0,56$ ) como para o CC (0,82,  $p = 0,40$ ), mesmo com ajuste para as co-variáveis (tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Distribuição de frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo Taq do gene *VDR* em pacientes e controles e estudo de associação com a hanseníase.

	N(frequência%)		OR	OR**
	Casos	Controles		
<b>TT *</b>	144 (47)	258 (44)	referência	referência
<b>TC</b>	130 (42)	254 (43)	0,91 (IC: 0,68 – 1,23; $p = 0,56$ )	0,93 (IC: 0,68 - 1,26; $p = 0,66$ )
<b>CC</b>	35 (11)	76 (13)	0,82 (IC: 0,52 - 1,29; $p = 0,40$ )	0,79 (IC: 0,49 - 1,28; $p = 0,35$ )
<b>Taq (rs731236)</b>				
<b>Total</b>	309	588		
<b>Alelo T*</b>	418 (68)	770 (65)	referência	referência
<b>Alelo C</b>	200 (32)	406 (35)	0,90 (IC: 0,67 - 1,21; $p = 0,51$ )	0,90 (IC: 0,66 - 1,22; $p = 0,51$ )
<b>Carreadores de C</b>	333 (56)	165 (56)	0,89 (IC: 0,67 - 1,18; $p = 0,43$ )	0,90 (IC: 0,67 - 1,20; $p = 0,48$ )

Valores de OR calculados com intervalo de confiança (IC) de 95%. P-global = 0,71. \* Utilizados como base para as comparações no modelo de regressão logística. \*\* Valores ajustados para as co-variáveis sexo e etnia.

O alelo C do SNP Taq mostrou frequência de 32% em pacientes e de 35% em controles, e os dados referentes às comparações alélicas nesses dois grupos tendo o alelo T como referência mostram valores de OR para o alelo C igual a 0,90 ( $p=0,51$ ), resultados que se mantiveram mesmo após o ajuste para as co-variáveis. Resultado semelhante foi encontrado para as comparações utilizando os carreadores do alelo C no Taq, mostrando  $OR=0,89$ , e  $OR=0,90$  após o ajuste para as co-variáveis ambos sem significância estatística ( $p=0,43$  e  $0,48$  respectivamente).

#### **4. Análise dos haplótipos no gene VDR em casos e controles e a hanseníase**

Foi verificada a possibilidade de que os marcadores estivessem em desequilíbrio de ligação dois a dois (pairwise LD), através do cálculo dos parâmetros  $D'$  e  $r^2$ . Os resultados eliminaram essa possibilidade, pois os valores se afastaram substancialmente do valor 1 (Fok/rs4760658:  $D'=0,01$ ; Fok/Taq:  $D'=0,02$ ; Taq/rs4760658:  $D'=0,06$ ).

Seguido das análises realizadas em cada polimorfismo individualmente, foi realizada a análise dos haplótipos formados pelas combinações alélicas dos polimorfismos Fok, rs4760658 e Taq, para averiguar o efeito da combinação entre os três marcadores na associação com a hanseníase. As frequências das combinações haplotípicas foram obtidas em casos e em controles através do modelo de máxima verossimilhança, e comparadas nesses dois grupos através do modelo de regressão logística. As comparações foram feitas com ou sem correção para as co-variáveis sexo e etnia.

A distribuição de frequências dos haplótipos entre casos e controles, bem como os resultados das comparações por regressão logística referem-se à combinação Fok/rs4760658/Taq, e estão mostrados na tabela 4.4. Os resultados das comparações, utilizando como base o haplótipo C/T/T, mostraram uma diferença não significativa para todas as combinações haplotípicas. Após a correção com as co-variáveis, alguns valores de OR foram alterados (tabela 4.4), com destaque para os haplótipos T/T/T ( $OR=0,62$ ,  $p=0,04$ ) e C/C/C ( $OR=0,46$ ,  $p=0,02$ ), que passaram a indicar significância estatística, e associação a proteção.

Também foram avaliadas em casos e controles as frequências da combinação haplotípica formada pelos SNPs Fok e Taq, a critério de comparação com o estudo familiar (o qual só incluiu esses dois polimorfismos). A análise mostrou que, considerando apenas esses dois polimorfismos, nenhuma combinação haplotípica apresentou associação com a hanseníase (tabela 4.5). O mesmo foi observado com o ajuste para as co-variáveis.

**Tabela 4.4:** Distribuição de frequências dos haplótipos dos polimorfismos no gene *VDR* em casos e controles e a associação com a hanseníase.

Haplótipo Fok/rs4760658/Taq	Frequências(%)			
	Casos	Controles	OR (p)	OR (p)**
T/C/C	3,8	3,3	0,94 (IC : 0,44 – 2,02; p= 0,88)	1,00 (IC : 0,47 -2,14; p= 0,98)
T/C/T	6,0	6,4	0,75 (IC: 0,44 – 1,33; p= 0,35)	0,80 (IC : 0,45 – 1,42; p= 0,45)
T/T/C	6,6	7,9	0,52 (IC: 0,35 – 1,04; p= 0,07)	0,62 (IC : 0,36 -1,07; p= 0,08)
T/T/T	12,8	13,7	0,57 (IC: 0,43 – 1,04; p= 0,07)	<b>0,62</b> <b>(IC : 0,39 - 0,99;</b> <b>p= 0,04)</b>
C/C/C	5,1	6,4	0,54 (IC: 0,29 – 1,01; p= 0,05)	<b>0,46</b> <b>(IC : 0,23 - 0,91;</b> <b>p= 0,02)</b>
C/C/T	14,3	14,2	0,75 (IC: 0,50 – 1,14; p= 0,18)	0,77 (IC : 0,51 -1,17; p= 0,23)
C/T/C	16,7	16,7	0,85 (IC: 0,58 – 1,25; p= 0,18)	0,88 (IC : 0,60 -1,30; p= 0,54)
C/T/T*	34,4	31,0	referência	referência

Valores de OR calculados com intervalo de confiança (IC) de 95%. \*Haplótipo utilizado como base para as comparações no modelo de regressão logística. \*\* Valores ajustados para as co-variáveis sexo e etnia.

**Tabela 4.5:** Distribuição de frequências dos haplótipos dos polimorfismos Fok e Taq no gene *VDR* em casos e controles e a associação com a hanseníase.

Haplótipo Fok/Taq	Frequências(%)		OR (p)	OR (p)**
	Casos	Controles		
T/C	10,5	11,2	0,79 (IC : 0,55– 1,14; p= 0,22)	0,79 (IC : 0,54 - 1,15; p= 0,22)
T/T	18,8	20,1	0,80 (IC: 0,59 – 1,08; p= 0,15)	0,77 (IC : 0,56 – 1,06; p= 0,11)
C/C	21,8	23,2	0,88 (IC: 0,66 – 1,16; p= 0,38)	0,86 (IC : 0,64 -1,16; p= 0,33)
C/T*	48,7	45,3	referência	referência

Valores de OR calculados com intervalo de confiança (IC) de 95%. \* Haplótipo utilizado como base para as comparações no modelo de regressão logística. \*\* Valores ajustados para as co-variáveis sexo e etnia.

## 5. Análise dos polimorfismos Fok e Taq e dos haplótipos no gene *VDR* em famílias

Um outro estudo para avaliar associação de polimorfismos no gene *VDR* foi conduzido, utilizando o desenho de estudo baseado em famílias e o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT). Nesse desenho, foram avaliados os SNPs Fok e Taq no gene *VDR*, e em seguida, realizou-se a contagem tanto dos alelos transmitidos quanto dos não transmitidos aos filhos afetados (tabela 4.6). Além disso, foram estimadas as frequências totais de transmissão dos alelos nas famílias. Para o SNP Fok, os resultados mostraram que houve a transmissão do alelo T para 18 filhos afetados em um total de 32 doentes de famílias informativas. Ainda em relação ao Fok, foram obtidas as frequências alélicas nas famílias, que mostrou ser 0,65 para o alelo C e 0,35 para o alelo T, mas com um p-valor igual a 0,09. No caso do polimorfismo Taq, houve a transmissão do alelo T em 33 dos 55 filhos afetados, e as frequências observadas nas famílias foram 0,73 para o alelo T e 0,27 para o alelo C, no entanto com um p-valor não significativo igual a 0,33 (tabela 4.6).

No TDT realizado em famílias também foi conduzida a avaliação das frequências haplotípicas formadas pela combinação entre os SNPs Fok e Taq (nessa ordem) no *VDR*. Nesse caso o teste estatístico (Teste Z) avalia o desvio da transmissão de cada haplótipo para

os filhos afetados. Os resultados estão mostrados na tabela 4.7, destacando-se a combinação haplotípica T/T, que embora tenha sido transmitida a 11 indivíduos e não transmitida a 18, apresentou um valor de p no limite da significância ( $p= 0,06$ ). Os resultados indicam que nenhuma das combinações haplotípicas foram transmitidas diferentemente do esperado, visto que os valores de p não foram significativos (tabela 4.7).

**Tabela 4.6:** Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) dos polimorfismos Fok e Taq no desenho familiar e a associação com a hanseníase.

SNPs	Transmissões					Teste Z	p-valor
	Alelos	Transmitidos	Não transmitidos	Frequência alélica (%)*			
<b>Fok</b>	C	14	18	65	-1,64	0,01	
	T	18	14	35	1,64	0,01	
<b>Taq</b>	T	33	25	73	0,96	0,33	
	C	25	35	27	-0,96	0,33	

\* Análises realizadas em 90 núcleos familiares, totalizando 365 indivíduos.

**Tabela 4.7.** Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) dos haplótipos formados pelos polimorfismos Fok e Taq no desenho familiar e a associação com a hanseníase.

Haplótipos Fok/Taq	Transmissões				Teste Z	p-valor
	Transmitidos	Não transmitidos	Frequência (%) *			
<b>C/T</b>	23	20	48	-1,28	0,20	
<b>T/T</b>	11	18	24	1,89	<b>0,06</b>	
<b>C/C</b>	16	11	19	-0,93	0,35	
<b>T/C</b>	1	2	9	1,19	0,23	

\* Análises realizadas em 90 núcleos familiares, totalizando 365 indivíduos.

## 6. Revisão sistemática

Na busca por trabalhos anteriores que associaram o polimorfismo Taq no gene *VDR* com a hanseníase, foram encontrados quatro estudos. Partindo das informações fornecidas nos artigos, que contiveram no mínimo a contagem genotípica do SNP Taq, foram reunidas as informações mais relevantes sobre cada estudo de associação, incluindo as frequências genotípicas e alélicas em casos e controles, o valor do  $\chi^2$  para o teste do EHW e o valor do  $\chi^2$  global (comparando as frequências entre pacientes e controles). Os trabalhos com os seus respectivos resultados estão exibidos na tabela 4.8.

O primeiro estudo foi conduzido por Roy e col em 1999, em um total de 397 indivíduos indianos. Em 2004, um estudo em maior escala utilizando uma população de 633 indivíduos de Malauí (África) também reportou associação do SNP Taq com a hanseníase. Dois anos depois, um terceiro grupo avaliou a associação do Taq com a hanseníase em brasileiros do estado de Minas Gerais, em uma população de 170 pessoas (Goulart e col., 2006). O estudo mais recente foi conduzido em mexicanos por Félix e col. em 2009, utilizando uma população de 215 indivíduos. No entanto, tanto os estudos conduzidos por Roy e col., quanto os feitos por Fitness e col. (Malauí) desviaram do EHW no grupo controle, com valores de  $\chi^2$  iguais a 4,69 e 6,26 respectivamente (tabela 4.8). Consequentemente, pelos critérios de exclusão esses dois estudos foram eliminados da análise. Os outros dois estudos mostraram estar de acordo com o EHW, exibindo valores de  $\chi^2$  iguais a 0,06 tanto para o trabalho de Goulart e col. quanto para o trabalho de Félix e col.

Em relação ao trabalho desenvolvido por Goulart e col. em 2004, o mesmo utilizou um desenho cujo grupo controle foi formado apenas por contatos domiciliares (tabela 4.8). Assim, devido a essa diferença no desenho experimental, esse trabalho também foi excluído. Além disso, o estudo realizado em Mexicanos também apresentou um estudo caso-controle distinto, o qual recrutou apenas pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase. Dessa forma o estudo em Mexicanos também foi excluído por não ser possível o agrupamento de acordo com as premissas de análise. Considerando que os trabalhos anteriores possuíam requisitos para eliminação do estudo segundo os critérios de exclusão, seja por desviar do EHW ou por restrições devido a distinções no desenho experimental, a realização da meta-análise foi impossibilitada.

**Tabela 4.8.** Revisão sistemática dos estudos de associação entre o polimorfismo Taq no VDR e a hanseníase\*.

População		Roy (1999)	Fitness (2004)	Goulart (2006)	Félix (2009)
		Índia	Malawi	MG/Brasil	Sinaloa/México
Pacientes	TT	105 (46)	131 (53)	42 (41)	44 (62)
	TC	90 (38)	101 (41)	49 (49)	19 (27)
	CC	36 (16)	15 (06)	11 (10)	8 (11)
	<b>Total</b>	231	247	102	71
	<b>T</b>	300 (65)	363 (73)	133 (67)	107 (75)
	<b>C</b>	162 (35)	131 (27)	71 (33)	35 (25)
	<b>Carreadores de T</b>	195	232	91	63
	<b>Não carreadores de T</b>	36	15	11	8
	<b>Equilíbrio de Hardy-Weinberg ?</b>	Não X <sup>2</sup> = 4,82 p = 0,03	Sim X <sup>2</sup> = 0,60 p = 0,43	Sim X <sup>2</sup> = 0,35 p = 0,55	Não X <sup>2</sup> = 5,55 p = 0,02
	Controles	TT	66 (39)	228 (57)	30 (44)
TC		87 (52)	158 (40)	31 (46)	61 (42)
CC		13 (7)	12 (3)	7 (10)	15 (10)
<b>Total</b>		166	398	68	144
<b>T</b>		219 (65)	614 (77)	91 (75)	177 (61)
<b>C</b>		113 (34)	182 (22)	183 (25)	91 (31)
<b>Carreadores de T</b>		153	386	61	130
<b>Não carreadores de T</b>		13	12	7	14
<b>Equilíbrio de Hardy-Weinberg ?</b>		Não X <sup>2</sup> = 4,64 p = 0,03	Não X <sup>2</sup> = 6,26 p = 0,01	Sim X <sup>2</sup> = 0,06 p = 0,80	Sim X <sup>2</sup> = 0,06 p = 0,08
		<b>χ<sup>2</sup> test (P-valor)</b>	9,3 p = 0,009	3,9 p = 0,13	0,14 p = 0,93
<b>Casos vs. Controles</b>	<b>Observações do desenho</b>	Caso-controle	Caso-controle	Caso-controle: grupo controle formado por contatos domiciliares	Caso-controle: contendo apenas pacientes com a forma LL da hanseníase

\* Valores apresentados como N (frequência%).LL=hanseníase lepromatosa.

## V. DISCUSSÃO

### 1. Considerações gerais

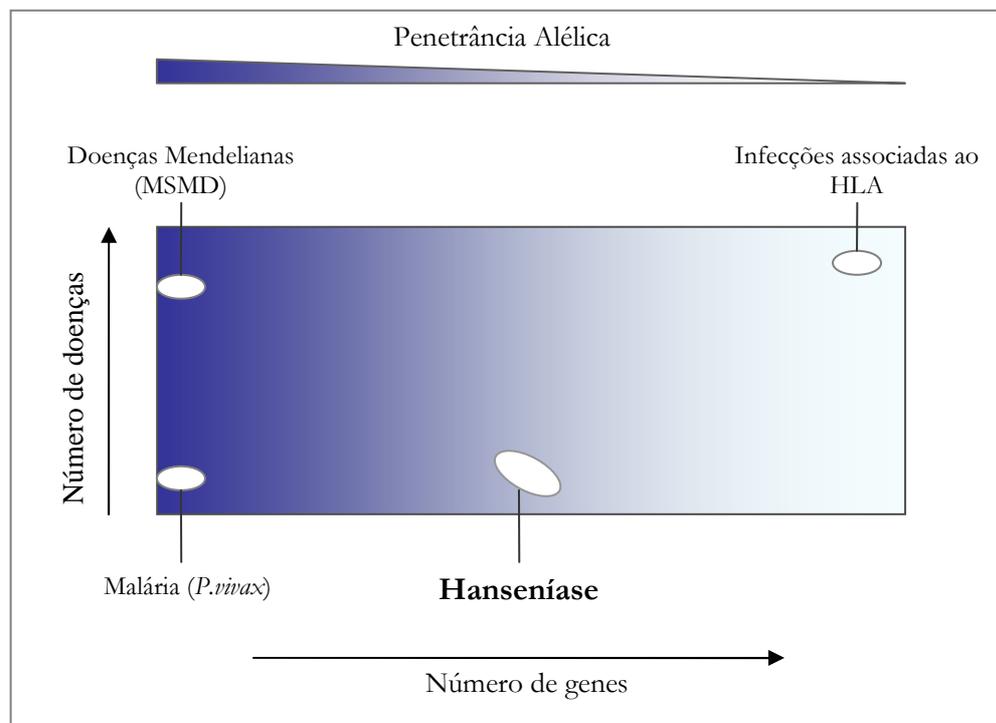
Esse estudo teve como proposta investigar a associação genética entre o gene *VDR* e a hanseníase. Um dos critérios para validação de um gene candidato é que haja consistência entre a replicação observada em diferentes populações, preferencialmente com desenhos experimentais distintos, como estudos de casos-controles e baseados em famílias. Dessa forma, o gene *VDR* foi escolhido para ser avaliado na tentativa de replicar resultados de estudos anteriores do nosso ou de outros grupos, e de alguma forma esclarecer alguns resultados contraditórios encontrados na literatura. Para tal fim foram utilizados dois desenhos de estudo distintos, de maneira a tentar replicar também os nossos próprios dados.

Vale reforçar aqui, alguns aspectos da influência genética do hospedeiro no desenvolvimento de doenças infecciosas. Essa influência foi inicialmente relatada em estudos com imunodeficiência primárias (IDP), definidas como uma alteração monogênica ou Mendeliana, que são raras e capazes de afetar fortemente o desfecho de doenças causadas por micobactérias avirulentas. A síndrome da susceptibilidade Mendeliana a doenças micobacterianas (MSMD) ilustra uma IDP, causada por uma ou mais mutações presentes em genes do eixo IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  (van de Vosse e col., 2004). Por outro lado, algumas doenças como a Malária grave causada pelo *Plasmodium vivax*, são influenciadas por apenas um gene, o qual é específico apenas para uma doença. Um polimorfismo na região promotora do gene que codifica o receptor DARC (do inglês “*Duffy Antigen and Receptor for Chemokine*”) resulta em resistência específica dos indivíduos ao *P. vivax*, o qual usa obrigatoriamente esse receptor nas hemácias (Casanova e col., 2002).

Além das doenças causadas por herança Mendeliana, existem as causadas por uma herança multigênica, onde muitos genes com efeitos sutis podem influenciar no desfecho da doença, como é o caso dos genes do HLA. Nesse contexto, existem ainda os efeitos de genes principais de susceptibilidade (ou genes “*major*”), que podem ter um papel chave no desfecho de uma ou mais doenças. É importante ressaltar que, alguns desses conjuntos multigênicos

podem compor uma via específica para um determinado tipo de patologia (Alcais e col., 2009).

A figura 5.1 ilustra essa discussão, onde o controle genético em doenças infecciosas poderia ser entendido como um espectro. Nesse âmbito, por um lado teríamos genes que unicamente ou em pequeno grupo causariam doenças Mendelianas, e em outro pólo, teríamos genes que em maior número influenciam várias patologias. Dentro desse espectro, a hanseníase pode ser considerada uma doença capaz de sofrer influência tanto de genes principais de susceptibilidade, como é o caso provável dos genes *PARK2* ou *LTA*, quanto de genes que possuem um impacto modesto individual, mas um efeito considerável ao nível populacional. Assim, a hanseníase pode ser considerada como oligogênica, localizada em uma posição intermediária do espectro de influência genética em doenças infecciosas (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Representação esquemática do modelo contínuo de influência a doenças infecciosas humanas. Esse modelo sugere uma influência espectral de genes de susceptibilidade. MSMD: síndrome da susceptibilidade Mendeliana a doenças micobacterianas, HLA: antígeno leucocitário humano. Adaptado de Alcais e col., 2009.

Como o desfecho da hanseníase envolve a participação de várias vias imunológicas, acredita-se que a genética do hospedeiro exerça influência na manutenção do equilíbrio das respostas imunológicas que culminam na eliminação do patógeno (Moraes e col., 2006). Dado o número de potenciais marcadores genéticos que poderiam estar relacionados a uma doença

complexa como a hanseníase, a validação de hipóteses estatísticas em estudos de associação genética tem sido uma tentativa crescente, e a construção de um painel de marcadores uma tarefa almejada, mas laboriosa (Ioannidis e col., 2001).

Inicialmente associada à homeostase óssea, a vitamina D passou a ser encarada também como participante em diversas vias fisiológicas, incluindo a resposta imunológica. O papel do gene *VDR* em doenças infecciosas ganhou destaque desde a identificação da sua presença na via antimicrobiana mediada pelos receptores Toll do tipo 1 e 2 (Liu e col., 2006). Estudos funcionais conduzidos pelo grupo do Dr Robert Modlin (Liu et al 2006), utilizando modelos de estimulação em monócitos por um lipopeptídeo derivado de *M. tuberculosis*, sugerem que a produção de peptídeos antimicrobianos seja induzida pela adição da vitamina D no meio de cultura, acompanhada do aumento da expressão do VDR (Liu e col, 2007). Esses achados são de grande relevância no contexto de doenças infecciosas intracelulares como é o caso da hanseníase, visto que as vias da resposta imune inata constituem uma etapa inicial essencial no controle ao estabelecimento da infecção.

Entretanto, a ação fisiológica pleiotrópica da vitamina D deve ser considerada, e o papel dessa vitamina e de seu receptor na infecção interpretado com muita cautela. Alguns estudos sugerem que a vitamina D possui também uma ação reguladora da imunidade em células como linfócitos T e B, estando sua deficiência relacionada à ocorrência de doenças auto-imunes (Kamen e col., 2010). A implicação desse pleiotropismo é que a Vitamina D pode ser interpretada como moduladora da resposta imune. Dessa forma, mais estudos devem ser conduzidos abordando a questão do envolvimento do VDR no balanço entre a imunidade inata e adaptativa, avaliando assim quais são os reais efeitos da vitamina D na hanseníase.

Um fato importante a se considerar na relação entre vitamina D e doenças é que os níveis circulantes dessa vitamina podem variar entre os indivíduos, o que depende de fatores como dieta e exposição solar. Foi demonstrado que esses níveis são influenciados também pela cor da pele, pois a melanina compete com o 7-deidrocolesterol pela luz UV incidente (Glass e col., 2009). Apesar disso, um estudo realizado no Reino Unido mostrou baixos níveis de vitamina D também em mulheres de pele clara, sugerindo nesse caso uma influência da baixa exposição ao sol nesses níveis de vitamina D circulantes nesse grupo de mulheres (Glass e col., 2009). Geralmente avalia-se os níveis da vitamina D na forma 25D<sub>3</sub>, a qual tem um tempo de vida útil em torno de 15 dias, com concentrações que variam entre 10ng/mL a

80ng/mL no soro, considerando-se 30ng/mL o nível ideal para a saúde (Lehmann & Meurer, 2010).

Um estudo conduzido em 194 africanos mostrou que em 61% deles os níveis de 25D<sub>3</sub> foram considerados insuficientes ( $\leq 15\text{ng/mL}$ ) (Tseng e col., 2009). Para avaliar estudos contemplando a associação dos níveis de vitamina D com a tuberculose realizou-se um estudo de meta-análise incluindo 7 estudos publicados, que resultou em uma associação dos altos níveis de vitamina D (25D<sub>3</sub>) com proteção a tuberculose (OR=0,68, IC95%=0,43-0,93), indicando assim um risco a tuberculose em indivíduos com baixos níveis dessa vitamina (Nnoaham e col., 2008). Assim, se faz interessante atrelar a dosagem de vitamina D aos estudos que avaliam a relação desta ou do VDR com doenças, para verificar o nível de variabilidade nas concentrações da VD<sub>3</sub> no soro da população em estudo.

Muitos estudiosos levantam a possibilidade de se utilizar a terapia baseada em complementação com a Vitamina D em grupos considerados de risco a desenvolver determinado tipos de doenças. Um estudo piloto realizado nos Estados Unidos demonstrou que a suplementação com vitamina D diariamente durante seis meses refletiu em um aumento dos seus metabólitos no soro em um grupo de risco a câncer colo-retal (McCullough e col., 2010). Experimentos mostraram que em pessoas expostas a irradiação com lâmpada bronzeadora três vezes por semana durante sete semanas houve um aumento de 50% nos níveis de 25D<sub>3</sub> (Lehmann & Meurer, 2010). Mostrou-se recentemente que o uso de análogos sintéticos da vitamina D pode ser útil como terapia em indivíduos com psoríase, contribuindo para a eficácia de corticosteróides e para minimizar os seus efeitos adversos (O'Neill e col., 2010).

Contrariamente à idéia que defende o uso terapia através da reposição da vitamina D, uma interpretação alternativa tem sido feita para os baixos níveis dessa vitamina envolvendo pacientes com doenças autoimunes. Alguns autores consideram que os baixos níveis de vitamina D presente nesses pacientes seria resultado da doença em si, e a implementação da vitamina D para promover uma redução da inflamação, poderia reduzir também a resposta imune a patógenos (Hewison e col., 2010).

Em relação a participação do VDR especificamente na hanseníase, estudos de expressão gênica mostraram que os genes envolvidos da via antimicrobiana mediada pela vitamina D tais como o gene *CYP27b1* (enzima que converte a vitamina D em sua forma ativa) e o *VDR* são

mais expressos em células provenientes de lesões de pacientes com a hanseníase TT comparado aos LL (Montoya e col., 2009). Em concordância com isso, esse mesmo perfil microbicida foi observado em pacientes com reação reversa, onde há uma reativação da resposta imuno-inflamatória em pacientes previamente não responsivos ao *M. leprae*. Esses dados sugerem que a via mediada pela vitamina D e possivelmente o VDR possuem atuação na imunopatogênese da hanseníase.

## 2. Associação de SNPs no gene *VDR* e a hanseníase: estudo caso-controle

No presente trabalho foi avaliada a possibilidade de associação entre polimorfismos no gene *VDR* e a hanseníase *per se*. Foram genotipados três polimorfismos, todos eles organizados em *tags*, ou seja, segregando em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos ao longo do gene. Considerando o conjunto de todos os polimorfismos que foram encontrados no HapMap como em desequilíbrio de ligação com os avaliados no presente estudo, totalizam-se 36 marcadores distribuídos ao longo de todo o gene *VDR*.

O gene *VDR* possui vários polimorfismos em regiões codificantes e não codificantes, porém, o polimorfismo que resulta em maior alteração na estrutura primária da proteína é o Fok (Jurutka e col., 2000). Esse polimorfismo é conhecido também por VDR-SCP devido a sua localização no *start códon* (do inglês “Start Codon Polymorphism”), e é caracterizado por uma troca T/C no primeiro ATG do gene. A presença do alelo C resulta num deslocamento do início da tradução para o próximo *start códon* (três aminoácidos à frente) e conseqüentemente na produção de uma proteína menor (Miyamoto, e col., 1997). A presença deste polimorfismo foi associada ao aumento da densidade mineral óssea e com o aumento da ativação da enzima hidroxilase CYP27b1 (Arai e col., 1997).

Em relação ao estudo do polimorfismo Fok nesse trabalho, o genótipo heterozigoto CT mostrou maior frequência em controles do que nos pacientes com hanseníase *per se*, refletindo em uma associação com a doença de modo a indicar proteção (OR= 0,78 e p=0,04). No entanto, após a correção para as co-variáveis, o valor de OR passou a ser 0,77 com p igual a 0,05 (tabela 4.1). Isso indicaria uma estimativa de proteção de 22% para os indivíduos que contém esse genótipo, o que poderia ser interpretado como uma associação modesta não estivesse o p-valor no limite da significância. As demais frequências genotípicas, alélicas bem

como dos carreadores do alelo T não exibiram diferença significativa entre pacientes e controles, indicando não associação com a hanseníase.

Um estudo de meta-análise conduzido recentemente mostrou associação do alelo T do polimorfismo Fok com risco (OR= 2,0) para a tuberculose (Gao e col., 2010), na população asiática. No entanto, nessa meta-análise nenhuma associação foi encontrada entre o Fok e a tuberculose, considerando estudos realizados em populações da África e da América do Sul (Gao e col., 2010). Apesar de ser considerado um dos principais polimorfismos no *VDR*, até então nenhum trabalho avaliou a associação do Fok com a hanseníase, e ainda se desconhece as possíveis conseqüências da sua presença na função do *VDR* durante a hanseníase (Moraes e col., 2006). A maioria dos experimentos funcionais conduzidos com esse polimorfismo no *VDR* sugere que a proteína menor (424 aminoácidos), gerada pela presença do alelo C, é mais ativa do que a forma maior (427 aminoácidos) em termos da atividade como fator transcricional (Valdivielso & Fernandez, 2006). No entanto, esse efeito funcional parece ser específico tanto para o gene a ser regulado quanto para o tipo celular, de forma que a sensibilidade ao efeito do polimorfismo pode variar (Valdivielso & Fernandez, 2006).

No que diz respeito ao polimorfismo rs4760658, não foram encontradas diferenças significativas entre as distribuições de freqüências em pacientes e controles (tabela 4.2). A análise desse polimorfismo foi inicialmente proposta com o objetivo de estender o número de marcadores avaliados no gene *VDR*, através de uma busca por polimorfismos organizados em desequilíbrio de ligação feita no banco *Hapmap*. O rs4760658 ainda não teve associação descrita com doenças na literatura.

O SNP Taq, localiza-se no éxon 9 do gene *VDR*, na posição +352, mas não resulta em alteração na seqüência de aminoácidos da proteína. Apesar disso, foi observada a produção de um RNAm mais estável na presença do alelo C do Taq quando comparada à presença do alelo T (revisado por Goulart e col., 2006). O estudo desse polimorfismo no nosso trabalho não mostrou distribuição de freqüências significativamente diferente entre casos e controles (tabela 4.3). O polimorfismo Taq foi avaliado em um estudo anterior na população chinesa quanto à associação com a tuberculose, onde também não foi encontrada associação (Chen e col., 2006).

Em relação à hanseníase, nossos resultados contradizem alguns trabalhos anteriores, os quais reportaram associação do Taq com a doença em populações distintas. Esses trabalhos

foram recrutados em uma revisão sistemática, a qual revelou inconsistências que colocam essas associações em discussão (ver abaixo no tópico 4).

Após avaliar cada SNP individualmente nos estudos caso-controle, buscou-se entender o comportamento dos polimorfismos em conjunto, através da análise do haplótipo no gene *VDR*. O haplótipo compreende a combinação de dois ou mais polimorfismos no mesmo cromossomo em um indivíduo (Pacheco & Moraes, 2009). O estudo da distribuição das frequências haplotípicas em casos e controles mostrou que, sem os ajustes para as co-variáveis, todas as combinações haplotípicas exibiram valores de *p* não significativos, embora a combinação C/C/C (Fok/ rs4760658/Taq) tenha mostrado um valor de *p* borderline igual a 0,05 (tabela 4.4). Interessantemente, após a correção com as co-variáveis sexo e etnia, dois haplótipos sofreram alteração das estimativas: o haplótipo T/T/T passou a ter OR igual a 0,62 (*p*= 0,04) e o C/C/C de OR=0,46 (*p*= 0,02). Assim, os resultados indicam que essas duas combinações haplotípicas estão associadas com proteção à hanseníase *per se*.

A fim de permitir a comparação entre a análise haplotípica do desenho caso-controle e a realizada em famílias, também foram avaliadas as frequências haplotípicas da combinação apenas entre os SNPs Fok e Taq no *VDR*. A análise mostrou que em nenhuma das combinações formadas pelos haplótipos Fok/Taq, houve associação com a hanseníase (tabela 4.5). Comparando esses achados com a análise haplotípica combinada três a três, a proteção exibida pelo haplótipo C/C/C não foi percebida na combinação dois a dois formada pelo C/C do Fok/Taq, que mostrou um valor de OR abaixo de 1 mas com valor de *p* não significativo (OR=0,86, *p*=0,33). Isso pode demonstrar a influência do polimorfismo rs4760658 na associação encontrada nos haplótipos formados pelos três marcadores.

Análises haplotípicas muitas vezes podem resultar em uma modificação dos efeitos observados em cada polimorfismo analisados separadamente, de forma que pode haver desde a anulação de algum efeito, até uma sinergia potencializando os efeitos. Assim pode ter ocorrido um acúmulo dos efeitos individuais, em que associações muito sutis em cada marcador tornaram-se significativas no haplótipo quando formado pelos três SNPs. Foi observado também que os polimorfismos não estão em desequilíbrio de ligação, segundo os resultados obtidos através dos parâmetros  $r^2$  e  $D'$  e por isso, se faz interessante o efeito “aditivo” observado no haplótipo com três SNPs que se perde quando apenas 2 SNPs são analisados. Mesmo assim, o efeito do *VDR* com esse número de SNPs parece modesto, e talvez a

utilização de maior número de SNPs em estudos futuros, e especialmente a genotipagem desses e do rs4760658 em populações de replicação (como no painel de famílias, ver abaixo) se faz crucial para termos uma certificação definitiva da participação deste locus na suscetibilidade/ resistência à hanseníase.

### **3. Associação de SNPs no gene *VDR* e a hanseníase: estudo baseado em famílias**

A associação entre marcadores no gene *VDR* e a hanseníase também foi avaliada em um desenho experimental baseado em famílias, no sentido de tentar replicar os resultados encontrados no estudo caso-controle. Esse tipo de replicação representa o aumento da estrigência da análise, visto que o estudo em famílias não é afetado por estratificação populacional.

Nesse trabalho, o TDT foi conduzido nos marcadores Fok e Taq, visto que foi encontrado um indicativo de associação do Fok com a hanseníase no nosso estudo caso-controle, e que o Taq foi o polimorfismo mais estudado no *VDR* em estudos genéticos anteriores de associação com a hanseníase. Os nossos resultados exibidos na tabela 4.6 mostram as transmissões dos alelos tanto do SNP Fok quanto do SNP Taq para os filhos afetados. Para o Fok, observou-se que o alelo T foi mais transmitido aos filhos afetados, estando presente em 18 dos 32 filhos avaliados, o que em termos de porcentagem representa que esse alelo esteve presente em 52% dos filhos. Vale ressaltar que esse desvio de apenas 2% refletiu em um valor de p não significativo, mas próximo ao tolerável ( $p=0,09$ ). Em relação ao Taq, o alelo T foi encontrado em 33 dos 58 filhos avaliados, o que equivale a uma transmissão em 56% dos filhos. No entanto, esse aumento de 6% na transmissão em relação ao esperado não foi estatisticamente significativo ( $p=0,33$ ). Assim, o estudo familiar sugere que os alelos dos polimorfismos Fok e Taq não possuem associação com a hanseníase.

A análise dos haplótipos formados pelos SNPs Fok e Taq nas famílias (tabela 4.7) mostrou que todas as combinações haplotípicas não foram transmitidas diferentemente do esperado aos filhos afetados, pois o teste estatístico exibiu valores de p não significativos. Apesar da combinação T/T do Fok/Taq ter sido transmitida para 11 filhos e não transmitida a 18 o que indicaria uma proteção, essa diferença resultou em um p-valor borderline ( $p=0,05$ ). É importante notar que o haplótipo T/T/T formado pelos SNPs Fok/rs4760658/Taq exibiu efeito

protetor no estudo caso-controle, que embora marginalmente significativo ( $p=0,04$ ) vai na mesma direção do haplótipo T/T para Fok/Taq encontrado em famílias. Já em relação ao haplótipo formado por essa mesma combinação dois a dois no estudo caso-controle, não foi encontrado um  $p$  valor significativo ( $p=0,11$ ), mas o valor de OR igual a 0,77 sugere a mesma direção para indicativo de proteção. A comparação entre os resultados obtidos no caso-controle e os estudos TDT mostram que apesar de não significativos, os efeitos vão na mesma direção, sugerindo que esses efeitos sejam difíceis de detectar e precisem de maior exploração. Reforça-se assim a necessidade de se realizar a caracterização do polimorfismo rs4760658 também no estudo familiar.

Possivelmente, a significância *borderline* encontrada no desenho em famílias tenha ocorrido devido ao tamanho da nossa amostra. A questão amostral no modelo TDT é um ponto crítico no estudo, pois o fato do modelo exigir trios formados por pais heterozigotos e ao menos um filho afetado, leva a eliminação de muitas famílias das análises, consideradas não informativas. Uma estimativa de poder para esse estudo mostrou que, considerando a frequência haplotípica de 0,24 (Fok-C/Taq-C com  $p=0,06$ ), seriam necessárias 186 famílias para conseguirmos detectar uma OR mínima de 1,5 com 80% de poder. Mesmo utilizando o genótipo dos irmãos como artifício para inferir o genótipo de um dos pais que poderiam estar ausentes, o nosso estudo efetuou a análise em 90 famílias totalizando 365 indivíduos, o que demonstra ser um número ainda insuficiente para obtenção de suficiente poder estatístico nesse desenho experimental.

#### **4. Revisão Sistemática**

A busca por estudos genéticos de associação entre o polimorfismo Taq no *VDR* e a hanseníase resultou em quatro artigos encontrados. O primeiro estudo sugeriu associação do genótipo CC com risco a forma tuberculóide da hanseníase, e associação do genótipo TT com risco a forma lepromatosa (Roy e col., 1999). Um outro estudo também indicou associação do genótipo CC do Taq, mas com risco a hanseníase *per se* (Fitness e col., 2004). Em brasileiros, foi conduzido um estudo atrelado à resposta negativa a lepromina (Mitsuda), sugerindo a princípio uma associação do genótipo TC com forma lepromatosa. Esse tipo de análise introduz viés nos resultados, pois a estratificação dificulta a comparação com outros dados da literatura (Goulart e col., 2006). O trabalho mais recente avaliando a associação do Taq com

hanseníase demonstrou associação do genótipo TT com susceptibilidade a forma lepromatosa da doença (Félix e col., 2009). Os resultados da forma com que foram apresentados por seus autores demonstram algumas controvérsias, tais como a associação do genótipo CC com susceptibilidade somente a forma TT da hanseníase segundo Roy e col., e associação desse mesmo genótipo a hanseníase *per se* de acordo com Fitness e col.

Comparando os trabalhos anteriores com os obtidos no presente estudo observam-se divergências entre os resultados, visto que em ambos os desenhos utilizados aqui (caso-controle e familiar) o polimorfismo Taq não foi associado com a hanseníase. Vale ressaltar, no entanto, que a maioria dos trabalhos anteriores possuem um tamanho amostral considerado reduzido para um estudo populacional (tabela 4.8). Relativamente ao nosso estudo, que utilizou 897 indivíduos para as análises no polimorfismo Taq, não se descarta o fato de que os resultados dos estudos anteriores sejam provenientes de flutuações nas frequências alélicas, o que é comum em amostras reduzidas. Ioannidis e col., em uma avaliação de 370 estudos de meta-análise relativos a 36 tipos de marcadores de associação, observaram que freqüentemente os primeiros estudos de associação a uma determinada doença indicam associação maior ao desfecho do que os estudos subsequentes (Ioannidis e col., 2001). Um outro ponto a ser destacado, é que o teste qui-quadrado comparando as frequências globais entre casos e controles, revelou que apenas o trabalho realizado por Roy e col. exibiu significância estatística ( $\chi^2 = 9,3$ ,  $p = 0,009$ ), o que põe em discussão a existência de diferença significativa entre as frequências em casos e controles nos outros estudos.

Quando existem vários estudos relacionando o mesmo marcador a uma determinada doença, mas com resultados distintos ou contraditórios, o estudo de meta-análise pode ser utilizado como poderosa ferramenta para fornecer uma medida de associação consenso entre os estudos (Pacheco & Moraes, 2009). Como esse foi o caso do polimorfismo Taq com a hanseníase, tentou-se reunir os dados da literatura da revisão sistemática com os obtidos no presente trabalho para realizar uma meta-análise. No entanto, a avaliação de cada um desses estudos demonstrou que, segundo os critérios de exclusão, nenhum deles poderia ser utilizados para juntamente com os nossos dados, realizar o estudo de meta-análise.

O trabalho realizado por Félix e col. utilizou apenas pacientes LL, tornando incoerente a comparação com o nosso desenho que possui pacientes classificados tanto como multibacilares como paucibacilares. Já o estudo conduzido por Goulart e col. utilizou como grupo controle

contatos domiciliares não aparentados, o que também representa um desenho incomparável ao conduzido no presente estudo. Foi observado também que tanto o estudo conduzido por Roy e col. quanto o feito por Fitness e col. apresentaram frequências genóticas nos controles desviando do EHW (valores de  $\chi^2$  iguais a 4,64 e 6,26 respectivamente), colocando em discussão os resultados obtidos pelos mesmos. Assim, como todos os trabalhos anteriores possuem requisitos que os enquadram nos critérios de exclusão, não foi possível reuni-los com os dados obtidos no presente estudo, impossibilitando a realização da meta-análise.

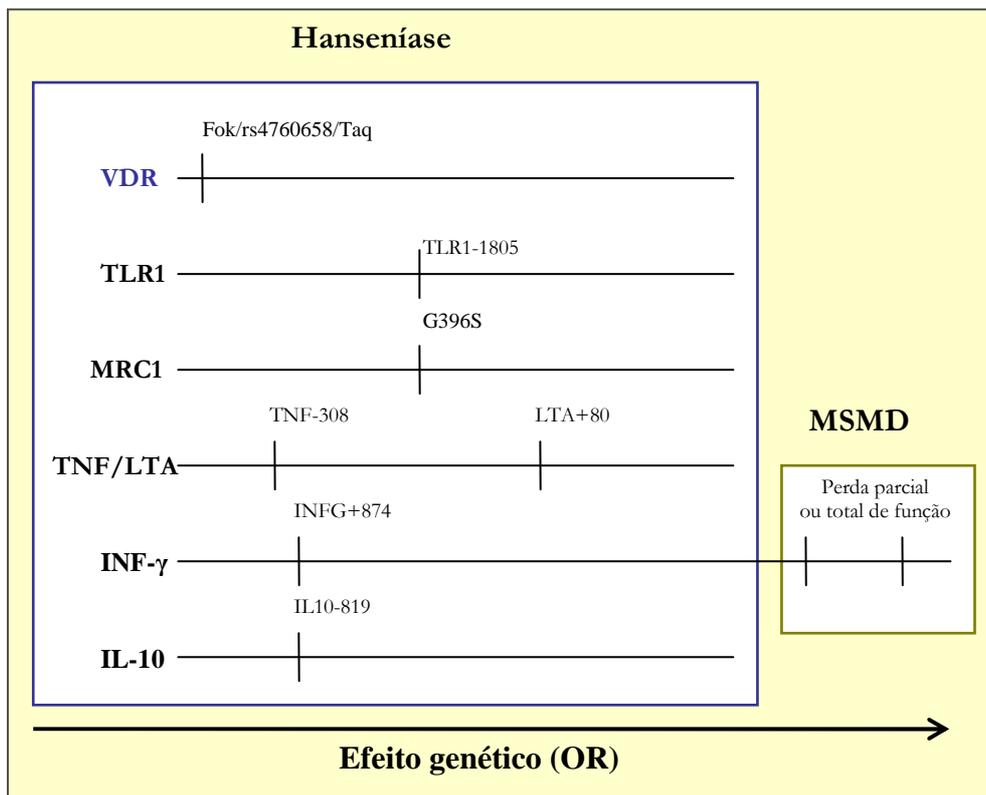
A lei de Hardy-Weinberg prevê que as proporções genóticas se mantenham constantes ao longo das gerações em uma população. Essa população teria como algumas de suas características ser infinitamente grande, ter o mesmo número de homens e mulheres, não sofrer mutações e nem pressão da seleção natural. Certamente essa seria uma população teórica, mas percebe-se que as populações tendem a seguir o EHW. Em uma população de estudo pode-se calcular o quanto as frequências gênicas observadas desviam do EHW através do teste  $\chi^2$ . Caso haja um desvio considerável entre as frequências observadas e esperadas no grupo controle ( $\chi^2 \geq 3,84$ ,  $p \leq 0,05$ ), existe um indicativo de equívoco no desenho experimental, que pode ir desde uma estratificação na população até erros de genotipagem (Hosking e col., 2004). Dessa forma o EHW pode ser interpretado como garantia de controle de qualidade da genotipagem (Pacheco & Moraes, 2009), justificando a importância de se utilizar o EHW como critério de exclusão em estudos de meta-análise.

## **5. Considerações finais**

Nossos achados, em relação à influência genética do *VDR* na hanseníase, acrescentam uma visão de que marcadores no gene desse receptor parecem influenciar de uma maneira sutil a resposta ao *M. leprae*. O presente trabalho sugere uma participação modesta no estudo caso-controle quando a combinação haplotípica é analisada, o que precisa ainda ser confirmado em outros estudos utilizando minimamente os três SNPs avaliados nesse estudo. Ainda não há como descartar a possibilidade de que outros componentes da via antimicrobiana mediada pela vitamina D possam estar associados geneticamente com maior força à hanseníase. Estudos genéticos abordando outros participantes dessa via merecem ser conduzidos para tentar identificar, caso exista, um componente genético que explique o envolvimento do *VDR* com a hanseníase, observado em estudos funcionais. A ação altamente dinâmica da vitamina D na

resposta a doenças, certamente reflete em uma participação do VDR em vias complexas na resposta a hanseníase, o que parece não ser entendido de maneira trivial apenas em estudos genéticos. Assim, a perspectiva para esse estudo é prosseguir com um aperfeiçoamento dos estudos genéticos, realizando um estudo funcional em conjunto para tentar esclarecer a influência do VDR na hanseníase.

Nossos resultados também contribuem para esclarecer como ocorre a influência genética na hanseníase, tendo em vista que essa associação sutil observada apenas no haplótipo se soma às já encontradas em outros marcadores, o que pode ser melhor interpretado em um modelo de eixos superpostos (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Esquema do modelo da sobreposição dos eixos de influência genética a doenças micobacterianas. Alterações genéticas poderiam ter efeitos que variam desde uma influência sutil ou moderada, como é o caso da hanseníase, até levar a uma perda parcial ou total de função, como por exemplo na síndrome da susceptibilidade Mendeliana a doenças micobacterianas (MSMD). Foi feita uma adaptação ao modelo sugerido por Cardoso em 2009, adicionando-se os genes da imunidade inata. Propõe-se que SNPs no VDR tenha efeitos sutis no desfecho da doença.

Esse modelo ilustra que os efeitos modestos de cada marcador individualmente podem ter um efeito aditivo no desfecho da hanseníase. Enquanto alguns polimorfismos atuam mais sutilmente, outros com relevância funcional já podem ser considerados com um efeito um pouco maior (penetrância) na resposta à doença. É importante notar também que estão presentes tanto genes da imunidade inata quanto da adaptativa sugerindo que essas respostas, separadas apenas didaticamente, atuam conjuntamente na resposta imunológica à doença.

Por fim, é importante destacar que esse trabalho se insere no contexto do estudo de marcadores genéticos associados à hanseníase, os quais têm sido considerados como uma possível ferramenta no auxílio ao diagnóstico precoce da doença. O rastreamento de painéis de suscetibilidade poderia ser de grande utilidade, por exemplo, em contatos domiciliares, onde existe um alto grau de exposição ao bacilo, constituindo assim um grupo de risco. A presença de um perfil altamente susceptível em um indivíduo poderia justificar uma intervenção terapêutica precoce, contribuindo assim para evitar a progressão da doença, e a redução no número de novos casos de hanseníase. Outro fator relevante é que, se estabelecidos marcadores genéticos associados à diferentes manifestações clínicas da hanseníase, esses poderiam contribuir para a intervenção de maneira a evitar quadros mais graves da doença e consequentemente possíveis danos neurais e desabilidades físicas.

## VI. CONCLUSÕES

### 1. Conclusões

A partir dos resultados encontrados nesse estudo, podemos concluir que:

1. Em relação ao polimorfismo Fok no *VDR*, o estudo caso-controle realizado na população do Rio de Janeiro indicou apenas uma associação *borderline* do genótipo CT com proteção à hanseníase.
2. Segundo o estudo caso-controle, os polimorfismos rs4760658 (alelo T) e Taq (alelo T) no *VDR* não possuem associação com a hanseníase.
3. O haplótipo C/C/C referente à combinação Fok/rs4760658/Taq no *VDR* mostrou associação com proteção à hanseníase, enquanto o haplótipo T/T/T apresentou proteção considerada *borderline*.
4. No estudo familiar, os polimorfismos Fok e Taq não apresentaram associação com a hanseníase, com valores de p não significativos, mas indo na mesma direção dos resultados encontrados no estudo caso-controle.
5. A análise haplotípica da combinação Fok/Taq não foi associada à hanseníase no estudo caso-controle, o que foi replicado no estudo familiar. No TDT, apenas uma associação à proteção *borderline* foi observada em relação ao haplótipo T/T com a hanseníase.
6. Os estudos anteriores que até então avaliaram associação entre o SNP Taq e a hanseníase, não possibilitaram a realização de uma meta-análise junto aos nossos dados.

## **2. Conclusão geral**

O presente trabalho permite concluir que os polimorfismos Fok, rs4760658 e Taq no gene *VDR* não estão associados à hanseníase quando avaliados individualmente, havendo apenas uma associação à proteção marginalmente significativa do SNP Fok em estudo caso-controle. No entanto, considerando o haplótipo formado por esses três marcadores, foi observada uma associação com proteção à doença. O estudo replicativo familiar, embora não tenha mostrado significância estatística, vai na mesma direção do estudo caso-controle. Assim, acredita-se que esses SNPs tenham influência modesta na genética da hanseníase, o que requer maior confirmação por estudos genéticos avaliando maior número de marcadores ao longo do gene.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet.* 1988 Feb;42(2):256-66.

Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Nakata N, Osana Y, Sakakibara Y, Ishii N. Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. *J Bacteriol* 2009; 191(10): 3321-3327.

Albert PJ, Proal AD, Marshall TG. Vitamin D: the alternative hypothesis. *Autoimmun Rev.* 2009 Jul;8(8):639-44. Epub 2009 Feb 12

Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest.* 2009 Sep;119(9):2506-14.

Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Cardoso CC, Grant AV, Abel L, Moraes MO, Alcaïs A, Schurr E. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet.* 2010 Mar;127(3):337-48.

Alvarado-Navarro A, Montoya-Buelna M, Muñoz-Valle JF, López-Roa RI, Guillén-Vargas C, Fafutis-Morris M. The 3'UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the west of Mexico. *Immunol Lett.* 2008 Jun 30;118(2):148-51.

Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, Kaplan G, Hawn TR. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis.* 2010 May 1;201(9):1422-35.

Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis* 2008 Jan;197(2):253-61.

Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):4974-80.

Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, Bah B, Sillah J, Gustafson P, Manneh K, Lisse I, Allen A, Sirugo G, Sylla A, Aaby P, McAdam KP, Bah-Sow O, Bennett S, Lienhardt C, Hill AV. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. *J Infect Dis.* 2004 Nov 1;190(9):1631-41

Bretherton-Watt D, Given-Wilson R, Mansi JL, Thomas V, Carter N, Colston KW. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Br J Cancer.* 2001 Jul 20;85(2):171-5 Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet.* 2004 Apr 10;363(9416):1209-19

Campbell FC, Xu H, El-Tanani M, Crowe P, Bingham V. The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-specific growth control. *Biochem Pharmacol.* 2010 Jan 1;79(1):1-9.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001 Feb;2(2):91-9

Cardoso CC, Martinez AN, Guimarães PE, Mendes CT, Pacheco AG, de Oliveira RB, e col.. Ninjurin 1 asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol* 2007 Oct;190(1-2):131-8.

Cardoso CC. Estudo da associação entre polimorfismos de base única (SNPs) nos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* e a suscetibilidade à hanseníase. Tese (doutorado) Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2009

Carless MA, Kraska T, Lintell N, Neale RE, Green AC, Griffiths LR. Polymorphisms of the VDR gene are associated with presence of solar keratoses on the skin. *Br J Dermatol.* 2008 Sep;159(4):804-10

Casanova JL, Schurr E, Abel L, Skamene E. Forward genetics of infectious diseases: immunological impact. *Trends Immunol.* 2002 Oct;23(10):469-72

Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jan;4(1):55-66.

Casanova JL, Abel L. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. *J Exp Med.* 2005 Jul 18;202(2):197-201.

Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J.* 2007 Feb 21;26(4):915-22

Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr;86(7):2453-7

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, e col. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001 Feb 22;409(6823):1007-11

Coura e col. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan, 2005. Rio de Janeiro.

Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, Gutierrez MA, Navab M, Reddy ST, Witztum JL, Fogelman AM, Rea TH, Eisenberg D, Berliner J, Modlin RL. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest.* 2008 Aug;118(8):2917-28

Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol.* 1998;39:131-203.

Departamento de Informática do SUS – DATASUS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Hanseníase. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hanseniaase/bases/Hansbrnet.def>

Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol.* 2000 Aug;78(4):318-24.

Dilmec F, Uzer E, Akkafa F, Kose E, van Kuilenburg AB. Detection of VDR gene ApaI and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *J Diabetes Complications.* 2010 May-Jun;24(3):186-91

Félix JSV, Salazar SGC, Velázquez R C, Maldonado JGR, Villalobos HR. Relación del polimorfismo TaqI del gen del receptor de la vitamina D con la lepra lepromatosa en población mexicana. *Salud pública de México,* 2009 Feb; 51(1).

Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, Langenberg DM, van Crevel R, Adema GJ, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005 Nov;1(3):279-85

Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, Fine PE, Hill AV. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Sep;71(3):330-40.

Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, Peixoto PR, Visentainer JE. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis.* 2009 Jul;13(4):493-8

Gao L, Tao Y, Zhang L, Jin Q. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010 Jan;14(1):15-23

Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 2003 Jan 6;197(1):7-17.

Ghelani AM, Samanta A, Jones AC, Mastana SS. Association analysis of TNFR2, VDR, A2M, GSTT1, GSTM1, and ACE genes with rheumatoid arthritis in South Asians and Caucasians of East Midlands in the United Kingdom. *Rheumatol Int.* 2010 Apr 18

Glass D, Lens M, Swaminathan R, Spector TD, Bataille V. Pigmentation and vitamin D metabolism in Caucasians: low vitamin D serum levels in fair skin types in the UK. *PLoS One.* 2009 Aug 3;4(8)

Guia de Vigilância Epidemiológica: Hanseníase. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Caderno 7. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_hanseniaase.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_hanseniaase.pdf)

Gorodezky C, Alaez C, Munguía A, Cruz R, Vazquez A, Camacho A, Flores O, Rodriguez M, Rodriguez O. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis (Edinb).* 2004;84(1-2):82-92.

- Goulart IM, Penna GO, Cunha G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Jul-Aug;35(4):365-75
- Hagge DA, Oby Robinson S, Scollard D, McCormick G, Williams DL. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1283-96
- Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol*. 1997 Sep;154 Suppl:S57-73.
- Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005 Feb;6(2):95-108
- Hitzig WH. The discovery of agammaglobulinaemia in 1952. *Eur J Pediatr*. 2003 May;162(5):289-304
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80
- Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi X, Moraes MO, Martinez AN, Oskam L, Faber WR, Sarno EN, Sampaio EP, Bühner-Sékula S. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Rev*. 2005 Sep;76(3):232-40
- Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Mar;78(3):518-21.
- Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med*. 2010 May;88(5):441-50.
- Klatser PR, van Beers S, Madjid B, Day R, de Wit MY. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. *J Clin Microbiol*. 1993 Nov;31(11):2947-51.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003 May;9(5):525-32.
- Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, Robles JA, Stenger S, Adams JS, Modlin RL. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol*. 2008 Nov 15;181(10):7115-20.
- Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL. Infection of mouse macrophages with viable *Mycobacterium leprae* does not induce apoptosis. *J Infect Dis*. 2010 Jun 1;201(11):1736-42.

Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:96-105

Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, Gandhi R, Chauhan V, Bansal G, Sachan P, Sachan S, Yadav VS, Jadhav R. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol* 2008; 8: 627-631.

Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans.* 2007 Dec;35(Pt 6):1479-84.

Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, Burdick A, Sarno EN, Rea TH, Modlin RL. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis.* 2010 Feb 15;201(4):558-69.

Lee SB, Kim BC, Jin SH, Park YG, Kim SK, Kang TJ, et al.. Missense mutations of the interleukin-12 receptor beta 1 (IL12RB1) and interferon-gamma receptor 1 (IFNGR1) genes are not associated with susceptibility to lepromatous leprosy in Korea. *Immunogenetics* 2003 Jun;55(3):177-81.

Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr.* 1995 Jun;125

Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev.* 2006 Mar;77(1):5-24. Review. Erratum in: *Lepr Rev.* 2006 Jun;77(2):170. Liu J, Barry CE 3rd, Besra GS, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem.* 1996 Nov 22;271(47):29545-51.

Li JH, Li HQ, Li Z, Liu Y, Gao JR, Zeng XJ, Gou CY, Zhu XL, Guo XH, Pan L, Li H. [Association of Taq I T/C and Fok I C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006 Jul 25;86(28):1952-6

Liu JH, Li HW, Wang JQ, Li M, Xin DQ, Na X, Zhang M, Ye SY, Na YQ. Vitamin D receptor gene Bsm I polymorphism and the susceptibility to prostate cancer in northern Chinese Han population]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2003 Sep;9(6):413-6.

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006 Mar 24;311(5768):1770-3. Epub 2006 Feb 23.

Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol.* 2007 Aug 15;179(4):2060-3.

Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, Goodman MT. Vitamin D receptor gene polymorphisms and epithelial ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Dec;16(12):2566-71

- Mahmoudi T, Mohebbi SR, Pourhoseingholi MA, Fatemi SR, Zali MR. Vitamin D receptor gene ApaI polymorphism is associated with susceptibility to colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2010 Jul;55(7):2008-13
- Makino M, Maeda Y, Mukai T, Kaufmann SH. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. *Eur J Immunol*. 2006 Jun;36(6):1443-52.
- Malhotra D, Darvishi K, Lohra M, Kumar H, Grover C, Sood S, e col.. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. *Eur J Hum Genet* 2006 Apr;14(4):438-42
- Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, Reddy BS, Bamezai RN. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet*. 2005 Nov;118(2):295-300
- Marri PR, Bannantine JP, Golding GB. Comparative genomics of metabolic pathways in Mycobacterium species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Nov;30(6):906-25
- Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, e col.. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 2006;44:3154-9.
- Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, e col.. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2009a;47(7):2124-30.
- Marques MA, Neves-Ferreira AG, da Silveira EK, Valente RH, Chapeaurouge A, Perales J, da Silva Bernardes R, Dobos KM, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MC. Deciphering the proteomic profile of Mycobacterium leprae cell envelope. *Proteomics*. 2008 Jun;8(12):2477-91
- Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr* 1999; 71: 61-67.
- Ministério da Saúde. Programa Mais Saúde 2008-2011- terceira edição. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/mais\\_saude\\_direito\\_todos\\_3ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/mais_saude_direito_todos_3ed.pdf)
- Mira MT, Alcais A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, Schurr E. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun*. 2003 Jan;4(1):67-73
- Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Verner A, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):412-5 Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, e col.. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 2003b Mar;33:412-5.

Mira MT, Alcáis A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, e col.. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004;427(6975):636-40.

Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, e col.. Human TLR1 Deficiency Is Associated with Impaired Mycobacterial Signaling and Protection from Leprosy Reversal Reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2008 May;2(5):e231.

Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997 Jul;11(8):1165-79.

Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 1983 Feb;8(2):182-9.

Modlin RL. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009 Oct 22;6(4):343-53

Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev*. 2004 Dec;75(4):310-26.

Möller M, de Wit E, Hoal EG. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Feb;58(1):3-26

Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, Matsuoka M, Taylor GM, Donoghue HD, Bouwman A, Mays S, Watson C, Lockwood D, Khamesipour A, Dowlati Y, Jianping S, Rea TH, Vera-Cabrera L, Stefani MM, Banu S, Macdonald M, Sapkota BR, Spencer JS, Thomas J, Harshman K, Singh P, Busso P, Gattiker A, Rougemont J, Brennan PJ, Cole ST. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1282-9. Epub 2009 Nov 1. Erratum in: *Nat Genet*. 2010 Apr;42(4):361

Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, Chun R, Schenk M, Zhang X, Ferguson BG, Burdick AE, Sarno EN, Rea TH, Hewison M, Adams JS, Cheng G, Modlin RL. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009 Oct 22;6(4):343

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborgh PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev*. 2006 Sep;77(3):189-202.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. 1999 Nov;50(5):541-9.

Morahan G, Kaur G, Singh M, Rappaport CC, Kumar N, Katoch K, e col.. Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens* 2007 Apr;69(Suppl1):234-6.

- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1;89(15):6665-9.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol*. 2005 Jul 1;175(1):5-14.
- Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol*. 1998 Oct;37(10):733-40.
- Moura RS, Calado KL, Oliveira ML, Bühner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41
- Murthy PK. Current epidemiology of leprosy. *J Indian Med Assoc*. 2004 Dec;102(12):672-3, 683.
- Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7477-85.
- Ninjurin 1 asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol* 2007 Oct;190(1-2):131-8.
- Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2008 Feb;37(1):113-9
- Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Jan;3(1):27-41.
- Ochs-Balcom HM, Cicek MS, Thompson CL, Tucker TC, Elston RC, J Plummer S, Casey G, Li L. Association of vitamin D receptor gene variants, adiposity and colon cancer. *Carcinogenesis*. 2008 Sep;29(9):1788-93.
- Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, e col.. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol*. 2005 Jul;58(7):740-3
- Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1427-33.
- Ordóñez-Morán P, Muñoz A. Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*. 2009 Jun 1;8(11):1675-80
- OMS- Organização Mundial de Saúde (do ingles “World Health Organization-WHO”). Global leprosy situation, beginning of 2008. [online]. Weekly epidemiological Record. Geneva, 2008; Disponível em: <http://www.who.int/wer/2009/wer8433.pdf>

OMS-Organização Mundial de Saúde 2010 (do inglês “World Health Organization-WHO”). Leprosy: the disease [online]. Disponível em: <http://www.who.int/lep/leprosy/en/index.html>

Pacheco AGF, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease Markers* 2009.

Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clin Immunol.* 2009 Nov;133(2):276-81

Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA.* 2008 Mar 19;299(11):1335-44. Erratum in: *JAMA.* 2008 May 14;299(18):2150.

Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, Villani-Moreno FR, Pacheco AG, Moraes MO. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009 Mar;10(2):174-80.

Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, Villani-Moreno FR, Pacheco AG, Moraes MO. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009 Mar; 10(2):174-80

Pessolani MC, Marques MA, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes Infect.* 2003 Jun;5(7):677-84

Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol* 2005 Jul;58(7):740-3.

Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase. Plano nacional de eliminação da hanseníase a nível municipal 2006-2010. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/hanseniase\\_plano.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/hanseniase_plano.pdf)

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science.* 2002 May 3;296(5569):927-31.

Reichel H, Koeffler HP, Tobler A, Norman AW. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits gamma-interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(10):3385-9.

Ridley, D.S. and Jopling, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-roup system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis,* 1966; 34: 255-273. Fitness J, Tosh K, Hill AV. Genetics of susceptibility to leprosy. *Genes Immun.* 2002 Dec;3(8):441-53.

Robbins G, V. Tripathy M, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, Schug MD. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS ONE* 2009 May 4(5)

Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis.* 1999 Jan;179(1):187-91.

Saadi A, Gao G, Li H, Wei C, Gong Y, Liu Q. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2009 Jul 21;10:71

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis.* 2002 Dec 1;186(11):1687-91.

Schaid DJ. Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations. *Am J Hum Genet.* 1998 Oct;63(4):935-41.

Schurr E, Alcaïs A, de Léséleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol.* 2006 Dec;18(6):404-10

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr;19(2):338-81

Scollard DM, Lathrop GW, Truman RW. Infection of distal peripheral nerves by *M. leprae* in infected armadillos; an experimental model of nerve involvement in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1996 Jun;64(2):146-51

Selvaraj P, Chandra G, Jawahar MS, Rani MV, Rajeshwari DN, Narayanan PR. Regulatory role of vitamin D receptor gene variants of Bsm I, Apa I, Taq I, and Fok I polymorphisms on macrophage phagocytosis and lymphoproliferative response to mycobacterium tuberculosis antigen in pulmonary tuberculosis. *J Clin Immunol.* 2004 Sep;24(5):523-32

Shankarkumar U, Ghosh K, Badakere S, Mohanty D. Novel HLA Class I Alleles Associated with Indian Leprosy Patients. *J Biomed Biotechnol.* 2003;2003(3):208-211

Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001 Jun;2(4):196-204

Sinotte M, Rousseau F, Ayotte P, Dewailly E, Diorio C, Giguère Y, Bérubé S, Brisson J. Vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI) and breast cancer risk: association replication in two case-control studies within French Canadian population. *Endocr Relat Cancer.* 2008 Dec;15(4):975-83

Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology.* 1998 Dec;95(4):529-36

Stram DO. Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol.* 2004 Dec;27(4):365-74

- Tang J, Zhou R, Luger D, Zhu W, Silver PB, Grajewski RS, Su SB, Chan CC, Adorini L, Caspi RR. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):4624-32
- Thomas DC, Witte JS. Point: population stratification: a problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Jun;11(6):505-12
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science.* 2001 Feb 23;291(5508):1544-7
- Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001 Mar;69(1):1-12
- Tseng M, Giri V, Bruner DW, Giovannucci E. Prevalence and correlates of vitamin D status in African American men. *BMC Public Health.* 2009 Jun 18;9:191
- Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004 Sep 1;338(2):143-56
- Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Sep;371(1-2):1-12.
- van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999 Jun;67(2):119-28
- van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis.* 2004 Dec;4(12):739-49
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1287-98
- Vanderborcht PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Schurr E, Sarno EN, Moraes MO. HLA-DRB1\*04 and DRB1\*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun.* 2007 Jun;8(4):320-4.
- Verhagen CE, Wierenga EA, Buffing AA, Chand MA, Faber WR, Das PK. Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like *Mycobacterium leprae* T cell reactivity in lesional skin: a follow-up study. *J Immunol.* 1997 Nov 1;159(9):4474-83
- Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull.* 2006;77-78:103-21

Wang LM, Kimura A, Satoh M, Mineshita S. HLA linked with leprosy in southern China: HLA-linked resistance alleles to leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999 Dec;67(4):403-8

Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorum A, Lallemand B, Zhang R, Mader S, White JH. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Nov;19(11):2685-95

Williams DL, Slayden RA, Amin A, Martinez AN, Pittman TL, Mira A, Mitra A, Nagaraja V, Morrison NE, Moraes M, Gillis TP. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC Genomics.* 2009 Aug 25;10:397

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254 (5029): 277-279.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol.* 1992 Aug 15;149(4):1470-5

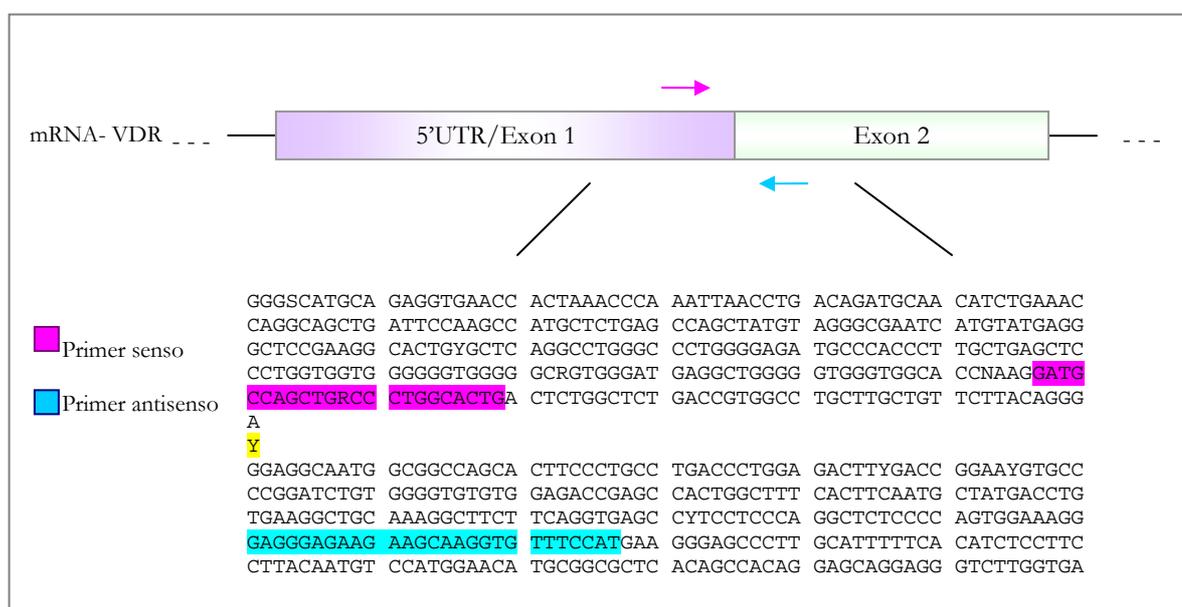
Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, Cui Y, Yan XX, Yang HT, Yang RD, Chu TS, Zhang C, Zhang L, Han JW, Yu GQ, Quan C, Yu YX, Zhang Z, Shi BQ, Zhang LH, Cheng H, Wang CY, Lin Y, Zheng HF, Fu XA, Zuo XB, Wang Q, Long H, Sun YP, Cheng YL, Tian HQ, Zhou FS, Liu HX, Lu WS, He SM, Du WL, Shen M, Jin QY, Wang Y, Low HQ, Erwin T, Yang NH, Li JY, Zhao X, Jiao YL, Mao LG, Yin G, Jiang ZX, Wang XD, Yu JP, Hu ZH, Gong CH, Liu YQ, Liu RY, Wang DM, Wei D, Liu JX, Cao WK, Cao HZ, Li YP, Yan WG, Wei SY, Wang KJ, Hibberd ML, Yang S, Zhang XJ, Liu JJ. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med.* 2009 Dec 31;361(27):2609-18

## ANEXO I

### 1. Sequenciamento

#### 1.1 Desenho de primers e PCR

O primeiro passo para o sequenciamento foi realizar a amplificação da região gênica que contém o polimorfismo. Para isso, foram utilizados primers desenhados anteriormente por Sweeney e col., 2006. Os primers flanqueiam a região do polimorfismo Fok, de forma que o primer senso anela na posição -39 e o antisenso na posição 183, amplificando uma região de 273pb (Figura 1).



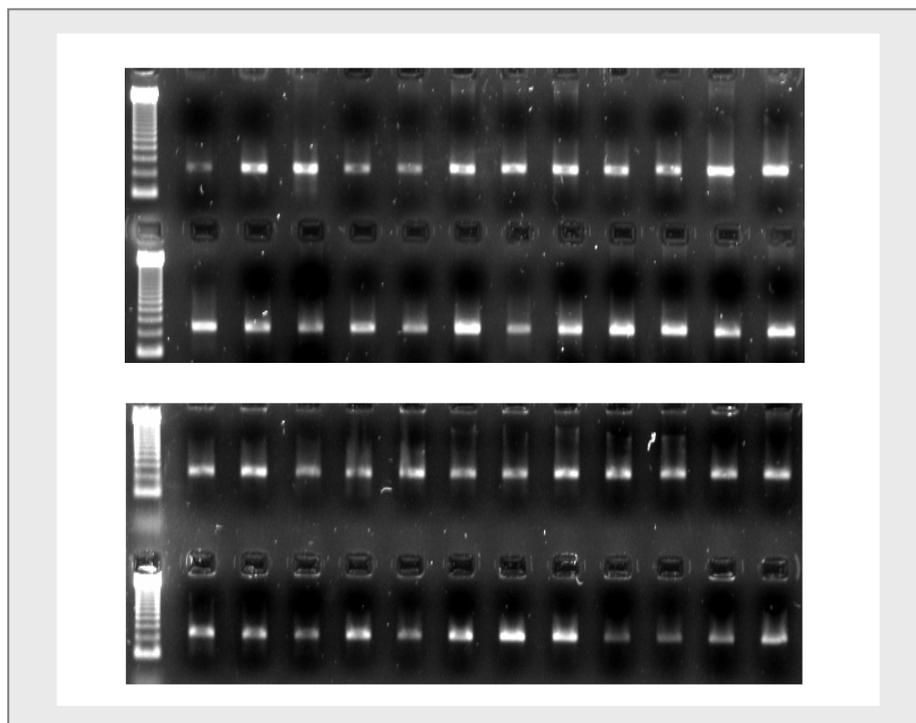
**Figura 1.** Esquema do anelamento dos primers utilizados para amplificar o polimorfismo (Y) Fok [C/T] no VDR. Sequência flaqueando o SNP foi obtida do dbSNP (NCBI).

As amplificações por PCR foram realizadas em reações com volume final de 25 µL, utilizando entre 50 a 100 ng de DNA genômico como molde. Para cada reação foram utilizados 1.0 U de Taq DNA polimerase com 1X de tampão de reação fornecidos pelo fabricante (Invitrogen, CA, USA), 1,5-2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP e 0,3 µM de cada primer. As condições de ciclagem do PCR foram as seguintes: 94 °C por 5 min (desnaturação), 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, com uma etapa de extensão final de 72 °C durante 5 min. O produto de PCR foi submetido a corrida

eletroforética em gel de agarose 1,7%, e corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Ao final as bandas foram visualizadas sob luz UV.

## 1.2 Purificação dos amplicons

Para purificação do produto de PCR foi utilizado o Kit Accuprep<sup>®</sup> PCR Purification (Bioner), segundo instruções do fabricante. Posteriormente, os produtos purificados foram submetidos a corrida eletroforética (como anteriormente descrito) estando o gel ilustrado na figura 2. Os produtos de purificação também foram quantificados utilizando o NanoDrop<sup>®</sup> ND (Uniscience).



**Figura 2.** Gel dos produtos de PCR purificados. Produtos de amplificação da região de 273pb que flanqueia o polimorfismo Fok no gene *VDR*. Na primeira coluna, o marcador de peso molecular de 123pb.

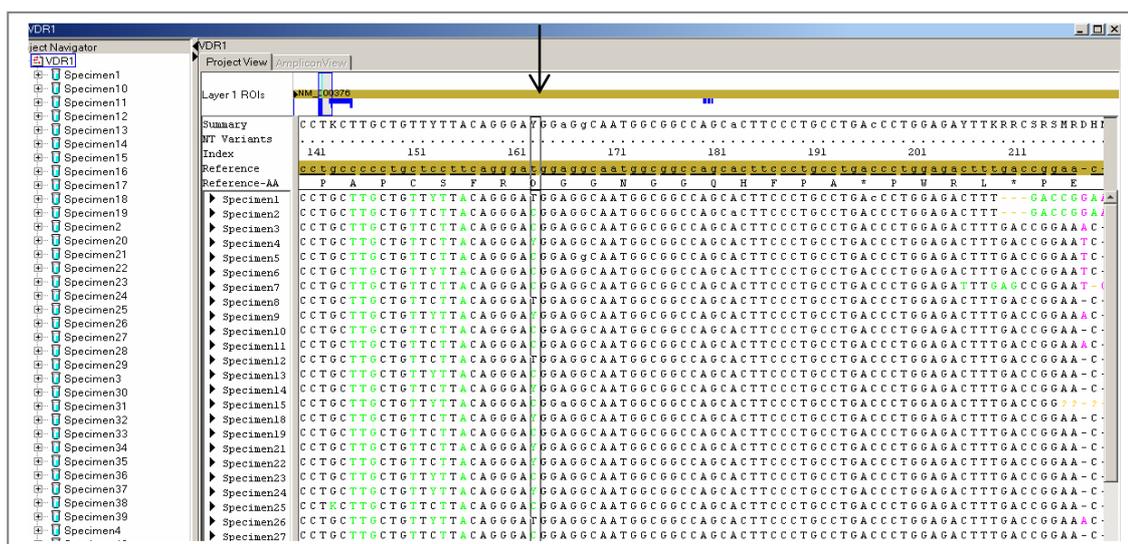
## 1.3 Sequenciamento

A partir dos amplicons purificados, foi realizado o sequenciamento automático em sequenciador ABI3730 (Applied Biosystems). As reações foram realizadas na Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Plataforma de

Seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ ([http://www.dbbm.fiocruz.br/PDTIS\\_Genomica/](http://www.dbbm.fiocruz.br/PDTIS_Genomica/)). Após obtidas as seqüências foram analisadas utilizando o programa SeqScape 2.1 (Applied Biosystems). As seqüências foram alinhadas com base na seqüência de referência do mRNA do gene *VDR* depositada no GenBank (NCBI) sob o código NM\_000376.2

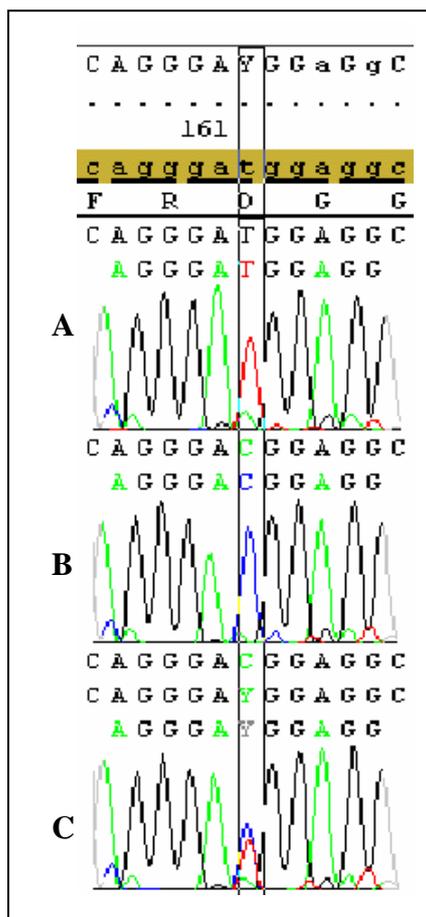
### 1.4 Resultados

O alinhamento das seqüências obtidas com a seqüência de referência possibilitou identificar o polimorfismo Fok no primeiro start códon do gene *VDR* (Figura 3). Das 48 amostras submetidas ao sequenciamento, 44 funcionaram de maneira a possibilitar a genotipagem.



**Figura 3.** Ilustração do alinhamento das seqüências realizado no programa SeqScape 2.1 (Applied Biosystems). Na seta, a posição do polimorfismo de acordo com a seqüência de referência.

A identificação dos genótipos foi realizada observando o pico referente ao polimorfismo, de forma que os homozigotos TT (Figura 4A) e CC (Figura 4B) apresentaram claramente um único pico, enquanto o heterozigoto CT apresentou dois picos com intensidades próximas (Figura 4C). Das amostras seqüenciadas, todas foram compatíveis com a genotipagem por PCR em tempo real, e apresentaram apenas a troca T/C.



**Figura 4.** Genotipagem do polimorfismo Fok no gene VDR. Exemplo ilustrando as possibilidades de genótipos encontradas para esse SNP. Em A e B picos únicos, representando os genótipos homozigotos TT e CC respectivamente e em C dois picos sobrepostos que representam o genótipo heterozigoto CT. Imagem extraída do programa SeqScape 2.1 (Applied Biosystems)

## 1.5 Conclusão

Todos os genótipos referentes ao polimorfismo Fok no gene *VDR* obtidos através do sequenciamento foram equivalentes aos genótipos obtidos por PCR em tempo real. Vale ressaltar que, na nossa amostra populacional, não houve nenhuma outra troca de base diferente da troca C/T na posição referente ao polimorfismo Fok. Isso indica a não existência de outras possibilidades de mudança de base no nosso banco.