



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

SÉRGIO RICARDO FERNANDES DE ARAÚJO

**DETERMINANTES GENÉTICOS DA HANSENÍASE EM UMA
POPULAÇÃO DO RIO GRANDE DO NORTE**

**NATAL
2008**

SÉRGIO RICARDO FERNANDES DE ARAÚJO

**DETERMINANTES GENÉTICOS DA HANSENÍASE EM UMA
POPULAÇÃO DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Selma Maria Bezerra Jerônimo.

**NATAL
2008**

Divisão de Serviços Técnicos
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial Leopoldo
Nelson.

Araújo, Sérgio Ricardo Fernandes.

Determinantes genéticos da hanseníase em uma população do Rio Grande do Norte / Sérgio Ricardo Fernandes de Araújo. – Natal (RN), 2008.

110 f.

Orientador: Selma Maria Bezerra Jerônimo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Polimorfismos - Dissertação. 2. Hanseníase - Dissertação. 3. SNP - Dissertação. 4. Susceptibilidade genética - Dissertação. I. Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BC

CDU 548.33 (043.3)

SÉRGIO RICARDO FERNANDES DE ARAÚJO

DETERMINANTES GENÉTICOS DA HANSENÍASE EM UMA POPULAÇÃO DO RIO
GRANDE DO NORTE

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: __/__/2008

BANCA EXAMINADORA

Dra. Selma Maria Bezerra Jerônimo
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientadora

Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos
Departamento de Bioquímica – UFRN
1º Examinador

Prof. Dr. Aldo A. Moreira Lima
Departamento de _____ – UFCE
2º Examinador

Dedico esta obra

À Deus,

Aos meus pais, Agatângelo e Margarida e meus irmãos Sílvio e Samara, pelo amor,
carinho e compreensão dispensados durante essa trajetória.

Ao meu querido filho Davi, que me traz alegria todos os dias pela sua existência

A todos os pacientes que participaram desse estudo. Compreendo a dor ao receber o diagnóstico, o sofrimento e a trajetória complexa do tratamento. Espero que esse trabalho traga, mesmo que indiretamente, uma contribuição, para as pesquisas da hanseníase. E que ajude futuramente a responder a pergunta mais freqüente que ouvi desses pacientes:
“Essa pesquisa é para cura da lepra?”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos, que de forma diferente, contribuíram para este trabalho.

Aos doentes de hanseníase que apesar do sofrimento biológico, sócio-epidemiológico e emocional relacionado a enfermidade por eles desenvolvida ou pelos familiares deles, se dispuseram a participar desse estudo.

À minha orientadora Dra Selma. Por me ensinar a ter um pensamento crítico, por me ensinar a cada dia, que a ciência básica é o suporte de toda medicina clínica. Sinto-me privilegiado e muito honrado, por ter tido a preciosa oportunidade de estar sob sua orientação, pois a sua dedicação ao trabalho, sabedoria e amor pela ciência são admiráveis.

À Carlos Maia, pelo aprendizado valioso, amizade e paciência. Pelo exemplo de dedicação, competência e paixão pelo seu trabalho. Pela ética, honestidade e simplicidade, com os quais expõe suas idéias e ensinamentos.

Ao grupo de amigos que tenho no laboratório de imunogenética, pela união em momentos difíceis e ajuda mútua. Vocês proporcionaram uma trajetória mais leve: Daniela pela dedicação, Núbia pela técnica, Glória e Olívia pela ajuda no processamento das amostras e extração do DNA, James por todo o suporte técnico e tecnológico, Eliene por organizar minha “bagunça”, enfim, a todos os amigos do laboratório, pelo companheirismo e alegria, que tornavam o ambiente de trabalho muito mais agradável.

À Dra. Márcia Dias e Mércia Souza por todo o suporte no trabalho de campo realizado em Mossoró.

À minha grande amiga e vizinha de bancada Bruna Leal, que me escutou durante todo o desenvolvimento desse trabalho, agradeço por suas opiniões e sugestões, bem como pelas orientações sobre as análises estatísticas. Gratidão eterna.

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelas críticas, ensinamentos, amizade e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Maurício Nobre, pela ajuda na coleta das amostras no hospital Giselda Trigueiro, assim como no trabalho de campo e diagnósticos dos pacientes encaminhados a ele.

Ao Dr. Pedro Trindade pelo apoio ao projeto, pelo incentivo prestado, assim como a cessão do setor de dermatologia do Hospital Onofre Lopes, sem o qual este trabalho não seria possível de ser realizado.

A Suely, Glória e Arlete pela ajuda e suporte na coleta das amostras no Hospital Universitário Onofre Lopes.

A professora Edda Lisboa pelo especial interesse em meu trabalho.

Aos meus caros colegas de turma de mestrado, foram momentos ímpares tê-los ao meu lado no percurso deste caminhar, foi muito bom e divertido ter conhecido todos em

especial a Virgínia a qual trabalhei nesses últimos dois anos, foi uma prazer incomensurável ter dividido meu tempo contigo.

À secretária da pós-graduação Margarita Mavromatis, pelas orientações, amizade e pelas conversas em Francês.

A Dra. Jenefer Blackwell, professora da universidade de Cambriedge, pelo apoio científico e resultados desse projeto

À secretária do laboratório de imunogenética Michelli Trigueiro pela competência e dedicação na organização do laboratório como um todo e particularmente pelo almoçarifado.

Aos professores Maurício e Roney por participarem da banca de qualificação, suas opiniões e observações foram muito bem vindas.

Aos meus sogros Neto e Lília por me ajudarem numa etapa tão difícil e pelo empenho em educar meu filho Davi nos meus momentos de ausência.

A Andreza Miranda por ter me incentivado e apoiado no início dessa trajetória.

Ao meus cunhados André Miranda e Flávia Freire por sempre acreditarem e torcerem por mim assim como meu grande amigo Marcelo Freire ao qual descobri ser uma pessoa a quem prezo muito e cuja opinião tem muito valor para mim.

Aos meus pais Agatângelo e Margarida pelo amor, pelo exemplo de dignidade que eles sempre me passaram e por terem me dado a oportunidade de estudar.

Aos meus irmãos Sílvio e Samara por me escutarem e discutirem muitas vezes sobre assuntos nem sempre compreendidos por eles.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento dessa pesquisa e fornecimento de bolsa de estudo.

A Deus por estar sempre cuidando de mim, por me dar inteligência no desenvolvimento desse trabalho, por renovar minha Fé, por me fazer acreditar que o mundo sempre poderá ser melhor e por amar a vida em toda sua plenitude.

*"A falsa ciência gera ateus; a verdadeira
ciência leva os homens a se curvar
diante de Deus."
Voltaire*

Resumo

Introdução: A hanseníase é uma doença milenar que pode causar incapacidades físicas e desfiguramento, sendo ainda imponente em nosso país, um problema de saúde pública em seis países incluindo o Brasil. Apenas uma fração dos indivíduos expostos ao *Mycobacterium leprae* desenvolve sintomas característicos da hanseníase. Os fatores relacionados à evolução da infecção para doença depende em parte de características genéticas do hospedeiro que influenciam o controle da infecção e à progressão da resposta imune. **Objetivo:** Avaliar se polimorfismos localizados na região cromossômica 17q11-q21 estão associados à hanseníase numa população oriunda do Rio Grande do Norte. **Material e métodos:** Foram estudados 215 pacientes de hanseníase e 229 controles sendo genotipados por Snapshot. Foram estudados variações em oito genes (NOS2A, CCL18, CRLF3, CCL23, TNFAIP1, STAT5B, CCR7 e CSF3) localizados na região cromossômica 17q11-q21. As freqüências genotípicas e alélicas foram determinadas por contagem direta e as diferenças na distribuição dessas entre os casos e os controles foram avaliadas por qui-quadrado usando o pacote estatístico SPSS versão 15, e Graph Prism Pad versão 4.0. **Resultados:** Nossos resultados mostraram que os marcadores NOS2A-277, NOS2A-rs16949, CCR7-rs11574663 e CSF3-rs2227322 apresentam forte associação com a hanseníase e seus genótipos de risco foram GG, TT, AA e GG respectivamente, apresentando todos padrão de herança recessivo. O marcador NOS2A-277 e CCR7-rs11574663 indicou maior probabilidade de risco no desenvolvimento a hanseníase em (OR = 3,92, p = 0,0001). A avaliação de haplótipos mostrou que CSF3-rs2227322-CC, CCR7-rs11574663-GA, NOS2A-rs16949-CT e NOS2A-277-GA estão relacionados com a proteção para o desenvolvimento da doença. Quando analisamos a distribuição genotípica dos marcadores estudados entre as formas clínicas paucibacilar e multibacilar, foram encontrados que os marcadores NOS2A-277-GG, CCR7-rs11574663-AA e CSF3-rs2227322-GG apresentavam uma forte associação com o polo multibacilar enquanto que o marcador NOS2A-rs16949-TT foi associado a forma paucibacilar. **Conclusões:** Os genes NOS2A, CCR7 e CSF3 possuíram grande importância na resposta imune contra o *Mycobacterium leprae* e que modificações na seqüência nucleotídica desses genes alteram a forma como agem no controle e desenvolvimento da hanseníase. Os polimorfismos nesses genes possuem uma maior probabilidade de risco quando analisados combinados. A maior susceptibilidade induzida pelos polimorfismos nesses genes está ligada a forma como evolui a doença sendo

alguns deles associados a uma doença mais severa e outros a forma mais branda. Estes dados validam que o agregado de genes presentes no cromossomo 17 que expressam moléculas importantes para manutenção do equilíbrio imune e que contribuem de forma intensa para a proteção contra microorganismos intracelulares como o *Mycobacterium leprae* podem ter suas funções comprometidas por alteração de suas seqüências nucleotídicas.

Palavras-chave: Polimorfismos, hanseníase, SNP, susceptibilidade genética

Abstract

Background: Leprosy can cause severe disability and disfigurement and is still a major health in different parts of the world. Only a subset of those individuals exposed to the pathogen will go on to develop clinical disease and there is a broad clinical spectrum amongst leprosy patients. The outcome of infection is in part due to host genes that influence control of the initial infection and the host's immune response to that infection.

Aim: Evaluate if polymorphisms type SNP in the 17q11-q21 chromosomal region contribute to development of leprosy in Rio Grande do Norte population.

Material and methods: A sample composed of 215 leprosy patients and 229 controls drawn from the same population were genotyped by using a Snapshot assay for eight genes (NOS2A, CCL18, CRLF3, CCL23, TNFAIP1, STAT5B, CCR7 and CSF3) located in chromosomal region 17q11-q21. The genotype and allele frequency were measured and statistical analysis was performed by chi-square in SPSS version 15 and graph prism pad version 4 software.

Results: Ours results indicated that the markers NOS2A-277, NOS2A-rs16949, CCR7-rs11574663 and CSF3-rs2227322 presented strong association with leprosy and their risk genotype were GG, TT, AA and GG respectively. The risk genotypes for all markers associated to leprosy presented recessive inheritance standard. When we compared the interaction among the markers in different combination we find that the marker NOS2A-277 associated with CCR7-rs11574663 presented highest risk probability to development of leprosy. When we evaluated the haplotype of the risk markers it was found a haplotype associated with increase of the protection (CSF3-rs2227322-CC, CCR7-rs11574663-GA, NOS2A-rs16949-CT and NOS2A-277-GA). The association of the clinical forms paucibacillary and multibacillary with markers showed that to the markers NOS2A-277-GG, CCR7-rs11574663-AA and CSF3-rs2227322-GG there were a strong influence to migration to multibacillary pole and to marker NOS2A-rs16949-TT the high proportion was found to the paucibacillary form.

Conclusions: Changes in the genes NOS2A, CCR7 and CSF3 can influence the immune response against *Mycobacterium leprae*. The combination among these polymorphisms alters the risk probability to develop leprosy. The markers type SNP associated to development of the leprosy also are linked to clinical forms and its severity being the polymorphism NOS2A-rs16949-TT associated with paucibacilar form and the polymorphisms NOS2A-277-GG, CCR7-rs11574663-AA and CSF3-rs2227322-GG associated to multibacilar form.

Key-words: Polymorphisms, genetic susceptibility, leprosy, SNP

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TAXAS DE PREVALÊNCIA E DETECÇÃO DA HANSENÍASE NO BRASIL.....	17
FIGURA 2 – PAÍSES QUE NÃO ATINGIRAM A TAXA DE PREVALÊNCIA PARA HANSENÍASE.....	17
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DO <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	20
FIGURA 4 - EVOLUÇÃO CLÍNICA DA HANSENÍASE.	24
FIGURA 5 – TAXA DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE NO FINAL DE 2005.	29
FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE HANSENÍASE NO BRASIL E O IDH DAS REGIÕES..	29
FIGURA 7- NÚMERO DE CASOS DE HANSENÍASE.....	31
FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE HANSENÍASE NO RIO GRANDE DO NORTE.	31
FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA HANSENÍASE NO BRASIL EM 2005.....	32
FIGURA 10 - RESPOSTA TH1 E TH2 AO <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	33
FIGURA 11 - GENES DE SUSCEPTIBILIDADE IMUNOLÓGICA A DIVERSAS DOENÇAS INFECCIOSAS....	38
FIGURA 12 - ESTUDOS DE VARREDURAS DO GENOMA	42
FIGURA 13 - CIDADES INCLUÍDAS NO ESTUDO.....	46
FIGURA 14 - MAPA FÍSICO DO CROMOSSOMO 17..	50
FIGURA 15 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE SNAPSHOT	55
FIGURA 16 - ELETROFEROGRAMA DO MARCADOR -1026 DO GENE NOS2A.	60
FIGURA 17 - DELIMITAÇÃO DOS “BINS” DE CADA MARCADOR NO PAINEL 2 DO CROMOSSOMO 17... ..	61
FIGURA 18 - DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS ENTRE OS CASOS E CONTROLES.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE	22
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS FORMAS CLÍNICAS.....	22
TABELA 3 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CLASSIFICAÇÕES.....	24
TABELA 4 – TAXA DE PREVALÊNCIA E DETECÇÃO DA HANSENÍASE.	32
TABELA 5 - VARIAÇÕES NA SEQÜÊNCIA DE DNA NO GENOMA HUMANO	36
TABELA 6 - TAXAS DE PREVALÊNCIA E DE DETECÇÃO	46
TABELA 7 - CASOS NOVOS DE HANSENÍASE.....	47
TABELA 8 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS GENOTIPADOS PARA CADA MARCADOR ESTUDADO	49
TABELA 9 - PRIMERS DE PCR USADOS PARA O CROMOSSOMO 17	51
TABELA 10 - PRIMERS DE SNAPSHOT DE CADA MARCADOR	52
TABELA 11 - CARACTERÍSTICAS SÓCIO-ECONÔMICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	58
TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS CASOS DE HANSENÍASE NA AMOSTRA ESTUDADA ..	59
TABELA 13 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	62
TABELA 14 - DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS MARCADORES ENTRE CASOS E CONTROLES.	66
TABELA 15 – MODELO	70
TABELA 16 - RELAÇÃO ENTRE OS ALELOS ASSOCIADOS COM A HANSENÍASE	71
TABELA 17 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS MARCADORES ENTRE OS CASOS E CONTROLES.....	72
TABELA 18 - MODELOS INTERATIVOS.....	75
TABELA 19 - HAPLÓTIPOS	76
TABELA 20 - DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA ENTRE OS CASOS PAUCIBACILAR E MULTIBACILAR.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	Hanseníase Borderline-borderline
BCG	Bacilo de “Calmette-Guérin”
BL	Hanseníase borderline-lepromatosa
BT	Hanseníase Borderline Tuberculoide
ENL	Eritema Nodoso Leproso
ENR	Eritema Nodoso Hansênico
HLA	Antígeno leucocitário humano
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
IMC	Imunidade Mediada por Células
INF-γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LL	Hanseníase Lepromatosa
M.leprae	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Hanseníase Multibacilar
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NRAMP1	Proteína 1 macrofágica associada a resistência natural
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Hanseníase paucibacilar
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGL-1	Glicolípido Fenólico 1

PQT	Tratamento poliquimioterápico
RR	Reação Reversa
SINAN	Sistema Nacional de Agravos e Notificações
SM	Salário mínimo
SNP	Polimorfismo de base única
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TT	Hanseníase Tuberculóide
UV	Ultra-violeta
VDR	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. A HANSENÍASE.....	16
1.1.1. Histórico	18
1.1.2. <i>Mycobacterium leprae</i>	19
1.1.3. Transmissão.....	20
1.1.4. Classificação	21
1.1.5. Sinais e Sintomas	25
1.1.6. Diagnóstico	25
1.1.7. Tratamento	27
1.1.8. Epidemiologia.....	28
1.1.9. Imunologia.....	33
1.1.10. Susceptibilidade genética à doenças infecciosas	35
1.2. VARIAÇÕES NO GENOMA HUMANO	36
1.3. POLIMORFISMOS E SUSCEPTIBILIDADE A DOENÇAS INFECCIOSAS	38
OBJETIVO GERAL	43
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	45
3.2. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	47
3.3. DESENHO DE ESTUDO.....	48
3.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DO DNA	48

3.5. GENES E MARCADORES ESTUDADOS	48
3.6. PRIMERS USADOS	51
3.7. GENOTIPAGEM.....	53
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
3.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	56
<u>4. RESULTADOS</u>	<u>57</u>
4.1. CARACTERIZAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA E CLÍNICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA	57
4.2. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SNAPSHOT	60
4.3. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG, FREQUÊNCIA ALÉLICA E GENOTÍPICA	61
4.4. MODELO DE INTERAÇÃO ENTRE OS MARCADORES.....	74
4.5. HAPLÓTIPOS GERADOS PELOS MARCADORES ASSOCIADOS À HANSENÍASE.....	76
4.6. DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA ENTRE OS CASOS PAUCIBACILARES E MULTIBACILAR	77
<u>5. DISCUSSÃO.....</u>	<u>80</u>
<u>6. CONCLUSÕES.....</u>	<u>87</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>89</u>
<u>APÊNDICES</u>	<u>98</u>

1. Introdução

1.1. A hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que acomete a pele, os nervos periféricos e, ocasionalmente, outros órgãos (COEYTAUX et al., 2007). O *M. leprae* apresenta grande afinidade pelas células de Schwann e macrófagos da pele, sendo a destruição destas células a principal razão da sua patogênese (AGRAWAL et al., 2005).

Nas últimas duas décadas, foi verificada uma redução na taxa de prevalência da hanseníase no Brasil, semelhante a outros países do mundo (Figura 1) (SEHGAL; SARDANA ; DOGRA, 2007) esta redução foi principalmente decorrente da adoção de um tratamento poliquimioterápico bastante eficiente, conforme estudos e recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (MANGLANI; ARIF, 2006), após a introdução do tratamento poliquimioterápico houve uma redução de aproximadamente 90% no número de doentes, no entanto, apesar dessa expressiva redução a taxa de detecção de novos casos não declinou, substancialmente, nos países mais endêmicos (PENNA ; PENNA, 2007), tal fenômeno mostra que apesar da eficácia do tratamento isso pouco influencia na transmissão bacteriana, mostrando que o diagnóstico precoce ainda é fundamental para a redução na taxa de prevalência a níveis recomendados pela OMS, cujo nível de detecção é 1:10000 permitirá eventualmente, o controle efetivo da doença.

Um total de 122 países endêmicos conseguiram eliminar a hanseníase entre os anos de 1985 e 2001. No entanto, a hanseníase permanece ainda um problema de saúde pública em seis países, incluindo o Brasil (Figura 2).

O conhecimento da genética das doenças infecciosas é considerado hoje uma ferramenta importante que poderá eventualmente auxiliar na profilaxia, no tratamento e no desenvolvimento de vacinas, assim como poderá ser útil na identificação de pessoas que são naturalmente resistentes ou susceptíveis às infecções (BEAMER; TURNER, 2005; HILL, 2006).

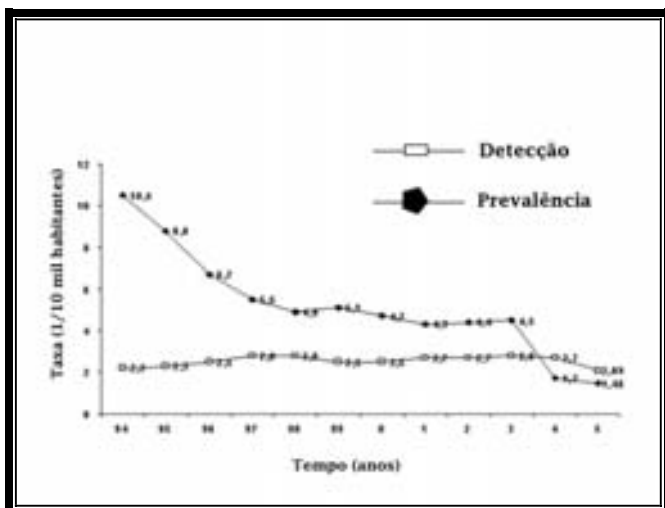


Figura 1 - Taxas de prevalência e detecção da hanseníase no Brasil. Nos últimos 10 anos a taxa de prevalência declinou no Brasil, reduzindo o número de doentes em 90%, resultado principalmente da introdução do tratamento poliquimioterápico em 1982, entretanto a taxa de detecção permaneceu estável nesse mesmo período, em virtude do diagnóstico tardio e da pequena influência do tratamento no ciclo infeccioso do *M. leprae*.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2008)

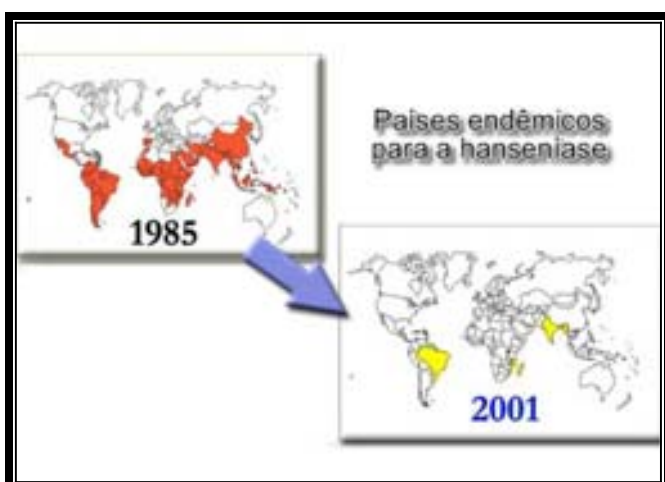


Figura 2 – Países que não atingiram a taxa de prevalência para hanseníase no mundo entre 1985 e 2001. Em 1985 havia 122 países considerados endêmicos mas em virtude do tratamento poliquimioterápico conseguiram em, sua maioria, reduzir as taxas de prevalência a níveis considerados satisfatórios pela OMS (1/10 mil habitantes). Em 2001 ainda havia 24 países considerados endêmicos dentre eles o Brasil, responsável por 90% dos casos de hanseníase das Américas. Os países marcados apresentam uma taxa maior que 1 caso/10 mil habitantes.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2008)

1.1.1. Histórico

A hanseníase parece ser uma das mais antigas doenças que acomete o homem (MONOT et al., 2005). Era considerada uma enfermidade incurável, geradora de preconceito, rejeição e discriminação por parte da sociedade geral. As referências escritas mais antigas datam de 600 A.C., e procedem da Índia e da África (MONOT et al., 2005). O termo *lepra* foi usado por Hipócrates ao descrever manifestações com lesões escamosas, não mencionando, no entanto, seus efeitos neurológicos. Esse termo também foi usado no Antigo Testamento da sagrada Bíblia, no livro de *Levítico* para designar as afecções “impuras” (GELBER, 1993).

Durante a Idade Média (século XII), uma elevada incidência da doença ocorreu no Oriente Médio e na Europa, principalmente em decorrência da elevada ocupação dessas regiões pelo homem. Nesse contexto a chance de infecção elevou-se devido a elevada densidade populacional. A Igreja católica foi a primeira instituição a tentar providenciar uma solução a curto prazo e estabeleceu regras para o isolamento dos doentes. Essas regras levaram à criação de leprosários, para acomodação dos portadores de hanseníase (MONOT, HONORE *et al.*, 2005).

Ao longo das Idades Moderna (1453-1789) e Contemporânea (a partir de 1789), observou-se um declínio na endemia européia, ocasionado principalmente pela melhoria das condições sócio-econômicas no continente (MEYERS ; MARTY, 1991). Ao mesmo tempo, surgiam focos endêmicos da doença na Ásia e na África.

Durante o período de colonização (período de conquistas portuguesas e espanholas e da imigração de escravos africanos), a América Latina tornou-se uma

nova área endêmica mundial. Os primeiros casos no Brasil foram notificados em torno do ano de 1600 (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1989).

O fato científico mais importante na história da hanseníase aconteceu na Noruega, em 1873, quando Gerhardt Henrik Amauer Hansen descobriu o agente causador da doença, o *M. leprae* (também denominado de bacilo de Hansen). Posteriormente, no Brasil, o nome lepra foi substituído por hanseníase em homenagem ao descobridor do agente etiológico, como tentativa de reduzir o estigma social originado dos conceitos populares e religiosos de impurezas e castigo divino e que eram facilmente identificados quando um paciente recebia a denominação de leproso (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1989).

Ao final da década de 40, o tratamento da doença foi revolucionado com a utilização da dapsona e seus derivados. Assim, os pacientes passaram a não necessitar mais dos leprosários, adotando tratamento em regime ambulatorial. Porém, o tratamento apenas com dapsona não foi eficaz, devido a resistência. No entanto, em 1982, foi iniciado o tratamento poliquimioterápico (PQT), composto por rifampicina (droga bactericida), a dapsona e a clofazimina (drogas bacteriostáticas), que tem mostrado eficácia. As diferentes formas clínicas da hanseníase recebem combinações distintas destas drogas, conforme apresentado abaixo.

1.1.2. *Mycobacterium leprae*

M. leprae é um bastonete imóvel, não formador de esporos, microaerófilo, ácido-resistente, reto ou levemente curvado (SCOLLARD et al., 2006), composto por uma parede celular que é um complexo covalentemente ligado de peptidoglicana-arabinogalactana-ácido micólico semelhante na composição a parede celular de

todas as micobactérias (BARKER, 2006) (Figura 3). O lipídio dominante na parede celular, que confere ao *M. leprae* especificidade imunológica, é o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) (SCOLLARD et al., 2006).

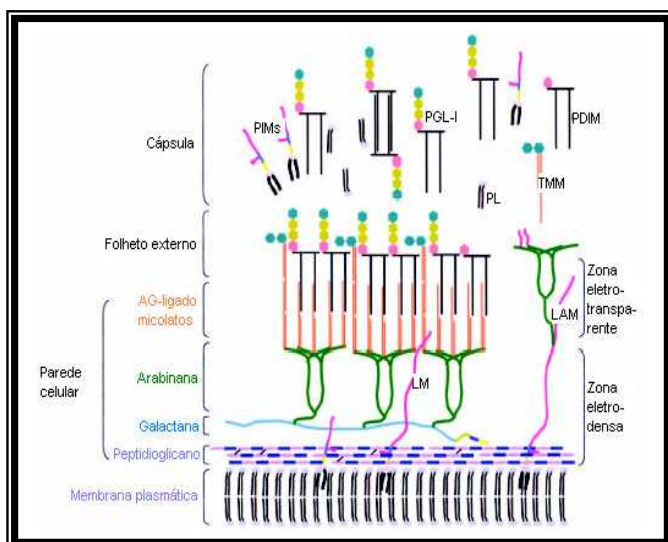


Figura 3 - Estrutura da parede celular do *Mycobacterium leprae*. A membrana plasmática é envolvida pela parede celular formada por peptidoglicano, covalentemente ligado a arabinogalactana. Três cadeias ramificadas da arabinana são ligadas a galactana. Os ácidos micólicos são ligados aos terminais das cadeias arabinana para formar o folheto interno de uma bicamada pseudolipídica. O folheto externo é formado pelos ácidos micólicos monomicolatos de trealose (TMM) e ácidos micocerosóicos de dimicocerosatos de ftiocerol (PDIMs) e glicolípido fenólico 1 (PGL-1). A cápsula presumivelmente composta por PGLs e outras moléculas como PDIMs, monossídeos de fosfatidilinositol e fosfolípidios envolve a bactéria. O glicolípido fenólico 1 (PGL-1), é a molécula responsável pela ligação específica do *M. leprae* a células alvos (Célula de Schwann e Macrófagos), assim como pela antigenicidade. Lipoglicanos como monossídeos de fosfatidilinositol, lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM) ancorados na membrana plasmática, são também encontrados na camada capsular.

FONTE: (VISSA; BRENNAN, 2001)

1.1.3. Transmissão

O mecanismo preciso da transmissão do *M. leprae* é desconhecido (SCOLLARD et al., 2006), a principal via de eliminação do bacilo e a provável via de entrada no organismo é a via respiratória. A pele é também uma possível porta de entrada e saída do bacilo, pois, pacientes com hanseníase lepromatosa não tratados podem eliminar grande número de bactérias de suas úlceras ou pele danificada,

porém, é possível que a pele seja uma porta de entrada apenas em inoculações acidentais e não há evidências de que possa haver infecção em pele íntegra (VAN BEERS; DE WIT ; KLATSER, 1996).

Os únicos reservatórios naturais conhecidos do bacilo são o homem e o tatu (*Priodontes*), apesar dos relatos de animais selvagens naturalmente infectados como o chimpanzé (DONHAM ; LEININGER, 1977) e o macaco *Sooty mangabey* (MEYERS; GORMUS ; WALSH, 1992).

O período de incubação é desconhecido, e pode variar de alguns meses a aproximadamente 30 anos (BRITTON ; LOCKWOOD, 2004; GODAL, 1978; VAN BEERS ; DE WIT ; KLATSER, 1996). Parte da população tem resistência inata ao bacilo e, quando adoece, manifesta as formas clínicas chamadas paucibacilares, na qual há presença de poucos bacilos, insuficientes para a transmissão. Estas pessoas não alimentam a cadeia de transmissão. No entanto, os indivíduos que manifestam as formas multibacilares e, se não forem tratados, vão se constituir nas fontes de infecção e são mantenedores da cadeia de transmissão.

1.1.4. Classificação

A classificação de Madri (1953) (CHAUSSINAND, 1953) divide a hanseníase em: Tuberculóide (T), Virchowiana (V), indeterminada (I) e em Dimorfa (D). Os quatro critérios que definem a classificação da doença estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios para classificação da hanseníase

Critérios	Características
Clínico	Tipo das lesões de pele e manifestações neurológicas
Bacteriológico	Exame de esfregaços de lesões de pele e mucosa nasal
Imunológico	Reação à lepromina
Histopatológico	Aspectos histopatológicos das lesões

Fonte: (MOSCHELLA, 2004)

As formas clínicas da hanseníase, na classificação de Madri (1953), considerando-se aspectos bacteriológicos e resposta à intradermoreação de Mitsuda, estão relacionadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características das formas clínicas através da reação de Mitsuda e baciloscopia, usando a classificação de Madri.

	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Dimorfa (D)	Virchowiana (V)
Reação de Mitsuda	Positiva ou Negativa	Fortemente positiva	Negativa a positiva fraca	Negativa
Baciloscopia	Negativa	Negativa	Positiva a raros bacilos	Positiva

FONTE: (SOUZA, 1997)

Uma classificação segundo rígidos critérios clínicos, histopatológicos, imunológicos e bacteriológicos foi proposto por RIDLEY; JOPLING, 1966. Segundo estes autores, a hanseníase pode ser classificada em cinco grupos: tuberculóide-tuberculóide (TT), lepromatosa-lepromatosa (LL), *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatosa (BL) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Pacientes que não se enquadram em nenhum dos cinco grupos acima são definidos como portadores de hanseníase indeterminada (I).

Em 1982, o Grupo de Estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou a classificação para hanseníase segundo os critérios propostos por Ridley-Jopling e a carga bacteriana presente na linfa (STINGL, 1982). Nesta classificação, criada essencialmente para fins terapêuticos, os pacientes TT e BT com índice bacteriológico (IB) $\leq 2+$ foram classificados como paucibacilares e BB, BL e LL com IB $> 2+$ foram classificados como multibacilares. O IB reflete o número de bacilos ácido-resistentes por média dos campos microscópicos imersos em óleo e é expresso em uma escala semilogarítmica de 0 a 6+(MOSCHELLA, 2004).

Em 1988, o Comitê Técnico em Hanseníase da OMS recomendou que qualquer paciente com esfregaço positivo fosse classificado como multibacilar. Em 1998, este Comitê declarou que os esfregaços não eram suficientes para orientar o tratamento e que o número de lesões presentes deveria ser a base para a classificação. As normas para diagnóstico clínico recomendadas foram: pacientes que não sofrem de reações e possuem menos de cinco lesões são classificados como paucibacilar (PB) e aqueles com mais de cinco lesões são classificados como multibacilar (MB) (MOSCHELLA, 2004). As classificações adotadas para as formas clínicas da hanseníase, a de Madri, a de Ridley e Jopling e da OMS podem ser correlacionadas como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley e Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase

Madri	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Dimorfa (D)			Virchowiana (V)
Ridley e Jopling	I	TT	BT	BB	BL	LL
OMS	Paucibacilares			Multibacilares		

FONTE: Adaptado de SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 326, Jul./Set. 1997.

A inter-relação entre as formas clínicas e suas características de resposta imunocelular e baciloscopia pode ser visualizada na Figura 4.

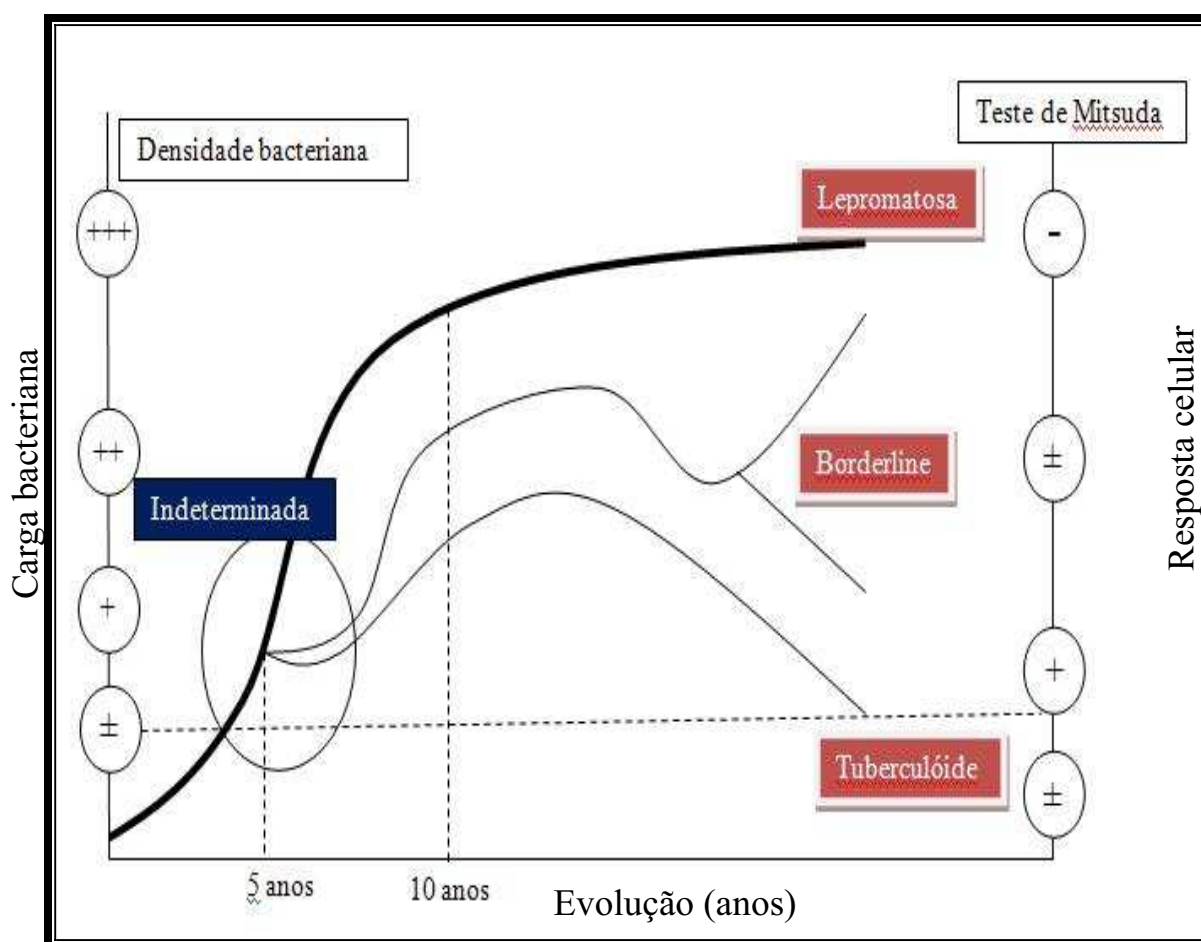


Figura 4 - Evolução clínica da hanseníase. A hanseníase tem um longo período de incubação sendo que os primeiros sintomas aparecem em média com 5 anos, inicialmente de forma inespecífica caracterizando a forma clínica indeterminada. O indivíduo infectado pode evoluir para o pólo lepromatoso caracterizado por baixa imunidade celular e elevada proliferação micobacilar ou para a forma clínica tuberculóide caracterizada por eficiente resposta celular e controle da proliferação do bacilo. (Adaptado de Gentilini & Duflo, *Médecine Tropicale*, Flammarion Médecine-Sciences)

1.1.5. Sinais e Sintomas

A hanseníase é uma doença infecciosa que se manifesta através de sinais e sintomas dermatoneurológicos, importantes na elaboração do diagnóstico clínico da doença. As lesões de pele com diminuição ou ausência de sensibilidade (WALKER ; LOCKWOOD, 2007) estão freqüentemente presentes. As lesões mais comuns são: manchas esbranquiçadas ou avermelhadas, pápulas, infiltrações, tubérculos e nódulos (WALKER ; LOCKWOOD, 2007). A diminuição ou ausência da sensibilidade é causada pelo comprometimento de ramos sensitivos cutâneos. No entanto, na fase inicial da lesão, pode haver um aumento da sensibilidade (hiperestesia) acompanhada de uma sensação de formigamento (WALKER ; LOCKWOOD, 2007).

A resposta inflamatória induz lesão periférica resultando em incapacidade nas mãos e pés tornando-os insensíveis e possibilitando a ocorrência de queimaduras, ferimentos, úlceras, fissuras, etc., Além disso, a insensibilidade propicia uma maior freqüência de acidentes e predispõe às infecções que podem destruir as estruturas da pele, dos músculos, dos ossos e resultando em deformidades permanentes (FOSS, 1997).

1.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico para a hanseníase baseia-se nos sinais clínicos e nos sintomas característicos da doença, ou seja, as lesões ou áreas da pele com alteração de sensibilidade e o comprometimento dos nervos periféricos (FOSS, 1997). O processo de diagnóstico da hanseníase deve ser realizado através do exame clínico

e, quando disponível, o exame baciloscópio deve ser realizado, para confirmar ou descartar diagnósticos suspeitos.

O exame clínico tem como propósito fazer a avaliação dermatoneurológica buscando sinais e sintomas característicos da doença. A avaliação dermatológica busca identificar as lesões de pele e pesquisar o grau de sensibilidade dessas lesões, enquanto a avaliação neurológica busca identificar neurites, ou lesões de nervos periféricos e as incapacidades físicas e deformidades provocadas por essas lesões. Através do exame clínico do paciente, são identificados, também, os estados reacionais ou reações hansênicas quando há uma exacerbação dos sinais e sintomas da hanseníase, e é feito o diagnóstico diferencial com outras doenças dermatológicas e neurológicas.

O exame baciloscópio fornece informações sobre a presença do bacilo nas lesões suspeitas. Os bacilos têm mais predileção por áreas do corpo que devem ser sítios de coleta. Os sítios de coleta padronizados são: 1) As lesões dermatológicas ou áreas anestésicas se houver; 2) Lóbulos auriculares e 3) cotovelos (MOSCHELLA, 2004).

Para fins de diagnóstico, o paciente deve ser classificado operacionalmente em paucibacilar ou multibacilar (MOSCHELLA, 2004). A classificação é feita através do exame clínico e identificação do número de lesões dermatológicas. O doente é classificado como paucibacilar quando apresenta até cinco lesões de pele e sua baciloscopia for negativa e aquele com mais de cinco lesões de pele e baciloscopia positiva é classificado como multibacilar (MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL, 2006).

1.1.7. Tratamento

O tratamento da hanseníase é efetuado usando-se esquema poliquimioterápico (tratamento PQT) e acompanhamento do caso, visando diagnosticar e tratar intercorrências (estados reacionais, efeitos colaterais de medicamentos e recidivas), bem como prevenir e/ou tratar incapacidades e deformidades físicas provocadas pela doença.

O tratamento quimioterápido é composto por um conjunto de medicamentos associados, que foi padronizado pela OMS e é o esquema recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil. Compreende a rifampicina (droga bactericida), a dapsona e a clofazimina (drogas bacteriostáticas).

Nos casos paucibacilares, é utilizada a associação de dois medicamentos (rifampicina e dapsona) e nos casos multibacilares é utilizada a associação dos três medicamentos (rifampicina, dapsona e clofazimina). Para os pacientes com contra-indicação formal ou intolerância a algum medicamento desse esquema, são adotados esquemas alternativos, com a retirada do medicamento restritivo do esquema terapêutico.

A duração dos esquemas de tratamento PQT deverá obedecer aos prazos estabelecidos, ou seja, de 6-9 meses para os casos paucibacilares e de 12-24 meses para os casos multibacilares (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Alguns pacientes, durante o tratamento ou após o término, podem apresentar intercorrências como reações hansênicas e recidivas. O paciente em estado reacional deve, somente, receber o tratamento para a reação e o paciente com recidiva deve reiniciar o tratamento PQT de acordo com a classificação do paciente em paucibacilar ou multibacilar (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

1.1.8. Epidemiologia

A epidemiologia da hanseníase, particularmente sua distribuição geográfica, permanece com numerosas lacunas e enigmas. Várias das principais áreas atualmente endêmicas no mundo encontram-se sob clima tropical, elevadas temperaturas e altas precipitações pluviométricas. No entanto, esta doença já apresentou incidência alta em áreas temperadas da Europa, não obstante fosse eliminada sem uma explicação definitiva (MEIMA, IRGENS *et al.*, 2002).

Atualmente, 80% dos casos novos concentram-se em países localizados na faixa inter-tropical: Índia, Brasil; Myamar; Madagascar; Nepal e Moçambique (Figura 5). Discute-se também o papel da história da ocupação dos territórios como fundamento da manutenção dos focos da doença. No entanto, geralmente é aceita a associação da hanseníase com condições desfavoráveis de vida, considerando-se fatores econômicos, higiênicos, sanitários e biológicos como predisponentes.

Entre os fatores sociais relacionados à distribuição geográfica da doença, destacam-se as condições higiênicas desfavoráveis e os movimentos migratórios (Magalhães e Rojas, 2007). Um comparativo entre a distribuição dos casos de hanseníase no Brasil e o índice de desenvolvimento humano (IDH) pode ser visto na Figura 6, que mostra claramente que a doença está associada com as regiões menos desenvolvidas.

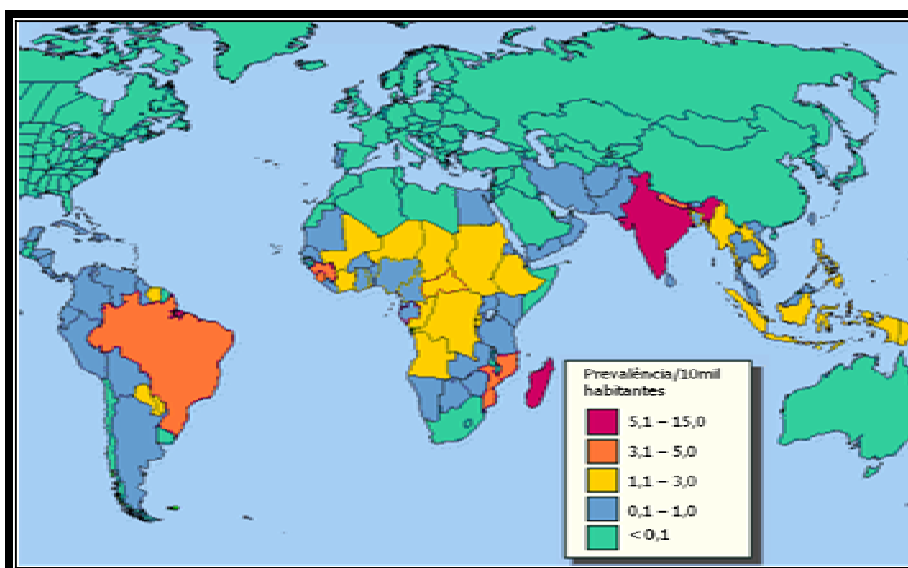


Figura 5 – Taxa de prevalência da hanseníase no final de 2005.
FONTE: OMS. Leprosy: prevalence rates at end 2005. Disponível em:
<http://www.who.int/lep/situation/PrateEnd2005v2-WM2.pdf> Acesso em: 23 Jul. 2007.

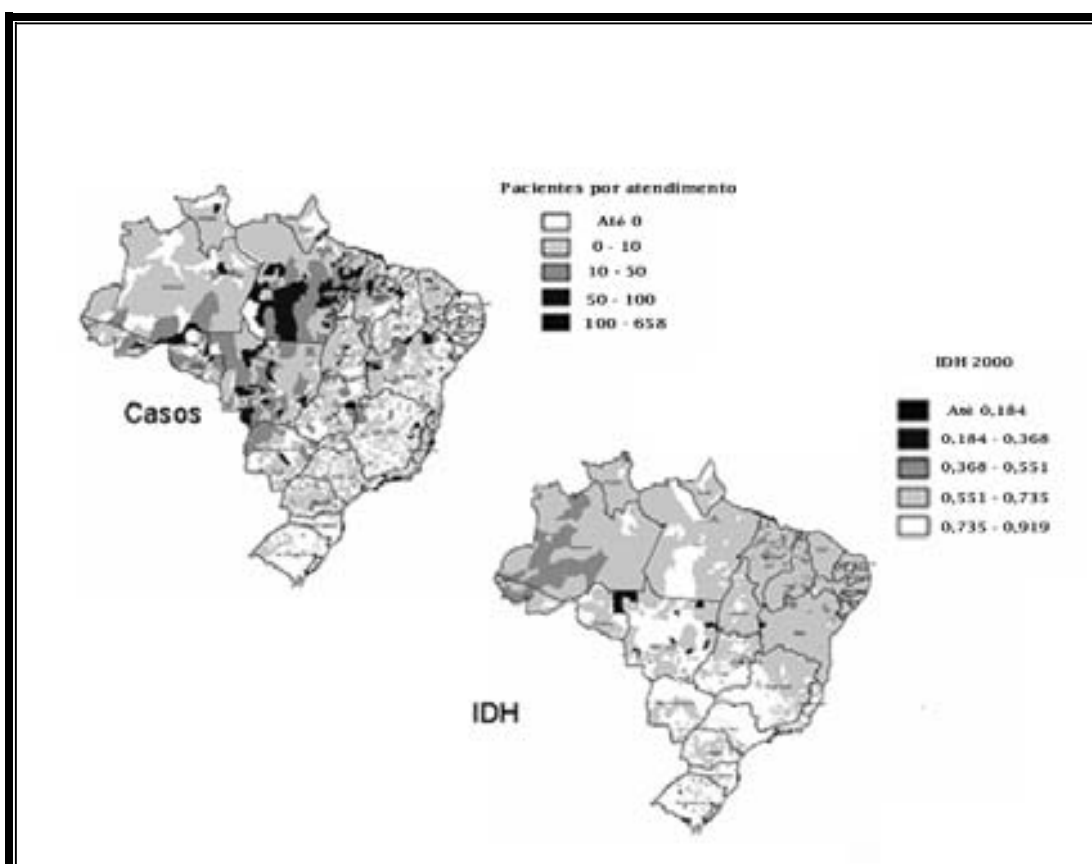


Figura 6 - Distribuição dos casos de hanseníase no Brasil e o IDH das regiões. As regiões com maiores taxas de prevalência (Norte e Centro-Oeste) são as que apresentam os menores índices de desenvolvimento do país.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2008)

Desde a implementação da poliquimioterapia (PQT/OMS), a prevalência global caiu cerca de 90%, sendo que quase 12 milhões de pacientes foram curados ao longo desses 15 anos (Figura 7) e 4 milhões de pessoas tiveram incapacidades físicas evitadas, entretanto, apesar da enorme redução na prevalência, tal estratégia de controle não mostrou redução na transmissão do agente. No Brasil a descoberta de novos casos vem mantendo-se estável há pelo menos 10 anos (Figura 1). Os pacientes novos já apresentam incapacidades físicas moderadas e graves ao diagnóstico, em cerca de 9% dos casos, indicando atraso na identificação e diagnóstico. Em 2004, foram diagnosticados 49.078 casos novos no Brasil, ficando evidente que esta endemia ainda é um importante problema para o país.

O Brasil manteve, nas duas últimas décadas, a situação mais desfavorável nas Américas e o segundo maior índice de detecção de novos casos do mundo. Dentro do Brasil a distribuição da doença não é homogênea, sendo os estados das regiões Norte e Centro-Oeste aqueles que apresentam os maiores coeficientes de prevalência e detecção de casos, seguidos pelo Nordeste (Tabela 4).

O Rio Grande do Norte, apesar de apresentar uma baixa taxa de prevalência, comparado aos demais estados da região Nordeste (Figura 99), tem uma distribuição de casos bastante heterogênea (Figura 8), apresentando municípios sem nenhum caso registrado nos últimos anos e outros com taxas de detecção tão altas quanto 10,52/10 mil habitantes (DIAS; DIAS ; NOBRE, 2005).

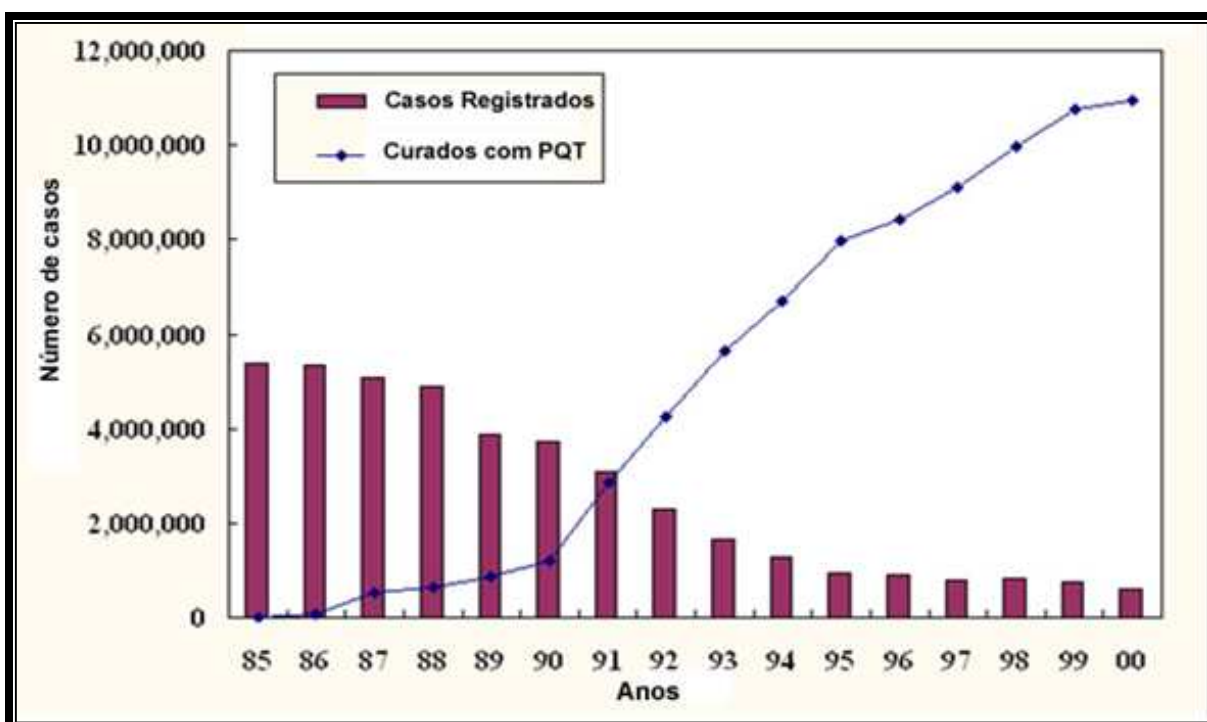


Figura 7- Número de casos de hanseníase registrados e número de pacientes curados com o tratamento poliquimioterápico (PQT) de 1985 – 2000 no mundo.

Fonte: OMS

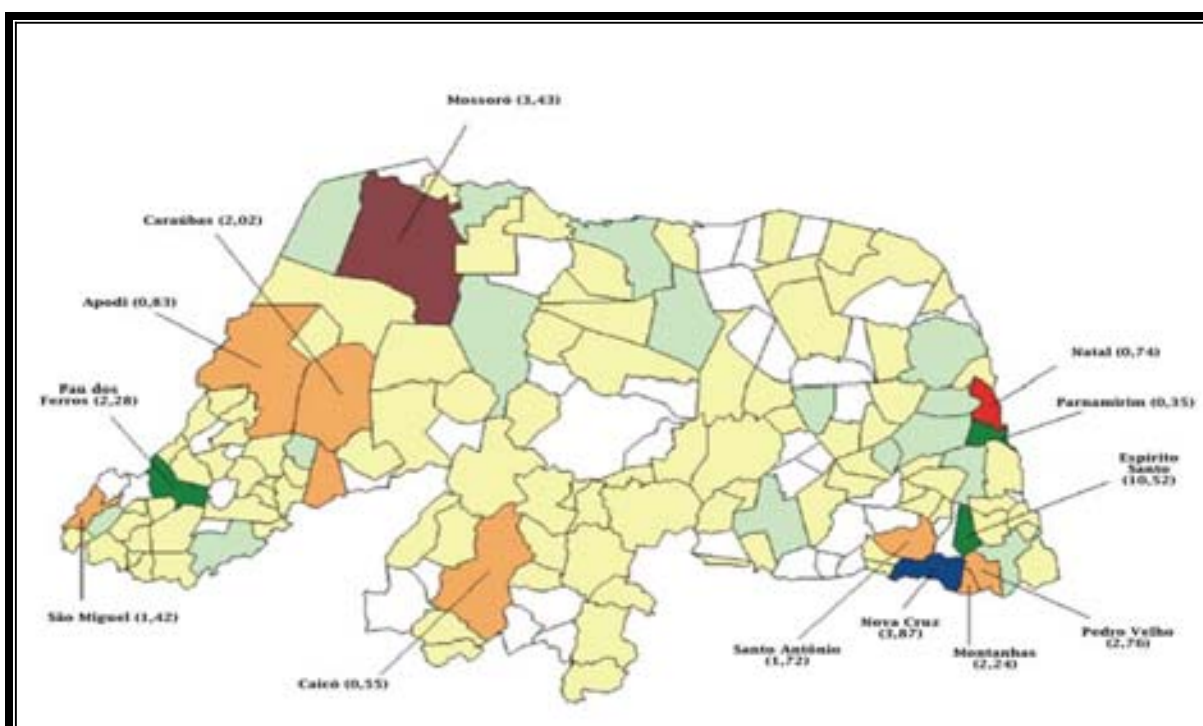


Figura 8 - Distribuição dos casos de hanseníase no Rio Grande do Norte entre 1998-2005. Os municípios em branco representam nenhum caso no período e os municípios em amarelo apresentaram apenas um caso.

Tabela 4 – Taxa de prevalência e detecção da hanseníase no Brasil em 2005 por região.

Região	Prevalência/10 mil hab.	Parâmetro	Detecção/10 mil hab.	Parâmetro
Norte	4,02	Médio	5,63	Hiperendêmico
Nordeste	2,14	Médio	3,07	Muito Alto
Sudeste	0,60	Baixo	0,88	Médio
Sul	0,53	Baixo	0,69	Médio
Centro-Oeste	3,30	Médio	4,41	Hiperendêmico
Brasil	1,48	Médio	2,09	Muito Alto

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010. Brasília. Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase, 2006.

Apesar das estratégias planejadas em coordenação com a OMS para a erradicação da hanseníase até o ano 2000, alguns países não conseguiram atingir a meta. Segundo NEIRA; DAUMERIE, 2000, a meta proposta não foi atingida devido à características peculiares a cada um dos países, tais como: alta prevalência da doença (Índia, Brasil e Nepal); países com intensa transmissão da doença (Índia e Madagascar); limitada cobertura geográfica dos serviços de PQT e guerra civil em alguns países destruindo a infra-estrutura dos serviços de saúde.

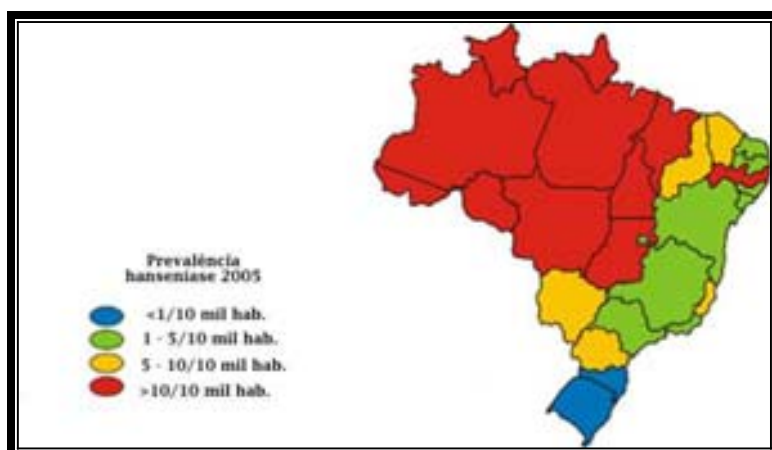


Figura 9 - Distribuição da hanseníase no Brasil em 2005. As maiores taxas de prevalências são encontradas nos estados das regiões norte e centro-oeste, enquanto que as menos são encontradas na região sul. No nordeste os estados do Maranhão e Pernambuco são os mais prevalentes, seguidos pelo Piauí e Ceará. O Rio Grande do Norte apresenta uma das menos taxas do Nordeste.

Fonte: SINAN

1.1.9. Imunologia

O estudo da interação entre patógenos e o sistema imune em pacientes portadores de doenças infecciosas têm fornecido modelos clínicos extraordinários para investigação dos mecanismos básicos da regulação da resposta imune celular humana, sendo a hanseníase um ótimo exemplo disso (GOULART; PENNA ; CUNHA, 2002).

As células T do tipo Th1 que produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (IFN- γ) estão presentes no pólo da doença mais localizada (pólo tuberculóide). O IFN- γ ativa macrófagos e a IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, facilitando a resolução da infecção por patógenos intracelulares. Por outro lado, as células T do tipo Th2, que produzem IL-4, IL-5 e IL-10 aumentam a resposta humoral. A IL-4 estimula a produção de IgE e, juntamente com a IL-10, estimulam células B e bloqueiam a ativação de macrófagos resultando em infecção progressiva (pólo lepromatoso) (FOSS, 1997) (Figura 10).

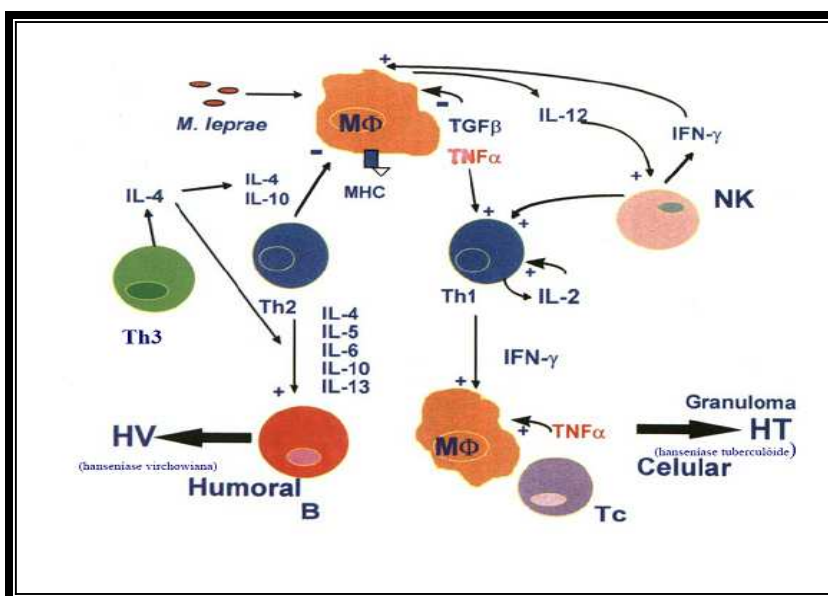


Figura 10 - Resposta TH1 e TH2 ao *Mycobacterium leprae*.
Fonte: FOSS, (1997)

A resistência à infecção pelo *M. leprae* está associada a produção de TNF- α e mediadores da oxidação, como os reativos intermediários do nitrogênio (e.g. NO) que são fundamentais para a destruição do bacilo no interior do macrófago (CHAN J. ; ET AL, 1992). Entretanto, o *M.leprae* pode escapar à oxidação intramacrofágica, sendo em parte devido aos antígenos PGL-1 (Glicolípido fenólico) e LAM (lipoarabinomanana) permitindo assim que o bacilo prolifere no interior do macrófago (FOSS, 1997).

Além do quadro clínico típico, doentes virchovianos apresentam, durante o tratamento específico, surtos reacionais caracterizados por nódulos eritematosos, febre, astenia, artralgia e outros achados compatíveis com um processo inflamatório. Foi observado que no eritema nodoso hansênico, comum em virchoviano, há aumento na produção de TNF- α , associado com a produção de proteína C reativa (PCR) isto pode sugerir que TNF- α pode atuar estimulando a reação inflamatória aguda, favorecendo o aparecimento dos sintomas característico da reação hansênica (FOSS; OLIVEIRA EB ; SILVA CL, 1993). As concentrações das citocinas IL-1 e TNF- α são maiores nas formas tuberculóides e dimorfas-tuberculóides, enquanto que as outras formas (Dimorfa e virchoviana) apresentam níveis baixos dessa citocinas e se relacionam com altas concentrações de IL-4 (ALMEIDA AM, 1996). Os títulos do anticorpo anti PGL 1 são maiores nas formas multibacilares (FOSS; CALLERA F ; ALBERTO FL, 1993) e se associaram com o aumento de IL-4 e redução de TNF- α e IL-1 (BONATO VLD, 1995). Entretanto, no eritema nodoso hansênico, mesmo com elevados níveis de anti-PGL I, ocorrem aumento de TNF- α e redução de IL-4. Também foi observado que com o tratamento poliquimioterápico específico para a hanseníase, os níveis de IL-4 são reduzidos, assim como o

número de bacilos e, em consequência, há redução nos títulos de anti-PGL I e aumento de TNF- α (BONATO VLD, 1995). Observa-se também que, em pacientes virchovianos e dimorfo-virchovianos, a produção de intermediários do nitrogênio, avaliada pela enzima oxido nítrico sintase induzida, está reduzida ou ausente (FIGUEIREDO F ; AL, 1997).

1.1.10. Susceptibilidade genética a doenças infecciosas

Na maioria das doenças infecciosas apenas uma proporção dos indivíduos expostos a um patógeno desenvolvem sintomas clínicos da doença (FINE, 1983b). Ao menos em parte, esta variabilidade individual é determinada pelo efeito combinado de proteínas do hospedeiro codificadas por uma série de genes participantes da resposta imune e que podem estar envolvidas na regulação da interação do microorganismo com o hospedeiro (BARKER, 2006). A identificação dos genes envolvidos na suscetibilidade/resistência do hospedeiro ao *M. leprae* permitirá um melhor entendimento da hanseníase e, provavelmente, facilitará o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Alguns aspectos da susceptibilidade à hanseníase já foram bem estudados (FERNANDO; BRITTON, 2006a; HILL, 2006) e neste sentido, estudos epidemiológicos já demonstraram que contatos intradomiciliares que possuem relação de parentesco exibem maior risco de desenvolver a doença do que pessoas não relacionadas geneticamente (MOET et al., 2006). Ainda, estudos com gêmeos também mostraram que a hanseníase é mais freqüente entre gêmeos monozigóticos quando comparado a gêmeos dizigóticos (HILL, 2001). Alguns estudos sugeriram que populações com diferentes origens étnicas, vivendo em área endêmica, exibem taxas de prevalências distintas (LAGRANGE ; ABEL, 1996) e que os níveis de

proteção da BCG são extremamente variáveis entre diferentes populações (PONNIGHAUS et al., 1992). Todas estas evidências tornam cada vez mais claro que o componente hereditário tem um papel determinante na susceptibilidade ou resistência à infecção pelo *Mycobacterium leprae*.

1.2. Variações no genoma humano

A seqüência do DNA entre as pessoas possui uma similaridade de 99,9% (KRUGLYAK ; NICKERSON, 2001), dentre os 0,01% de variação, cerca de 90% são polimorfismos de base única (SNP), que são definidos como variações num único nucleotídeo, numa freqüência mínima de 1% na população geral. Outras variações conhecidas no genoma humano são os minissatélites e microsatélites que são repetições de pequenas seqüências em tandem dos nucleotídeos; também são comuns inserções, deleções, inversões e duplicações (Tabela 5) (STACHAN T ; READ AP, 2004)

Tabela 5 - Variações na seqüência de DNA no genoma humano

Polimorfismo	Tipo	Tamanho	Número estimado no genoma humano	Referência
SNP	Bialélico	1 par de bases	11 milhões	Kruglyak e Nickerson, 2001
Inserção/deleção	Bialélico	1 a centenas de pares de bases	250.000	Weber et al, 2004
Microsatélite	Multialélico	1 a 6 pb	210.000 (2-3 nt/repet)	Lander et al, 2001
Minisatélites	Multialélico	6 a centenas pb	30.000 (>6 nt/repet)	Naslund et al, 2005

Fonte: ANNA RAUTANEN, (2007)

Alguns polimorfismos genéticos podem regular a expressão de diversos genes, inclusive os níveis de citocinas (KNIGHT ; KWIATKOWSKI, 1999). Os polimorfismos mais comuns e estudados são os microsátélites e os polimorfismos de base única (SNP). Estes últimos são mutações pontuais bialélicas (G-A, C-T, C-A e etc). Geralmente, dependendo da localização os SNPs podem modificar a afinidade de ligação a fatores transcricionais em regiões promotoras, ou modificar sítios de “splicing”. Quando os SNPs estão localizados em regiões codificantes, eles podem mudar a seqüência aminoacídica, levando a uma variação na estrutura ou função da proteína. Os SNPs presentes em regiões não codificadoras ou não funcionais também são úteis e podem funcionar como marcadores genéticos e são frequentemente utilizados em estudos de associação.

Uma combinação de dois ou mais polimorfismos é chamada de haplótipo e estas podem ser usadas como marcadores gênicos. A associação e a presença de haplótipos foi demonstrada na hanseníase (MALHOTRA et al., 2006; MORAHAN et al., 2007; OHYAMA et al., 2005). Há vantagens claras no uso de haplótipos em substituição a SNPs, pois, os primeiros conferem mais informação, tem maior poder de associação e dados epidemiológicos podem ser associados com evidências biológicas com o uso de haplótipos em vez de SNPs.

Aproximadamente 2/3 dos SNP são substituições entre os nucleotídeos A e G ou entre T e C (MATYAS et al., 2002). O número estimado de SNPs comuns, com freqüência alélica > 5% é de aproximadamente 7 milhões, entretanto, também existe um grande número de SNPs raros com freqüência alélica 1-5% perfazendo um total de aproximadamente 11 milhões de SNPs. Dos SNPs mais comuns, cerca de 85% podem ser encontrados compartilhados entre todas as populações, enquanto que os

15% restantes são restritos a populações específicas (KRUGLYAK ; NICKERSON, 2001).

1.3. Polimorfismos e susceptibilidade a doenças infecciosas

Vários genes já foram analisados em diversas populações e modelos de controle imunológico a diversas doenças infecciosas já foram propostos (Figura 11). Para a hanseníase os genes associados a susceptibilidade estão localizados nos cromossomos 6, 10, 17 e 20 (FRODSHAM, 2004).

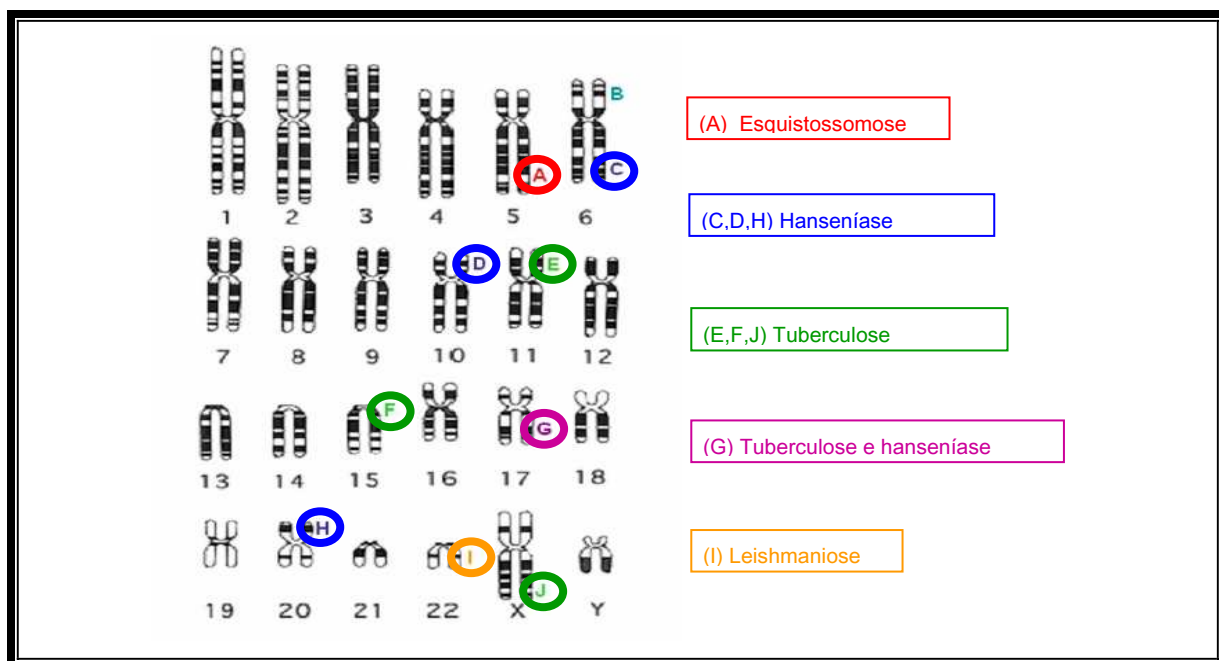


Figura 11 - Genes de susceptibilidade imunológica a diversas doenças infecciosas. Na hanseníase estudos demonstraram que polimorfismos nos genes TNF e LTA no cromossomo 6, no gene do receptor da manose localizado no cromossomo 10 assim como numa região cromossômica em 17q11-q21 e 20p12 estavam associados com a maior susceptibilidade para o desenvolvimento da hanseníase.

Fonte: Frodsham and Hill, Hum Mol Gen (2004)

A maioria dos polimorfismos associados a doenças infecciosas encontram-se em genes responsáveis pela expressão de moléculas envolvidas com a resposta

imune, sejam elas moduladoras, agonistas, receptores e antagonistas (VOLKMAN et al., 2007).

Entre os genes ou regiões cromossômicas estudadas que já foram implicadas na modulação da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase incluem genes relacionados ao complexo maior de histocompatibilidade. Variantes de HLA-DR2 entre irmãos afetados com hanseníase tuberculóide, mas não entre irmãos saudáveis ou afetados com hanseníase lepromatosa foi demonstrada (VAN et al., 1980). IZUMI et al., 1982 associaram variantes HLA-DR2 com hanseníase tuberculóide e lepromatosa. KIM et al., 1987 detectaram os antígenos HLA-DR1, DR2, DRw9 e DQw1 em frequência maior nos pacientes de hanseníase lepromatosa e tuberculóide do que no grupo controle. TODD; WEST ; MCDONALD, 1990 encontraram que os antígenos HLA-DR2 e DQw1 estavam associados com ambas as formas lepromatosa e tuberculóide da hanseníase. VAN et al., 1985 observaram que HDL-DR3 foi herdado preferencialmente por crianças com hanseníase tuberculóide em vez de hanseníase lepromatosa e que a susceptibilidade à hanseníase *per se* provavelmente não é controlada por genes ligados ao HLA.

Além dos genes ao HLA, outros genes mostraram-se associados a hanseníase *per se* ou a suas diversas formas clínicas em diferentes grupos populacionais, tais como: TAP (RAJALINGAM; SINGAL ; MEHRA, 1997), TNF (ROY et al., 1997), NRAMP1 (ABEL et al., 1998) e VDR (ROY et al., 1999)

Finalmente, o uso de estudos de varredura do genoma também realizados em diversos grupos étnicos (FIGURA 10) permitiu a identificação de áreas do genoma associadas a hanseníase. SIDDIQUI et al., 2001b identificaram uma região associada com a susceptibilidade à hanseníase no cromossomo 10 em uma população do sul da Índia. Segundo SCOLLARD et al., 2006, a maioria dos pacientes nestas famílias

tinha hanseníase tuberculóide (paucibacilar) e não está claro se o locus que foi identificado está associado à hanseníase *per se*, ou apenas à hanseníase tuberculóide. Neste contexto, MIRA et al., 2003a, estudando uma população vietnamita, confirmou que o locus no cromossomo 10p13 está envolvido apenas na hanseníase paucibacilar. TOSH et al., 2002 identificaram uma região de ligação no cromossomo 20 (20p12) como um locus de susceptibilidade em uma população recrutada em Tamil Nadu, região do sul da Índia. Porém, esta região do cromossomo não pareceu estar associada à susceptibilidade entre as famílias de Andhra Pradesh, outra região do Sul da Índia. MIRA et al., 2003a identificaram forte evidência de associação entre hanseníase *per se* (hanseníase independente de apresentações clínicas específicas) e a região cromossômica 6q25-q27 em 86 famílias afetadas com hanseníase do Vietnam do Sul. MIRA et al., 2004 investigaram mais além a região do cromossomo 6q25-26, previamente associada à susceptibilidade à hanseníase e identificaram variações dos genes *PACRG* e *PARK2* associadas com um risco maior de hanseníase. Inicialmente, a análise foi aplicada a 197 famílias vietnamitas independentes; em seguida, os resultados foram replicados em uma segunda amostra caso-controle de 975 indivíduos do Brasil (587 pacientes com hanseníase e 388 controles). Este gene foi inicialmente descrito associado a doença de Parkinson. JAMIESON et al., 2004b, identificaram um agrupamento de genes no cromossomo 17 (17q11-q21) foram associados ao controle da tuberculose e hanseníase. Esta região apresenta uma série de genes envolvidos na resposta imune (JAMIESON ET AL, 2004b). Através de estudo de “linkage” evidenciaram correlação entre alguns genes nessa região e uma provável tendência ao fenótipo doente.

O crescente número de pessoas com hanseníase no Rio Grande do Norte, e a observação da existência de agregação espacial (DIAS et al, 2007, QUEIROZ et al, 2008) que não é explicada unicamente por determinantes ambientais nos levaram a realizar o presente estudo para validar áreas gênicas que estudos prévios, que em outras populações, demonstraram estar associadas as formas clínicas da hanseníase.

A região cromossômica 17q11.2-12 é conhecida por conter um conglomerado de genes que expressam várias citocinas (BUGEJA et al., 2006), além de fatores de transcrição e a enzima óxido nítrico sintase responsável pela síntese do óxido nítrico, que possui diversas funções, dentre elas combater patógenos intracelulares (SCHON et al., 2001b). Alguns genes localizados nessa região cromossômica podem estar envolvidos com o desenvolvimento de uma maior susceptibilidade à hanseníase já que são responsáveis pela expressão de diversas citocinas.

Jamieson et al., 2004 demonstraram em uma população de Belém/PA a existência de dois picos com elevado Zlr score para a hanseníase usando microsátélites como marcadores, sendo estes, localizados numa região rica em polimorfismos do tipo SNP e contendo diversos genes candidatos para a regulação da resposta imune contra o *Mycobacterium leprae*. Nesse mesmo trabalho foram encontradas também fortes evidências de associação de marcadores SNPs com o desenvolvimento da tuberculose na mesma população. Os achados de Jamieson, foram a principal motivação para o desenvolvimento desse trabalho, sendo testado os marcadores SNPs associados à tuberculose na população de Belém/PA para a hanseníase na população do Rio Grande do Norte.

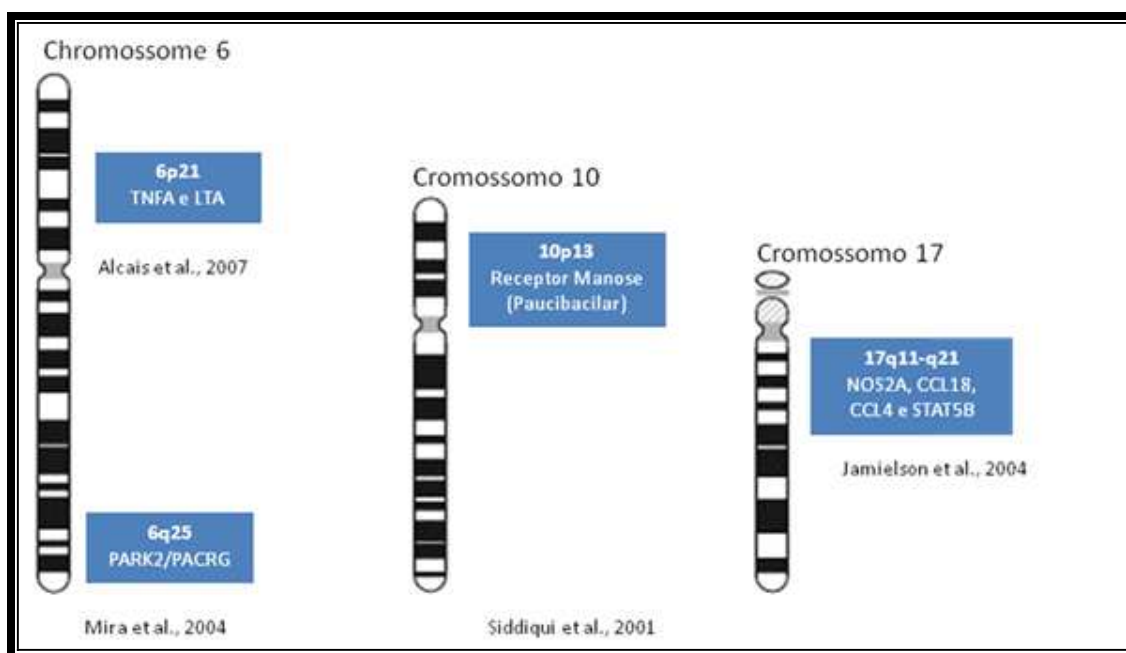


Figura 12 - Estudos de varreduras do genoma em busca de genes de susceptibilidade a hanseníase
Fonte: Alcais et al., 2007; Mira et. al., 2004; Siddiqui et. al., 2001 e Jamieson et. al., 2004

Objetivo geral

Avaliar se polimorfismos de base única (SNP) localizados no cromossomo 17, previamente já demonstrados estarem associados à hanseníase, estão associados as formas clínicas da hanseníase numa população oriunda do Rio Grande do Norte, Brasil.

2. Objetivos específicos

1. Verificar se há associação alélica e genotípica entre alguns marcadores da região cromossômica 17q11-q21 e o desenvolvimento da hanseníase;
2. Testar modelos da combinação de marcadores envolvidos com a doença e que avaliem se a interação entre eles, podem determinar diferenças no grau de susceptibilidade;
3. Identificar haplótipos que possam estar relacionados com a evolução frente à infecção por *Mycobacterium leprae*;

3. Material e métodos

3.1. Caracterização da área de estudo

A distribuição da hanseníase no estado do Rio Grande do Norte é bastante heterogênea, sendo que 85% dos municípios apresentam nenhum ou 1 caso, entretanto os 15% restantes são responsáveis por 90% dos casos, mostrando o fator de agregação e o maior risco de exposição para estas populações (Tabela 7). As cidades de Mossoró, Natal e Nova Cruz possuem uma taxa de prevalência média para hanseníase acima de 1 doente para cada 10.000 habitantes. (Figura 13).

Mossoró está situada na latitude sul 05°11'16" e na longitude Oeste 37°20'38". A cidade apresenta um clima semi-árido, com altitude de 16 m acima do nível do mar, e tem temperatura média de 27°C, com população de 229.784 habitantes e área é 2.108,9 Km². Mossoró possui uma taxa de prevalência média de 3,5 casos/10.000 habitantes e detecção de 5,6 casos/10.000 habitantes.

Natal está localizada na latitude sul 05°47'42" e longitude Oeste 35°12'34", possui uma altitude 30 m acima do nível do mar, sua população é 789.795 habitantes, área 169, 9 Km², clima tropical úmido, temperatura média 28 °C, a taxa de prevalência média é de 0,23 caso/10.000 habitantes e detecção de novos casos de 0,5 caso/10.000 habitantes.

Nova Cruz, cidade localizada na latitude sul 6°28'41" e longitude oeste 35°26'02", altitude 73 m, população 36.628 habitantes, área 283,4 Km², taxa de prevalência média de 1,3 casos/10.000 habitantes e detecção de 2,7 casos/10.000 habitantes. As taxas de prevalência e detecção das cidades participantes desse estudo podem ser visualizadas na Tabela 6.



Figura 13 - Cidades incluídas no estudo, que possuem elevada taxa de prevalência de hanseníase maior que 1 doente para cada 10 mil habitantes

Fonte: Secretaria Estadual de Saúde/RN

Tabela 6 - Taxas de prevalência e de detecção de novos casos nos municípios estudados, nos anos de 2004, 2005 e 2006

Cidades	Taxa de prevalência			Taxa de detecção de novos casos		
	2004	2005	2006	2004	2005	2006
Mossoró	2,3	4,9	3,3	3,8	8,5	4,7
Natal	0,3	0,2	0,2	0,6	0,5	0,4
Nova Cruz	2,8	0,6	0,6	5,1	1,9	1,1

Fonte: Datasus

Quase metade da população norte riograndense é exposta ao *Mycobacterium leprae* (Tabela 6), isso corresponde a apenas 8 municípios, o que mostra que ações governamentais podem ser facilmente desenvolvidas em prol da prevenção e que estratégias que diminuam a taxa de transmissão do *Mycobacterium leprae* são a melhor forma de ser atingida a meta de eliminação da hanseníase.

Tabela 7 - Casos novos de hanseníase, por município e percentual da população. Rio Grande do Norte, 2006

Carga da doença	Número de Municípios	População em 2006	% da população
Até 1 caso	141	1.325.820	43,56
1 a 3 casos	9	144.544	4,75
3 a 5 casos	9	246.157	8,09
5 a 20 casos	6	307.540	10,10
Mais de 20 casos	2	1.019.679	33,50
Total	167	3.043.740	100,0

Fonte: Relatório da situação do Rio Grande do Norte da Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. 2007.

3.2. Caracterização da população estudada

Um total de 215 indivíduos portadores de hanseníase e 229 controles foram estudados. Os controles foram selecionados dentre os cônjuges dos casos, por apresentarem o mesmo nível de exposição e condições nutricionais dos pacientes.

Foi feito um contato pessoal com cada participante, que recebeu esclarecimentos sobre os objetivos da pesquisa. Aqueles que concordaram foi preenchido um formulário com dados clínicos, epidemiológicos e sócio-econômicos e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

Para cada indivíduo foi solicitada a colaboração para responder a um questionário padrão (Apêndice B) para pacientes e (Apêndice C) para Controles referentes ao estilo de vida, nível sócio-econômico, local de nascimento, antecedentes pessoais e familiares sobre infecções dentre outros questionamentos.

Todos os homens e mulheres que participaram deste estudo tiveram seus diagnósticos, confirmados por baciloscopia ou biópsia, ou descartados através de um exame clínico, a faixa etária compreendeu pessoas entre 3 e 93 anos, que foram tratados para hanseníase no período de 1986 a 2008 nas cidades escolhidas para o

estudo ou aqueles tratados nos hospitais Onofre Lopes, Giselda Trigueiro nos anos de 2007 e 2008.

3.3. Desenho de estudo

Foi realizado um estudo tipo caso-controle, sendo avaliado se a presença de polimorfismos estariam influenciando na evolução clínica da doença.

3.4. Processamento das amostras e extração do DNA

As coletas de sangue foram realizadas através de punção venosa (8mL) coletados em tubos contendo EDTA, sendo subsequentemente extraído DNA pelo método "salting out". O DNA foi quantificado por espectrofotometria (ultrospec 1100, Amersham Pharmacia Biotech, EUA), com absorbância na faixa de 260 nm a 325 nm.

3.5. Genes e marcadores estudados

Conforme mencionado, diversas regiões com potencial de ligação e associação com a hanseníase já foram identificadas (JAMIESON et al., 2004b; MIRA et al., 2003b; SIDDIQUI et al., 2001a; TOSH et al., 2002) (Figura 12)

Os genes e os marcadores usados neste estudo são mostrados na Tabela 7. A relação entre os marcadores pode ser vista no mapa dos genes (Figura 14).

Tabela 8 - Número de indivíduos genotipados para cada marcador estudado

Gene	Marcador	Número de indivíduos genotipados	Casos	Controles
NOS2A	rs12450521	443	214	229
	-277	438	215	223
	rs944724	372	182	190
	-1659	342	176	166
	-2447	438	212	226
	rs16949	383	170	213
	-1026	430	207	216
TNFAIP1	rs1007398	415	199	216
CCL23	rs1003645	379	162	217
	rs1719204	376	161	215
CCL18	rs712043	383	164	219
	rs14304	370	159	211
	rs2015086	366	157	209
CRLF3	rs999798	219	88	131
	rs1061342	220	87	133
STAT5B	rs2230097	322	143	179
	rs3865361	297	131	166
	rs8064638	376	163	213
CCR7	rs11574663	377	162	215
	rs2023906	376	163	213
	rs3136685	373	160	213
CSF3	rs2827	379	165	214
	rs2227322	372	161	211

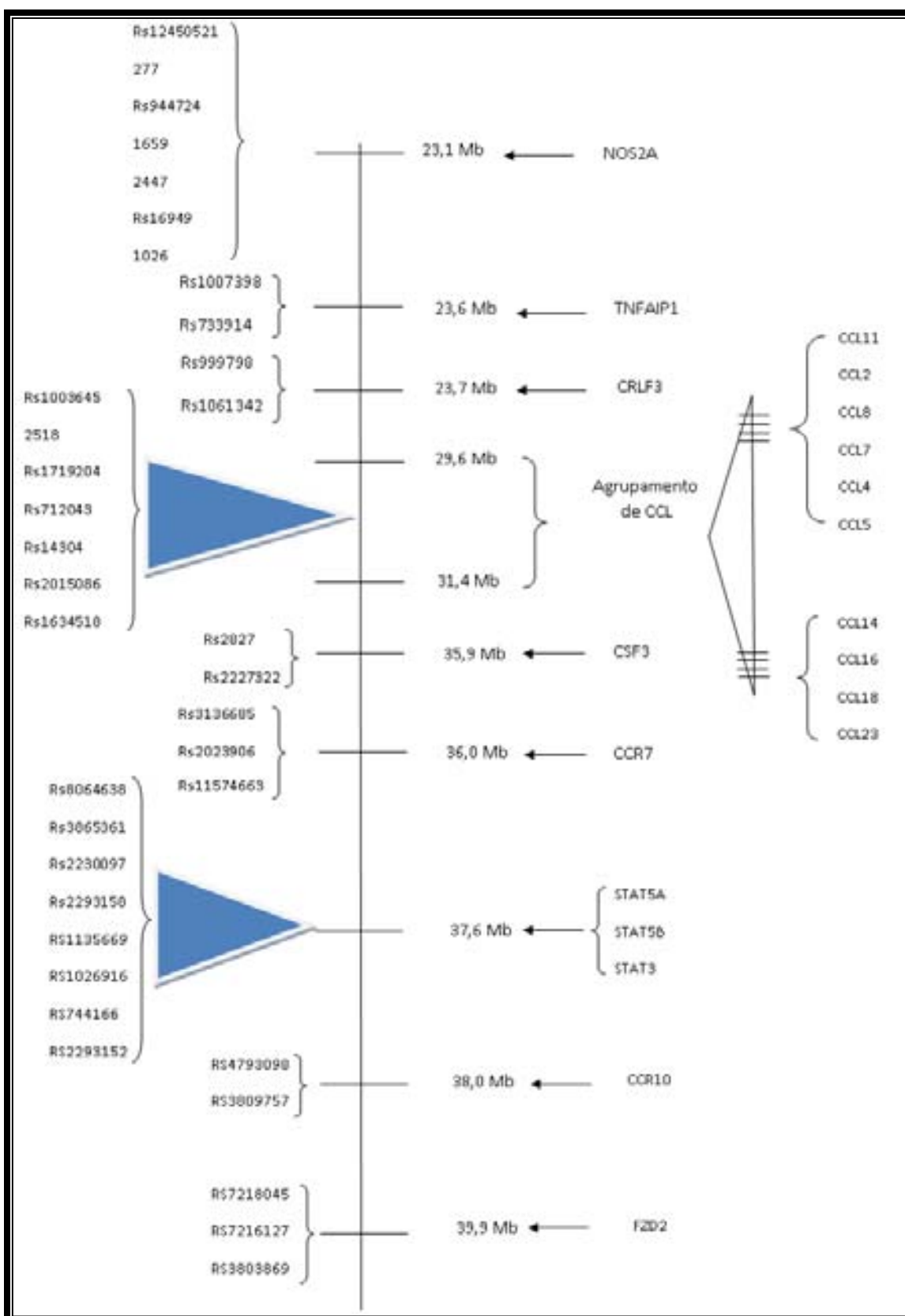


Figura 14 - Mapa físico do cromossomo 17. Os genes estudados ficam numa região de aproximadamente 15 Mb onde já foram descritos diversos polimorfismos e onde a maioria desses genes possuem papel na resposta imune.

Fonte: (JAMIESON et al., 2004b)

3.6. Primers usados

Os primers de PCR usados nas análises foram divididos em 3 painéis com 8 marcadores nos dois primeiros e 7 no último como pode ser vistos na Tabela 9. A Tabela 10 mostra os primers de Snapshot usados na genotipagem.

Tabela 9 - Primers de PCR usados para o cromossomo 17

Painel	Marcadores	Primers F	Primers R	Temp. (°C)	Frag. (pb)
1	NOS2A/rs12450521	GCAGAGGCCAAACCTAAGC	AGTCTCATGCGAGACTGTGC	65	251
	NOS2A-277	AGTTCAGAGGCCTGTCTGGA	TATGACTGTGACTGCCAGGG	65	385
	NOS2A/rs944724	CATGCCCATCAAAGACTGG	ATGCTTGAATTCTTGGCTCC	65	490
	NOS2A-1659	GCCAGAATATGTGAAAGCAGC	AGAAAGTGACAAGATGGCCG	68	296
	NOS2A-2447	GACCATAGCTCTCTGCAGCC	AAAGTGACAAGATGGCTGGG	65	257
	NOS2A/rs16949	GACAGATACACTCAGGGCCG	TGATTCTTCATGTCCCTCC	65	289
	TNFAIP1/rs1007398	TGGAACCAGTTAGAGAGGGC	TTCAGGAAGTTGGGACAAGG	65	393
	NOS2A-1026	CAGTGGTAGCAAAGTGTGGG	CTGCTCATTGCAACTTCTGC	65	393
2	CCL23/rs1003645	TTGACTGGGAAATCTGAGGG	TGAGAAACTGTTTATTAGATGAATTGC	65	345
	CCL18/rs712043	CATGGTACATCTATGCTGTTGG	GATACTGGTGTGCTGCTGTGC	65	266
	CCL18/rs14304	TCACACTGGTTGATCCATGC	TGGGTCCAGAAATACATCAGC	65	349
	CCL18/rs2015086	CAGACGAGGACAAGGAGGG	TAAGCATAATCCCTGGGTGC	68	353
	CCL23/rs1719204	CACTGTGGAGGGTGAGAAGG	CTCCAAGGAAGATCAGGACG	65	303
	CRLF3/rs999798	GAGTTTACGGCTGCTTCAGG	TATTGAGGTGAAAAGCTCGC	65	346
	CRLF3/rs1061342	TGATGTGTCTGGCAATAGGG	TGCTCAGGCTGGTCTTGG	65	463
3	STAT5B/rs2230097	CTGGAGGACACAATGGACG	CCATGCACAGAAACACTAAGG	65	242
	CCR7/rs3136685	GGTCAAACCCGAAATACTGG	GAGGCACACATCTCTCATGG	65	329
	CSF3/rs2827	ACGTGGGAGACAAGAAATCC	AGTCACAGTCCTGACCCTCG	65	318
	STAT5B/rs3865361	TTCTAGCTCTGGGCTGTTCC	GCCACCAAGATTCTCTCAGG	68	483
	CSF3/rs2227322	GGAGGAAGGGAGTTTGAGGG	ACATGCTGTTCCCTACCACC	65	463
	CCR7/rs2023906	GGAACCAGATTCAGCAGCTC	AGATAGGGCAGGATGTGGTG	68	488
	CCR7/rs11574663	TGCTGACAAGCAGAGTGTCC	TGTTTCTGATGAGCCTGCTG	69	471
	STAT5B/rs8064638	CAAGGCTCCACTTAACTCATCC	ATGTGGTGCTTCAAAGAGG	65	277

Fonte: (JAMIESON et al., 2004a)

Tabela 10 - Primers de Snapshot de cada marcador

Primer	Tamanho do fragmento (pb)	Polimorfismo	Fluorescência
NOS2A/rs12450521 CGAGGATGCTGTGGCCACA	20	A/C	Verde/Preto
NOS2A-277 AAACCTGGCTCCGTGGTGCCTCT	23	A/G	Verde/Azul
NOS2A/rs944724 CCAGCAAACCCAGAATTCCAAGAAAA	26	C/T	Preto/Vermelho
NOS2A-1659 TTTTTTTTTTCTTTCTTGAACAAGGCAGAAC	32	C/T	Preto/Vermelho
NOS2A-2447 TTTTTTTTTTTTTAGGACTACAGTAGCTGGGCATGCCA	38	C/G	Preto/Azul
NOS2A/rs16949 TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTATGTGGTGGTCTTGTGTAGA	42	T/C	Vermelho/Preto
TNFAIP1/rs1007398 TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAAAGATTCCAGCCTCCAGAGCAG	46	C/T	Preto/Vermelho
NOS2A-1026 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGGAATGAAATTATAGGCCGGGCAT	54	G/T	Azul/Vermelho
CCL23/rs1003645 ATAAGCAAGTTCAGGTTTGC	20	A/G	Verde/Azul
CCL18/rs712043 TGACACCAGCATCTCACCTCCT	22	T/C	Preto/Vermelho
CCL18/rs14304 TAGCAGATGGGACTCTTAGAAGAGGT	26	A/G	Verde/Azul
CCL18/rs2015086 CCTGGCCTCCTTCTGGGGTATGAGCTGT	28	C/T	Preto/Vermelho
CCL23/rs1719204 TTTTTTTTTTTTTTTGAGGGCACTCAGGGTGGGCCA	36	C/G	Preto/Azul
CRLF3/rs999798 TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAACCCGGGAGTTTGAAATTTGAA	42	C/T	Preto/Vermelho
CRLF3/rs1061342 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTTCTATTTCAAGAGCACACAAAGTA	48	C/T	Preto/Vermelho
STAT5B/rs2230097 CCATCTTCAGCTTCTTCATC	20	T/C	Preto/Vermelho
CCR7/rs3136685 CAGCAAGGAGCAAGAGGTGGGT	22	G/A	Verde/Azul
CSF3/rs2827 TTTTCCACGAATTTGCTGGGGAATCT	26	C/T	Preto/Vermelho
STAT5B/rs3865361 CATGGGTCAGGGCTGGGGTCAGAGTGAC	28	G/A	Verde/Azul
CSF3/rs2227322 TTTTTTGCCTCCATGGGGTTATGTATAAAGG	32	C/G	Azul/Preto
CCR7/rs2023906 TTTTTTTTTTTTGTCTCTATCTTTTTTCACACCCA	36	G/A	Verde/Azul
CCR7/rs11574663 TTTTTTTTTTTTTTTTTGGTACGGCATCCCTAAGGAATTTG	40	A/G	Verde/Azul
STAT5B/rs8064638 TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGAGCTCTAATACCATACCCT	44	G/A	Azul/Verde

Fonte: (JAMIESON et al., 2004a)

3.7. Genotipagem

Um total de 23 SNPs em 8 genes (NOS2A, TNFAIP1, CCL18, CRLF3, CCL23, STAT5B, CCR7 e CSF3) existentes na região cromossômica 17q11-q21 foram selecionados para genotipagem dos 444 indivíduos. Estes SNPs foram genotipados usando a técnica de Snapshot (Figura 15), que permite a genotipagem de múltiplos SNPs simultaneamente em uma única reação multiplexada. Este método está baseado na diferença de um único nucleotídeo na posição polimórfica, após uma reação de PCR; a diferenciação alélica é feita através da incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados, que provocam a terminação da extensão da cadeia, e desta forma a cadeia sintetizada terá em uma de suas extremidades uma base marcada com fluoróforo, cuja base será detectada quando da eletroforese capilar realizada no seqüenciador de DNA (MAKRIDAKIS ; REICHARDT, 2001).

3.7.1. PCR

Cada segmento gênico foi amplificado através de uma reação em cadeia de polimerase (PCR), usando um *mix* de PCR (MgCl 25 mM, dNTPs 5 mM, Betaína 5M, tampão 10X, ddH₂O), 60 ng de DNA genômico, um par de *primers* desenhado para a região de interesse, numa concentração de 100 ng/μL e 15U de *AmpliTaq*. As reações de PCR foram realizadas em termociclador My Cyclyer Bio Rad e seguiram o programa: 1 ciclo de 94°C por 10 minutos; 14 ciclos de 94°C por 20 segundos, 63°C por 1 minuto; 25 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 1 minuto e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram purificados do excesso de primers e nucleotídeos não incorporados por meio de degradação enzimática com as enzimas Exol (Exonuclease I) e SAP (Fosfatase Ácida de Camarão) respectivamente.

Após as reações de amplificação foi realizada uma eletroforese para controle da qualidade da PCR, aplicando-se 4 μL do produto de PCR em gel de agarose a 1,5% e submetendo-o a corrida eletroforética a 120 V por 30 minutos. O tampão TAE (Tris, 4,84g; Ácido acético, 1,14mL; 2mL EDTA 0,5M; água qsp 20mL) foi usado para o preparo dos géis e também para a corrida eletroforética. As bandas de cada produto de PCR após a corrida eletroforética foram visualizadas no transluminador de luz ultra-violeta e fotografadas através de um sistema de fotodocumentação computadorizado (Biorad Quantity one V. 4.6.1).

3.7.2. Snapshot

A esta alíquota foi adicionado 1 μL de uma mistura dos primers de Snapshot para cada um dos marcadores do painel, numa diluição 10:1 perfazendo para estes primers uma concentração final de 1 μM , também foi adicionado a reação 2,5 μL do master mix multiplex de Snapshot (Applied Biosystems, EUA) contendo tampão e ddNTPs marcados com o fluoróforo característico de cada base nucleotídica. Após a reação de Snapshot ser concluída, o produto foi purificado com a adição da enzima SAP numa quantidade de 1,5 U diluído numa proporção 2:1 com o tampão da enzima. Uma alíquota de 3 μL do produto de Snapshot purificado foi adicionado a cada poço de uma placa de 96 poços, sendo incluído 7,8 μL de formamida e 0,2 μL do marcador de peso molecular (Lys 120). As amostras foram então levadas ao seqüenciador automático de DNA (ABI Avant 3100) com 4 capilares, onde a separação dos produtos foi concluída em aproximadamente 12h. Após a leitura de todas as amostras e armazenamento dos dados em terminal de computador, estes foram analisados quanto ao seu genótipo através do software Genemapper. A figura 16 mostra o procedimento de Snapshot desde a amplificação do segmento de DNA até o seqüenciamento da base polimórfica.

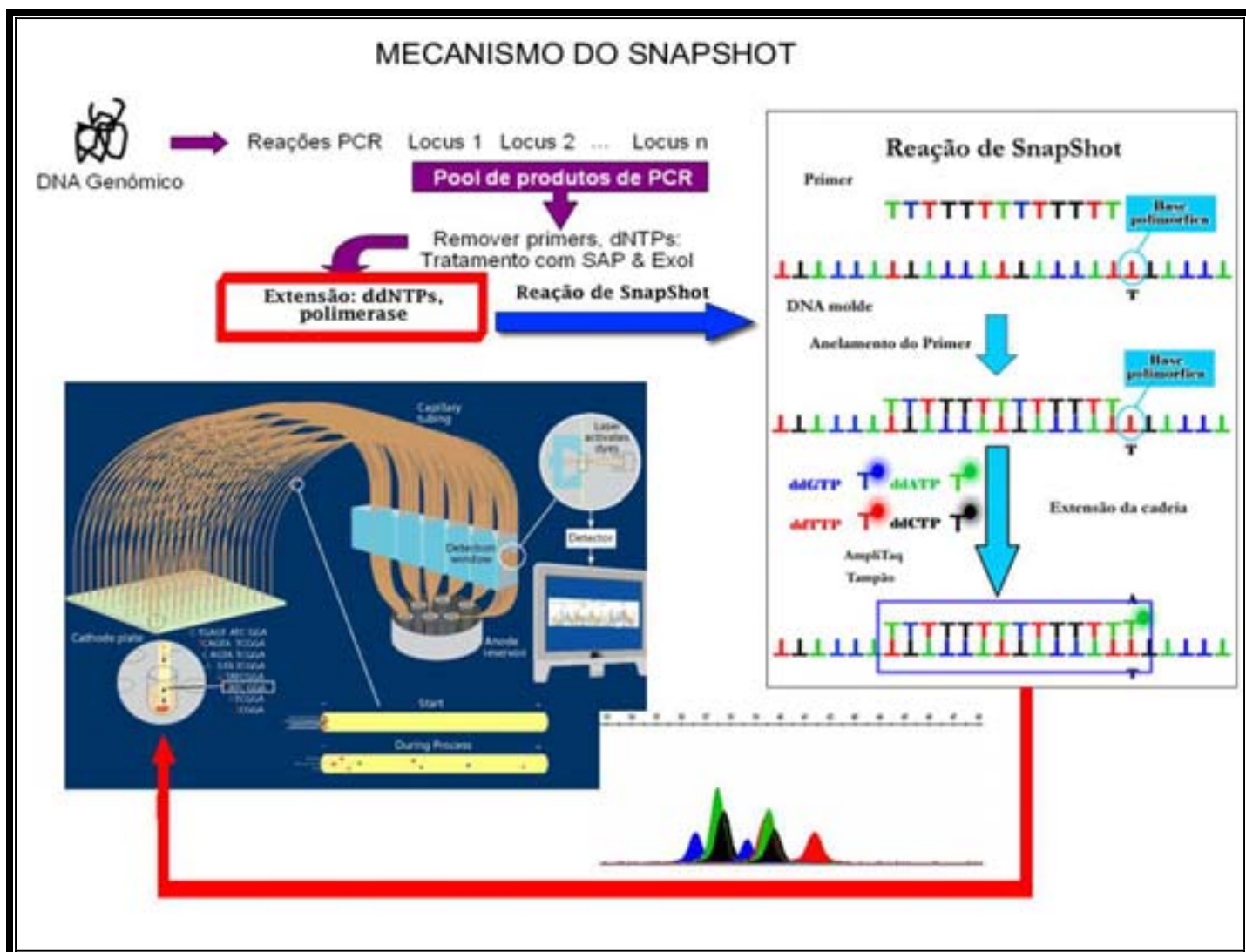


Figura 15 - Esquema da Reação de Snapshot

Fonte: Adaptado de www.jgi.doe.gov/education/how/electrophoresis.gif

3.8. Análise estatística

Para analisar a associação entre a variante polimórfica nos genes estudados e a Hanseníase foram comparadas as freqüências genotípicas e alélicas de casos e controles, através da análise das tabelas de contingência 2X2 e 3x2, para se obter o valor de P. Este valor foi obtido pelo teste qui-quadrado com auxílio do programa estatístico SPSS versão 15.0 e Prism Graph Pad versão 4.0. O valor de $P < 0,05$ foi adotado como limite de significância. Foi avaliado ainda a "Odds ratio" no intuito de se definir a probabilidade de risco.

3.9. Considerações éticas

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (CEP-UFRN), (Adendo D) sob o número de protocolo 617/2003 e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), protocolo 7504. Todos os pacientes foram informados dos objetivos da pesquisa, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4. Resultados

4.1. Caracterização sócio-econômica e clínica da população estudada

As características sócio-econômicas da população estudada estão mostradas na Tabela 10. Foram observadas diferenças significativas entre casos e controles com relação às faixas etárias. A maior parte das pessoas estudadas (31,5%) possuíam idade superior a 50 anos.

Com relação ao tempo de moradia, nível de escolaridade e renda familiar não foi observado diferença significativa entre os casos e os controles, sendo que a maioria das pessoas residiam no mesmo lugar por mais de 5 anos (55,6%), tinham no máximo primeiro grau completo (42,1%) e a renda familiar era de no máximo 2 salários mínimos (37,4%).

Com relação ao sexo foram encontradas diferenças significativas entre os casos e controles sendo que a maioria dos casos era do sexo masculino (56,6%, $p = 0,030$).

Com relação às características clínicas (Tabela 11) observou-se que quanto à classificação operacional a distribuição entre as forma paucibacilar e multibacilar foram praticamente idênticas. Quanto à forma clínica a maior proporção dos casos desenvolveu a forma TT (17,2%). Cerca de 40% dos casos não apresentou grau de incapacidade, no entanto cerca de 25% apresentou algum nível de incapacidade, mostrando que o diagnóstico ainda é tardio. Cerca de 21% dos casos tinham mais de 20 lesões indicando a maior gravidade da doença e cerca de 15% desenvolveram algum de tipo de reação hansênica, também condizente com proporção de pessoas com algum grau de incapacidade.

Tabela 11 - Características sócio-econômicas da população estudada

Característica	Controles N(%)	Casos N(%)	Total (%)	p
Idade				
• Abaixo de 20 anos	77 (34)	24 (11)	101(22,7)	<0,0001
• 20-30 anos	54 (24)	29 (13)	83 (18,7)	
• 31-50 anos	52 (23)	66 (31)	118 (26,6)	
• Acima de 50 anos	44 (19)	96 (45)	140 (31,5)	
• Sem informação	2 (<1)	0 (0)	2 (0,45)	
• Total	229	215	100,0	
Tempo de moradia				
• Menos de 2 anos	49 (21)	25 (12)	74 (16,7)	0,240
• 2 – 5 anos	17 (7)	17 (8)	34 (7,66)	
• Acima de 5 anos	143 (62)	104 (48)	247 (55,6)	
• Sem informação	20 (9)	69 (32)	89 (20,0)	
• Total	229	215	100,0	
Nível de Escolaridade				
• Primeiro grau	114 (50)	73 (34)	187 (42,1)	0,172
• Segundo grau	40 (17)	15 (7)	55 (12,4)	
• Terceiro grau	5 (2)	6 (3)	11 (2,50)	
• Sem escolaridade	34 (15)	27 (13)	61 (13,7)	
• Sem informação	36 (16)	94 (44)	130 (29,3)	
• Total	229	215	100,0	
Renda familiar				
• Sem renda	2 (<1)	3 (1)	5 (1,13)	0,562
• Menos de 2 SM	103 (45)	63 (29)	166 (37,4)	
• 2 – 4 SM	53 (23)	35 (16)	88 (19,8)	
• Acima de 4 SM	31 (14)	14 (7)	45 (10,1)	
• Sem informação	40 (17)	100 (47)	140 (31,6)	
• Total	229	215	100,0	
Sexo				
• Masculino	82 (36)	107 (50)	189 (42,6)	0,030
• Feminino	147 (64)	108 (50)	255 (57,4)	
• Total	229	215	100,0	

Sm=salário mínimo

Tabela 12 - Características clínicas dos casos de hanseníase na amostra estudada

Características	Observados	%
Classificação operacional		
• MB	73	33,9
• PB	72	33,5
• Sem informação	70	32,6
• Total	215	100,0
Formas clínicas		
• BB (Borderline-borderline)	17	7,90
• BL (Borerline-lepromatosa)	31	14,4
• BT (Borderline Tuberculóide)	22	10,2
• I (Indeterminada)	8	3,70
• LL (Lepromatosa-lepromatosa)	18	8,40
• TT (Tuberculóide-tuberculóide)	37	17,2
• Forma Neural	2	9,30
• Sem informação	80	37,2
• Total	215	100,0
Grau de incapacidade		
• 0	90	41,9
• 1	29	13,5
• 2	26	12,1
• Sem avaliação	70	32,6
• Total	215	100,0
Número de lesões/caso		
• 1 - 5	73	33,9
• 6 – 20	13	6,04
• Acima de 20	45	20,9
• Sem informação	84	39,1
• Total	215	100,0
Reação reversa	18	51,4
Eritema nodoso hansênico (ENR)	14	40,0
ENR e reação reversa	3	8,60

BB: Borderline-borderline; BL: Borerline-lepromatosa; BT: Borderline Tuberculóide; I: Indeterminada; LL: Lepromatosa-lepromatosa; TT: Tuberculóide-tuberculóide

4.2. Padronização da técnica de Snapshot

Conforme mencionado, a técnica de Snapshot permite a genotipagem de múltiplos SNPs em uma única reação, por esse motivo ela foi escolhida para os estudos de genotipagem aqui propostos.

Inicialmente foi determinada a forma como cada fragmento de Snapshot migrava no polímero de seqüenciamento POP4 sob as condições da eletroforese estabelecidas no protocolo. As informações de localização e cor dos fragmentos de SnapShot serviram de parâmetros para que o software Genemapper pudesse interpretar os dados oriundos do seqüenciador de DNA. Para se determinar o perfil eletroforético dos fragmentos de snapshot e, portanto, o posicionamento de cada alelo dentro do marcador três amostras teste foram utilizadas para a PCR, e procedeu-se a reação de Snapshot com cada marcador isoladamente (Figura 16).

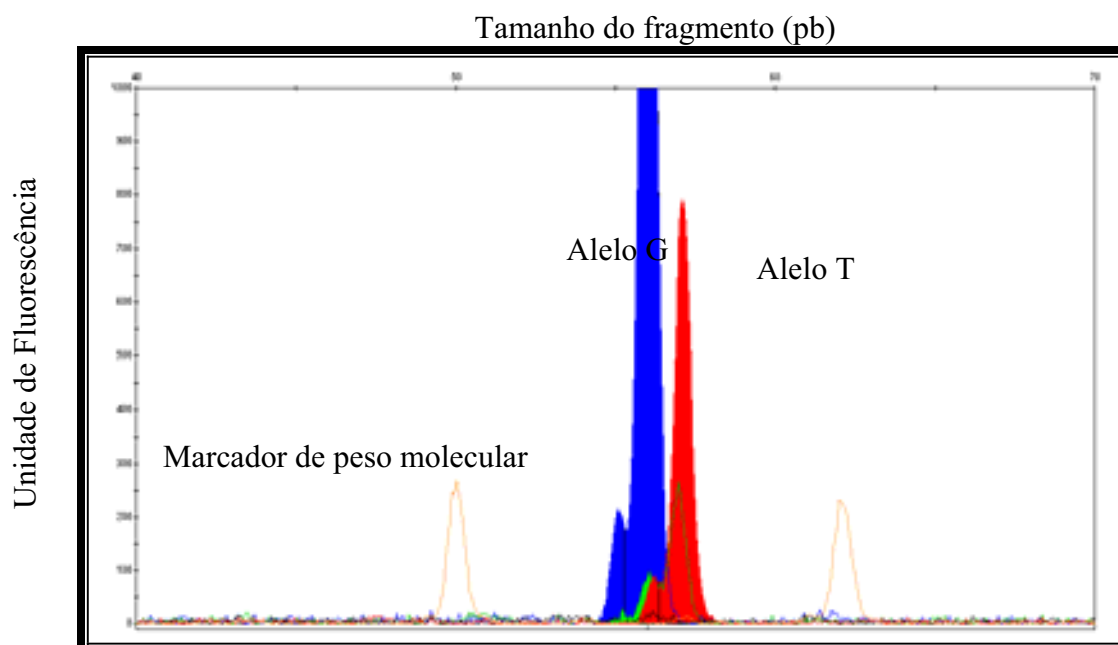


Figura 16 - Eletroferograma do marcador -1026 do gene NOS2A, mostrando a heterozigozidade do indivíduo testado e a localização dos picos em torno de 56 pares de bases. Observe que os picos são agudos e que a amostra não apresenta picos espúrios ou excesso de nucleotídeo não incorporado, o que indica a qualidade do material analisado.

A partir da reprodutibilidade do padrão de migração do fragmento de snapshot no polímero, delimitou-se uma faixa, onde normalmente os picos eram encontrados, este intervalo chamado de “Bin” é essencial para que o software Genemapper possa interpretar quais alelos são encontrados nos marcadores. Após a delimitação dos “bins”, procedeu-se com as reações de snapshot utilizando-se todos os produtos de PCR do mesmo painel juntos, desta forma foi determinado o genótipo de cada marcador do painel simultaneamente (Figura 19).

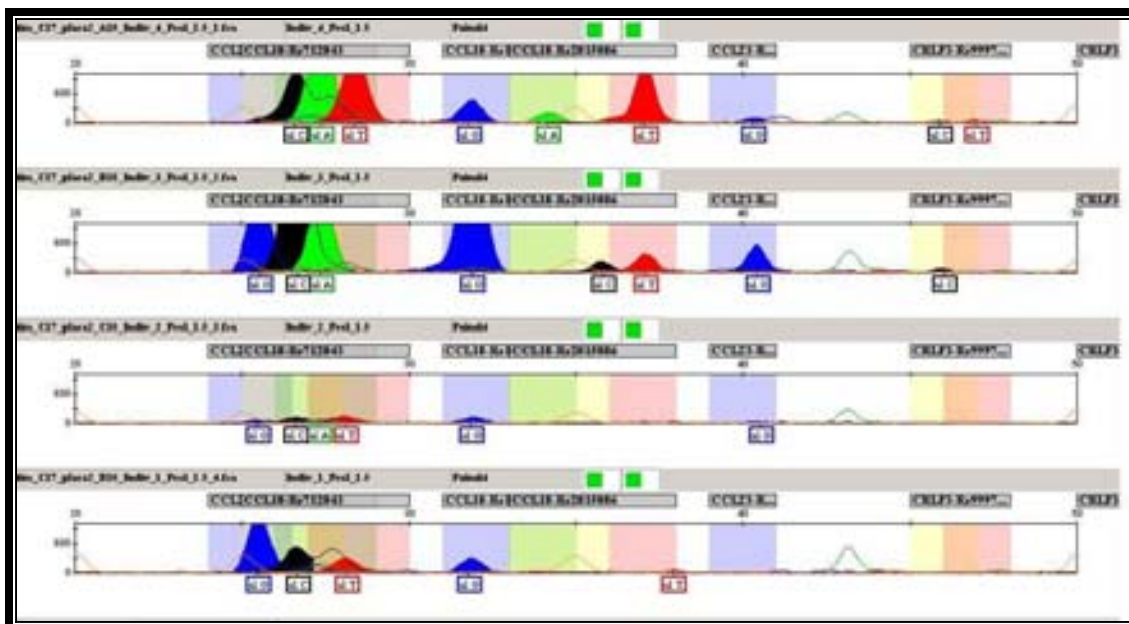


Figura 17 - Delimitação dos “bins” de cada marcador no painel 2 do cromossomo 17. Todos os marcadores do painel foram colocados juntos para a reação de SnapShot. Cada marcador foi diferenciado pelo tamanho do fragmento e cada alelo pela cor do fluoróforo.

4.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequência alélica e genotípica dos marcadores

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para todos os marcadores, para avaliar se a população estudada estava em equilíbrio e desta forma a frequência genotípica e alélica estaria associada ao fenótipo e não dependeria da mistura de diferentes populações ou fluxos migratórios. A Tabela 12 mostra os resultados do teste estatístico comparando a frequência genotípica encontrada com a esperada

pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Podemos notar que quatro marcadores não estavam em equilíbrio: rs944724, -2447, rs712043 e rs8064638 e, portanto, não foram analisados subsequentemente.

Tabela 13 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A) genes NOS2A e TNFAIP1

Gene	Marcador	Genótipos	Frequência observada nos controles	Frequência esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg	χ^2	P
NOS2A	-277	GG	0,03	0,07	2,57	0,28
		AA	0,48	0,53		
		GA	0,48	0,40		
	Rs944724	TT	0,36	0,27	7,53	0,02
		CC	0,33	0,23		
		CT	0,31	0,50		
	-2447	GG	0,27	0,40	19,04	<0,0001
		CC	0,01	0,14		
		GC	0,72	0,47		
	Rs16949	TT	0,16	0,22	2,34	0,31
		CC	0,23	0,28		
		CT	0,6	0,50		
	Rs12450521	CC	0,68	0,70	1,17	0,55
		AA	0,01	0,03		
		CA	0,31	0,28		
-1659	TT	0,09	0,06	0,98	0,61	
	CC	0,58	0,56			
	CT	0,33	0,38			
-1026	GG	0,51	0,53	0,22	0,89	
	TT	0,06	0,07			
	GT	0,43	0,40			

B) Genes CCL18, CRF3 e CCL23

Gene	Marcador	GENÓTIPOS	Frequência observada nos controles	Frequência esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg	X ²	P
CCL18	Rs712043	CC	0,25	0,33	18,20	<0,0001
		TT	0,01	0,18		
		CT	0,65	0,49		
	Rs14304	AA	0,03	0,03	0,01	0,99
		GG	0,69	0,69		
		GA	0,27	0,28		
	Rs2015086	TT	0,53	0,52	0,12	0,94
		CC	0,09	0,08		
		CT	0,38	0,40		
CRLF3	Rs999798	TT	0,59	0,55	1,73	0,42
		CC	0,11	0,07		
		CT	0,31	0,38		
	Rs1061342	GG	0,66	0,67	0,27	0,87
		AA	0,02	0,03		
		GA	0,31	0,29		
CCL23	Rs1719204	GG	0,70	0,69	0,22	0,89
		CC	0,04	0,03		
		GC	0,26	0,28		
	Rs1003645	GG	0,14	0,20	3,22	0,20
		AA	0,25	0,31		
TNFAIP1	Rs1007398	GA	0,62	0,49	2,75	0,25
		CC	0,15	0,21		
		TT	0,24	0,30		
		CT	0,61	0,50		

C) Genes STAT5B, CCR7 e CSF3

Gene	Marcador	Genótipos	Frequência observada nos controles	Frequência esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg	χ^2	P
STAT5B	Rs2230097	CC	0,03	0,02	0,31	0,85
		TT	0,78	0,76		
		CT	0,20	0,22		
	Rs3865361	AA	0,40	0,37	0,51	0,77
		GG	0,17	0,15		
		GA	0,43	0,48		
	Rs8064638	GG	0,25	0,35	9,28	0,01
		AA	0,07	0,17		
		GA	0,68	0,48		
CCR7	Rs3136685	GG	0,79	0,79	0,00	1,00
		AA	0,01	0,01		
		GA	0,20	0,20		
	Rs2023906	GG	0,05	0,12	5,12	0,07
		AA	0,37	0,44		
		GA	0,58	0,45		
Rs11574663	GG	0,26	0,36	2,20	0,14	
	AA	0,05	0,16			
	GA	0,69	0,48			
CSF3	Rs2827	CC	0,75	0,76	2,10	0,35
		TT	0,00	0,02		
		CT	0,24	0,22		
	Rs2227322	CC	0,65	0,63	0,69	0,70
		GG	0,06	0,04		
		GC	0,28	0,32		

As distribuições dos genótipos para os genes estudados são mostrados na Tabela 13. Para testar se a distribuição de cada genótipo entre os casos e os controles era ao acaso, ou obedecia alguma tendência foi usado o teste estatístico qui-quadrado, assim como foi calculada a “Odds ratio” para determinar o nível de influência de cada genótipo. A frequência esperada entre os casos e controles foi calculada através da equação: $(E = n_{AA} * n_{caso \text{ ou } controle} / n)$, onde n_{AA} é o número de pessoas que possuem o genótipo AA para o marcador testado, $n_{caso \text{ ou } controle}$ é o número de casos ou controles observados e n é o número total de indivíduos

genotipados (LEWIS, 2002). Foi aceito como diferença significativa quando o valor de p encontrado pelo teste estatístico foi inferior a 0,05.

Tabela 14 - Distribuição genotípica dos marcadores entre casos e controles.

A) Gene NOS2A

Gene	Marcador	GEN.	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC
			Observados	Esperados	Observados	Esperados				
NOS2A	-277	GG	21	13	6	14	5,08	0,02	3,77	1,16 - 12,3
		AA	101	103	108	106	0,04	0,84	0,96	0,65 - 1,41
		GA	93	99	109	103	0,36	0,55	0,89	0,60 - 1,31
	Rs944724	TT	62	64	69	67	0,06	0,80	0,94	0,57 - 1,52
		CT	62	59	59	62	0,15	0,70	1,10	0,66 - 1,82
		CC	58	59	62	61	0,02	0,90	0,97	0,58 - 1,60
	-2447	GG	96	76	61	81	5,14	0,02	1,68	1,07 - 2,62
		GC	115	135	163	143	2,91	0,09	0,75	0,53 - 1,04
		CC	1	1	2	2	0,00	1,00	1,00	0,03 - 29,8
	Rs16949	TT	56	40	35	51	5,64	0,02	2,04	1,12 - 3,68
CT		73	90	129	112	2,97	0,08	0,70	0,47 - 1,05	
CC		41	40	49	50	0,02	0,88	1,05	0,58 - 1,88	
Rs12450521	CC	155	150	156	161	0,16	0,69	1,07	0,77 - 1,46	
	CA	54	60	70	64	0,58	0,44	0,82	0,49 - 1,35	
	AA	5	4	3	4	0,25	0,61	1,67	0,22 - 12,2	
-1659	CT	63	60	54	57	0,15	0,69	1,11	0,66 - 1,85	
	TT	21	19	15	17	0,23	0,64	1,25	0,49 - 3,17	
	CC	92	97	97	92	0,26	0,61	0,90	0,60 - 1,34	
-1026	GG	117	111	114	120	0,31	0,58	1,11	0,77 - 1,59	
	GT	79	84	96	91	0,29	0,59	0,89	0,58 - 1,35	
	TT	11	12	13	12	0,08	0,77	0,85	0,27 - 2,62	

B) Genes TNFAIP1, CCL18, CRLF3 e CCL23

Gene	Marcador	GEN.	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC
			Observados	Esperados	Observados	Esperados				
TNFAIP1	Rs1007398	CT	105	114	132	123	0,69	0,41	0,86	0,59 - 1,23
		TT	69	58	52	63	2,01	0,16	1,44	0,86 - 2,39
		CC	25	27	32	30	0,14	0,71	0,87	0,41 - 1,81
CCL18	Rs712043	CT	137	137	145	145	0,00	1,00	1,00	0,71 - 1,39
		TT	22	21	22	23	0,05	0,83	1,10	0,47 - 2,52
		CC	53	53	56	56	0,00	1,00	1,00	0,58 - 1,70
		GA	58	53	57	62	0,44	0,51	1,19	0,70 - 1,99
		GG	114	120	147	141	0,28	0,60	0,91	0,64 - 1,28
CCL23	Rs1003645	AA	8	7	7	8	0,13	0,72	1,31	0,31 - 5,48
		TT	101	99	111	113	0,04	0,85	1,04	0,70 - 1,52
		CT	69	70	80	79	0,01	0,91	0,97	0,61 - 1,53
		CC	14	15	18	17	0,06	0,80	0,88	0,32 - 2,36
		GG	63	62	78	79	0,01	0,90	1,03	0,64 - 1,64
CRLF3	Rs999798	CT	31	32	41	40	0,03	0,87	0,95	0,48 - 1,82
		CC	10	11	14	13	0,08	0,77	0,84	0,26 - 2,64
		GG	62	62	87	87	0,00	1,00	1,00	0,63 - 1,58
		GA	27	28	41	40	0,03	0,86	0,94	0,47 - 1,86
		AA	4	3	3	4	0,29	0,59	1,78	0,21 - 14,7
CCL23	Rs1719204	GG	147	138	150	159	0,55	0,46	1,13	0,81 - 1,55
		GC	31	40	56	47	1,93	0,17	0,65	0,35 - 1,19
		CC	8	7	8	9	0,13	0,72	1,29	0,31 - 5,17
		GA	115	120	136	131	0,20	0,65	0,92	0,65 - 1,31
		AA	49	49	54	54	0,00	1,00	1,00	0,57 - 1,72
		GG	37	32	30	35	0,75	0,39	1,35	0,68 - 2,66

C) Genes STAT5B, CCR7 e CSF3

Gene	Marcador	GEN.	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC
			Observados	Esperados	Observados	Esperados				
STAT5B	Rs2230097	CT	26	27	35	34	0,03	0,86	0,94	0,45 - 1,91
		TT	109	110	139	138	0,01	0,93	0,98	0,69 - 1,40
		CC	8	6	5	7	0,62	0,43	1,87	0,39 - 8,89
	Rs3865361	GA	65	60	71	76	0,37	0,54	1,16	0,71 - 1,86
		GG	37	29	29	37	1,94	0,16	1,63	0,81 - 3,23
		AA	29	42	66	53	3,80	0,05	0,55	0,30 - 1,00
Rs8064638	GA	92	102	144	134	0,88	0,35	0,84	0,58 - 1,21	
	AA	26	18	15	23	3,14	0,08	2,22	0,91 - 5,37	
	GG	45	43	54	56	0,08	0,77	1,09	0,61 - 1,90	
	GG	126	126	168	168	0,00	1,00	1,00	0,72 - 1,38	
CCR7	Rs3136685	GA	29	31	43	41	0,11	0,74	0,89	0,45 - 1,73
		AA	5	3	2	4	1,17	0,28	3,33	0,36 - 30,7
	Rs2023906	GA	84	90	123	117	0,36	0,55	0,89	0,60 - 1,31
		AA	64	62	79	81	0,06	0,81	1,06	0,66 - 1,68
		GG	15	11	11	15	1,23	0,27	1,86	0,61 - 5,58
CSF3	Rs11574663	GA	93	104	149	138	1,04	0,31	0,83	0,57 - 1,19
		AA	32	18	11	25	9,36	0,002	4,04	1,61 - 10,0
		GG	37	40	55	52	0,20	0,65	0,87	0,48 - 1,57
	Rs2827	CC	121	123	161	159	0,03	0,87	0,97	0,69 - 1,35
		CT	42	41	52	53	0,02	0,88	1,04	0,58 - 1,85
Rs2227322	TT	2	1	1	2	0,67	0,41	4,00	0,13 - 119	
	CC	90	99	138	129	0,73	0,39	0,85	0,58 - 1,23	
	GG	26	17	13	22	4,20	0,04	2,59	1,03 - 6,48	
	GC	45	45	60	60	0,00	1,00	1,00	0,57 - 1,72	

O teste estatístico qui-quadrado comparou a distribuição genotípica entre o grupo caso e o grupo controle, sem levar em consideração a interação inter ou intra-gênica, desta forma cada marcador foi considerado isoladamente como único influenciador no processo de susceptibilidade ou resistência. Forte evidência de associação foi encontrada entre os marcadores -277 e rs16949 no gene NOS2A; rs11574663 no gene CCR7 e rs2227322 no gene CSF3.

O genótipo homocigoto polimórfico GG do marcador NOS2A-277 estava significativamente associado ao grupo caso ($p = 0,02$, Odds = 3,77 e IC = 1,16 – 12,3). Os indivíduos com o genótipo GG apresentaram 3,77 vezes mais chance de ter hanseníase em relação aos indivíduos com outros genótipos.

Os resultados encontrados para o marcador rs16949 no gene NOS2A mostraram que o genótipo homocigoto selvagem TT estava relacionado ao desenvolvimento do fenótipo doente ($p = 0,02$, Odds = 2,04 e IC = 1,12 – 3,68), e este genótipo aumentou 2,04 vezes mais chance de desenvolvimento da hanseníase. Este marcador também apresentou o genótipo heterocigoto CT próximo de um resultado significativo, indicando, possivelmente a necessidade de novas análises que confirmem se este genótipo está associado a hanseníase.

A distribuição genotípica entre casos e controles para o marcador rs11574663 do gene CCR7 mostrou que o genótipo homocigoto selvagem AA está associado a susceptibilidade a hanseníase ($p = 0,002$, Odds = 4,04 e IC = 1,61 – 10,0) e que a presença desse genótipo aumenta em 4,04 vezes a chance de seu portador adoecer.

O marcador rs2227322 do gene CSF3 mostrou uma distribuição genotípica, onde o genótipo homocigoto polimórfico GG foi associado à susceptibilidade a hanseníase ($p = 0,04$, Odds = 2,59 e IC = 1,03 – 6,48). O nível de susceptibilidade proporcionado por esse genótipo aumentou em 2,59 vezes a chance de ter hanseníase.

O marcador rs3865361 apresentou o genótipo homocigoto AA próximo do nível de significância, assim como o marcador rs8064638 para o genótipo homocigoto AA, ambos no gene STAT5B, indicando ser necessário um aumento amostral para certificação da associação desses dois marcadores com o aumento de susceptibilidade a hanseníase.

A partir dos resultados encontrados foi construído um modelo para testar se o padrão de herança era recessivo ou dominante (Tabela 15).

Tabela 15 – Modelo que testa se o genótipo envolvido com a susceptibilidade é recessivo

A) Comparação para o homocigoto de risco

Gene	Marcador	Fenótipo	Observados		Esperados		χ^2	p	ODDS	IC
			GG	GG	GG	GG				
NOS2A	-277	Casos	21	13	5,08	0,024	3,77	1,15 - 12,2		
		Controles	6	14						
			TT	TT						
	rs16949	Casos	56	40	5,64	0,018	2,04	1,12 - 3,68		
Controles		35	51							
			AA	AA						
CCR7	rs11574663	Casos	32	18	9,36	0,002	4,04	1,61 - 10,0		
		Controles	11	25						
			GG	GG						
CSF3	rs2227322	Casos	26	17	4,19	0,04	2,58	1,03 – 6,48		
		Controles	13	22						

B) Comparação entre o heterozigoto e o homozigoto de não risco

Gene	Marcador	Fenótipo	Observado	Esperado	χ^2	p	ODDS	IC
			AA + GA	AA + GA				
NOS2A	-277	Casos	194	202	0,31	0,577	0,93	0,70 - 1,21
		Controles	217	209				
	rs16949	Casos	114	130	1,80	0,180	0,80	0,57 - 1,11
		Controles	178	162				
CCR7	rs11574663	Casos	130	144	1,21	0,271	0,84	0,61 - 1,14
		Controles	204	190				
CSF3	Rs2227322	Casos	135	144	0,49	0,48	0,89	0,65 - 1,22
		Controles	198	189				

A Tabela 15 mostra o modelo recessivo, onde testamos o genótipo homozigoto envolvido com a susceptibilidade, e compara este genótipos com os demais. Por este modelo podemos ver claramente que todos os genótipos associados com a susceptibilidade a hanseníase são recessivos, pois só há diferenças significativas entre casos e controles quando em homozigoze.

A Tabela 16 mostra um resumo da relação de dominância e recessividade entre os alelos associados à hanseníase.

Tabela 16 - Relação entre os alelos associados com a hanseníase

Gene	Marcador	Alelo de risco	Tipo de alelo	Freqüência do alelo de risco*	Alelo dominante
NOS2A	-277	G	Polimórfico	0,36	A
	rs16949	T	Ancestral	0,79	C
CCR7	rs11574663	A	Ancestral	0,73	G
CSF3	Rs2227322	G	Polimórfico	0,33	C

*<http://www.nature.com/journal/v5/n1/extref/6364029x1.htm>

A freqüência alélica entre os casos e controles foi calculada através do teste estatístico qui-quadrado e seus resultados podem ser vistos na Tabela 16. Quando comparamos a freqüência alélica entre os grupos casos e controles, notamos que nenhum dos alelos mostrou-se associado à hanseníase, corroborando com a hipótese da recessividade do alelo indutor da susceptibilidade. O marcador rs2227322 mostrou o alelo G próximo do nível de significância indicando que provavelmente este alelo tenha padrão de herança dominante (Tabela 15). A análise mostra se os genótipos dos marcadores são recessivos, encontramos que o nível de p está próximo da significância e que um aumento amostral seria necessário para definir se este alelo é de fato recessivo ou se possui padrão de herança dominante.

Tabela 17 - Freqüência alélica dos marcadores entre os casos e controles

A) Genes NOS2A e TNFAIP1

Gene	Marcador	Alelo	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC
			Observ.	Esper.	Observ.	Esper.				
NOS2A	-277	G	135	126	121	130	0,63	0,42	1,15	0,81 - 1,62
		A	295	304	325	316	0,26	0,60	0,94	0,75 - 1,17
	Rs944724	T	186	187	197	196	0,005	0,94	0,98	0,74 - 1,31
		C	178	177	183	184	0,005	0,94	1,01	0,75 - 1,35
	-2447	G	307	287	285	305	1,35	0,24	1,14	0,91 - 1,43
		C	117	137	167	147	2,84	0,09	0,75	0,53 - 1,04
	Rs16949	T	185	170	199	214	1,17	0,27	1,17	0,88 - 1,55
		C	155	170	227	212	1,20	0,27	0,85	0,63 - 1,13
	Rs12450521	C	364	360	382	386	0,04	0,83	1,02	0,83 - 1,25
		A	64	68	76	72	0,22	0,63	0,89	0,55 - 1,42
	-1659	C	247	255	248	240	0,25	0,61	0,93	0,73 - 1,20
		T	105	97	84	92	0,68	0,40	1,18	0,79 - 1,77
	-1026	G	313	308	324	329	0,07	0,77	1,03	0,82 - 1,28
		T	101	106	119	114	0,22	0,63	0,91	0,62 - 1,32
TNFAIP1	Rs1007398	C	155	168	196	183	0,96	0,32	0,86	0,64 - 1,15
		T	243	230	236	249	0,70	0,40	1,11	0,86 - 1,43

B) Genes CCL18, CRLF3 e CCL23

Gene	Marcador	Alelo	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC
			Observ.	Esper.	Observ.	Esper.				
CCL18	rs712043	C	243	244	257	256	0,004	0,94	0,99	0,77 - 1,27
		T	181	180	189	190	0,005	0,94	1,01	0,75 - 1,34
	rs14304	G	286	293	351	344	0,15	0,69	0,95	0,76 - 1,19
		A	74	67	71	78	0,67	0,41	1,21	0,76 - 1,92
	rs2015086	T	271	268	302	305	0,03	0,85	1,02	0,80 - 1,28
		C	97	100	116	113	0,08	0,77	0,94	0,64 - 1,38
CRLF3	rs999798	T	157	155	197	199	0,02	0,87	1,02	0,76 - 1,37
		C	51	53	69	67	0,06	0,79	0,93	0,56 - 1,55
	rs1061342	G	151	152	215	214	0,005	0,94	0,98	0,73 - 1,32
		A	35	34	47	48	0,02	0,87	1,05	0,56 - 1,95

C) Genes STAT5B, CCR7 e CSF3

Gene	Marcador	Alelo	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC
			Observ.	Esper.	Observ.	Esper.				
STAT5B	rs2230097	C	42	39	45	48	0,20	0,64	1,14	0,63 - 2,08
		T	244	247	313	310	0,03	0,85	0,97	0,77 - 1,24
	rs3865361	G	139	118	129	150	3,29	0,06	1,37	0,97 - 1,92
		A	123	144	203	182	2,79	0,09	0,76	0,56 - 1,04
	rs8064638	G	182	188	252	246	0,16	0,68	0,94	0,72 - 1,23
		A	144	138	174	180	0,22	0,63	1,07	0,78 - 1,47
CCR7	rs3136685	G	281	283	379	377	0,01	0,91	0,98	0,79 - 1,22
		A	39	37	47	49	0,09	0,75	1,09	0,60 - 2,00
	rs2023906	G	114	112	145	147	0,03	0,85	1,03	0,72 - 1,46
		A	212	214	281	279	0,01	0,89	0,98	0,76 - 1,26
	rs11574663	G	167	183	259	243	1,24	0,26	0,85	0,65 - 1,12
		A	157	141	171	187	1,57	0,20	1,21	0,89 - 1,65
CSF3	rs2827	C	284	286	374	372	0,01	0,91	0,98	0,79 - 1,22
		T	46	44	54	56	0,08	0,77	1,08	0,62 - 1,89
	rs2227322	C	225	243	336	318	1,18	0,27	0,87	0,69 - 1,11
		G	97	79	86	104	3,54	0,05	1,48	0,98 - 2,24
CCL23	rs1719204	G	325	317	356	364	0,18	0,66	1,04	0,84 - 1,297
		C	47	55	72	64	1,09	0,29	0,75	0,45 - 1,271
	rs1003645	G	189	184	196	201	0,13	0,71	1,05	0,79 - 1,398
		A	213	218	244	239	0,10	0,74	0,95	0,73 - 1,241

4.4. Modelo de interação entre os marcadores

Os marcadores que se mostraram associados à hanseníase foram colocados em um modelo interativo, onde, os genótipos estatisticamente significativos de cada um dos 4 marcadores foram combinados e testados através do qui-quadrado para verificar como eles se relacionam com o fenótipo hanseníase. A Tabela 18 mostra o resultado do teste estatístico dos modelos gerados.

Como esperado todos os modelos se mostraram relacionados a hanseníase, no entanto, alguns modelos se mostraram mais fortemente associados ao fenótipo doença. O segundo modelo que combina o marcador -277 com o rs11574663 mostrou um maior poder, aumentando em 3,92 vezes a chance de um indivíduo com os genótipos GG para -277 e AA para rs11574663 de ter hanseníase em relação aos outros indivíduos que não possuíam esses genótipos.

Tabela 18 - Modelos interativos gerados pela combinação dos marcadores (-277 GG), rs16949 TT, rs11574663 AA e rs2227322 GG

Modelos	Casos		Controles		X ²	P	OR	IC
	Observ.	Esper.	Observ.	Esper.				
(-277)+(rs16949)	77	53	41	65	9,86	0,002	2,3	1,36 - 3,89
(-277)+(rs11574663)	53	31	17	39	14,40	0,0001	3,92	1,90 - 8,07
(-277)+(rs2227322)	47	30	19	36	9,01	0,0027	2,97	1,44 - 6,10
(rs16949)+(rs11574663)	88	58	46	76	13,54	0,0002	2,51	1,53 - 4,10
(rs16949)+(rs2227322)	82	57	48	73	9,66	0,0019	2,19	1,33 - 3,59
(rs11574663)+(rs2227322)	58	35	24	47	13,14	0,0003	3,25	1,70 - 6,19
(-277)+(rs16949)+(rs11574663)	109	71	52	90	18,19	< 0,0001	2,66	1,68 - 4,18
(-277)+(rs16949)+(rs2227322)	103	70	54	87	14,02	0,0002	2,37	1,50 - 3,73
(rs16949)+(rs11574663)+(rs2227322)	114	75	59	98	17,74	< 0,0001	2,53	1,63 - 3,90
(-277)+(rs11574663)+(rs2227322)	79	48	30	61	18,13	< 0,0001	3,35	1,90 - 5,89
(-277)+(rs16949)+(rs11574663)+(rs2227322)	135	88	65	112	22,39	< 0,0001	2,64	1,76 - 3,97

4.5. Haplótipos gerados pelos marcadores associados à hanseníase

Os marcadores que mostraram associação significativa tiveram seus genótipos combinados e a partir desses haplótipos onde foi testada a distribuição entre os casos e controles para os 3 haplótipos mais frequentes entre os caso. A Tabela 19 mostra os haplótipos gerados e a sua distribuição. Para esta análise foram utilizados 144 casos e 202 controles.

Tabela 19 - Haplótipos gerados a partir da combinação dos genótipos dos marcadores rs2227322, rs11574663, rs16949 e -277

Haplótipos	FENÓTIPO	FREQUÊNCIA	CSF3- rs2227322 C>G	CCR7- rs11574663 A>G	NOS2A- rs16949 T>C	NOS2A- 277 A>G	P
1	CASOS	12%	CC	GA	CT	GA	0,006
	CONTROLE	20%					
2	CASOS	8%	CC	GG	TT	AA	0,172
	CONTROLE	6%					
3	CASOS	4%	CC	GG	CT	GA	0,867
	CONTROLE	5%					

Teste qui-quadrado, Nível de significância com $p < 0,05$

O teste estatístico qui-quadrado foi usado para avaliar se havia diferença significativa na distribuição dos três haplótipos entre os casos e controles. Foi encontrada diferença significativa somente no haplótipo 1, sendo este maior nos controles indicando um haplótipo associado à proteção (Figura 18).

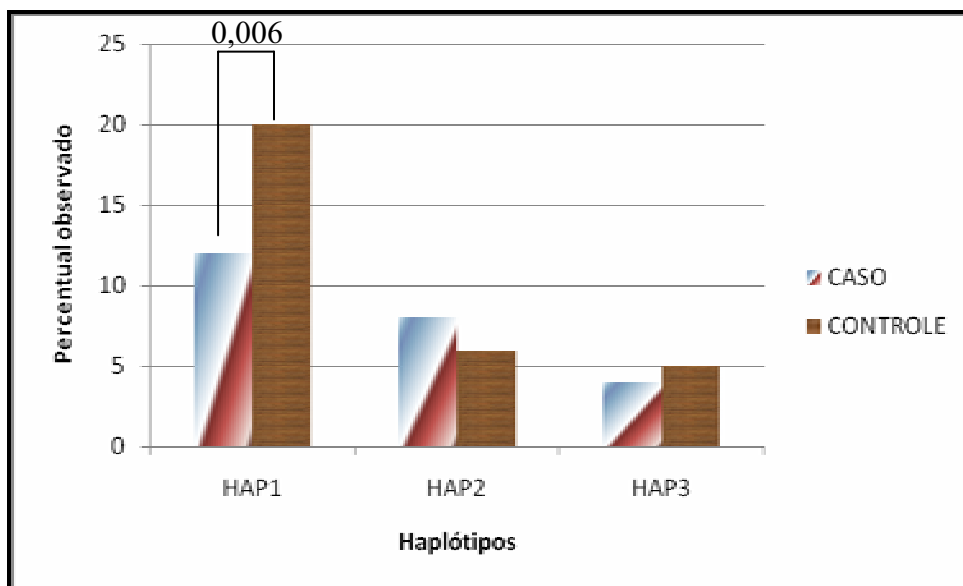


Figura 18 - Distribuição dos haplótipos entre os casos e controles

4.6. Distribuição genotípica entre os casos paucibacilares e multibacilar

Os marcadores que tiveram relação significativa na distribuição entre os casos e controles foram usados para testar se havia associação entre os casos de hanseníase induzindo a migrarem para os pólos paucibacilar ou multibacilar. A Tabela 19 mostra os resultados da comparação da distribuição genotípica entre as formas clínicas.

O resultado estatístico mostrou que o marcador NOS2A-rs16949 apresentou o genótipo TT relacionado à migração dos casos para o pólo paucibacilar, no entanto, nota-se que para a distribuição dos casos multibacilares esse marcador apresentou um resultado próximo da significância, indicando que talvez um aumento da amostra pudesse encontrar uma relação desse marcador apenas com a hanseníase per se.

Os marcadores NOS2A-277, CCR7-rs11574663 e CSF3-rs2227322 apresentaram os genótipos GG, AA e GG, respectivamente, relacionados ao apresentar a forma multibacilar, sendo calculado um p valor de 0,02; 0,03 e 0,003 respectivamente. Para o marcador CCR7-rs115763 um resultado próximo da significância na distribuição dos casos paucibacilares, foi calculado sendo que um aumento amostral talvez mostre a relação desse marcador com a hanseníase per se.

Tabela 20 - Distribuição genotípica entre os casos paucibacilar e multibacilar

Gene	Marcadores	Genótipo	Controles	PB	OR (95% IC)	P	MB	OR (95% CI)	P
NOS2A		GG	6	7	3,89 (0,72 – 21,1)	0,11	10	5,00 (1,10 – 22,8)	0,03
		AA	108	35	1,00 (0,58 – 1,71)	1,00	36	1,04 (0,61 – 1,77)	0,89
		GA	109	30	0,85 (0,49 – 1,49)	0,57	26	0,73 (0,41 – 1,32)	0,30
		TT	35	24	2,43 (1,10 – 5,43)	0,03	20	2,29 (0,96 – 5,40)	0,06
	rs16949	CC	49	6	0,44 (0,15 – 1,27)	0,12	16	1,19 (0,52 – 2,69)	0,68
		CT	129	30	0,82 (0,47 – 1,42)	0,48	20	0,59 (0,31 – 1,10)	0,09
		GG	55	25	1,46 (0,72 – 2,93)	0,29	14	1,00 (0,43 – 2,29)	1,00
CCR7	rs11574663	AA	11	11	3,40 (0,92 – 12,5)	0,06	17	5,67 (1,74 – 18,4)	0,003
		GA	149	29	0,65 (0,38 – 1,10)	0,11	26	0,65 (0,37 – 1,13)	0,13
		CC	138	38	0,91 (0,54 – 1,50)	0,70	23	0,67 (0,37 – 1,21)	0,18
CSF3	rs2227322	GG	13	11	2,54 (0,74 – 8,63)	0,13	13	4,20 (1,21 – 14,5)	0,02
		GC	60	15	0,85 (0,38 – 1,86)	0,69	17	1,17 (0,53 – 2,55)	0,69

5. Discussão

A população de estudo foi constituída por 444 indivíduos residindo em áreas endêmicas para a hanseníase no estado do Rio Grande do Norte, que é um dos poucos estados do Brasil com uma taxa de prevalência menor do que a recomendada pela OMS (LUIS; RANGEL MAYORAL ; LISO RUBIO, 2004). Embora o estado como um todo esteja dentro dos limites aceitáveis de prevalência e detecção, existem algumas regiões com aglomerados que, persistentemente, mantêm altos níveis da doença (DIAS ; DIAS ; NOBRE, 2005). A existência desses aglomerados não acontece por acaso, mas obedece a uma tendência que pode ser prevista por modelos matemáticos como mostrado por Queiroz et al, (2008). A existência de aglomerados em áreas circunscritas, assim como a existência de famílias com múltiplos casos que albergam a hanseníase por 3 ou 4 gerações nos faz crer que a dinâmica da infecção é um complexo de fatores que culmina com o paradigma que sustenta a maioria das doenças infecciosas: a exposição contínua e a susceptibilidade genética (LEWIS, 2002).

Neste trabalho, foram analisados 23 marcadores existentes em 8 genes: NOS2A, que codifica a enzima óxido nítrico sintase induzida; TNFAIP1, que codifica a proteína 1 a qual é induzida pelo TNF alfa em células endoteliais; CCL18 e CCL23, que codificam as quimiocinas 18 e 23 respectivamente; CRLF3, que codifica o fator 3 tipo receptor de quimiocina; STAT5B, que codifica o fator de transcrição, CCR7, responsável pela expressão do receptor 7 de quimiocinas e CSF3, responsável pela expressão do fator estimulador de

colônia 3. Esses genes se localizam na região cromossômica 17q11-q21 entre as posições 23,1 Mb a 37,6 Mb (JAMIESON et al., 2004a). Essa região cromossômica carrega genes com função de proteção contra patógenos intramacrofágicos. JAMIESON et al., 2004a, encontraram, através de um estudo de ligação usando 72 famílias com múltiplos casos de hanseníase no estado do Pará, uma forte relação entre marcadores nessa região cromossômica e os casos encontrados nas famílias estudadas.

A contribuição dos fatores genéticos que geram susceptibilidade à hanseníase ainda não está bem estabelecida, assim como se sabe que há um forte componente ambiental que influencia a dinâmica da transmissão. Contínua exposição, debilidade imunológica, má nutrição e estresse são fatores conhecidamente importantes para aumentar o risco de desenvolvimento da hanseníase (FERNANDO ; BRITTON, 2006b). Os mecanismos pelo qual a exposição ao patógeno, os fatores ambientais e a susceptibilidade genética são traduzidos em doença ainda são desconhecidos (SCHURR, 2007).

Polimorfismos genéticos revelam como os fatores de risco para o desenvolvimento da hanseníase influenciam diferentemente as pessoas expostas ao *Mycobacterium leprae* (VARADO-NAVARRO et al., 2008) e, sendo os mecanismos de patogênese da hanseníase amplamente influenciados pelos fatores ambientais, pode-se esperar uma extensiva interação gene-ambiente capaz de mascarar a heterogeneidade da susceptibilidade à doença (SCHURR, 2007) e confundir os resultados se não forem levados em consideração.

Doenças complexas como hanseníase sofrem a influência de múltiplos genes, que interagem para, combinados, denotarem susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento da doença (JAMIESON et al., 2004a). Para estudo de susceptibilidade é particularmente apropriada a análise de regiões que contêm aglomerados de genes para moléculas imunomoduladoras tais como a região estudada nesse trabalho.

A comparação das freqüências genóticas entre os casos e controles revelou que pelo menos três genes candidatos, NOS2A, CCR7 e CSF3, ou genes em desequilíbrio de ligação com eles, podem contribuir para a susceptibilidade genética à hanseníase. Em trabalho realizado por BURGNER et al., 2003, foi encontrado que o alelo NOS2A-1659T estava associado à malária cerebral em Gambia; esse SNP foi analisado nesse trabalho, mas nenhuma associação foi encontrada com o fenótipo doente mesmo estando os quatro SNPs do promotor aqui analisados em desequilíbrio de ligação (JAMIESON et al., 2004a). JAMIESON et al., 2004a, encontraram que o SNP -1026 no promotor do gene NOS2A estava associado à susceptibilidade à tuberculose. Neste trabalho não foi encontrada nenhuma associação com esse SNP, muito embora a tuberculose seja uma doença infecciosa também provocada por uma bactéria da mesma família do patógeno da hanseníase. Embora a presença de iNOS e a produção de óxido nítrico em macrófagos humanos seja controversa (SCHOEDON et al., 1995), evidências têm demonstrado o papel do óxido nítrico contra patógenos que infectam macrófagos, como *M. tuberculosis* (CHAN et al., 1995) e *M. leprae* (ADAMS et al., 1991). Funcionalmente NOS2A, é um excelente gene candidato para à

susceptibilidade a hanseníase. SCHON et al., 2001a, demonstraram elevada e específica expressão de iNOS em granulomas e infiltrados de nervos em lesões de pacientes com hanseníase “borderline”, com e sem reação reversa, sugerindo que a regulação da expressão da iNOS poderia estar envolvida na susceptibilidade à hanseníase e/ou ao dano nervoso.

A segunda região que apresentou associação com hanseníase continha o gene CCR7 que tem uma função chave como organizador do sistema imune (KAHLMANN et al., 2007). Nesse gene foram analisados três marcadores, desses um apresentou forte associação com o fenótipo doente (rs11574663), sendo o genótipo homozigoto selvagem AA o responsável pela susceptibilidade nesse marcador. Alguns trabalhos (LANDE et al., 2003; RAGNO et al., 2001; SADEK et al., 1998) têm mostrado que células dendríticas infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*, expressam elevados níveis de CCR7 e tornam-se mais responsivas ao seu ligante CCL21. SALLUSTO et al., 1999 demonstraram que a expressão de CCR7 estimula as células T de memória a se dividirem em dois subgrupos, as células T de memória negativa que mostram função efetora imediata e as células T de memória positiva que geram uma memória imunológica duradoura e estimulam eficientemente células dendríticas a expressarem CCR7 e que, posteriormente, se diferenciam em células efetoras negativas sob estímulo secundário. O trabalho de SCHON et al., 2001a destaca a complexa interação entre quimiocinas e seus receptores, que ocorre na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a qual orchestra o recrutamento e seleciona células para acumularem-se no sítio de infecção e tomarem parte na formação do granuloma. É possível que esse mecanismo também aconteça

com a hanseníase e que elementos regulatórios na região cromossômica 17q11-q12 possam coordenar a expressão em resposta à infecção podendo contribuir para o padrão complexo de susceptibilidade gênica observado para o mal de Hansen.

O terceiro gene envolvido com a susceptibilidade a hanseníase foi o CSF3, que é um fator estimulador de colônia, importante na sobrevivência e proliferação de neutrófilos e macrófagos. O CSF3 também é indutor da expressão de citocinas pro-inflamatórias (HE et al., 2008). Foram analisados 2 marcadores, sendo o rs2227322 fortemente associado a hanseníase.

A forma como cada indivíduo reage a doenças infecciosas é bastante complexa e depende da interação de diversas moléculas, que em conjunto determinam a evolução de infecção para doença ou cura espontânea ou agravamento do quadro clínico. Modificações na seqüência de bases dos genes codificadores das moléculas envolvidas na defesa imunológica podem fazer com que a eficiência com que é combatida a infecção seja diminuída. Os modelos que comparam de que forma os genótipos dos marcadores envolvidos com a susceptibilidade a hanseníase interagem revelaram uma relação de recessividade (Tabela 15), sendo importantes apenas quando em homozigose.

Quando as freqüências alélicas foram comparadas, (Tabela 17) nenhuma associação foi encontrada. Isto se deve ao fato de que a relação recessiva não permitiu denotar nenhuma significância estatística quando apenas um alelo foi analisado, pois a freqüência do alelo de risco no genótipo heterozigoto diluiu as diferenças entre os casos e controles.

Analizamos também a forma como os marcadores interagem entre si (Tabela 18). Comparamos as frequências observadas e esperadas entre os casos e controles quando no modelo foram incluídos os marcadores significativamente associados à hanseníase de forma combinada. Encontramos interações que mostraram potências diferentes, mostrando que os produtos de expressão podem funcionar em conjunto para proporcionar uma maior susceptibilidade a infecção pelo *Mycobacterium leprae*. A maior probabilidade de risco foi encontrada quando combinado os genótipos de risco dos marcadores -277 do promotor do gene NOS2A e o rs11574663 do gene CCR7. Entretanto, quando o marcador rs16949 do gene NOS2A foi incluído no modelo, a probabilidade de risco (Odds Ratio) foi reduzida de 10 a 30%.

Foi também analisada a forma como todos os genótipos dos marcadores de risco interagem, pois, sendo o alelo de risco recessivo, a combinação de alguns genótipos poderia ser responsável pela resistência inata que algumas pessoas apresentam. Foram construídos 3 haplótipos para os 4 marcadores de risco (Tabela 19). Encontramos diferenças significativas entre a distribuição desses haplótipos nos casos e controles apenas para o haplótipo 1, sendo este considerado protetor. Percebe-se que o fator protetor é provocado pelo alelo dominante que, na maioria dos casos, apareceu em heterozigose com o alelo de risco.

A relação entre modificações na seqüência do DNA de alguns genes e variações no padrão de resistência à hanseníase mostrou que alguns marcadores estão associados ao fenótipo doente. No entanto, mesmo os indivíduos doentes mostram evoluções distintas, sendo que alguns evoluem

para o pólo paucibacilar enquanto outros mostram ausência completa de resistência desenvolvendo o tipo multibacilar da hanseníase. Analisamos os indivíduos doentes para saber se alguns desses marcadores estavam associados ao desenvolvimento da forma paucibacilar ou da multibacilar. A Tabela 21 mostra os resultados da distribuição genotípica entre os casos. Dos dois marcadores do gene NOS2A, um apresentou-se relacionado aos casos paucibacilares (rs16949) e o outro aos casos multibacilares (-277). Em trabalho realizado por NGUYEN et al., 2008 foi encontrada evidente associação entre esses dois marcadores e a febre tifóide, mostrando a associação desse polimorfismo e a expressão da iNOS e, desta forma, comprometimento da resposta imune a patógenos intra-macrofágicos. Além do marcador -277 localizado no promotor do gene NOS2A, dois outros marcadores localizados em “introns” também estavam associados ao desenvolvimento de casos multibacilares: rs11574663 no gene CCR7 e rs2227322 no gene CSF3.

Os resultados encontrados por Jamieson et al., 2004 mostraram que dois marcadores microsatélites (D17S250 e D17S1795) estavam fortemente associados a hanseníase enquanto que o marcador D17S1795 também mostrou-se associado a tuberculose. Foram investigados também nesse estudo a associação entre 49 SNPs e a tuberculose sendo encontrado associação entre 6 deles numa população constituída por 627 indivíduos residentes de Belém/PA, portando a mesma susceptibilidade encontrada para a tuberculose poderia ser compartilhada com a hanseníase, e dessa forma o estudo realizado para a tuberculose foi validado para a hanseníase na população do Rio Grande do Norte.

6. Conclusões

1. Polimorfismos característicos nos marcadores dos genes NOS2A-277 e CSF3-rs2227322 estão mais presentes em pacientes com hanseníase, sendo a probabilidade de risco atribuída a eles 3,77 e 2,59 vezes respectivamente, enquanto que, para os marcadores NOS2A-rs16949 e CCR7-rs11574663, os genótipos selvagens é que foram associados à hanseníase numa proporção de 2,04 e 4,04 vezes, respectivamente.
2. Os genótipos associados a maior susceptibilidade à hanseníase comportaram-se recessivamente, sendo que nenhum alelo foi significativamente associado à doença quando sua distribuição foi comparada de forma isolada.
3. Os modelos interativos, que associaram os genótipos ligados a susceptibilidade à hanseníase, mostraram que os marcadores com maior poder de susceptibilidade foram NOS2A-277 com CCR7-rs11574663 e que, quando esses dois marcadores estavam associados e o marcador NOS2A-rs16949 também foi incluído no modelo, uma redução de aproximadamente 30% na probabilidade de risco foi incrementada ao modelo.
4. A presença de haplótipos dos marcadores de risco mostrou que os genótipos contendo o alelo dominante induziu um certo nível de resistência, sendo que o haplótipo 1 formado pelos genótipos: CSF3-rs2227322-CC, CCR7-rs11574663-GA, NOS2A-rs16949-CT e NOS2A-277-GA mostrou-se significativamente relacionado aos controles.

5. O genótipo TT no marcador NOS2A-rs16949 mostrou-se associado ao desenvolvimento dos casos paucibacilares enquanto que os genótipos GG, GG e AA nos marcadores -277, rs2227322 e rs11574663, respectivamente, mostraram-se associados ao desenvolvimento dos casos multibacilares.

Referências

ABEL, L.; SANCHEZ, F. O.; OBERTI, J.; THUC, N. V.; HOA, L. V.; LAP, V. D. et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J.Infect.Dis.*, v. 177, n. 1, p. 133-145, 1998.

ADAMS, L. B.; FRANZBLAU, S. G.; VAVRIN, Z.; HIBBS, J. B., Jr.; KRAHENBUHL, J. L. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J.Immunol.*, v. 147, n. 5, p. 1642-1646, 1991.

AGRAWAL, A.; PANDIT, L.; DALAL, M.; SHETTY, J. P. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clin.Neurol.Neurosurg.*, v. 107, n. 6, p. 445-454, 2005.

ALMEIDA AM. **Concentração sérica de citocinas no espectro das formas clínicas da hanseníase**. 1996. - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto/SP, 1996.

ANNA RAUTANEN. **GENOTYPING FOR GENETIC ASSOCIATION STUDIES: METHODS AND APPLICATIONS**. 2007. 2007.

BARKER, L. P. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances. *Indian J.Med.Res.*, v. 123, n. 6, p. 748-759, 2006.

BEAMER, G. L. ; TURNER, J. Murine models of susceptibility to tuberculosis. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)*, v. 53, n. 6, p. 469-483, 2005.

BONATO VLD. **Correlação dos anticorpos anti PGL-1 com o índice baciloscópico, a reação de Mitsuda, o tratamento poliquimioterápico e as interleucinas nas diferentes formas da hanseníase**. 1995. - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto/SP, 1995.

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle da Hanseníase, uma proposta de integração ensino-serviço. *Secretaria Nacional de programas especiais de saúde*, Rio de Janeiro, Divisão nacional de dermatologia sanitária. 1989

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hanseníase-atividades de controle e manual de procedimentos. Brasília. 2001

BRITTON, W. J. ; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. *Lancet*, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 2004.

BUGEJA, M.J. et al. An investigation of polymorphisms in the 17q11.2-12 CC chemokine gene cluster for association with sclerosis in Australians. *BMC Medical Genetics*, v. 7, n. 64. Jul/2006

BURGNER, D.; USEN, S.; ROCKETT, K.; JALLOW, M.; ACKERMAN, H.; CERVINO, A. et al. Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Hum.Genet.*, v. 112, n. 4, p. 379-386, 2003.

CASANOVA, J. L. ; ABEL, L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 4, n. 1, p. 55-66, 2004.

CHAN J. ; ET AL. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J.Exp.Med*, v. 175, p. 1111-1122, 1992.

CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROLL, D.; FLYNN, J.;BLOOM, B. R. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect.Immun.*, v. 63, n. 2, p. 736-740, 1995.

CHAUSSINAND, R. [Classification of leprosy.]. *Bull.Soc.Pathol.Exot.Filiales.*, v. 46, n. 2, p. 252-262, 1953.

COEYTAUX, A.; TRUFFERT, A.; MUELLER, Y.; ANTILLE, C.;JACKSON, Y. [Leprosy, a neurologic disease]. *Rev.Med.Suisse*, v. 3, n. 110, p. 1178, 1180-1178, 1184, 2007.

DIAS, M.C.F.D.; DIAS, G.H.; NOBRE, M.L. Distribuição espacial da hanseníase no município de Mossoró/RN, utilizando o sistema de informação geográfica - SIG. *An Bras Dermatol*, v. 80, n. Supl 3, p. 289-294. 2005

DONHAM, K. J. ; LEININGER, J. R. Spontaneous leprosy-like disease in a chimpanzee. *J.Infect.Dis.*, v. 136, n. 1, p. 132-136, 1977.

FERNANDO, S. L. ; BRITTON, W. J. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol.Cell Biol.*, v. 84, n. 2, p. 125-137, 2006a.

_____. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol.Cell Biol.*, v. 84, n. 2, p. 125-137, 2006b.

Figueiredo F & al (1997). *Detection of Nitric oxide (NO) in dermal lesion of patients with leprosy.*

FINE, P. E. Natural history of leprosy--aspects relevant to a leprosy vaccine. *Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.*, v. 51, n. 4, p. 553-555, 1983b.

_____. Natural history of leprosy--aspects relevant to a leprosy vaccine. *Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.*, v. 51, n. 4, p. 553-555, 1983a.

FOSS, N.T. Aspectos Imunológicos da hanseníase. *Simpósio hanseníase*, v. Capítulo II, p. 335-339. 1997

FOSS, N. T.; CALLERA F;ALBERTO FL. Anti-PGL-1 level in leprosy patients and their contacts. *Braz J Med Res*, v. 26, 1993.

FOSS, N. T.; OLIVEIRA EB;SILVA CL. Correlation between TNF production, increase of plasma-C-reactive protein level and supression of T lymphocyte response to cocanavalin A during erythema nodosum leprosum. *Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.*, v. 61, p. 218-226, 1993.

GELBER, R. H. Hansen`s Disease. *The western journal of medicine*, v. 158, n. 6, p. 583-590, 1993.

GODAL, T. Immunological aspects of leprosy--present status. *Prog.Allergy*, v. 25, p. 211-242, 1978.

GOULART, I.M.B.; PENNA, G.O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, v. 35, n. 4, p. 365-375. Jul/2002

HE, J. Q.; SHUMANSKY, K.; CONNETT, J. E.; ANTHONISEN, N. R.; PARE, P. D.; SANDFORD, A. J. Association of genetic variations in the CSF2 and CSF3 genes with lung function in smoking-induced COPD. *Eur.Respir.J.*, 2008.

HILL, A. V. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu.Rev.Genet.*, v. 40, p. 469-486, 2006.

_____. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.*, v. 2, p. 373-400, 2001.

HOWARD, B. J. e. a. **Clinical and pathogenic microbiology**. 2nd. St. Louis:1994.

IZUMI, S.; SUGIYAMA, K.; MATSUMOTO, Y.; OHKAWA, S. Analysis of the immunogenetic background of Japanese leprosy patients by the HLA system. *Vox Sang.*, v. 42, n. 5, p. 243-247, 1982.

JAMIESON, S.E. et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun.*, v. 5, n. 1, p. 46-57, 2004b.

KAHLMANN, D.; VALOS-MISSLITZ, A. C.; OHL, L.; STANKE, F.; WITTE, T.; FORSTER, R. Genetic variants of chemokine receptor CCR7 in patients with systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome and systemic sclerosis. *BMC Genet.*, v. 8, p. 332007.

KIM, S. J.; CHOI, I. H.; DAHLBERG, S.; NISPEROS, B.; KIM, J. D.; HANSEN, J. A. HLA and leprosy in Koreans. *Tissue Antigens*, v. 29, n. 3, p. 146-153, 1987.

KNIGHT, J. C. ; KWIATKOWSKI, D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc.Assoc.Am.Physicians*, v. 111, n. 4, p. 290-298, 1999.

KRUGLYAK, L. ; NICKERSON, D. A. Variation is the spice of life. *Nat.Genet.*, v. 27, n. 3, p. 234-236, 2001.

LAGRANGE, P. H. ; ABEL, L. [The genetic susceptibility to leprosy in humans]. *Acta Leprol.*, v. 10, n. 1, p. 11-27, 1996.

LANDE, R.; GIACOMINI, E.; GRASSI, T.; REMOLI, M. E.; IONA, E.; MIETTINEN, M. et al. IFN-alpha beta released by Mycobacterium tuberculosis-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J.Immunol.*, v. 170, n. 3, p. 1174-1182, 2003.

LEWIS, C. M. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief.Bioinform.*, v. 3, n. 2, p. 146-153, 2002.

LUIS, F. J.; RANGEL MAYORAL, J. F.; LISO RUBIO, F. J. [A review on Hansen's disease]. *Farm.Hosp.*, v. 28, n. 2, p. 123-129, 2004.

MAKRIDAKIS, N. M. ; REICHARDT, J. K. Multiplex automated primer extension analysis: simultaneous genotyping of several polymorphisms. *Biotechniques*, v. 31, n. 6, p. 1374-1380, 2001.

MALHOTRA, D.; DARVISHI, K.; LOHRA, M.; KUMAR, H.; GROVER, C.; SOOD, S. et al. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. *Eur.J Hum.Genet.*, v. 14, n. 4, p. 438-442, 2006.

MANGLANI, P. R. ; ARIF, M. A. Multidrug therapy in leprosy. *J.Indian Med.Assoc.*, v. 104, n. 12, p. 686-688, 2006.

MATYAS, G.; GIUNTA, C.; STEINMANN, B.; HOSSLE, J. P.;HELLWIG, R. Quantification of single nucleotide polymorphisms: a novel method that combines primer extension assay and capillary electrophoresis. *Hum.Mutat.*, v. 19, n. 1, p. 58-68, 2002.

MEYERS, W. M.; GORMUS, B. J.;WALSH, G. P. Nonhuman sources of leprosy. *Int.J.Leprotic Mycobact.Dis.*, v. 60, n. 3, p. 477-480, 1992.

MEYERS, W. M. ; MARTY, A. M. Current concepts in the pathogenesis of leprosy. Clinical, pathological, immunological and chemotherapeutic aspects. *Drugs*, v. 41, n. 6, p. 832-856, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL. Plano Nacional de eliminação da hanseníase em nível municipal 2006-2010. 2006

MIRA, M. T.; ALCAIS, A.; DI, P. T.; THUC, N. V.; PHUONG, M. C.; ABEL, L. et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun.*, v. 4, n. 1, p. 67-73, 2003a.

MIRA, M. T.; ALCAIS, A.; NGUYEN, V. T.; MORAES, M. O.; DI, F. C.; VU, H. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*, v. 427, n. 6975, p. 636-640, 2004.

MIRA, M. T.; ALCAIS, A.; VAN, T. N.; THAI, V. H.; HUONG, N. T.; BA, N. N. et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat. Genet.*, v. 33, n. 3, p. 412-415, 2003b.

MNISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas no Brasil. 2008

MOET, F. J.; PAHAN, D.; SCHURING, R. P.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J. H. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J. Infect. Dis.*, v. 193, n. 3, p. 346-353, 2006.

MONOT, M.; HONORE, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPEE, J. Y.; LACROIX, C. et al. On the origin of leprosy. *Science*, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, 2005.

MORAHAN, G.; KAUR, G.; SINGH, M.; RAPTHAP, C. C.; KUMAR, N.; KATOCH, K. et al. Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens*, v. 69 Suppl 1, p. 234-236, 2007.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am. Acad. Dermatol.*, v. 51, n. 3, p. 417-426, 2004.

NEIRA, M. P. ; DAUMERIE, D. Remaining challenges towards elimination of leprosy. *Lepr. Rev.*, v. 71, n. 3, p. 247-252, 2000.

NGUYEN, H. et al. Human Chromosome 17q11.2-q22 contains typhoid fever susceptibility genes. *New Insights into infectious diseases*. Jun/2008

OHYAMA, H.; OGATA, K.; TAKEUCHI, K.; NAMISATO, M.; FUKUTOMI, Y.; NISHIMURA, F. et al. 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.*, v. 58, n. 7, p. 740-743, 2005.

PENNA, M. L. ; PENNA, G. O. Trend of case detection and leprosy elimination in Brazil. *Trop.Med.Int.Health*, v. 12, n. 5, p. 647-650, 2007.

PONNIGHAUS, J. M.; FINE, P. E.; STERNE, J. A.; WILSON, R. J.; MSOSA, E.; GRUER, P. J. et al. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. *Lancet*, v. 339, n. 8794, p. 636-639, 1992.

RAGNO, S.; ROMANO, M.; HOWELL, S.; PAPPIN, D. J.; JENNER, P. J.; COLSTON, M. J. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology*, v. 104, n. 1, p. 99-108, 2001.

RAJALINGAM, R.; SINGAL, D. P.; MEHRA, N. K. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens*, v. 49, n. 2, p. 168-172, 1997.

RIDLEY, D. S. ; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int.J Lepr.Other Mycobact.Dis.*, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

ROY, S.; FRODSHAM, A.; SAHA, B.; HAZRA, S. K.; MASCIE-TAYLOR, C. G.; HILL, A. V. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J.Infect.Dis.*, v. 179, n. 1, p. 187-191, 1999.

ROY, S.; MCGUIRE, W.; MASCIE-TAYLOR, C. G.; SAHA, B.; HAZRA, S. K.; HILL, A. V. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J.Infect.Dis.*, v. 176, n. 2, p. 530-532, 1997.

SADEK, M. I.; SADA, E.; TOOSI, Z.; SCHWANDER, S. K.; RICH, E. A. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 19, n. 3, p. 513-521, 1998.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999.

SCHOEDON, G.; SCHNEEMANN, M.; WALTER, R.; BLAU, N.; HOFER, S.; SCHAFFNER, A. Nitric oxide and infection: another view. *Clin.Infect.Dis.*, v. 21 Suppl 2, p. S152-S157, 1995.

SCHON, T.; HERNANDEZ-PANDO, R. H.; NEGESSE, Y.; LEEKASSA, R.; SUNDQVIST, T.; BRITTON, S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br.J.Dermatol*, v. 145, n. 5, p. 809-815, 2001b.

_____. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br.J.Dermatol*, v. 145, n. 5, p. 809-815, 2001a.

SCHURR, E. Is susceptibility to tuberculosis acquired or inherited? *J.Intern.Med.*, v. 261, n. 2, p. 106-111, 2007.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. *Clin.Microbiol.Rev.*, v. 19, n. 2, p. 338-381, 2006.

SEHGAL, V. N.; SARDANA, K.; DOGRA, S. The imperatives of leprosy treatment in the pre- and post-global leprosy elimination era: Appraisal of changing the scenario to current status. *J.Dermatolog.Treat.*, p. 1-10, 2007.

SIDDIQUI, M. R.; MEISNER, S.; TOSH, K.; BALAKRISHNAN, K.; GHEI, S.; FISHER, S. E. et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat.Genet.*, v. 27, n. 4, p. 439-441, 2001b.

_____. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat.Genet.*, v. 27, n. 4, p. 439-441, 2001a.

SOUZA, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, v. 30, p. 326. 1997

STACHAN T; READ AP. **Human Molecular genetics 3**. 3rd. London and New York: Garland publishing, 2004.

STINGL, P. [Leprosy. Classification--clinical aspects--diagnosis--therapy]. *Z.Hautkr.*, v. 57, n. 21, p. 1559-1567, 1982.

TODD, J. R.; WEST, B. C.; MCDONALD, J. C. Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. *Rev.Infect.Dis.*, v. 12, n. 1, p. 63-74, 1990.

TOSH, K.; MEISNER, S.; SIDDIQUI, M. R.; BALAKRISHNAN, K.; GHEI, S.; GOLDING, M. et al. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J.Infect.Dis.*, v. 186, n. 8, p. 1190-1193, 2002.

VAN BEERS, S. M.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 136, n. 3, p. 221-230, 1996.

VAN, E. W.; DE VRIES, R. R.; MEHRA, N. K.; VAIDYA, M. C.; D'AMARO, J.; VAN ROOD, J. J. HLA segregation of tuberculoid leprosy: confirmation of the DR2 marker. *J.Infect.Dis.*, v. 141, n. 6, p. 693-701, 1980.

VAN, E. W.; GONZALEZ, N. M.; DE VRIES, R. R.; CONVIT, J.; VAN ROOD, J. J. HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J.Infect.Dis.*, v. 151, n. 1, p. 9-14, 1985.

VARADO-NAVARRO, A.; MONTOYA-BUELNA, M.; MUNOZ-VALLE, J. F.; LOPEZ-ROA, R. I.; GUILLEN-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.*, v. 118, n. 2, p. 148-151, 2008.

VISSA, V. D. ; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.*, v. 2, n. 8, p.

VOLKMAN, S. K.; LOZOVSKY, E.; BARRY, A. E.; BEDFORD, T.; BETHKE, L.; MYRICK, A. et al. Genomic heterogeneity in the density of noncoding single-nucleotide and microsatellite polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Gene*, v. 387, n. 1-2, p. 1-6, 2007.

WALKER, S. L. ; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. *Clin.Dermatol.*, v. 25, n. 2, p. 165-172, 2007.

Apêndices

Apêndice A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO

Determinantes ambientais e genéticos do Mal de Hansen no Rio Grande do Norte

PESQUISADORES

Selma M.B. Jeronimo, Maurício L. Nobre, Márcia C. Dias, Gutemberg Dias, Eliana T. Nascimento, Glória Monteiro, Olívia Sousa, Ana M. Oliveira Ramos, Alexandre O. Sales, Pedro B. Trindade-Neto, Richard D. Pearson, e Jenefer M. Blackwell

OBJETIVOS

Este estudo envolve pesquisa e objetiva determinar o que leva as pessoas a desenvolverem as doenças conhecidas como tuberculose e Mal de Hansen. Este estudo também pretende mapear as localidades onde foram registrados casos de hanseníase no Rio Grande do Norte, através de um aparelho que identifica as coordenadas geográficas, visando determinar fatores no ambiente que podem estar envolvidos na propagação da hanseníase. Coordenadas geográficas são linhas que determinam a posição de um local na terra. Esse registro será feito através de uso de um aparelho (GPS) que capta sinais vindos de satélites circulantes em volta da Terra.

PESQUISA GENÉTICA

Esta pesquisa se propõe a ler informações na molécula do DNA. DNA é a substância encontrada dentro das nossas células, herdada dos nossos pais e transmitidas por nós aos nossos filhos. Estamos fazendo esses estudos para compreendermos porque as pessoas adoecem com o mal de Hansen e tuberculose.

PROCEDIMENTOS

Procedimentos a serem realizados para aqueles que concordarem em participar do estudo:

1. Realização de uma consulta médica;
2. Coleta das coordenadas geográficas,
3. Coleta de sangue, para extração de células, DNA, plasma e soro, aproximadamente 10-20 ml de sangue.
4. Biópsia de pele, para realização de exame de histopatologia para confirmação da lesão hanseníase.
5. Coleta de esfregaço da boca.

RISCOS

Os riscos associados à participação neste estudo são mínimos e podem ser sangramentos ou manchas arroxeadas no local da coleta do sangue, infecção e desmaio. Os riscos desses procedimentos são minimizados, seguindo os cuidados de higiene e pressão e uso de técnicas de higiene adequadas. Trataremos complicações que possam ocorrer. A biópsia de pele somente será realizada em mancha ou ferida suspeita. O procedimento será realizado por um dermatologista ou cirurgião. Esta pesquisa envolve o estudo de DNA e assumimos o compromisso que o mesmo será usado para os objetivos aqui propostos.

ARMAZENAMENTO E MEDIDAS DE PROTEÇÃO

Estamos solicitando sua permissão para armazenar e ter sob nossa guarda amostra do seu sangue e produtos derivados (soro, plasma, células e DNA), no Laboratório de Imunogenética, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob a responsabilidade da Prof. Selma Jeronimo. Assumimos o compromisso que seguiremos as normas que estão sendo elaboradas pela UFRN, referente a banco de amostras biológicas e de dados. Todas as amostras serão numeradas e codificadas, através de código de barras. Apesar de não termos conhecidos até o momento fatores genéticos específicos que regulem a resposta imune, necessário a realização de acompanhamento clínico ou de aconselhamento genético, para aqueles indivíduos portadores, nós informaremos a vocês resultados destes estudos que sejam importantes para a sua saúde ou de algum membro da sua família.

Nós nos comprometemos a submeter qualquer projeto novo ao CEP-UFRN e CONEP e você será consultado a respeito do mesmo. Pedimos permissão para anotar o seu endereço para futuro contato. Os resultados dos estudos genéticos serão mantidos em sigilo absoluto. Não permitiremos acesso às informações encontradas a terceiros; tais como, seguradoras de saúde ou a empregadores e superiores hierárquicos.

BENEFÍCIOS

Os benefícios em participar deste estudo são aqueles individuais, nos quais você e os membros de sua família serão avaliados por um médico, quanto à possibilidade de exposição aos organismos que causam tuberculose e Hansen. O diagnóstico e o tratamento precoces podem diminuir complicações da doença, sendo um dos benefícios direto de sua participação neste estudo. Os benefícios coletivos são aqueles oriundos da compreensão da razão que levam as pessoas a desenvolverem essas doenças. Não haverá ônus para você em decorrência dos testes ou tratamento que realizarmos.

CONFIDENCIALIDADE DO ESTUDO

O registro da sua participação neste estudo será mantido em sigilo. Guardaremos os registros de cada pessoa, em sala trancada, e somente a Dra. Selma Jeronimo e/ou pesquisadores trabalhando na equipe terão acesso a estas



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

informações. Cada indivíduo receberá um número, sendo o sangue e/ou outra amostra coletado identificada através deste número, codificado em barras. O nome do participante não aparecerá no tubo. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, a identificação do paciente não será revelada. Os resultados serão relatados de forma sumariada e a pessoa não será identificada.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

Você será ressarcido, isto é reembolsado, de qualquer despesa decorrente de sua participação nesta pesquisa. Se houver algum dano ou se algum problema ocorrer decorrente desse estudo ou devido a negligência de algum membro da nossa equipe, tratamento médico será fornecido sem ônus e será providenciado pela Dra. Selma Jeronimo e/ou médico que esteja trabalhando neste projeto.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Toda participação é voluntária. Não há penalidade para alguém que decida não participar neste estudo. Ninguém também será penalizado se decidir desistir de participar do estudo, em qualquer época.

PERGUNTAS

Se houver alguma pergunta ou dúvida, vocês podem contatar a Dra Selma Jeronimo (84-3215-3428) no Departamento de Bioquímica da UFRN, em Natal, RN.

COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/CNS/Ministério da Saúde, Brasília). O CEP-UFRN fica localizado no Campus Universitário (fone 84-3215-3135), Natal, RN.

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO

Estou de acordo com a participação no estudo descrito acima, me submetendo e também autorizando a participação de meus filhos menores. Fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido e os possíveis riscos envolvidos na minha participação.

Dou permissão para que o restante do DNA, do soro e do plasma isolados do meu sangue, e que não sejam utilizados nesta pesquisa, sejam guardados no Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sabendo que serei contactado, caso estudos adicionais sejam realizados.

Dou permissão para que DNA, soro e plasma, necessários a realização desta pesquisa seja encaminhada, quando necessário for, a Universidade de Cambridge, para que sejam realizados os estudos genéticos ligados a doença de Hansen. Os pesquisadores me garantiram que este procedimento seguirá a legislação vigente no Brasil e que após o término do projeto, este material será repatriado para o Brasil, ficando sob a guarda da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Dou permissão também para realização do Teste HIV e para que os pesquisadores registrem meu endereço e coletem informações referentes à minha residência, incluindo a coleta das coordenadas geográficas.

Os pesquisadores me garantiram disponibilizar qualquer esclarecimento que se torne necessário e o direito de desistir da participação neste estudo em qualquer momento, sem que a minha desistência implique em qualquer prejuízo a minha pessoa ou a minha família. Os pesquisadores também me garantiram o envio dos resultados dos testes realizados com o meu sangue, caso estas informações sejam importantes para minha saúde ou da minha família.

A minha participação ou a participação do meu filho(a) menor na pesquisa é voluntária, e não implicará em custos ou prejuízos adicionais, sejam esses custos ou prejuízos de caráter econômico, social, psicológico ou moral, sendo garantido o anonimato e o sigilo dos dados referentes a minha identificação.

ASSINATURAS:



Impressão dactiloscópica (sujeito da pesquisa ou seu representante legal)

Data ____/____/____.

Sujeito da Pesquisa ou seu representante legal

Data ____/____/____.

Pesquisador Responsável

Apêndice B

	ETIQUETA
PACIENTE	
DATA: ____ ____ ____	Visita 1ª __ 2ª __ 3ª __
NOME _____	CADASTRO ____
APELIDO: _____	
PAI _____	CADASTRO ____
APELIDO: _____	
MÃE _____	CADASTRO ____
APELIDO: _____	
FAMÍLIA _____	IDADE: ____ DATA DO NASCIMENTO: ____ ____ ____
ENDEREÇO _____	
BAIRRO _____	Cidade: _____ Fone: _____
REFERÊNCIA _____	
COORDENADAS _____	

Unidade de Tratamento: _____	
Número do Prontuário: _____	
COLETA:	
1. Sangue: __ 0: não __ 1: sim	4. Biópsia de pele: __ 0: não __ 1: sim
2. Swab nasal: __ 0: não __ 1: sim	5. Baciloscopia __ 0: não __ 1: sim
3. Esfregaço de mucosa __ 0: não __ 1: sim	6. TCLE __ 0: não __ 1: sim
PENDÊNCIAS: _____	
INTERCORRÊNCIAS: _____	INDICAR: _____
Responsável pelo registro de entrada: _____	RECEBIMENTO: __ __ __
DIGITADOR 1: _____	RECEBIMENTO: __ __ __ DIGITAÇÃO __ __ __
DIGITADOR 2: _____	RECEBIMENTO: __ __ __ DIGITAÇÃO __ __ __
FORMULÁRIO 6 – VERSÃO 01-06	
1 DE 6	

ETIQUETA

PACIENTE

I. IDENTIFICAÇÃO

Família: |_____| Cadastro |_____| Caso índice: |_____|
 Sexo: |_____| Idade: _____ DN: |_____|_____| CAD Pai |_____| CAD Mãe |_____|
 Ocupação: |_____|
 Escolaridade: |_____| 0: sem escolaridade |_____| 3: II grau incompleto |_____| 6: III grau completo
 |_____| 1: I grau incompleto |_____| 4: II grau completo
 |_____| 2: I grau completo |_____| 5: III grau incompleto

II. EPIDEMIOLOGIA

Município de Nascimento: |_____| UF |_____|
 Residiu em outros municípios por período igual ou superior a 6 meses? |_____| 0: não |_____| 1: sim
 Quais? Município |_____| UF |_____|
 Município |_____| UF |_____|
 Município |_____| UF |_____|
 Tempo de moradia no endereço atual:
 |_____| 1: menos de 6 meses |_____| 3: 1 a 2 anos
 |_____| 2: 6 meses a 1 ano |_____| 4: 2 a 5 anos |_____| 5: mais de 5anos
 Total Renda familiar |_____| 0: sem renda |_____| 2: 1 a 2 salários mínimos |_____| 4: 3 a 4 SM
 |_____| 1: até 1 salário mínimo |_____| 3: 2 a 3 salários mínimos |_____| 5: mais de 4 SM

III. QUEIXAS NOS ÚLTIMOS 12 MESES: |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação

|_____| 1: Lesões cutâneas |_____| 4: Diminuição de força muscular nas mãos e/ou nos pés
 |_____| 2: Parestesia |_____| 5: Obstrução ou sangramento nasal
 |_____| 3: Choque nas mãos e/ou nos pés |_____| 6: Cianose de extremidades |_____| 7: Edema de extremidades

Tempo de evolução antes do diagnóstico:

|_____| 1: menos de 6 meses |_____| 3: 1 a 2 anos
 |_____| 2: 6 meses a 1 ano |_____| 4: 2 a 5 anos |_____| 5: mais de 5anos

IV. ANTECEDENTES PESSOAIS:

Tuberculose |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação idade |_____|
 Diabetes |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 HAS |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 Alergia |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 Outros |_____|
 Internamentos |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 Causa(s) |_____|

PACIENTE

V. ANTECEDENTES FAMILIARES:

Tuberculose 0: não 1: sim 99: não sabe
 Leishmaniose 0: não 1: sim 99: não sabe
 Outros antecedentes | _____ |
 Hanseníase na família 0: não 1: sim 99: não sabe Número de casos
 Hanseníase na residência 0: não 1: sim 99: não sabe Número de casos
 Parentesco com o(s) caso(s) de HANSEN 1: seu pai 2: sua mãe 3: seu filho(a)
 4: seu esposo(a) 5: outros, especificar: | _____ |

VI. EXAME FÍSICO GERAL

1. Peso: Kg 2. PA X mm Hg
 3. Abdome
 0: normal 1: hepatomegalia 2: esplenomegalia 3: tumorações 99: sem informação
 Se houver hepatomegalia, especificar cm do rebordo costal
 Se houver esplenomegalia, especificar cm do rebordo costal

VII. EXAME DÉRMATO-NEUROLÓGICO

1. Número de cicatrizes de BCG:
 0: zero 1: uma 2: duas 99: sem informação
 Tamanho da(s) cicatriz(es) em centímetros X X
 2. Número de lesões cutâneas de hanseníase
 0: nenhuma 1: uma a cinco 2: seis a vinte 3: mais de vinte
 3. Tipo(s) de lesão(ões) observadas 0: sem lesões cutâneas
 1: máculas 4: lesões foveolares 7: Eritema Nodoso Hansênico (ENH)
 2: placas 5: infiltração 8: Área de anestesia s/ lesão cutânea
 3: hansenomas 6: Reação Reversa (RR) 99: sem informação
 4. Localização da(s) lesão(ões): | _____ |
 (utilizar os códigos do diagrama corporal ou 100 para disseminadas)
 5. Redução / ausência de sensibilidade superficial nas lesões
 0: não detectada 1: detectada 2: duvidosa 99: sem informação
 6. Troncos nervosos espessados 0: nenhum tronco nervoso espessado
 1: retroauricular D 4: ulnar E 7: mediano D 10: fibular E
 2: retroauricular E 5: radial D 8: mediano E 11: tibial post D
 3: ulnar D 6: radial E 9: fibular D 12: tibial post E
 7. Sensibilidade corneana ao fio dental 0: normal bilateral
 1: anestesia no olho D 3: anestesia bilateral
 2: anestesia no olho E 99: sem informação
 8. Sensibilidade ao kit de monofilamentos de Semmes-Weinstein na MÃO DIREITA

PACIENTE

8.1 Ponto 1	8.2 Ponto 2	8.3 Ponto 3	8.4 Ponto 4	8.5 Ponto 5	8.6 Ponto 6	8.7 Ponto 7
<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g
<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g
<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g
<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g
<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g
<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g
<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g

9. Sensibilidade ao kit de monofilamentos de Semmes-Weinstein na MÃO ESQUERDA

9.1 Ponto 1	9.2 Ponto 2	9.3 Ponto 3	9.4 Ponto 4	9.5 Ponto 5	9.6 Ponto 6	9.7 Ponto 7
<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g
<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g
<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g
<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g
<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g
<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g
<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g

10. Sensibilidade ao kit de monofilamentos de Semmes-Weinstein no PÉ DIREITO

10.1 Ponto 1	10.2 Ponto 2	10.3 Ponto 3	10.4 Ponto 4	10.5 Ponto 5
<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g
<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g
<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g
<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g
<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g
<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g
<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g

10.6 Ponto 6	10.7 Ponto 7	10.8 Ponto 8	10.9 Ponto 9	10.10 Ponto 10
<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g	<input type="checkbox"/> 6: 0,05g
<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g	<input type="checkbox"/> 5: 0,2 g
<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g	<input type="checkbox"/> 4: 2 g
<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g	<input type="checkbox"/> 3: 4 g
<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g	<input type="checkbox"/> 2: 10 g
<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g	<input type="checkbox"/> 1: 300 g
<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g	<input type="checkbox"/> 0: não sente 300 g

11. Sensibilidade ao kit de monofilamentos de Semmes-Weinstein no PÉ ESQUERDO

PACIENTE

11.1 Ponto 1

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.2 Ponto 2

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.3 Ponto 3

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.4 Ponto 4

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.5 Ponto 5

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.6 Ponto 6

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.7 Ponto 7

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.8 Ponto 8

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.9 Ponto 9

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

11.10 Ponto 10

 6: 0,05g 5: 0,2 g 4: 2 g 3: 4 g 2: 11 g 1: 300 g 0: não
sente 300 g

12. Força muscular nas mãos e pés (gradação padrão de 0 a 5, 99:sem informações)

12.1 abdução do dedo mínimo D 0 1 2 3 4 512.2 abdução do polegar D 0 1 2 3 4 512.3 extensão do punho D 0 1 2 3 4 512.4 abdução do dedo mínimo E 0 1 2 3 4 512.5 abdução do polegar E 0 1 2 3 4 512.6 extensão do punho E 0 1 2 3 4 512.7 extensão do hálux D 0 1 2 3 4 512.8 extensão do hálux E 0 1 2 3 4 512.9 dorsiflexão plantar D 0 1 2 3 4 512.10 dorsiflexão plantar E 0 1 2 3 4 5

13. Grau de incapacidade atribuído

 0: grau zero 2: grau II 1: grau I 3: não avaliado 99: sem informações14. Em casos de incapacidade grau II, especificar as alterações encontradas: 0: grau diferente de II 1: lagoftamo e/ou ectrópio 7: reabsorção nas mãos 2: triquiase 8: mão caída 3: opacidade corneana central 9: lesões tróficas e/ou traumáticas nos pés 4: acuidade visual < 0,1 10: garras de artelhos 5: lesões tróficas e/ou traumáticas nas mãos 11: reabsorção nos pés

PACIENTE

 6: garras nas mãos 12: pé caído

15. Hipótese Clínica

 1: LL 3: BB 5: TT 7: forma neural pura 2: BL 4: BT 6: I 8: não classificada / inconclusiva

VIII. EXAMES COMPLEMENTARES

1. Teste da histamina 0: não realizado 1: prova completa 2: prova incompleta2. Baciloscopia 0: não realizada 1: realizada

Se realizada, escrever o Índice baciloscópio médio (IB médio) no esfregaço dérmico _____

3. Biópsia de pele 0: não realizada 1: realizada

Se realizada, qual a classificação histopatológica?

 1: LL 3: BB 5: TT 7: forma neural pura 2: BL 4: BT 6: I 8: não classificada/inconclusiva

Localização da(s) lesão(ões) biopsiada(s): _____ (códigos do diagrama corporal)

Índice baciloscópio médio (IB médio) no fragmento examinado na biópsia _____

4. Coleta de fragmento de pele para congelação 0: não realizada 1: realizada5. Sorologia anti-PGL-I 0: não realizada 1: realizada6. PCR 0: não realizada 1: realizadaSe realizada coleta 1: swab nasal 2: linfa

IX. CONCLUSÃO

1. Forma Clínica 1: LL 3: BB 5: TT 7: forma neural pura 2: BL 4: BT 6: I 8: não classificada / inconclusiva2. Classificação Operacional 1: PB 2: MB 3. Data do início do tratamento: ____/____/____

X. COLETA DE SANGUE

Em relação ao tratamento 1: antes 2: durante PQT 3: após PQT

Em que dose da PQT _____ (0=antes do tratamento ou número de doses, 88: depois da PQT)

Número de meses após o fim da PQT _____ (0=antes ou durante PQT ou número de meses após PQT)

Reação reversa 0: não 1: sim Eritema nodoso hansênico 0: não 1: sim

Dose diária média de prednisona na última semana _____ mg

Dose diária média de talidomida na última semana _____ mg

Responsável pelas informações: _____ data _____/_____/_____

DIGITADOR 1: _____ RECEBIMENTO: _____ DIGITAÇÃO _____

DIGITADOR 2: _____ RECEBIMENTO: _____ DIGITAÇÃO _____

Apêndice C

COMUNICANTE	ETIQUETA	
DATA: ____/____/____		
<input type="checkbox"/> Comunicante intradomiciliar de caso	<input type="checkbox"/> Comunicante extradomiciliar	
NOME	_____	CADASTRO <input type="checkbox"/>
APELIDO:	_____	
PAI	_____	CADASTRO <input type="checkbox"/>
APELIDO:	_____	
MÃE	_____	CADASTRO <input type="checkbox"/>
APELIDO:	_____	
Nº FAMÍLIA	_____	IDADE: ____ DATA DO NASCIMENTO: ____/____/____
ENDEREÇO	_____	
BAIRRO	_____	Cidade: _____ Fone: _____
REFERÊNCIA	_____	
COORDENADAS	_____	_____
COLETA:		
1. Sangue:	<input type="checkbox"/> 0: não <input type="checkbox"/> 1: sim	3. Esmagamento de mucosa <input type="checkbox"/> 0: não <input type="checkbox"/> 1: sim
2. Swab nasal:	<input type="checkbox"/> 0: não <input type="checkbox"/> 1: sim	4. TCLE <input type="checkbox"/> 0: não <input type="checkbox"/> 1: sim
PENDÊNCIAS:	_____	
INTERCORRÊNCIAS:	<input type="checkbox"/>	INDICAR: _____
Responsável pelo registro de entrada:	_____	RECEBIMENTO: ____/____/____
DIGITADOR 1:	_____	RECEBIMENTO: ____/____/____ DIGITAÇÃO ____/____/____
DIGITADOR 2:	_____	RECEBIMENTO: ____/____/____ DIGITAÇÃO ____/____/____

COMUNICANTE

ETIQUETA

I. IDENTIFICAÇÃO

Família: |_____| Cadastro |_____| Caso índice: |_____|
 Sexo: |_____| Idade: _____ DN: |_____|_____|_____| CAD Pai |_____| CAD Mãe |_____|
 Ocupação: |_____|
 Escolaridade: |_____| 0: sem escolaridade |_____| 3: II grau incompleto |_____| 6: III grau completo
 |_____| 1: I grau incompleto |_____| 4: II grau completo
 |_____| 2: I grau completo |_____| 5: III grau incompleto

II. EPIDEMIOLOGIA

Município de Nascimento: |_____| UF |_____|
 Residiu em outros municípios por período igual ou superior a 6 meses? |_____| 0: não |_____| 1: sim
 Quais? Município |_____| UF |_____|
 Município |_____| UF |_____|
 Município |_____| UF |_____|

Tempo de moradia no endereço atual:

|_____| 1: menos de 6 meses |_____| 3: 1 a 2 anos
 |_____| 2: 6 meses a 1 ano |_____| 4: 2 a 5 anos |_____| 5: mais de 5 anos

Total Renda familiar |_____| 0: sem renda |_____| 2: 1 a 2 salários mínimos |_____| 4: 3 a 4 SM
 |_____| 1: até 1 salário mínimo |_____| 3: 2 a 3 salários mínimos |_____| 5: mais de 4 SM

III. ANTECEDENTES PESSOAIS:

Tuberculose |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação idade |_____|
 Diabetes |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 HAS |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 Alergia |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 Outros |_____|
 Internamentos |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe / sem informação
 Causa(s) |_____|

IV. ANTECEDENTES FAMILIARES:

Tuberculose |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe
 Leishmaniose |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe
 Outros antecedentes |_____|
 Hanseníase na família |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe |_____| Número de casos
 Hanseníase na residência |_____| 0: não |_____| 1: sim |_____| 99: não sabe |_____| Número de casos
 Parentesco com o(s) caso(s) de HANSEN |_____| 1: seu pai |_____| 2: sua mãe |_____| 3: seu filho(a)
 |_____| 4: seu esposo(a) |_____| 5: outros, especificar: |_____|

COMUNICANTE

V. EXAME FÍSICO GERAL1. Peso: Kg 4. Altura cm 5. Circunferência abdominal cm2. PA X mm Hg

3. Abdome

 0:normal 1:hepatomegalia Se houver hepatomegalia, especificar cm do rebordo costal 2:esplenomegalia 3:tumorações Se houver esplenomegalia, especificar cm do rebordo costal 99:sem informação**VI. EXAME DÉRMATO-NEUROLÓGICO**

1. Número de cicatrizes de BCG:

 0:zero 1:uma 2:duas 99:sem informaçãoTamanho da(s) cicatriz(es) em milímetros X X

2. Número de lesões cutâneas de hanseníase

 0:nenhuma 1: uma a cinco 2: seis a vinte 3: mais de vinte3. Tipo(s) de lesão(ões) observadas 0: sem lesões cutâneas 1: máculas 4: lesões foveolares 7: Eritema Nodoso Hansênico (ENH) 2: placas 5: infiltração 8: Área de anestesia s/ lesão cutânea 3: hansenomas 6: Reação Reversa (RR) 99:sem informação

4. Redução / ausência de sensibilidade superficial nas lesões

 0: não detectada 1: detectada 2: duvidosa

5. Troncos nervosos espessados

 0: nenhum tronco nervoso espessado 1: retroauricular D 4 :ulnar E 7: mediano D 10: fibular E 2: retroauricular E 5: radial D 8: mediano E 11: tibial post D 3 :ulnar D 6: radial E 9: fibular D 12:tibial post E**VII. CONCLUSÃO**

1. Diagnóstico de hanseníase

 0:descartado 1:confirmadoResponsável pelas informações: data DIGITADOR 1: RECEBIMENTO: DIGITAÇÃO DIGITADOR 2: RECEBIMENTO: DIGITAÇÃO

Apêndice D



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N.º 617/2003

Registro CONEP: 7504 (Este n.º deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 15/03

Processo n.º 25000.026144/2003-78

Projeto de Pesquisa: "Susceptibilidade genética à tuberculose e doença de Hansen no Nordeste do Brasil"

Pesquisador Responsável : Dr.ª. Selma Maria Bezerra Jerônimo

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte / UFRN

Área Temática Especial : Genética Humana

Pesquisa com cooperação estrangeira

O projeto tem como objetivo estudar famílias com história de múltiplos casos de tuberculose e de doença de Hansen, para determinar o papel dos genes ou regiões gênicas implicados na susceptibilidade à *Mycobacterium* e estudar famílias com casos esporádicos de ambas as doenças, para realizar o mapeamento fino dos genes de susceptibilidade à infecção por micobactérias, na população do Rio Grande do Norte. Estudos anteriores indicam que a susceptibilidade à *Mycobacterium* é geneticamente regulada e aquele semelhante realizado no Pará parece indicar que o modelo de herança é de controle único, sugerindo o modelo usado em análise paramétrica. Entretanto, os pesquisadores, naquele projeto, optaram por analisar outras regiões dos genes candidatos e os dados da varredura do genoma através de análises não paramétricas. Agora se pretende realizar o mapeamento fino, que não foi conclusivo no estudo anterior em razão da dificuldade de ter grupos de descendentes. A amostra deverá totalizar, aproximadamente, 3.000 pessoas em dois anos, a partir daquelas arroladas em consulta de segmento nos ambulatórios dos hospitais Giselda Trigueiro e Universitário Onofre Lopes. Foram apresentados: bibliografia pertinente e atualizada, análise crítica dos benefícios esperados, orçamento adequado, descrição das responsabilidades dos pesquisadores e das instituições, que possuem a infra-estrutura necessária e concordam em participar da pesquisa, com o local de realização das várias etapas. Note-se que a varredura do genoma será realizada na Universidade de Cambridge, com a participação de alunos de pós-graduação da UFRN.

Cont. Parecer CONEP nº 617/2003

O material colhido será guardado (DNA, soro e plasma) no Departamento de Bioquímica da UFRN e qualquer nova pesquisa será submetida ao CEP e à CONEP, solicitando-se um novo consentimento antes de iniciado o estudo. A participação estrangeira nessa pesquisa deverá trazer vantagens para o avanço do conhecimento e responde à necessidade de treinamento de pessoal no Brasil.

O TCLE é muito completo e está escrito em linguagem acessível. Ele contém explicações detalhadas sobre a justificativa, os objetivos e os procedimentos do estudo, os benefícios esperados, a possibilidade de obtenção de esclarecimentos antes e durante a pesquisa sobre a metodologia e de recusar ou retirar o consentimento sem penalizarão, a garantia de sigilo e privacidade e as medidas de proteção da confidencialidade.


O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

As informações enviadas atendem, de modo geral, aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 24 de abril de 2003


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS