

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

JULIA MONTEIRO PEREIRA LEAL

**ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE DE IDOSOS À HANSENÍASE *PER*
SE POR MEIO DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *PARK2*
E *NOD2***

DIREITO AUTENTAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



RIO DE JANEIRO

2018



UNIRIO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

INSTITUTO BIOMÉDICO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JULIA MONTEIRO PEREIRA LEAL

Estudo da suscetibilidade de idosos à Hanseníase *per se* por meio da avaliação da expressão gênica de *PARK2* e *NOD2*

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina. Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Dra. Danuza de Almeida Esquenazi

Coorientador: MSc. Pedro Henrique Lopes da Silva



Rio de Janeiro

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

L433 Leal, Julia Monteiro Pereira

Estudo da suscetibilidade de idosos à Hanseníase *per se* por meio da avaliação da expressão gênica de *PARK2* e *NOD2* / Julia Monteiro Pereira Leal - Rio de Janeiro, 2018.

64

Orientadora: Danuza de Almeida Esquenazi.

Coorientador: Pedro Henrique Lopes da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Graduação em Biomedicina, 2018.

1. Hanseníase. 2. Idosos. 3. Imunossenescência. 4. Expressão Gênica.
I. Esquenazi, Danuza de Almeida, orient. II Silva, Pedro Henrique Lopes da, coorient. III. Estudo da suscetibilidade de idosos à Hanseníase *per se* por meio da avaliação da expressão gênica de *PARK2* e *NOD2*.

LEI DO DIREITO AUTOCATÁLOGO protegidas
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



LEI DO DIREITO AUTORAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz - IOC - na Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, sob orientação da Dra. Danuza de Almeida Esquenazi e co-orientação do MSc. Pedro Henrique Lopes da Silva.

JULIA MONTEIRO PEREIRA LEAL

**ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE DE IDOSOS À HANSENÍASE *PER SE* POR
MEIO DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *PARK2* E *NOD2***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação,
apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de
concentração de Imunologia, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Dra. Danuza de Almeida Esquenazi, FIOCRUZ (Orientadora científica)

MSc. Pedro Henrique Lopes da Silva, FIOCRUZ (Coorientador)

Prof. Dra. Rosa Maria Tavares Haido, UNIRIO (Orientadora acadêmica)

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento, UNIRIO

MSc. Luciana Nahar dos Santos, FIOCRUZ

MSc. Tamiris Lameira Bittencourt, FIOCRUZ



AGRADECIMENTOS

A Deus por toda a força e coragem para seguir em frente mediante a todos os obstáculos. E por ter me proporcionado momentos incríveis ao lado de pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a minha formação.

Aos meus familiares, em especial meus pais, irmão, vó, primos e tios pelo amor, carinho e apoio incondicional. Apesar de todas as dificuldades, estavam sempre me fortalecendo com incentivos e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

A minha equipe do laboratório de Hanseníase, especialmente aos meus orientadores Danuza Esquenazi e Pedro Henrique Lopes que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Estavam a todo tempo dispostos a me ajudar, dando todo o tipo de suporte com muita compreensão, paciência, amizade e aprendizado. Agradeço à Katherine Kelda e Luciana Nahar por todos os conselhos, companheirismo e auxílio em momentos de dúvidas de trabalho e situações cotidianas. Sou muito grata também à Mayara Mendes, que me ajudou muito na reta final deste trabalho, me proporcionando conhecimentos acerca da metodologia do mesmo.

E as minhas amigas Anna Carolina Nóbrega, Júlia Leite, Michellin Albuquerque, Mylena Masseno e Viviane Viana que fizeram parte da minha trajetória ao longo de todos os anos de estudo, compartilharam comigo lágrimas e alegria, e contribuíram para o meu crescimento como pessoa. Agradeço imensamente pela amizade de vocês.



RESUMO

A hanseníase é uma doença crônica infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular obrigatório que possui tropismo por macrófagos e células de Schwann. A doença apresenta tendência de maior prevalência em adultos jovens e o seu diagnóstico ocorre geralmente entre 20 e 40 anos de idade. Entretanto, os últimos boletins epidemiológicos apontam aumento na incidência da doença em indivíduos idosos – acima de 60 anos. Existem alguns estudos que provam a relação entre suscetibilidade genética e infecções, porém as bases moleculares de vulnerabilidades genéticas resultantes da maioria das infecções micobacterianas em humanos ainda não são bem conhecidas. A imunossenescência também é capaz de ocasionar um aumento da suscetibilidade a diversas doenças virais e bacterianas, como a hanseníase. O presente estudo teve como objetivo analisar a expressão dos genes *PARK2* e *NOD2* associados com a suscetibilidade à hanseníase. O estudo contou com a presença de dois grupos, a saber: 10 pacientes idosos multibacilares e 10 pacientes idosos paucibacilares. Todos os pacientes foram acompanhados no ASA, parte do Laboratório de Hanseníase (LAHAN) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, no Rio de Janeiro. Para as amostras biológicas, foram realizadas técnicas de extração e purificação de RNA total, transcrição reversa e quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real, a partir de amostras de sangue total. A expressão dos genes *PARK2* e *NOD2* não apresentaram diferenças significativas entre as formas clínicas, assim como quando correlacionada com o índice baciloscópico da forma multibacilar. O nível de expressão de *PARK2* aumenta com o envelhecimento dos paucibacilares, sendo tal correlação significativa, o que não ocorre com os multibacilares. Em ambas as formas a expressão gênica de *NOD2* não apresenta diferenças significativas. Dessa forma, foi possível observar que o aumento da expressão do gene *PARK2* está associado com o envelhecimento dos pacientes, sobretudo na forma paucibacilar da doença, e que o gene *NOD2* parece não estar relacionado com o mecanismo de imunossenescência dos pacientes idosos estudados.

Palavras-chave: hanseníase; idosos; expressão gênica; imunossenescência.



ABSTRACT

Leprosy is a chronic, infectious and contagious disease caused by *Mycobacterium leprae*, obligate intracellular bacteria showing tropism for macrophages and Schwann cells. The disease is primarily prevalent in young adults, being usually diagnosed between 20 and 40-years old. Nevertheless, the latest epidemiologic bulletins indicate an increased incidence of leprosy in elderly – above 60-years old. Some studies demonstrate a relation between gene susceptibility and infections, even though the molecular basis of vulnerable gene conditions resulting from most mycobacterial infections in humans still requires clarification. In addition, immunosenescence may provoke increased susceptibility to several viral and bacterial diseases, such as leprosy. This study intended to assess the expression of *PARK2* and *NOD2* genes in correlation with susceptibility to leprosy, and was performed in the following two groups: 10 multibacillary elderly patients and 10 paucibacillary elderly patients, all of them under follow-up at the Outpatient Unit (ASA) integrating the Leprosy Laboratory (LAHAN) of Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, in Rio de Janeiro. The biological samples were obtained by using extraction and purification techniques of whole RNA, reverse transcription and gene expression quantification through real-time quantitative PCR from samples of whole blood. The *PARK2* and *NOD2* gene expressions did not present significant differences in the clinical forms, and the same occurred as we associated them to the bacilloscopic index of multibacillary form. *PARK2* expression level increases throughout the ageing of paucibacillary patients, and such correlation is significant, as opposed to the data from multibacillary individuals. In both forms, *NOD2* gene expression does not present significant differences. Thus, we noted that the increased *PARK2* gene expression is associated to ageing, particularly in the paucibacillary form of the disease, and that *NOD2* gene does not appear to be related to the immunosenescence mechanism among the studied elderly.

Key words: leprosy, elderly, gene expression, immunosenescence.



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vestimenta dos portadores de hanseníase	2
Figura 2 - Taxa de incidência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no ano de 2015	6
Figura 3 - Organização da parede celular do <i>M. leprae</i>	8
Figura 4 - Classificação clínica, biológica e terapêutica da hanseníase	11
Figura 5 - Características macro e microscópicas das lesões das formas polares da hanseníase	13
Figura 6 - Teste de Mitsuda positivo	14
Figura 7 - Parquina e seu papel na degradação de proteínas alvos	20
Figura 8 - Especificidade espacial da sinalização de <i>NOD2</i> induzida por MDP	21
Figura 9 - Expressão dos genes <i>PARK2</i> (gráfico à esquerda) e <i>NOD2</i> (gráfico à direita) de acordo com os grupos estudados, PB e MB	35
Figura 10 - Correlação entre a expressão gênica de <i>PARK2</i> (gráfico à esquerda) e <i>NOD2</i> (gráfico à direita) e o índice baciloscópico	36
Figura 11 - Correlação entre a expressão gênica de <i>PARK2</i> com a idade de pacientes PB (gráfico à esquerda) e MB (gráfico à direita)	37
Figura 12 - Correlação entre o nível de expressão de <i>NOD2</i> de pacientes PB (gráfico à esquerda) e MB (gráfico à direita) e a idade	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais datas associadas ao histórico da hanseníase	3
Tabela 2 - Principais doenças negligenciadas tropicais de acordo com o agente etiológico, a nível global	5
Tabela 3 - Lesões dermatológicas mais comuns na hanseníase	12
Tabela 4 - Dados demográficos e clínicos dos indivíduos analisados	33
Tabela 5 - Quantificação relativa dos genes de interesse	34

LEI DO DIREITO AUTOMÁTICO
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



Lista de Siglas e Abreviaturas

ASA – Ambulatório Souza Araújo

BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente

BB - *Borderline* Borderline

BL- *Borderline* Lepromatosa

BR1 – Tampão de ressuspensão 1

BR2 - Tampão de ressuspensão 2

BR3 - Tampão de ressuspensão 3

BR4 - Tampão de ressuspensão 4

BR5 - Tampão de ressuspensão 5

BT – *Borderline* Tuberculoide

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CMV - Citomegalovírus

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

ENH - Eritema Nodoso Hansênico

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GI - Grau de Incapacidade

HUPE – Hospital Universitário Pedro Ernesto

IB - Índice Baciloscópico

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2



IL-4 - Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

LAHAN- Laboratório de Hanseníase

LL - Lepromatosa

MB - Multibacilares

MCP-1 - Proteína Químioatraente de Monócitos-1

MDP - Muramil Dipeptídeo

MS - Ministério da Saúde

NOD2 - Domínio de ligação da Oligomerização de Nucleotídeos 2

NRAMP1 - Proteína de Macrófagos Associada à Resistência Natural 1

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PARK 2 - Parquína

PB - Paucibacilares

PBS – Salina Tampão Fosfato

PGL-1 - Glicolípido Fenólico 1

PQT - Poliquimioterapia

PRR - Receptor de Reconhecimento de Padrões

RR - Reação Reversa

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único



TCLE – Termo de Compromisso Livre e Esclarecido

T_H1 – Linfócito T *helper* 1

T_H2 – Linfócito T *helper* 2

TLR 2 –Receptor *Toll-like* 2

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TT - Tuberculoide

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

VDR - Receptor de Vitamina D

LEI DO DIREITO AUTORAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos históricos da hanseníase	1
1.2 Epidemiologia	4
1.3 Agente etiológico	7
1.4 Espectro clínico e estratégias terapêuticas	9
1.5 Mecanismos de transmissão	15
1.6 Diagnóstico	16
1.7 Aspectos genéticos envolvidos com a suscetibilidade à hanseníase	17
1.8 Imunossenescência e dinâmica das doenças inflamatórias	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 População de estudo	27
4.2 Considerações éticas e biossegurança	27
4.3 Coleta e estocagem das amostras biológicas	28
4.5 Extração e purificação de RNA total	28
4.5 Quantificação e pureza do RNA	29
4.6 Obtenção de cDNA	30
4.7 Quantificação da expressão gênica de fatores transcricionais por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	30
4.8 Análise dos dados obtidos a partir de RT-qPCR	31
4.9 Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Análise de dados demográficos e clínicos dos grupos de estudo	32
5.2 Quantificação dos genes de interesse	33

5.3 Análise da expressão gênica com as formas PB e MB da doença	34
5.4 Correlação entre expressão gênica e índice bacilosκόpico dos pacientes MB	35
5.5 Correlação entre quantificação gênica e idade dos pacientes PB e MB	36
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LEI DO DIREITO AUTORAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos da hanseníase

A hanseníase é uma doença crônica infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular obrigatório que possui tropismo por macrófagos e células de Schwann (Scollard et al., 2006). A doença causa lesões cutâneas, neuropatia periférica e anestesia, com posterior desenvolvimento de deformidades, cegueira e até desfiguração facial (Lockwood et al., 2005; Spencer et al., 2011).

Ao longo da história, o portador da doença foi visto como "senhor do perigo e da morte", sendo esta doença diferenciada das demais pelo grande estigma social (Garcia, 2001). Há milhares de anos, devido ao pouco conhecimento sobre a doença, medidas drásticas eram tomadas como expulsão de pacientes de suas famílias e sociedade, separações, perda de amigos e demissões do trabalho (Trautman, 1984).

Durante o período medieval, a história do caminho percorrido pela hanseníase foi objeto de estudo para o impacto da doença na sociedade. De acordo com registros escritos e arqueológicos, após os séculos VI e VII a doença se instalou como endemia na Europa, durante a Alta Idade Média. No século XIV, a endemia começa a declinar, e após dois séculos está praticamente extinta. Durante essa trajetória, mecanismos de segregação dos doentes eram práticas de forte aceitação social, que tinham como objetivo o controle da doença que era caracterizada como impura e altamente contagiosa (Pinto, 1985).

Neste mesmo período, os pacientes eram confinados em leprosários, que foram se multiplicando no decorrer dos séculos chegando a existir um total de 19 mil estabelecimentos. Acreditava-se que a doença era hereditária, então homens eram separados de mulheres para que fosse evitada a reprodução. O caráter religioso influenciava também nessa questão, pois o homem medieval associava deformidades físicas ao pecado e a uma figura impura (Pinto, 1985).

Uma obra literária de Pieter Bruegel do século XVI chamada "Os aleijados" mostra como os doentes tinham permissão de sair dos leprosários: vestindo capas

nas quais eram pregados rabos de raposas, tendo em vista que nunca ficaram totalmente restritos aos leprosários, podendo frequentar locais autorizados. O objetivo, portanto, era fazer com que todos notassem a presença dos doentes e se afastassem deles (Pinto, 1985). A Figura 1 ilustra essa realidade.



Figura 1: Vestimenta dos portadores de hanseníase. Acervo do Museu do Louvre, Paris. Obra literária de Pieter Bruegel.

No Brasil, verifica-se que o estabelecimento da doença ocorreu com o avanço da colonização pelos portugueses, antes disso não há menção de hanseníase entre os ameríndios. Na época do descobrimento do Brasil, a doença era encontrada em ilhas africanas, portanto, acredita-se que a doença tenha chegado ao Brasil não só pelos portugueses, mas também por povos europeus, sendo o tráfico de escravos o maior meio de disseminação da doença (Monot et al., 2005; Monteiro, 1987).

Não é possível saber exatamente quando os primeiros indivíduos infectados chegaram ao Brasil, entretanto, acredita-se que foi através da chegada de colonos, especialmente os da Ilha da Madeira. Durante o século XVII, no Rio de Janeiro, existiam muitos doentes, o que foi alarmante para as autoridades (Garcia, 2001; Monot et al., 2005). Em 1737, foram tomadas algumas medidas sanitárias, dentre elas a criação do primeiro leprosário construído pela Irmandade de Nossa Senhora da Candelária. No século XVIII, surgiram as primeiras indicações de isolamento dos leprosos como medida de contenção da epidemia. Já no século XX, foram construídos asilos para abrigar os doentes, locais onde não havia assistência

médica e tratamento, o que visava a proteção para a população sadia, e não o atendimento de necessidades desses pacientes (Monot et al., 2005).

Tabela 1: Principais datas associadas ao histórico da hanseníase

Ano	Fato histórico
600 a.C.	1ª descrição da hanseníase em um tratado indiano;
1873	Gerhard Henrick Armauer Hansen identifica o agente causador da doença;
1941	1ª publicação sobre a eficácia da dapsona por Faget;
1960	Shepard quantifica a multiplicação do bacilo da hanseníase na pata de camundongo;
1964	1º caso reportado de resistência à dapsona;
1970	Identificação de uma nova droga: rifampicina;
1971	Kirchheimer e Storrs inoculam a doença no tatu de nove bandas;
1981	OMS recomenda a utilização da terapia multidrogas;
1997	Um regime de dose única é sugerido para pacientes com uma única lesão nodular: "ROM" (rifampicina / ofloxacina / minociclina);
2001	Sequenciamento do genoma completo de uma cepa indiana de <i>M. leprae</i> isolado da região de Tamil Nadu (Índia).

Tabela adaptada de Reibel et al., 2015.

Em 1947, houve o início da aplicação de sulfonas em doses supervisionadas, que controlavam a transmissão do bacilo e permitiu a saída dos indivíduos infectados dos asilos. Esse fator evitava internações compulsórias, garantindo um avanço na assistência dos pacientes, porém, não garantiu a reintegração social (Garcia, 2001).

Com o passar do tempo, a palavra lepra começou a gerar grandes discussões e repercussões devido ao estigma social causado. Em 29 de março de 1995, o Presidente Fernando Henrique Cardoso sancionou uma lei que visava a proibição da palavra em documentos oficiais da Administração centralizada e descentralizada da União e Estados-membros, lei de nº 9.010 (Ministério dos Direitos Humanos, 1995; Trautman, 1984). Um resumo histórico acerca da doença está descrito na Tabela 1.

1.2 Epidemiologia

As enfermidades conhecidas como doenças tropicais negligenciadas (DTN), que são caracterizadas pela prevalência em condições de pobreza e contribuição para a manutenção do quadro de desigualdade, afetam mais de um bilhão de pessoas, representando cerca de um sexto da população mundial. Além disso, essas doenças são caracterizadas pelo seu alto grau de morbidade e mortalidade, e representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida. A hanseníase está entre as doenças negligenciadas (Tabela 2) e necessita de maiores investimentos em pesquisa, controle e produção de medicamentos (OMS, 2007).

Vários fatores favorecem a transmissão das DTN, entre eles estão: a falta de acesso à água potável e limitado acesso aos serviços de saúde e aos medicamentos. No que concerne ao governo, há pouco investimento em pesquisa sobre as DTN, além de pouco interesse da indústria farmacêutica (Manderson et. al., 2009).

LEI DO DIREITO AUTOMÁTICO
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



Tabela 2: Principais doenças negligenciadas tropicais de acordo com o agente etiológico, a nível global

<u>Causadas por vírus</u>	
Doença	Estimativa de mortes por ano
Dengue	3.000–4.200
Raiva	26.000
<u>Causadas por protozoários</u>	
Doença de Chagas	10.300
Tripanossomíase Africana	9.100
Leishmanioses	51.600*
<u>Causadas por helmintos</u>	
Cisticercose/teníase	1.200
Equinococose	1.200
Oncocercose	**
Filariose	**
Esquistossomose	11.700
Helmintíases transmitidas pelo solo contaminado	2.700
<u>Causadas por bactérias</u>	
Hanseníase	**
Tracoma	**

Tabela adaptada de Molyneux et al., 2017. * Dados referentes ao subcontinente Indiano. ** Sem mortes atribuídas.

A organização Mundial de Saúde (OMS) promoveu um propósito de Estratégia Global para Hanseníase durante o período de 2016-2020, que visa a detecção precoce da doença para evitar o aumento do grau de incapacidade do paciente e impedir a disseminação para a população. Além da estratégia atual, houve outras: durante o período de 2000-2005 o foco era a introdução da poliquimioterapia (PQT); de 2006-2010 foi realizada a estratégia global com o objetivo de reduzir a incidência da hanseníase e manter as atividades de controle da doença; e de 2011-2015 foi realizada a estratégia global aprimorada para redução da incidência da doença, em que houve o aperfeiçoamento de ações conjuntas que visavam sua detecção precoce (OMS, 2016).

As três últimas décadas foram marcadas por avanços no controle da hanseníase devido a introdução da poliquimioterapia (PQT), em que mais de 16 milhões de indivíduos foram diagnosticados e tratados, podendo assim observar uma diminuição drástica na prevalência da doença em nível global. Porém, mesmo com o sucesso da implementação da PQT, a incidência ainda se mantém alta, com redução discreta a cada ano, e ainda permanece endêmica em alguns países (Richardus & Habbema, 2007).

De acordo com a atualização global da hanseníase em 2015, foram detectados 211.973 novos casos ao redor do mundo, correspondente a uma taxa de 2.9 casos por 100.000 habitantes (Figura 2), e a taxa de prevalência era de 0.2 casos por 10.000 habitantes, resultando em um total de 176.176 casos registrados. Diante disso, pode-se observar que mesmo com uma variedade de estratégias de controle da doença, ainda há um elevado índice de indivíduos infectados atualmente, sendo a Índia o país com maior incidência, seguido pelo Brasil (OMS, 2015).

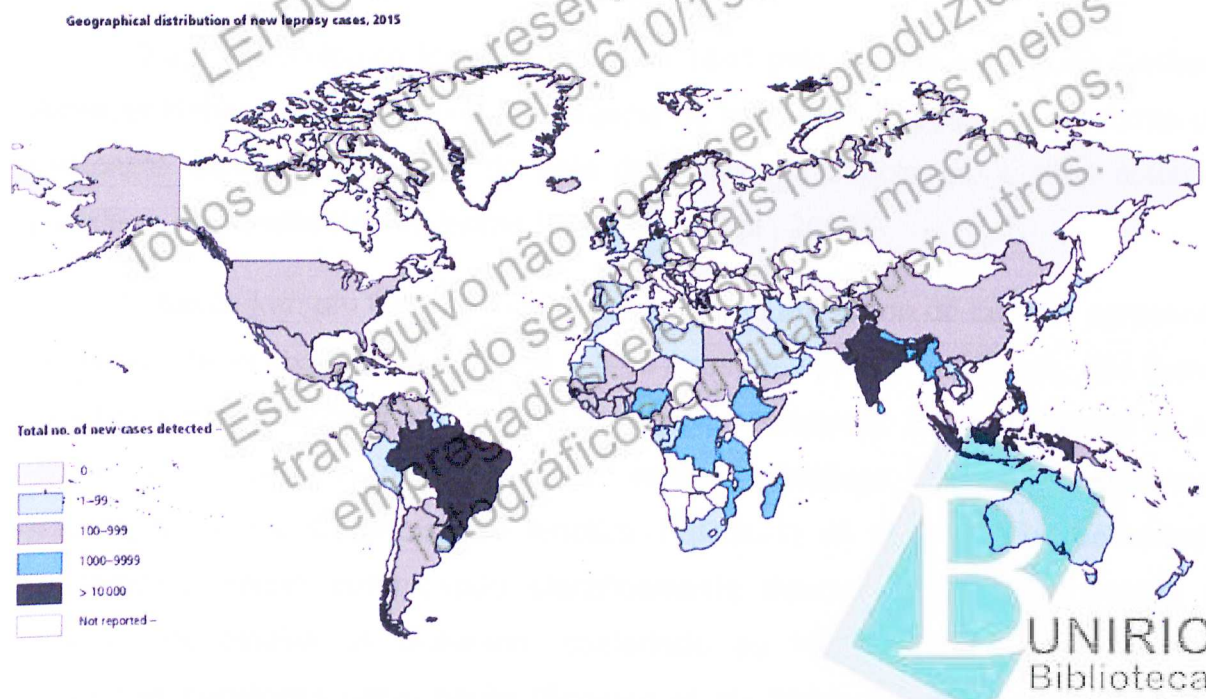


Figura 2: Taxa de incidência mundial da hanseníase reportada à OMS, no ano de 2015. As taxas correspondem a uma razão para cada 10.000 habitantes (OMS, 2015).

No Brasil, em 2016, houve cerca de 25 mil novos casos, e taxa de prevalência era de 1.10 pacientes para cada 10.000 mil habitantes (MS, 2017a). A distribuição da hanseníase entre as regiões brasileiras é bastante heterogênea, sendo a região Nordeste a de maior prevalência, com quase 11 mil casos e coeficiente de prevalência de 1.77 pacientes para cada 10.000 habitantes (MS, 2017b). Diante disso, é possível afirmar que a doença ainda é endêmica, o que representa um grande problema de saúde pública, e que a endemia deverá permanecer por muitos anos no país. Além disso, os últimos boletins epidemiológicos apontam aumento na incidência da doença em indivíduos idosos – acima de 60 anos - população alvo do presente estudo. O Brasil, portanto, continuará com o objetivo de avançar no processo de eliminação da hanseníase e, sobretudo, reduzir as chances de contaminação de indivíduos saudáveis.

1.3 Agente etiológico

O agente etiológico foi descoberto em 1841 pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen. Ele descobriu a existência de pequenos corpúsculos em forma de bastonete isolados de lesões de pele de indivíduos infectados, e denominou o patógeno de *Mycobacterium leprae* (Benchimol et al., 2004).

O bacilo tem um formato levemente curvo ou em forma de cajado, apresenta um tempo de incubação que varia de 2 a 10 anos, não possui motilidade, não forma esporos, é microaerófilo e tem caráter álcool ácido resistente. A parede celular do *M. leprae* é covalentemente ligada a ácidos micólicos e peptidoglicanos-arabinogalactanos. O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) dá ao bacilo especificidade imunológica, sendo comprovado cientificamente interações entre a bactéria e laminina de células de Schwann, conferindo ao PGL-1 papel importante em interações periféricas nervo-bacilo (Scollard et al., 2006; Spencer et al., 2011). A organização espacial da parede celular está representada na Figura 3.

Seu caráter álcool ácido resistente é explicado pelo fato de que o bacilo é corado em vermelho pela fucsina e não se descora devido a lavagem com ácidos e álcoois quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen, por isso, o *M. leprae* é conhecido como BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente (Scollard et al., 2006). Esse

fato permite a observação da gram positividade da bactéria, diante da coloração vermelha (Cole et al., 2001).

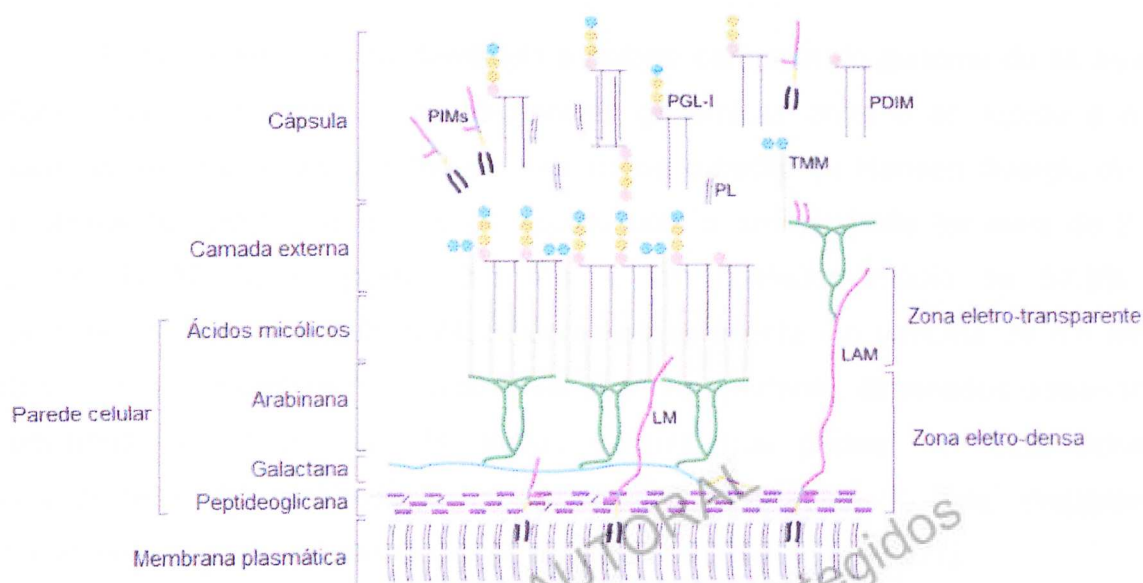


Figura 3: Organização da parede celular do *M. leprae*. A camada mais externa apresenta glicolípido fenólico 1 (PGL-1), monomicolato de trealose (TMM), ácidos micocerosóicos (PDIMs), fosfatidilinositolmonosídeos (PIMs) e fosfolípídeos (PL). Na parede celular, LM significa lipomanana e LAM, lipoarabinomanana. Adaptado de Vissa & Brennan, 2001.

O bacilo possui melhor sobrevivência em temperaturas entre 30-33°C, isso faz com que as extremidades do corpo como braços, mãos, coxas, pernas, pés e face sejam mais afetadas (Batista et al., 2011). Outro fator que impede a manutenção do bacilo em meios artificiais é sua duplicação lenta, cerca de 14 dias (Cole et al., 2001). Este fato torna-se um grande impasse para novas descobertas no meio científico.

Em 1960, foi provada a possibilidade de proliferação do bacilo no coxim plantar de camundongos. O patógeno proveniente de pacientes humanos era inoculado em camundongos, e diante disso, era possível observar um granuloma microscópico contendo bacilos álcool ácidos resistentes se desenvolvendo (Shepard, 1960). E um século após a descoberta do agente etiológico, um novo modelo animal mais adequado foi descoberto na Louisiana, na década de 70, o tatu de nove bandas *Dasypus novemcinctus*, que, diferente dos camundongos, possibilita a recuperação do bacilo com maior eficiência e em maiores quantidades em

gânglios linfáticos, baço e fígado (Cole et al., 2001; Dets et al., 2008; Scollard et al., 2006).

Somente em 2001 foi finalizada a análise completa do genoma do *M. leprae*. Foram feitas comparações de sequências genômicas entre o *M. leprae* e o *M. tuberculosis*, diante disso, pode-se afirmar que o bacilo de Hansen divergiu de um ancestral comum bacteriano, e de acordo com a análise pode ter mais de 2 mil genes. O *M. leprae* possui 3,3 Mb, e um conteúdo médio de 57,8% de guanina+citosina, enquanto o *M. tuberculosis* apresenta um genoma de 4,4 Mb, e 65,6% de guanina+citosina. Foi possível observar, portanto, dimensões e rearranjos reduzidos no genoma do *M. leprae*, fatores que podem ser associados à incapacidade de multiplicação *in vitro* pela eliminação de vias metabólicas essenciais, quando comparado ao *M. tuberculosis* (Cole et al., 2001).

Devido ao compartilhamento de antígenos com alto grau de homologia e diversos estudos sobre os patógenos da hanseníase e tuberculose, foi recomendado desde 1991 pelo Ministério da Saúde (MS) a administração da vacina BCG (Bacillus Calmette-Guérin atenuado) para os contatos domésticos de pacientes com hanseníase. Contatos sem a cicatriz da BCG ou com apenas uma cicatriz são vacinados. Essa política do reforço da vacina conferiu uma proteção de 56% a esses indivíduos (De Carvalho et al., 2017).

1.4 Espectro clínico e estratégias terapêuticas

Um indivíduo infectado com o *M. leprae* pode desenvolver a doença sob um variado espectro clínico, em que os padrões podem ser modificados durante o seu curso ou evoluir para a cura espontânea, dependendo da resposta imune do hospedeiro. Apesar da baixa patogenicidade, o caráter imunogênico do *M. leprae* é responsável pelo potencial incapacitante da doença, sendo altamente infectivo (Scollard et al., 2006). Diante disso, é possível observar que as respostas imunológicas desempenham um papel fundamental no controle da doença (Moraes et al., 2006).

Inicialmente, o indivíduo infectado apresenta a forma indeterminada da doença. Pacientes classificados nessa forma não se enquadram no espectro clínico descrito mais a frente, e somente se houver a progressão da doença será possível distingui-la diante da variedade de formas clínicas existentes. A hanseníase indeterminada apresenta uma condição macular, poucas lesões (geralmente hipopigmentadas) e pode haver um comprometimento da sensibilidade (Ridley & Jopling, 1966).

A classificação de Ridley e Jopling, adotada em 1966, é a mais aceita atualmente. Nesta classificação, o espectro clínico é amplo e dividido em 5 formas: dois grupos polares, tuberculoide (TT) e lepromatosa (LL); e três grupos intermediários também chamados de formas *borderlines*, *borderline* tuberculoide (BT), *borderline* *borderline* (BB) e *borderline* lepromatosa (BL) (Ridley & Jopling, 1966). A maioria dos pacientes se enquadra nas formas *borderline* (Scollard et al., 2006).

LEI DO DIREITO AUTORAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



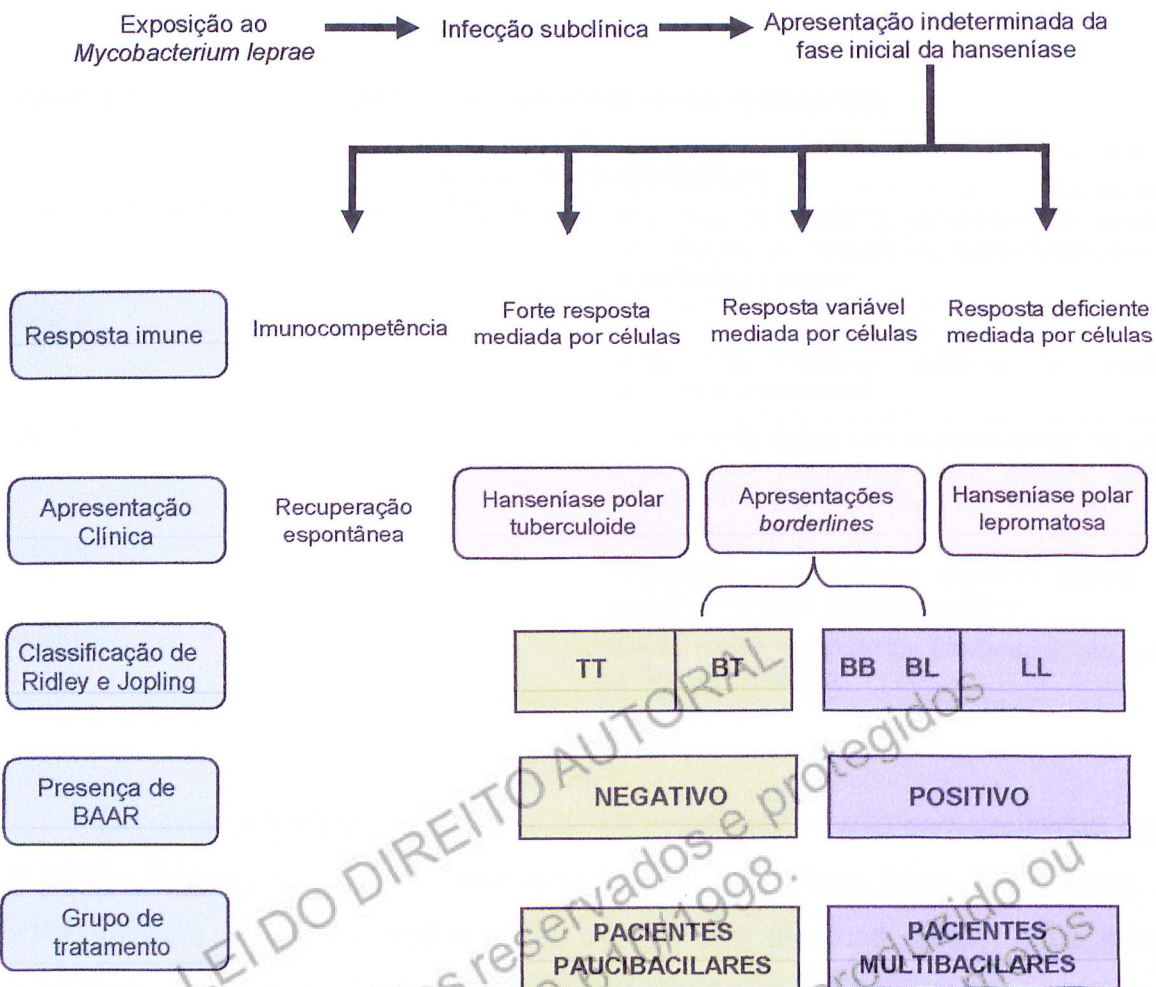


Figura 4: Classificação clínica, biológica e terapêutica da hanseníase. Adaptada de Reibel et al., 2015.

As lesões cutâneas características do polo tuberculoide envolvem a clássica placa eritematosa com a borda exterior elevada e um centro achatado. As lesões são pouco numerosas, com superfícies ásperas, anestésicas (exceção do rosto) e lesões nos nervos, o que causa dor e inchaço. Este polo é marcado por um alto nível de resposta imune celular, predominância de resposta do tipo T_H1 , presença de granulomas bem formados, infiltrados linfocitários, o que permite o controle da replicação micobacteriana, portanto, dificilmente são encontrados bacilos nas lesões de pele (Ridley & Jopling, 1966; Santos et al., 2002).

Tabela 3: Lesões dermatológicas mais comuns na hanseníase

Sinais dermatológicos	
Manchas pigmentares ou discrômicas	Resultam da ausência, diminuição ou aumento de melanina ou depósito de outros pigmentos ou substâncias na pele.
Placa	Lesão que se estende em superfície por vários centímetros. Pode ser individual ou constituir aglomerado de placas.
Infiltração	Aumento da espessura e consistência da pele, com menor evidência dos sulcos, limites imprecisos, acompanhando-se, às vezes, de eritema discreto.
Tubérculo	Designação em desuso, significa pápula ou nódulo que evolui deixando cicatriz.
Nódulo	Lesão sólida, circunscrita, elevada ou não, de 1 a 3 cm de tamanho.

Fonte: Nery et al., 2015.

Já no outro extremo, o polo lepromatoso, as lesões são caracterizadas como múltiplas máculas ou pápulas pequenas e com superfícies lisas e brilhantes. As lesões podem não ser anestésicas ou apenas em algumas partes, e os nervos periféricos não podem ser palpáveis, a não ser que o paciente tenha evoluído de uma forma *borderline* anteriormente. É marcado por um alto nível de resposta humoral, na análise histopatológica são encontrados inúmeros macrófagos ricos em bacilos e não há formação de granulomas (Ridley & Jopling, 1966).

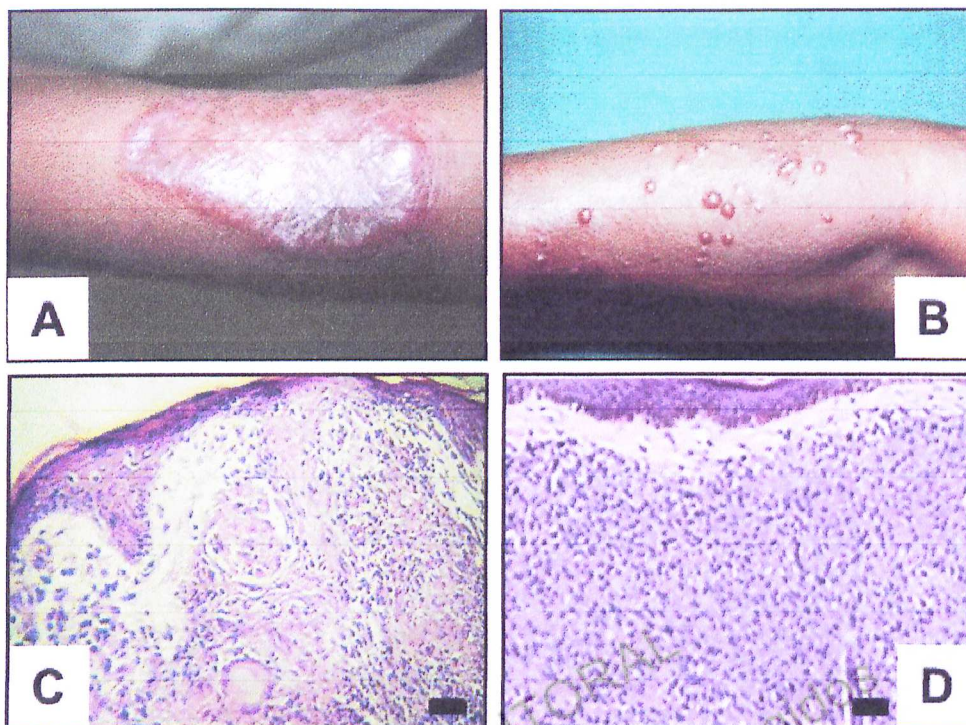


Figura 5: Características macro e microscópicas das lesões das formas polares da hanseníase. Lesão em placa em antebraço de paciente tuberculoide (A) e nódulos disseminados em paciente lepromatoso (B). Característica histológica típica de fragmento de lesão cutânea de paciente com a forma tuberculoide mostrando granuloma e célula epitelióide (C) e de lesão lepromatosa com infiltrado mononuclear difuso e inespecífico (D); coloração de Hematoxilina e Eosina, HE 200X. (Nery et al., 2015).

Em alguns casos, pode ocorrer a interrupção do curso natural da doença com episódios de inflamação aguda, denominado episódio reacional ou reação. Esses episódios são diferenciados em: reação do tipo I (reação reversa ou RR) e reação do tipo II (eritema nodoso hansênico ou ENH) (Moraes et al., 2006). O quadro reacional está associado com agravamento do estado clínico do paciente, podendo surgir novas lesões e até mesmo o reaparecimento de lesões antigas (Scollard et al., 2006).

Há um teste cutâneo que fornece uma medida da capacidade do hospedeiro formar uma resposta imune mediante aos antígenos inoculados, denominado teste de lepromina - cuja reação é denominada de Reação de Mitsuda (Figura 6). O teste é geralmente positivo em pacientes TT (>5mm), e negativo em pacientes LL, que pode ser explicado pela característica de pacientes lepromatosos apresentarem

baixa imunidade celular frente ao bacilo. Esse teste, portanto, auxilia na distinção dos polos (Ridley & Jopling, 1966).



Figura 6: Teste de Mitsuda positivo (Lesão de 11mm). Fonte: Antonio et al., 2013.

Em relação ao tratamento, o Ministério da Saúde do Brasil adotou uma classificação para definir os esquemas terapêuticos a serem utilizados. Pacientes BB, BL e LL são classificados como multibacilares (índice baciloscópico - IB - maior ou igual a 2), e os pacientes TT e BT são paucibacilares (IB - menor que 2). O IB refere-se à estimativa do número de bacilos presentes no esfregaço, seguindo a escala logarítmica de Ridley e Jopling (MS, 2010).

Com relação ao tratamento, a PQT é uma combinação de rifampicina, dapsona e clofazimina, associação essa que intervém na interrupção da cadeia de transmissão da doença logo nas primeiras doses. O tratamento para pacientes MB é a utilização de rifampicina (600 mg, dose mensal), clofazimina (300 mg, dose mensal e 50 mg/dia) e dapsona (100mg, dose mensal e 100 mg/dia), com duração de 12 doses em até 18 meses. Em pacientes PB, é utilizado rifampicina (600 mg, dose mensal) e dapsona (100mg, dose mensal e 100 mg/dia), com duração de 6 doses em até 9 meses. As doses mensais são supervisionadas, enquanto as doses diárias são auto-administradas. E a alta por cura é dada após administração completa do esquema terapêutico (MS, 2014).

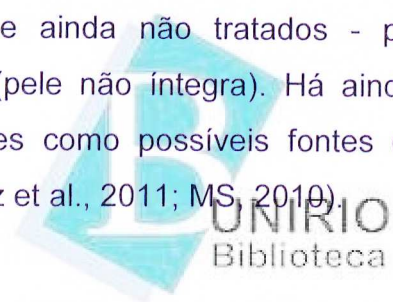
1.5 Mecanismos de transmissão

Acredita-se que o sítio preferencial de entrada e saída do *M. leprae* é a mucosa nasal, portanto, a infecção inicial ocorre através das vias aéreas superiores (Cole et al., 2001; Martinez et al., 2011). Embora a cavidade oral seja raramente reportada, estudos realizados em 2010 por Martinez e colaboradores comprovaram que a mucosa oral é a segunda fonte de infecção e transmissão do bacilo. Os contatos intradomiciliares também podem participar da transmissão ativa da doença, visto que a transmissão subclínica é de possível ocorrência (Martinez et al., 2011).

Doentes paucibacilares (PB) abrigam um pequeno número de bacilos, portanto, não são considerados fontes importantes de transmissão devido à baixa carga bacilar. Ao passo que doentes multibacilares (MB) abrigam muitos bacilos na cavidade nasal, sendo considerados como importantes fontes de infecção e manutenção da cadeia epidemiológica. Após iniciado o tratamento com a PQT, os doentes não são mais capazes de transmitir a doença, pois os bacilos são mortos nas primeiras doses da antibioticoterapia (MS, 2010).

A transmissão da doença envolve o contato prolongado entre os indivíduos infectados e não infectados e, além disso, o risco é maior quando há exposição com o tatu de nove bandas, por meio da ingestão da carne. Portanto, indivíduos que possuem contato prolongado com doentes e estão expostos ao animal possuem chances maiores de serem infectados (Deps et al., 2008).

Os mecanismos de transmissão englobam, portanto, vias aéreas superiores - através de pacientes com carga bacilar elevada e ainda não tratados - por inoculação na mucosa nasal, oral, lesões de pele (pele não íntegra). Há ainda, suspeitas de objetos contaminados e insetos vetores como possíveis fontes de transmissão do patógeno (Batista et al., 2011; Martinez et al., 2011; MS, 2010).



1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é, por definição, clínico e deve ser realizado por uma equipe de saúde especializada (Saunderson & Groenen, 2000). Devido ao caráter infeccioso e contagioso da doença, o diagnóstico precoce é essencial para aumentar as possibilidades de um curso clínico favorável durante o tratamento (Martinez et al., 2011).

Ao sugerir critérios de diagnóstico para qualquer condição médica é de grande importância analisar as condições de especificidade e sensibilidade, pois é necessário evitar diagnósticos errôneos, seja por novos casos perdidos ou por serem excessivos e desnecessários. Diante disso, as informações e ferramentas disponíveis devem ser avaliadas para que atinjam um certo grau de confiabilidade, com o objetivo de ser obtido um diagnóstico correto (Saunderson & Groenen, 2000).

De acordo com o oitavo relatório do Comitê de Hanseníase da Organização Mundial de Saúde, o mais recente e publicado no ano de 2012, sugere que a hanseníase seja diagnosticada quando pelo menos um dos sinais clínicos estejam presentes: hipopigmentação ou vermelhidão da pele com perda definitiva de sensibilidade; nervo periférico espessado, com perda de sensação e/ou fraqueza dos músculos ligados ao nervo; e presença de bacilos álcool-ácidos resistentes em esfregaços cutâneos (OMS, 2012).

Há ferramentas que podem servir de auxílio no diagnóstico clínico como a baciloscopia, a análise histopatológica de fragmentos de lesões de pele e a reação em cadeia da polimerase (PCR; MS, 2010; OMS, 2012). A PCR é um método de amplificação de regiões específicas do DNA do *M. leprae*, sendo muito importante por auxiliar no diagnóstico de pacientes paucibacilares devido à baciloscopia negativa (Martinez et al., 2011; Rosa et al., 2013; Scollard et al., 2006). A baciloscopia (exame baciloscópico do raspado intradérmico) classifica o paciente de acordo com o espectro clínico, quando se refere às formas MB é positiva, e às formas PB, negativa (MS, 2010). E a análise histopatológica das lesões cutâneas dos pacientes, feita através do método de hematoxilina e eosina (H&E), é o padrão ouro dos testes diagnósticos. A coloração H&E é a principal utilizada em anatomia

patológica, sendo as principais características observadas: o acometimento de nervos cutâneos, inflamação e granulomas (Scollard et al., 2006).

É possível, também, verificar a presença do bacilo utilizando testes sorológicos para auxiliar o diagnóstico por meio da identificação de anticorpos anti-PGL-1, utilizados juntamente com o exame clínico. A análise dos títulos destes anticorpos pode ser usada para estimar a carga bacilar do indivíduo infectado, identificando infecção subclínica ou a doença. Em pacientes MB, a detecção desses anticorpos pode ser muito útil, já em paciente PB pode ser muito baixa ou indetectável, o que representa uma dificuldade desse método (Buhrer-Sekula, 2008).

1.7 Aspectos genéticos envolvidos com a suscetibilidade à hanseníase

Antes da descoberta do bacilo *M. leprae* por Hansen, a teoria de transmissão mais aceita desde o século XIX era a hereditariedade. Foi observado que a doença afetava mais de uma geração de famílias, mas havia muitos casos em que o indivíduo apresentava a doença em idade adulta, e então anos mais tarde foi associada à predisposição genética. Diante disso, pode-se perceber a importância de parentesco entre os doentes e comunicantes para a cadeia de transmissão (Pandya, 1998). Com o avanço da ciência, foi possível concluir que a doença é de caráter contagioso, mas que polimorfismos genéticos podem conferir resistência ou suscetibilidade à doença.

As bases moleculares de vulnerabilidades genéticas resultantes da maioria das infecções micobacterianas em humanos ainda não são bem conhecidas. Entretanto, existem alguns estudos que provam a relação entre suscetibilidade genética e infecções (Kang & Chae, 2001). No caso da hanseníase, sabe-se que a partir do momento em que um indivíduo é exposto ao bacilo, um conjunto de diferentes genes podem modificar a suscetibilidade à doença em dois momentos, seja ele no controle da infecção *per se*, ou na determinação da forma clínica (Prevedello & Mira, 2007).

Os genes candidatos são selecionados de acordo com três critérios: possível papel crítico na patogênese da doença; localização da região genômica envolvida no

controle da doença; ou uma combinação dos dois critérios anteriores, ou seja, candidatos funcionais/posicionais (Prevedello & Mira, 2007).

Em 2001, foi realizado um estudo por Kang e Chae, no qual foi demonstrado que mutações no Receptor Toll-like 2 (TLR 2) presentes na superfície de macrófagos e células dendríticas estão associadas com suscetibilidade à infecção pelo *M. leprae* (Kang & Chae, 2001). O TLR 2 é a principal molécula de superfície celular capaz de mediar respostas imunes inatas a agentes patogênicos, sobretudo, às micobactérias (Scollard et al., 2006). A ativação do TLR 2 desencadeia uma cascata de sinalização citoplasmática que promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas desempenham papel crucial no funcionamento da resposta imune inata e na ativação da resposta adaptativa (Kapsenberg, 2003). Portanto, alterações na expressão e/ou funcionamento destes receptores, podem influenciar na resposta do indivíduo contra o patógeno (Kang & Chae, 2001). Em um estudo que envolveu pacientes oriundos da Etiópia, polimorfismos no gene que codifica o TLR2 foram associados a suscetibilidade à hanseníase, bem como ao desenvolvimento da reação reversa (Bochud et al., 2008).

O IFN- γ está envolvido no processo de contenção e/ou morte do bacilo, pois induz resposta do tipo T_H1 por meio da indução da secreção de IL-12. Além disso, o IFN- γ está envolvido em diversos eventos que regulam a resposta imune adaptativa, sendo capaz de conter a infecção e evitar a disseminação da doença. O gene que codifica o IFN- γ está localizado na região 12q14, e o alelo 874T está ligado à proteção contra doenças infecciosas, principalmente a tuberculose. Estudos realizados por Cardoso e colaboradores provaram tal associação com a resistência à hanseníase, tendo em vista que o IFN- γ é uma molécula chave no desenvolvimento de respostas imunológicas protetoras (Cardoso et al., 2010; Cardoso et al., 2011).

Outra citocina que desempenha papel relevante na imunopatogênese da hanseníase é o Fator de Necrose Tumoral (TNF). O TNF é produzido principalmente por macrófagos, e promove a ativação de macrófagos e linfócitos T, desempenhando um papel fundamental na inflamação inespecífica e na resistência inata. Estudos demonstraram que polimorfismos nos genes promotores para TNF

estão associados com o desenvolvimento da hanseníase, em especial a forma multibacilar da doença (Santos et al., 2002).

Além disso, polimorfismos no gene NRAMP1, que codifica a Proteína de Macrófagos Associada à Resistência Natural 1, estão associados com manifestações clínicas da hanseníase e com suscetibilidade à infecção. A proteína codificada pelo gene NRAMP1 garante resistência à parasitas intracelulares, pois está ligada a morte destes patógenos nos fagolisossomos de células fagocitárias. Isto ocorre devido ao efluxo dos íons Fe^{++} e Mn^{++} , que são essenciais para a sobrevivência do patógeno no interior da célula fagocitária (Blackwell et al., 2000; Canonne-Hergauxet al., 1999; Cooke & Hill, 2001; Meisner et al., 2001; Nevo & Nelson, 2006).

Ademais, o metabolismo ativo da vitamina D é crucial na modulação de respostas imunes adquiridas. Já foi demonstrado que a vitamina D pode prevenir infecção por *Mycobacterium tuberculosis* através da ligação da sua forma bioativa (1,25-dihidroxicolecalciferol) ao receptor de vitamina D (VDR). O receptor nuclear polimórfico regula a expressão de genes fundamentais para a função imune, ou seja, está diretamente associado com a supressão da proliferação de linfócitos, a produção de imunoglobulinas e a síntese de citocinas (Cooke & Hill, 2001; Scollard et al., 2006; Sutaria et al., 2014). A partir desse conhecimento, foi realizado um estudo em pacientes com hanseníase, o qual indicou que alelos diferentes desse gene estavam associados à formas diferentes da hanseníase, influenciando no espectro clínico da doença (Cooke & Hill, 2001; Roy et al., 1999).

Destaca-se a importância dos genes *PARK2* e *NOD2* - alvos do presente estudo - pois estão diretamente associados com o perfil de imunossenescência e suscetibilidade à hanseníase. O gene *PARK2* codifica uma proteína denominada parquina. Esta proteína é responsável pelo processo de ubiquitinação E3 ligase de proteínas alvo para degradação no complexo proteassômico. De acordo com a Figura 7, a parquina é constituída por uma porção amino-terminal ubiquitina like que interage com o proteassoma e uma porção carboxi-terminal com 3 domínios que interage com pelo menos uma proteína de membrana, neste caso a CASK. Além disso, a parquina pode recrutar uma série de proteínas acessórias como HSP70, CHIP e componentes de outras ligases E3 como hsel10. Os substratos associam-se

ao domínio RING1 e regiões próximas, enquanto IBR e RING2 são responsáveis pela vinculação de E2, enzima que carrega ubiquitinas ativadas. A proximidade de E2 e substrato pode promover a reação de ubiquitinação, que pode continuar através de vários ciclos que são reconhecidos pelo proteassoma e então degradado aos peptídeos constituintes (Cookson, 2003).

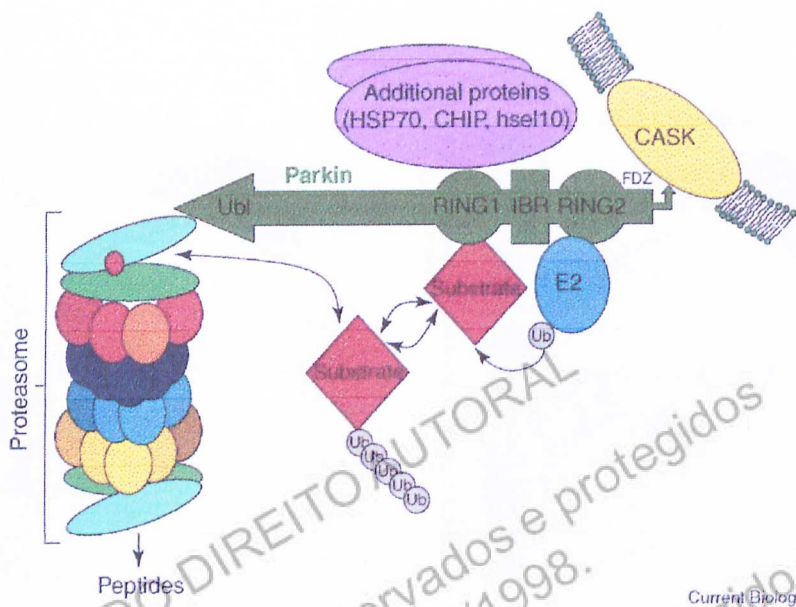


Figura 7: Parquina e seu papel na degradação de proteínas alvos. Cookson, 2003.

Já é bem conhecida a associação entre genes *PARK2* (Parquina) e *PACRG* (gene co-regulador com parquina) com a suscetibilidade à hanseníase. A parquina é responsável pela ubiquitinação de proteínas alvo para degradação, reconhecimento de mitocôndrias despolarizadas, regulação do processo de autofagia e possui efeito antiapoptótico. Diante disso, é possível perceber que a parquina possui um efeito protetor bem descrito, apresenta uma tendência em inibir a apoptose e promover a autofagia de patógenos intracelulares. Mutações neste gene, portanto, podem fazer com que os indivíduos apresentem um ambiente permissivo para o crescimento do patógeno, devido à inibição do processo autofágico (Cardoso et al., 2011; Scollard et al., 2006).

O gene *NOD2* interage diretamente com o sistema imune inato. De acordo com a Figura 8, após a estimulação basolateral do muramil dipeptídeo (MDP), *NOD2* é recrutado para a membrana plasmática por um regulador positivo de NF κ B

(FRMPD2), que é facilitado por uma proteína associada à membrana (ERBB2IP). Posteriormente, uma proteína adaptadora (RIPK2) acopla-se ao complexo e habilita a ativação da via do fator de transcrição NFκB e a indução da quimiocina pró-inflamatória IL-8 e o peptídeo antimicrobiano BD-2. Quando há uma variante genética associada ao *NOD2*, a interação com o regulador positivo de NFκB é prejudicada, podendo levar a uma compartimentação desregulada de *NOD2* e falha na ativação de NF-κB e na indução de genes alvos (Lipinski et al., 2012).

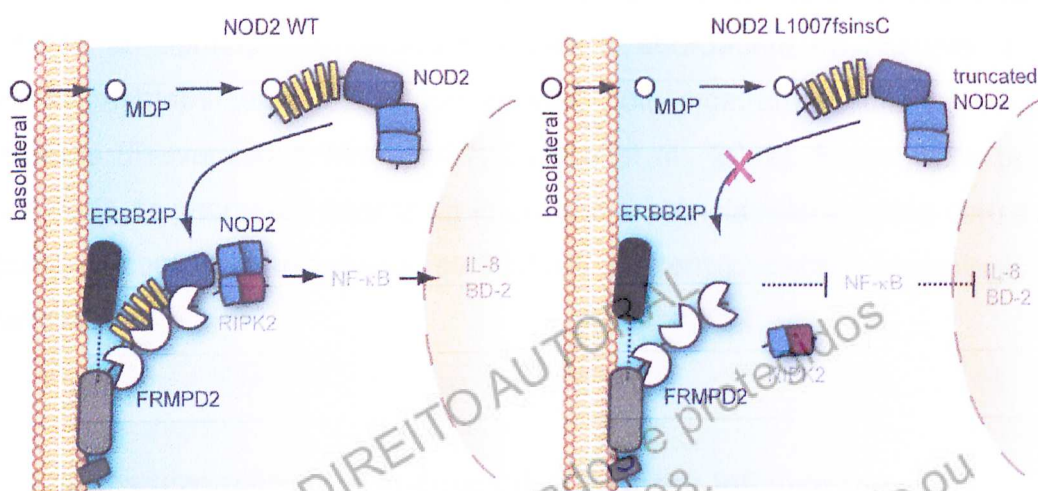


Figura 8: Especificidade espacial da sinalização de NOD2 induzida por MDP. Lipinski et al., 2012.

Estudos realizados em uma população no Nepal, demonstraram relações entre polimorfismos no gene *NOD2* e hanseníase. Evidências indicam que tal gene está envolvido no controle da suscetibilidade à hanseníase. Porém, ainda se fazem necessárias pesquisas mais aprofundadas sobre arranjos de haplótipos (combinações de um grupo de alelos adjacentes, que compartilham o mesmo cromossomo), pois essas associações podem não ser condizentes em diferentes populações. Acredita-se que polimorfismos no gene *NOD2* possam estar relacionados ao controle da autofagia, pois há uma interação com o gene 16L1 (ATG16L1) ligado à autofagia. Já foi comprovado também que na Doença de Chron, alterações neste gene levam à incapacidade de indução de autofagia. Com relação à hanseníase, é provável que alterações nesse gene possam desregular a via

autofágica, assim como ocasionar uma menor indução de NF- κ B, um fator de transcrição que regula a atividade de múltiplos genes, especialmente genes que controlam respostas imunes e reações inflamatórias. Essas alterações são capazes de favorecer a infecção pelo *M. leprae* (Cardoso et al., 2011).

Apesar de avanços tecnológicos que possibilitam tais evidências, identificar a natureza do componente genético, principalmente o número de genes envolvidos, funções biológicas e variações genéticas, ainda é um desafio para a ciência (Prevedello & Mira, 2007). Além de alterações genéticas, há uma ampla variedade de efeitos ambientais que contribuem para a abordagem do assunto. E muitas vezes, os estudos tornam-se inconclusivos, pois mostram resultados variados e conflitantes (Prevedello & Mira, 2007; Santos et al., 2002). Esses fatos provam a necessidade de pesquisas acerca da imunossenescência relacionadas com doenças infecciosas, como a hanseníase, particularmente em pacientes imunologicamente diferenciados.

1.8 Imunossenescência e dinâmica das doenças inflamatórias

O envelhecimento está relacionado com o progressivo declínio da função imunológica de um indivíduo, denominado imunossenescência (Hakim & Gress, 2007; Panda, 2010). Assim, a imunossenescência é capaz de ocasionar um aumento da suscetibilidade à diversas doenças virais e bacterianas, como a hanseníase, alvo do presente estudo, e até mesmo diminuição de resposta às vacinas (Panda, 2010).

Ao longo da vida, as células são constantemente expostas a agentes estressantes como radiações ionizantes e espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias, entre outros. Esses agentes podem provocar danos no DNA que, se não forem reparados, podem ocasionar mutações e até mesmo induzir a morte da célula. A correta regulação da eliminação dessas células potencialmente danificadas é o processo de antienvelhecimento (Cevenini et al., 2013).

Por outro lado, a ausência do processo de eliminação dessas células pode iniciar uma resposta denominada de senescência celular, que consiste na parada

permanente do ciclo celular, fazendo com que a célula não realize seu metabolismo e não haja substituição das mesmas. A senescência celular também está associada com o encurtamento gradual do DNA telomérico, sequências nucleotídicas que protegem os cromossomos, o que inviabiliza a renovação celular (Salvioli et al., 2013).

Existem genes descritos na literatura que estão relacionados com a senescência de linfócitos T, sendo a telomerase e o CD28 exemplos de proteínas codificadas por alguns desses genes. Para compensar a redução dos telômeros, algumas subpopulações celulares expressam a telomerase, uma enzima transcriptase reversa, que utiliza um molde de RNA para sintetizar o DNA telomérico. Já foi demonstrado que há a diminuição da região telomérica em linfócitos T, e que apenas em uma subpopulação de linfócitos T CD28+, a telomerase possui atividade, sendo capaz de manter o comprimento dos telômeros. Portanto, o estudo dessa subpopulação é importante para o entendimento da regulação da telomerase em linfócitos T e nos desdobramentos do declínio da ação funcional dessas células durante a imunossenescência (Huang et al., 2017).

Ademais, o processo de envelhecimento também está relacionado com a ocorrência de diversas doenças inflamatórias comuns à terceira idade, como aterosclerose, diabetes tipo 2, síndrome metabólica, sarcopenia e a osteoporose. O conjunto das condições fisiológicas e celulares que propiciam um ambiente permissivo para ocorrência das doenças inflamatórias citadas é denominado *inflamm-ageing*. Esse processo está associado com uma redução na capacidade do sistema imune em responder a agentes químicos, físicos, antigênicos e com o aumento gradual de marcadores pró-inflamatórios como Interleucina-6 (IL-6) e TNF. Componentes da família NF- κ B, por exemplo, são mediadores característicos da inflamação, que controlam a multiplicação e sobrevivência celular durante as respostas imunes inatas e adaptativas. Tendo em vista que o envelhecimento provoca mudanças específicas em diferentes células e órgãos, a função da família NF- κ B sofrerá modificação quanto ao seu caráter mediador nos processos inflamatórios (De Martinis et al., 2005; Cevenini et al., 2013).

Em relação a resposta inata, durante a imunossenescência, ocorre redução no recrutamento de fagócitos, na liberação de grânulos, na atividade microbicida por

macrófagos e de células polimorfonucleares e na expressão de receptores e correceptores de linfócitos T (Panda, 2010). A imunidade inata parece estar mais preservada, enquanto alterações na imunidade adaptativa são comprometidas em maior grau como retratado a seguir (Agondi et al., 2012).

Na imunidade adaptativa, a involução tímica, que está associada ao avanço da idade, provoca declínio na população de linfócitos T *naïve* e ao mesmo tempo, pode ser observado um aumento na subpopulação de linfócitos T de memória, mas com uma diminuição na diversidade e funcionalidade de células CD4+ e CD8+. Com relação à imunidade humoral, pode haver uma resposta reduzida dos anticorpos, diminuindo então a afinidade antígeno-anticorpo, além do aumento da probabilidade de falhas na eliminação de linfócitos autorreativos, fazendo com que as doenças autoimunes sejam bastante frequentes em idosos. Esses problemas disparem contribuem para o mesmo problema central, a diminuição na produção de novas células T e B, com consequentes perdas na diversidade do repertório e competência funcional (Derhovanessian et al., 2009; Hakim & Gress, 2007).

Esses fenômenos descritos explicam a capacidade aumentada que os idosos têm de não responder adequadamente aos antígenos presentes, tendo como referência vacinas ou novas infecções. Já foi demonstrado, por exemplo, que a permanência do citomegalovírus (CMV) no hospedeiro pode acelerar o envelhecimento do sistema imune. O CMV é um vírus humano da família *Hespeviridae*, sua soroprevalência é de 70-90% da população adulta, e é caracterizado pela presença de altos níveis de anticorpos contra o citomegalovírus, acúmulo de linfócitos T CD8+ específicos para CMV e redução na população de linfócitos T *naïves*. É mais comum em indivíduos imunossuprimidos, e está relacionado com o aumento do índice de morbi-mortalidade em idosos, aumentando a suscetibilidade a infecções (Pawelec et al., 2014).

Atualmente, existem diversos estudos transversais, que retratam sobre a incidência e prevalência da hanseníase. Por outro lado, há poucos estudos longitudinais que associam a hanseníase com a imunossenescência. Por isso, é de muita importância fazer a associação entre o aparecimento da hanseníase em idosos e a imunossenescência.

2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma das doenças infecciosas mais antigas, e ainda continua sendo um problema de saúde pública, com índices de incidência preocupantes (Cole et al., 2001). Possui maior prevalência em adultos jovens, tendo em vista que o diagnóstico da doença ocorre geralmente entre 20 e 40 anos de idade. Porém, a incidência em indivíduos idosos (com idade igual ou superior a 60 anos) tem aumentado cada vez mais.

De acordo com o MS, o Brasil possui a quinta maior população idosa do mundo, com cerca de 28 milhões de idosos, representando 13,7% do total (MS, 2016). Diante desses dados, é possível afirmar que o número de novos casos de pacientes idosos com hanseníase tende a sofrer um aumento progressivo.

Dados epidemiológicos do Ambulatório Souza Araújo (ASA), centro de referência do MS, localizado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), mostram um aumento da incidência de 5,5% da população idosas entre os períodos de 1990-2001 a 2002-2013, perfazendo um total de 20% de todos os casos em 2014 (Lisboa, 2016). Se faz necessário, portanto, entender quais fatores estão relacionados com o desenvolvimento da doença somente na terceira idade, pois os mecanismos envolvidos com essa ocorrência não estão esclarecidos.

Levando-se em conta que o tempo de incubação do bacilo varia entre 2 a 10 anos, e que a maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* residem em áreas endêmicas a maior parte da vida, é de interesse entender a relação entre o aparecimento tardio da doença e a imunossenescência. Nesse contexto, já está bem demonstrado que, dentre outras condições, a imunossenescência está associada com suscetibilidade a infecções. Porém, ainda não foi esclarecida a relação entre a queda da atividade imunológica de um indivíduo e o aparecimento da hanseníase.

Assim, é possível concluir que o melhor entendimento do impacto da genética em doenças como a hanseníase e a associação com a imunossenescência pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prevenção e terapêutica da doença no futuro. Além disso, esse conhecimento pode impactar positivamente na diminuição de novos casos nessa faixa etária da população brasileira, podendo contribuir para o equilíbrio da qualidade de vida em idosos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Analisar a expressão de genes associados com a imunossenescência e suscetibilidade à hanseníase em idosos acompanhados no Ambulatório Souza Araújo (ASA) - FIOCRUZ.

3.2 Específicos:

1. Quantificar a expressão dos genes de interesse (*PARK2* e *NOD2*) e constitutivo (*GAPDH*) por meio de PCR quantitativo em tempo real.
2. Correlacionar os dados obtidos quanto a expressão gênica com os dados clínicos e demográficos.

LEI DO DIREITO AUTORA
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População de Estudo

Este estudo envolveu pacientes idosos diagnosticados com hanseníase, classificados de acordo com Ridley e Jopling. A pesquisa contou com a presença de dois diferentes grupos, 10 pacientes MB e 10 PB com idade igual ou superior a 60 anos. Todos os pacientes foram acompanhados no ASA do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, no Rio de Janeiro.

É importante ressaltar que variáveis como gênero, condições socioeconômicas e regiões de residência em áreas endêmicas foram analisadas, assim como dados clínicos desses pacientes. Todos os pacientes eram virgens de tratamento, as amostras biológicas foram coletadas imediatamente após o diagnóstico e antes do início da PQT, logo, casos de recidiva eram excluídos desde então - reaparecimento de uma doença ou sintoma. E, também, não foram coletadas amostras de pacientes em estágios reacionais, pois esses episódios de resposta inflamatória aguda não se enquadram no objetivo do estudo. Os critérios de não inclusão foram pacientes que se recusaram a participar do estudo e que possuíam comorbidades infecciosas agudas ou crônicas.

4.2 Considerações Éticas e Biossegurança

A participação de cada indivíduo no estudo foi mediante a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para assegurar a garantia do sigilo e confidencialidade dos dados de pesquisa, os nomes não foram divulgados, sendo substituídos então por números de identificação pessoal. Os dados clínicos e demográficos foram colhidos na fase diagnóstica e encontram-se referenciados na Tabela 4.

As amostras biológicas, no caso o sangue venoso, foram coletadas por profissionais especializados no ASA e transportadas até o laboratório em caixa isotérmica, seguindo os padrões de biossegurança adequados.

4.3 Coleta e estocagem das amostras biológicas

Foram coletados 2 tubos de sangue periférico total de cada paciente, sendo um vacutainer PAXgene Blood RNA™ (capacidade para 2,5 mL) e um tubo sem anticoagulante (para a obtenção de soro, capacidade de 8 mL). Os tubos para obtenção de soro foram coletados primeiramente para que fossem evitadas contaminações com RNA de células da pele, e posteriormente, foram devidamente processados e o soro armazenado em freezers a -20°C, em um biorrepositório. Os tubos PAXgenes permaneceram por, no mínimo, duas horas à temperatura ambiente e em seguida congelados no freezer com temperatura a -70°C. Todos os tubos receberam um número de identificação para garantir a anonimização dos participantes. Além disso, todas as amostras foram cuidadosamente armazenadas para que qualquer tipo de contaminação fosse evitada.

4.4 Extração e purificação de RNA total

As amostras de sangue foram retiradas do freezer -70°C para o descongelamento a temperatura ambiente, por duas horas. Todas as amostras ficaram estocadas por período inferior a seis meses. O Kit utilizado para a extração dos RNAs foi produzido pela QIAGEN. Todo o procedimento seguiu as instruções do fabricante.

Todos os passos da etapa de Extração de RNA foram realizados em temperatura ambiente (25°C). As amostras contidas nos tubos PAXgenes foram homogeneizadas manualmente e centrifugadas por 10 minutos a 3000 x g. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 4 mL de RNase Free Water ao sedimento. As amostras foram agitadas em Vórtex até o pellet ser visivelmente dissolvido. Em seguida, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 3000 x g. Os sobrenadantes foram descartados, e então foi adicionado 350 µL do tampão de ressuspensão (BR1) sob o pellet para posterior agitação no Vórtex. As amostras foram transferidas para tubos de microcentrifuga (Eppendorfs), e então foi adicionado 300 µL de BR2 e 40 µL de proteinase K.

As amostras foram incubadas a 55°C por 10 minutos em banho seco. Posteriormente, foram homogeneizadas e transferidas para tubos com coluna lilás. Foi feita a centrifugação dos tubos por 3 minutos a 20.000 x g. Após isso, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos Eppendorfs que continham 350 µL de etanol absoluto. Transferiu-se 700 µL de cada amostra para tubos de coluna rosa e centrifugados por 1 minuto a 20.000 x g. Para as amostras que continham mais de 700 µL, o passo anterior foi repetido. Novos tubos foram colocados em cada coluna rosa e adicionou-se 350 µL de BR3. As amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 20.000 x g.

O tratamento dos RNAs foi realizado adicionando 80 µL do tampão de DNase (mix contendo 10 µL de DNase + 70 µL de RDD). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, os tubos foram trocados, adicionados novamente 350 µL de BR3 e centrifugou-se por 30 segundos a 20.000 x g. Em seguida, adicionou-se 500 µL de BR4, centrifugou-se por 1 minuto a 20.000 x g. Após a centrifugação, foi novamente adicionado 500 µL de BR4, e a centrifugação durou 2 minutos a 20.000 x g.

Finalmente, as colunas foram transferidas para um novo tubo. Os RNAs foram eluídos com 80 µL do tampão BR5 e então incubados por 5 minutos a 65°C. Em seguida transferidos imediatamente para o gelo. Os RNAs foram estocados a -70°C até a utilização em etapas seguintes.

4.5 Quantificação e pureza do RNA

Para a quantificação e avaliação da pureza, foi utilizado o equipamento Espectrofotômetro NanoDrop^R ND-1000 (Thermo scientific, USA), mediante a leitura de absorbância (A) nos comprimentos de onda (λ) 260, 280 e 230 nm. Os valores de absorbância λ 260/280nm obtidos entre 1,8 a 2,0 e a absorbância λ 260/230nm com valores entre 1,8 a 2,2 demonstram características ótimas de pureza de uma amostra. As razões de 260/280 indicam grau de contaminação por proteínas, e A260/230 indicam grau de contaminação por compostos orgânicos provenientes dos processos de obtenção e extração de RNA.

As amostras que não tiveram um grau de pureza tão satisfatório, foram avaliadas por gel de agarose (Life Technologies/Invitrogen) a 1,2% (p/v) em tampão MOPS 1x (Sigma-Aldrich) coradas com SYBER Green II 100x (Life Technologies/Applied Biosystems), 35% (v/v) formamida, MOPS 1x e 0,125% (p/v) corante azul de bromofenol. Após a corrida eletroforética, o gel foi analisado por um sistema de fotodocumentação (I-Pix Touch, Loccus Biotecnologia, SP, Brasil).

4.6 Obtenção de cDNA

A transcrição de RNA em cDNA foi realizada com o kit SuperScript™ VILO Master Mix (Invitrogen, USA) e os procedimentos foram realizados conforme orientações do fabricante. Foram adicionados em Eppendorfs estéreis os seguintes componentes: 2µL da enzima SuperScript™ VILO Master Mix em todas as amostras, 400 ng RNA, sendo que a quantidade de µL variou de acordo com cada amostra, e água tratada até atingir um volume de 20 µL. Para a preparação do controle transcriptase reversa (RT) negativo foram adicionados ao eppendorf 2µL da enzima SuperScript™ VILO Master Mix e água tratada, foi feita uma incubação de 65°C por 10 minutos para a desnaturação da enzima, e após isso foram adicionadas as amostras selecionadas. Posteriormente, todas as amostras foram incubadas a 42°C por 60 minutos, seguidas por outra incubação de 85°C por 5 minutos. Foram imediatamente transferidas para o gelo e armazenadas a -20°C até a próxima utilização.

4.7 Quantificação da expressão gênica de fatores transcricionais por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para analisar a expressão de genes, foi realizada a RT-qPCR utilizando o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, foi realizada uma reação de 10 µL, onde foram adicionados 1 µL de cada cDNA na concentração de 10ng, transcrito com Oligo (dT), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems). Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse e do gene

constitutivo GAPDH. As reações foram incubadas no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus® (Applied Biosystems, EUA), seguindo as condições da reação: 95° C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 3 segundos e 60° C por 30 segundos. Ao final da reação de amplificação, as amostras foram submetidas a uma nova incubação para geração da curva de dissociação, onde se determina o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos oligonucleotídeos de suas sequências alvo. Para os ensaios acima, os seguintes genes SYBR™ Green foram utilizados: *PARK2* (Parquina) e *NOD2*. Todos os oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-qPCR foram desenhados a partir de sequências de referência de cada gene obtidas no UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>), utilizando o software *Primer3* v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

4.8 Análise dos dados obtidos a partir de RT-qPCR

A análise da expressão gênica relativa foi realizada utilizando-se o método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Inicialmente foi calculado o ΔCt , subtraindo-se os valores de Ct (do inglês *thresholdcycle*, limiar do ciclo) de cada gene alvo pelos valores de Ct do gene normalizador GAPDH (Life Technologies, USA). Uma vez determinado o ΔCt das amostras, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, referente ao gene alvo.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram representados como mediana. Os dados foram analisados utilizando-se o Teste de Mann-Whitney para a comparação de variáveis independentes, e para análise de correlação foi utilizado o Teste de Correlação de *Spearman*. Ambos os testes são não pareados e não paramétricos, e a significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. As análises estatísticas dos dados apresentados foram realizadas através do programa Windows GraphPadPrism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. Resultados

5.1 Análise de dados demográficos e clínicos dos grupos de estudo

O presente estudo realizou a análise de uma população composta por 20 pacientes idosos, sendo 10 PB e 10 MB. As características demográficas e clínicas dos pacientes deste estudo estão detalhadas na Tabela 4. A média de idade do grupo PB foi $68,1 \pm 9,5$ anos, e do grupo MB foi $70,2 \pm 7,0$ anos. Quanto ao gênero, no grupo de pacientes PB, a porcentagem de indivíduos do sexo feminino foi de 60% e do sexo masculino, 40%. Já no grupo de pacientes MB, 30% eram do sexo feminino e 70%, sexo masculino.

Os pacientes PB apresentaram Índice Baciloscópico (IB) igual a zero, o que já é esperado para esta forma clínica. O grupo de pacientes MB apresentou um IB médio de 3,8 (variação de 2,5 a 5,75). O Grau de Incapacidade (GI) funcional está associado ao nível de comprometimento decorrente da doença. Os testes foram realizados em 9 pacientes PB, sendo que apenas 1 apresentou GI=1, na classificação numérica (numa escala que varia de 0 a 2). Para o grupo MB, a avaliação foi realizada em 9 pacientes, sendo que 5 indivíduos apresentaram GI=1 e 4 pacientes GI=0.

Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998

Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



Tabela 4: Dados demográficos e clínicos dos indivíduos analisados

ID	Forma clínica	Sexo	Idade (anos)	IB	GI
11	PB	F	80	0	0
16	PB	M	66	0	0
27	PB	M	65	0	1
42	PB	F	89	0	NR
52	PB	F	71	0	0
53	PB	F	60	0	0
56	PB	F	64	0	0
57	PB	M	66	0	0
72	PB	F	60	0	0
73	PB	M	60	0	0
15	MB	M	81	5,75	0
35	MB	M	76	3,75	1
39	MB	M	73	3,5	1
51	MB	M	60	4	0
60	MB	F	74	4,5	0
65	MB	M	62	4	NR
71	MB	M	74	3,25	1
77	MB	F	64	2,5	0
80	MB	F	64	3,25	1
91	MB	M	74	3,25	1

ID: Código de identificação; IB: Índice Baciloscópio; GI: Grau de Incapacidade; PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar; F: Feminino; M: Masculino; NR: Não Realizado.

5.2 Quantificação dos genes de interesse

A expressão dos genes *PARK2* e *NOD2* amplificados pela técnica de qPCR em tempo real foi realizada. Os valores mostrados na Tabela 5 são referentes ao valor de $2^{-\Delta Ct}$, utilizado para estratégia de quantificação relativa dos dados analisados. Esse método permite o cálculo entre os diferentes níveis de expressão dos genes a medida em que se utiliza *threshold cycles* (CTs), ou ciclos limites, gerados pelo sistema. O ΔCt representa a diferença entre o Ct do gene constitutivo, GAPDH, e os genes de interesse.

Tabela 5: Quantificação relativa dos genes de interesse

ID	Forma clínica	<i>PARK2</i>	<i>NOD2</i>
11	PB	0,000378	0,035348
16	PB	0,000181	0,029184
27	PB	0,000271	0,069914
42	PB	0,000408	0,035109
52	PB	0,000311	0,030997
53	PB	0,000240	0,033533
56	PB	0,000232	0,030209
57	PB	0,000177	0,039300
72	PB	0,000169	0,019440
73	PB	0,000190	0,050935
15	MB	0,000140	0,032046
35	MB	0,000339	0,089916
39	MB	0,000323	0,054993
51	MB	0,000416	0,045990
60	MB	0,000335	0,041855
65	MB	0,000433	0,062447
71	MB	0,000244	0,036083
77	MB	0,000223	0,022901
80	MB	0,000307	0,028612
91	MB	*	0,007996

Dados referentes a quantificação relativa por meio do 2^{- Δ C_t}. ID: Código de identificação; * diferenças acima do tolerável para o Ct das duplicatas.

5.3 Análise da expressão gênica com as formas PB e MB da doença

Por meio do PCR quantitativo em tempo real, a expressão dos genes *PARK2* e *NOD2* foi analisada de acordo com os dois grupos estudados - pacientes PB e MB. Apesar da sugestão de pacientes MB apresentarem maiores índices quanto à expressão de ambos os genes, não houve alteração significativa, como pode ser observado na Figura 9.

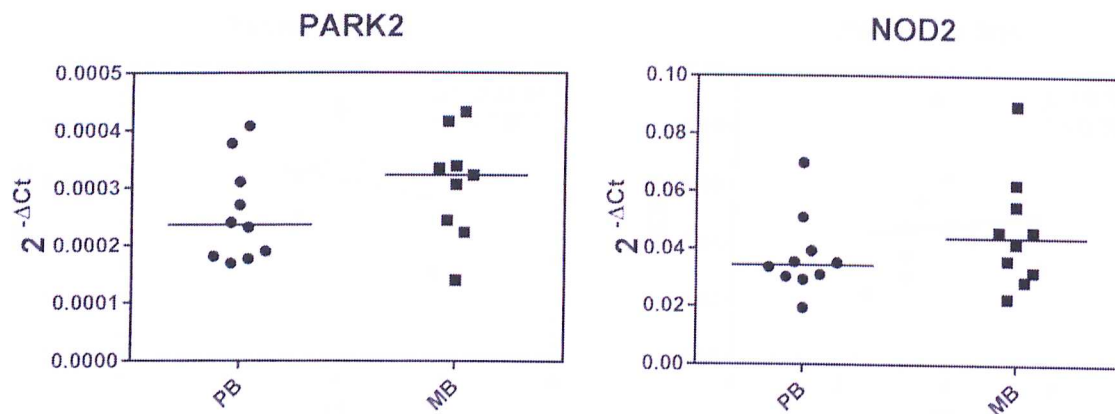


Figura 9: Expressão dos genes *PARK2* (gráfico à esquerda) e *NOD2* (gráfico à direita) de acordo com os grupos estudados, PB e MB. Análise por qPCR em tempo real a partir do RNA total. As barras horizontais representam a mediana dos grupos, e os símbolos representam os pacientes, sendo: 10 PB (*PARK2* e *NOD2*) e 10 MB para *NOD2* e 9 MB para *PARK2*. O teste Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística.

5.4 Correlação entre expressão gênica e índice baciloscópico dos pacientes MB

A fim de associar a quantificação da expressão dos genes com dados clínicos dos indivíduos, foi feita uma correlação entre a expressão gênica de *PARK2* (gráfico à esquerda) e de *NOD2* (gráfico à direita) com o índice baciloscópico de cada paciente MB. Apenas a classificação MB foi analisada devido à presença de carga bacilar. Não foi observada correlação significativa, e os resultados podem ser vistos na Figura 10.

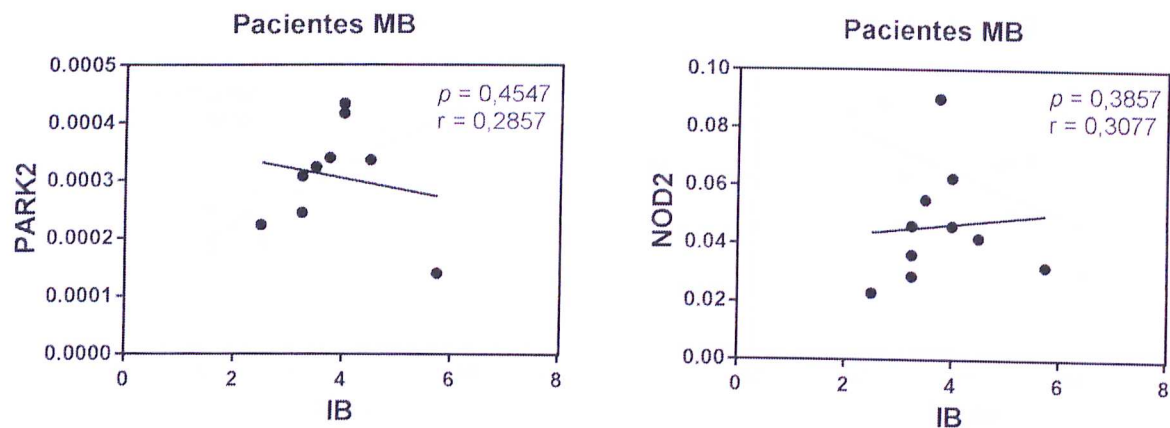


Figura 10: Correlação entre a expressão gênica de *PARK2* (gráfico à esquerda) e *NOD2* (gráfico à direita) e o índice baciloscópico. Dados pareados de 9 pacientes MB analisados quanto ao gene *PARK2*, e 10, para *NOD2*, sendo que cada ponto representa um paciente. Os coeficientes de relação são mostrados nas retas (valores de r), assim como o nível de significância (valores de p). Análise feita pelo método de correlação de *Spearman*.

5.5 Correlação entre expressão gênica e idade dos pacientes PB e MB

Também foi realizada a correlação da expressão do gene *PARK2* com a idade dos pacientes de ambos os grupos de estudo, como pode ser visto na Figura 11. Na forma PB, os indivíduos apresentaram uma correlação positiva e significativa, isto é, quanto maior a idade, maior é a expressão gênica de *PARK2* ($r = 0,6698$, $p = 0,0390$). E em pacientes MB, apesar de existir uma correlação negativa, oposto ao que foi encontrado para os pacientes PB, isto é, sugere-se que haja um declínio da expressão gênica de *PARK2* com o envelhecimento, não foi observada alteração significativa.



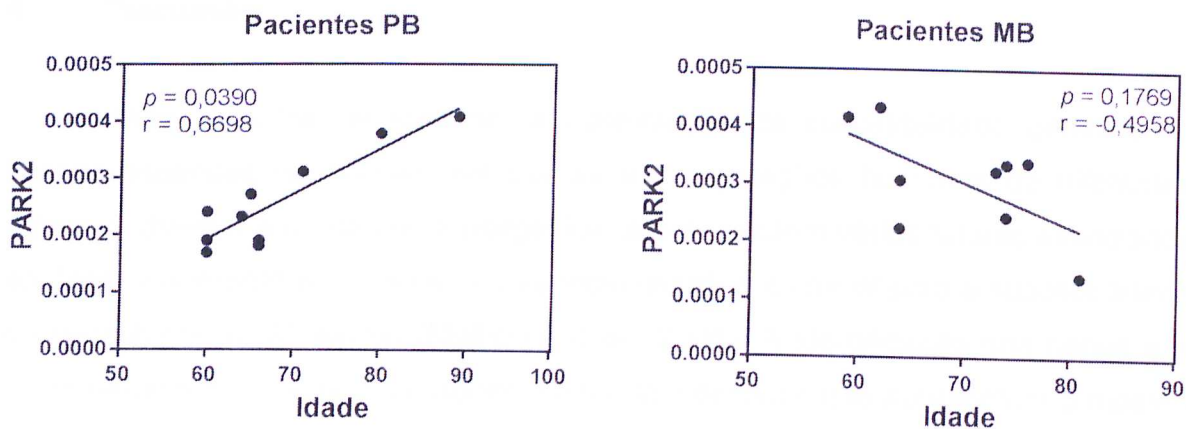


Figura 11: Correlação entre a expressão gênica de *PARK2* com a idade de pacientes PB (gráfico à esquerda) e MB (gráfico à direita). Dados pareados de 9 pacientes MB e 10 PB analisados, sendo que cada ponto representa um paciente. Os coeficientes de relação são mostrados nas retas (valores de r), assim como o nível de significância (valores de p). Análise feita pelo método de correlação de *Spearman*.

Além disso, o gene *NOD2* também foi analisado quanto ao nível de expressão gênica associado à idade dos pacientes de ambos os grupos de estudo. Em indivíduos PB, observamos uma discreta diminuição da expressão gênica com o aumento da idade, porém, sem correlação significativa. Já em pacientes MB, foi observado um aumento progressivo da expressão gênica com o envelhecimento dos indivíduos, porém, da mesma forma, não houve alterações significativas, como pode ser visto na Figura 12.

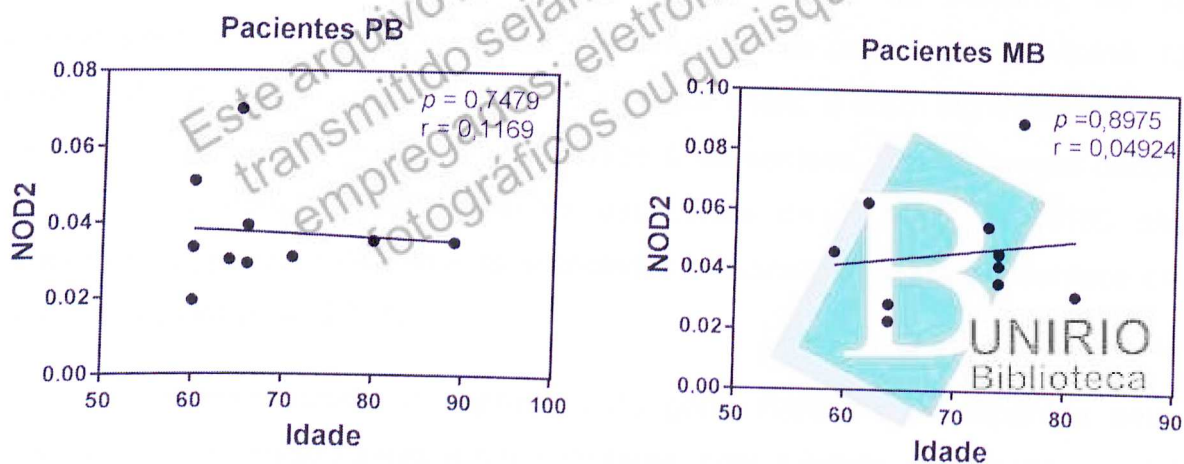


Figura 12: Correlação entre o nível de expressão de *NOD2* de pacientes PB (gráfico à esquerda) e MB (gráfico à direita) e a idade. Dados pareados de 10 pacientes de cada grupo, sendo que cada ponto representa um indivíduo. Os coeficientes de correlação são mostrados nas retas (valores de r), assim como o nível de significância (valores de p). A análise estatística foi realizada através do método de *Spearman*.

6. Discussão

Vários estudos demonstram a contribuição da suscetibilidade genética na imunopatogênese da hanseníase *per se* em populações humanas de diferentes etnias. A doença é de natureza poligênica, isto é, existem vários fatores associados ao desenvolvimento da mesma, e o aspecto genético é crucial para a suscetibilidade ou resistência ao *M. leprae* (Malhotra et al., 2006). A identificação dos genes e a compreensão do processo de adoecimento de indivíduos que apresentam o mesmo grau de exposição ao bacilo, mas diferem com relação à evolução (doença ou resolução), podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias de intervenção terapêutica e controle da doença.

Um forte componente genético analisado no presente estudo é o *PARK2*, juntamente com seu gene corregulado *PACRG*. O gene *PARK2* codifica uma proteína denominada parquina que promove uma ubiquitinação E3 ligase envolvida no envio de proteínas poliubiquitinadas ao complexo proteassômico. Até o momento, já foi demonstrado que em populações indianas, a região cromossômica 10p13 regula a suscetibilidade à forma PB, e a região 6q25-27 controla a suscetibilidade à hanseníase *per se* (De Léséleuc et al., 2013; Malhotra et al., 2006). Porém, populações de origens étnicas diferentes apresentam outros resultados. Em um estudo realizado por Mira e colaboradores foi sequenciado o genoma de famílias vietnamitas e brasileiras (mais especificamente do Rio de Janeiro), de 15 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do DNA de populações do Vietnã, 13 eram válidos para populações brasileiras e dentre estes, 9 eram significativamente associados a um alto risco de suscetibilidade à hanseníase. Diante desses dados, os autores constataram que variantes específicas de *PARK2* e *PACRG* são componentes genéticos diretamente associados à suscetibilidade à hanseníase em nível global (Mira et al., 2004).

No presente estudo, a expressão do gene *PARK2* foi comparada entre pacientes idosos multibacilares e paucibacilares, com o intuito de investigar se há um perfil de expressão para cada forma clínica. Embora nossos resultados não apresentem alterações significativas, estudos anteriores já demonstraram que alterações na expressão do gene *PARK2* não estão ligadas a uma forma clínica

específica, mas sim à hanseníase *per se* (Misch et al., 2010). Diante disso, este fato pode justificar a não significância dos resultados associados à expressão do gene nas diferentes formas clínicas da doença, além do pequeno número de pacientes analisados.

Verificamos ainda a correlação entre o índice baciloscópico e a expressão do gene *PARK2* e os dados mostraram um declínio na linha de correlação: quanto maior o IB, menor a expressão gênica de *PARK2*. Um importante e recente estudo demonstrou diferença na regulação da autofagia entre pacientes pauci- e multibacilares. Nos PB, foi observada uma regulação positiva, caracterizando aumento na formação de autofagossomos, enquanto nos MB, tal relação foi negativa, o que contribui para o aumento da carga bacilar (Silva et al., 2017). Com o processo de eliminação autofágica, acredita-se que pode haver a mobilização dos bacilos para o complexo proteassômico, levando a uma baixa carga bacilar, característica essa de pacientes PB. Em função dos resultados obtidos, e, apesar do baixo número amostral, acredita-se que o bacilo possa regular negativamente a expressão de *PARK2*, o que reduz a morte do *M. leprae* pela via autofágica, pois, pacientes com IB alto apresentaram menor expressão deste gene.

Além disso, também foi analisada a correlação entre a expressão do gene *PARK2* com a idade dos pacientes, tanto na forma clínica PB quanto MB. Nos PB, o nível de expressão gênica aumentou com a idade, sendo tal correlação significativa ($r=0,6698$). É sabido que macrófagos são células hospedeiras naturais do *M. leprae*, assim como são mediadores primários da defesa imunes inata, por meio da secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Um estudo comprovou que o aumento da regulação de *PARK2* em macrófagos originados de monócitos e células de Schwann ocasiona maior produção da interleucina-6 e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), mediadores da imunidade inata (De Léséleuc et al., 2013). Embora indivíduos idosos tenham o sistema imunológico comprometido, pacientes PB induzem uma resposta imune celular mais robusta que os MB, e essa resposta ocorre após um processo inflamatório e consequente atuação de macrófagos, linfócitos ou células infectadas que apresentam os antígenos aos linfócitos T. Portanto, espera-se que os indivíduos PB apresentem maior expressão de *PARK2* em relação aos pacientes MB. Assim, de acordo com os resultados do presente

estudo, há uma hipótese de que pacientes PB, com o avanço da idade, podem garantir o processo autofágico devido a manutenção da expressão de *PARK2*, enquanto os pacientes MB, com o avanço da idade, podem perder a regulação positiva do processo autofágico devido à redução na expressão deste gene, o que facilita a manutenção do bacilo nos macrófagos.

Outro gene analisado em nosso estudo foi o *NOD2* (Domínio de ligação da Oligomerização de Nucleotídeos 2). Acredita-se que variações genéticas em receptores do sistema imune inato favoreçam a infecção pelo *M. leprae*. Os genes candidatos centralizam-se em receptores de patógenos presentes na superfície, organelas intracelulares e no citosol. Os receptores de *NOD2* são citosólicos e estão envolvidos na detecção citoplasmática de microrganismos e na ativação de cascatas inflamatórias, isto é, estão diretamente ligados com a ativação de NF κ B e produção de IL-1 β e TNF frente ao estímulo do *M. leprae* (Kang et al., 2011). Um estudo envolvendo pacientes de origem asiática, demonstrou a associação de polimorfismos no gene que codifica o *NOD2* com a suscetibilidade à hanseníase, além da proteção e/ou suscetibilidade aos estados reacionais da doença (Berrington et al., 2010).

O *NOD2* está diretamente relacionado com o sistema imune inato, capacitando o combate às infecções através da ligação de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) aos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (Franchi et al., 2009). Há uma tendência que pacientes PB apresentem menor comprometimento quanto a expressão gênica de *NOD2*, tendo em vista que esta forma clínica é caracterizada pela resposta imunológica do tipo T_{H1}, isto é, ocorre essa diferenciação dos linfócitos T *helper* em função do microambiente em que citocinas como IFN- γ e IL-2 estão presentes em altos níveis. Enquanto que nos pacientes MB há uma resposta predominantemente do tipo T_{H2}, que está relacionada a um microambiente permissivo, com altos níveis de citocinas IL-4 e IL-10, e caracterizado pela produção de altos títulos de anticorpos (Britton & Lockwood, 2004; Scollard et al., 2006). Porém, sabe-se que com o envelhecimento, a resposta imune torna-se restrita e prejudicada, podendo levar a uma diminuição da expressão de *NOD2*.

Curiosamente, o *NOD2* possui um sistema de reconhecimento independente contra infecções micobacterianas, identificando o muramil dipeptídeo (MDP), parte do peptidoglicano da parede celular micobacteriana (Coulombe et al., 2009; Mahapatra et al., 2008). Um trabalho demonstrou que polimorfismos no gene que codifica o *NOD2* estão associados a uma menor resposta de macrófagos à presença do *Mycobacterium tuberculosis*, por meio de uma menor produção de TNF nessas células após a interação com antígenos do bacilo (Ferwerda et al., 2005).

O presente estudo verificou a expressão do gene *NOD2* em pacientes PB e MB. Foi analisado o nível de carga bacilar de acordo com a expressão de tal gene e os dados apontam para um leve aumento da expressão de *NOD2* em função do índice baciloscópico em pacientes MB. Um estudo realizado por Schenk e colaboradores apontou que o receptor *NOD2* é expresso em maior quantidade em lesões de pacientes tuberculoides, e que a ativação deste receptor é essencial para a ativação e diferenciação de células dendríticas, por meio da expressão gênica de diversos mediadores inflamatórios, enquanto que na forma MB não ocorre o mesmo, a interleucina-10 (IL-10) bloqueia os efeitos da ativação do *NOD2* (Schenk et al., 2012). Os dados do presente estudo não viabilizaram uma possível confirmação dos achados de Schenk e colaboradores, o que pode estar associado ao reduzido número de pacientes analisados. Entretanto, como citado anteriormente, o índice baciloscópico parece influenciar na expressão de *NOD2*.

Uma associação entre a genética e suscetibilidade à hanseníase se faz necessária para a criação e otimização de condutas de prevenção e terapia com os pacientes, assim como para a avaliação de risco de adoecimento dos comunicantes. Com o avanço da tecnologia, é esperada a descrição da variação genética em populações de diversas etnias e a elaboração de hipóteses para a contribuição na patogênese da doença através de novas ferramentas que detectam polimorfismos em amostras biológicas. As limitações do presente estudo englobam o pequeno número de amostras biológicas de pacientes idosos, a ausência de um grupo controle - voluntários idosos saudáveis - e a utilização de um único gene constitutivo analisado no último passo da metodologia. Além disso, é necessário maior investimento na pesquisa e que mais estudos sejam realizados, incluindo as

variáveis de limitações, para os genes *PARK2* e *NOD2* e outros genes que possam estar relacionados à suscetibilidade de idosos à hanseníase.

LEI DO DIREITO AUTORAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



7. CONCLUSÕES

- O aumento da expressão do gene *PARK2* pode estar associado com o envelhecimento dos pacientes, isto é, com o avanço da idade, sobretudo na forma paucibacilar (PB) da doença.
- O gene *NOD2* parece não estar relacionado com a determinação das formas clínicas nos pacientes idosos estudados.

LEI DO DIREITO AUTORAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.



8. Referências bibliográficas

AGONDI RC, RIZZO LV, KALIL J, et al. Imunossenescência. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.** 2012;35(5):169-176.

ANTONIO JR, SOUBHIA RMC, PASCHOAL VDA, et al. Biological agents: investigation into leprosy and other infectious diseases before indication. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** 2013;88(6 Suppl 1):23-25.

BATISTA ES, CAMPOS RX, QUEIROZ RCG, SIQUEIRA SL, PEREIRA SP, PACHECO TJ, et al. Perfil sócio-demográfico e clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em Campos dos Goytacazes, RJ. **Rev Soc Bras Clin Med.** 2011 abr;9(2):101-6.

BENCHIMOL JL, SÁ MR. **Adolpho Lutz: Hanseníase. Leprosy.** 2 ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004.

BERRINGTON WR, MACDONALD M, KHADGE S, SAPKOTA BR, JANER M, HAGGE DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. **J Infect Dis.** 2010 Maio 1;201(9):1422-35.

BLACKWELL JM, Searle S, Goswami T, et al. Understanding the multiple functions of Nramp1. **Microbes Infect.** 2000 Mar;2(3):317-21.

BOCHUD PY, HAWN TR, SIDDIQUI MR, SAUNDERSON P, BRITTON S, ABRAHAM I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **J Infect Dis.** 2008 Jan 15;197(2):253-61.

BRITTON WJ, LOCKWOOD DN. Leprosy. **Lancet.** 2004 Abr 10;363(9416):1209-19.

BUHRER-SEKULA S. PGL-I leprosy serology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2008, vol.41, suppl.2, pp. 3-5.

CANONNE-HERGAUX F, GRUENHEID S, GOVONI G, et al. The Nramp1 Protein and Its Role in Resistance to Infection and Macrophage Function. **Proceedings of the Association of American Physicians.** 1999; 111: 283-289.

CARDOSO CC, PEREIRA AC, BRITO-DE-SOUZA VN, DIAS-BAPTISTA IM, MANIERO VC, VENTURINI J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. **Hum Genet.** 2010 Nov;128(5):481-90.

CARDOSO CC, PEREIRA AC, de SALES MARQUES C, et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol.** 2011 Maio;6(5):533-49.

CEVENINI E, MONTI D, FRANCESCHI C. Inflamm-ageing. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 2013 Jan;16(1):14-20.

COLE ST, EIGLMEIER K, PARKHILLI J, JAMES KD, THOMSON NR, WHEELER PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature.** 2001 Fev 22;409(6823):1007-11.

COOKE GS, HILL AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nat Rev Genet.** 2001; 2: 967-77.

COOKSON MR. Neurodegeneration: how does parkin prevent Parkinson's disease? **Curr Biol.** 2003 Jul 1;13(13):R522-4.

COULOMBE F, DIVANGAHI M, VEYRIER F, de LÉSÉLEUC L, GLEASON JL, YANG Y, et al. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. **J Exp Med.** 2009 Ago 3;206(8):1709-16.

DE CARVALHO FM, RODRIGUES LS, DUPPRE NC, ALVIM IMP, RIBEIRO-ALVES M, PINHEIRO RO, et al. Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to Mycobacterium leprae specific antigens. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017 Maio3;11(5):e0005560.

DE LÉSÉLEUC L, ORLOVA M, COBAT A, GIRARD M, HUONG NT, BA NN, et al. PARK2 mediates interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 production by human macrophages. **PLoS Negl Trop Dis.** 2013;7(1):e2015.

DE MARTINIS M, FRANCESCHI C, MONTI D, et al. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. **FEBS Lett.** 2005 Abr 11;579(10):2035-9.

DEPS PD, ALVES BL, GRIPP CG, ARAGAO RL, GUEDES B, FILHO JB, et al. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.** 2008 Jul-Ago;74(4):338-42.

DERHOVANESEAN E, LARBI A, PAWELEC G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. **Curr Opin Immunol.** 2009 Ago;21(4):440-5.

FERWERDA G, GIRARDIN SE, KULLBERG BJ, Le BOURHIS L, de JONG DJ, LANGENBERG DM, et al. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog.** 2005 Nov;1(3):279-85.

FRANCHI L, WARNER N, VIANI K, et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev.** 2009 Jan;227(1):106-28.

GARCIA JRL. Entre a "loucura" e a hanseníase: interfaces históricas das práticas e políticas instituídas. **Hansen. Int.** 2001;26(1):14-22.

HAKIM, FT, GRESS, RE. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. **Tissue Antigens.** 2007 Set;70(3):179-89.

HUANG EE, TEDONE E, O'HARA R, CORNELIUS C, LAI TP, LUDLOW A, et al. The Maintenance of Telomere Length in CD28+ T Cells During T Lymphocyte Stimulation. **Sci Rep.** 2017 Jul 28;7(1):6785.

KANG TJ, CHAE GT. The Role of Intracellular Receptor NODs for Cytokine Production by Macrophages Infected with Mycobacterium leprae. **Immune Netw.** 2011 Dez;11(6):424-7.

KANG, TJ, CHAE GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2001 Jul;31(1):53-8.

KAPSENBERG ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat Rev Immunol.** 2003 Dez;3(12):984-93.

LIPINSKI S, GRABE N, JACOBS G, BILLMANN-BORN S, TILL A, HASLER R, et al. RNAi screening identifies mediators of NOD2 signaling: implications for spatial specificity of MDP recognition. **Proc Natl Acad Sci**. 2012 Dez 26;109(52):21426-31.

LISBOA M. **Estratégias para bloquear a transmissão da hanseníase em município hiperendêmico - Mossoró-RN**. 254 f. Tese (Doutorado em Medicinal Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2016.

LOCKWOOD DN, SUNEETHA S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bull World Health Organ**. 2005 Mar;83(3):230-5.

MAHAPATRA S, CRICK DC, MCNEIL MR, BRENNAN PJ. Unique structural features of the peptidoglycan of *Mycobacterium leprae*. **J Bacteriol**. 2008 Jan;190(2):655-61.

MALHOTRA D, DARVISHI K, LOHRA M, KUMAR H, GROVER C, SOOD S, et al. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. **Eur J Hum Genet**. 2006 Abr;14(4):438-42.

MANDERSON L, AAGAARD-HANSEN J, ALLOTEY P, et al. Social research on neglected diseases of poverty: continuing and emerging themes. **PLoS Negl Trop Dis**. 2009;3:e332.

MARTINEZ TS, FIGUEIRA MM, COSTA AV, GONÇALVES MA, GOULART LR, GOULART IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clin Microbiol Infect**. 2011 Nov;17(11):1653-8.

MEISNER SJ, MUCKLOW S, WARNER G, SOW SO, LIENHARDT C, HILL AV. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **Am J Trop Med**. 2001 Dez;65(6):733-5.

Ministério da Saúde. **Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase**. Brasil 2001 – 2016. Fonte: Portal da Saúde, 2017a. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/10/Indicadores-epidemiol--gicos-e-operacionais-de-hansen--ase.%20Brasil,%202001-.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2017.

Ministério da Saúde. **Ministério recomenda: é preciso envelhecer com saúde**. Fonte: Portal da Saúde, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/25924-ministerio-recomenda-e-preciso-envelhecer-com-saude>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

Ministério da Saúde. **Registro ativo: número e percentual, casos novos de hanseníase: número, taxa e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2016**. Fonte: Portal da Saúde, 2017b; Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/11/Tabela%20Geral_12016.pdf>. Acesso em 25 out. 2017.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em**

hanseníase/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 54 p.

Ministério da Saúde. **Tratamento poliquimioterápico - PQT.** Fonte: Portal da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hansenise/11299-tratamento>>. Acesso em: 27 out. 2017.

Ministério dos Direitos Humanos. Lei nº 9.010, de 29 de março de 1995. Dispõe sobre a terminologia oficial relativa a hanseníase e dá outras providências. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, 26 dez. 2017. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9010.htm>. Acesso em: 26 dez. 2017.

MIRA MT, ALCAIS A, NGUYEN VT, MORAES MO, Di FLUMERI C, VU HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**. 2004 Fev 12;427(6975):636-40.

MISCH EA, BERRINGTON WR, VARY JC Jr, et al. Leprosy and the human genome. **Microbiol Mol Biol Rev**. 2010 Dez;74(4):589-620.

MOLYNEUX DH, SALVIOLI L, ENGELS D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **Lancet**. 2017;389:312–25.

MONOT M, HONORÉ N, GARNIER T, ARAOZ R, COPPÉE JY, LACROIX C, et al. On the origin of leprosy. **Science**. 2005 Maio 13;308(5724):1040-2.

MONTEIRO YN. Hanseníase: história e poder no Estado de São Paulo. **Hansenologia Internationalis**, São Paulo, v. 12, n.1, p.1-7, 1987.

MORAES MO, CARDOSO CC, VANDERBORGHT PR, PACHECO AG. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev**. 2006 Set;77(3):189-202.

NERY JAC, SOUSA MDG, ESQUENAZI D. **Hanseníase**. In: Candiani, J.O.; Gatti, C.F.; Lupi, O.(Org.). Dermatologia: Guías de Actualización Clínica. 1 ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2015, v. 1, p. 493-502.

NEVO Y, NELSON N. The NRAMP family of metal-ion transporters. **Biochim Biophys Acta**. 2006 Jul;1763(7):609-20.

OMS. **Epidemiology**, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/epidemiology/en/>>. Acesso em: 27 out. 2017.

OMS. **Global Leprosy Strategy: Accelerating towards a leprosy-free world**. Organização Mundial da Saúde, 2016.

OMS. **Global plan to combat neglected tropical diseases 2008–2015**. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2007.

OMS. **WHO Expert Committee on Leprosy: eighth report**. WHO Technical Report Series, No. 968, 2012.

- PANDA A, QIAN F, MOHANTY S, VAN DUIN D, NEWMAN FK, ZHANG L, et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. **J Immunol.** 2010 Mar 1;184(5):2518-27.
- PANDYA, SHUBHADA 1998 'Anti-contagionism in leprosy'. **Internat. J. Lepr.**, 66, pp. 374-84.
- PAWELEC G. Immunosenescence: role of cytomegalovirus. **Exp Gerontol.** 2014 Jun;54:1-5.
- PINTO, PGHR. O estigma do pecado: a lepra durante a idade média. **Physis.** Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 131-144, 1995.
- PREVEDELLO, FC; MIRA, MT. Hanseníase: uma doença genética?. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 82, n. 5, p. 451-459, Out. 2007.
- REIBEL F, CAMBAU E, AUBRY A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Med Mal Infect.** 2015 Set;45(9):383-93.
- RICHARDUS JH, HABBEMA JD. The impact of leprosy control on the transmission of *M. leprae*: is elimination being attained?. **Lepr Rev.** 2007 Dez;78(4):330-7.
- RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.
- ROSA FB, SOUZA VC, ALMEIDA TA, NASCIMENTO VA, VÁSQUEZ FG, CUNHA Mda G, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2013 Ago;108(5):572-7.
- ROY S, FRODSHAM A, SAHA B, HAZRA SK, MASCIE-TAYLOR CG, HILL AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis.** 1999 Jan;179(1):187-91.
- SALVIOLI S, MONTI D, LANZARINI C, CONTE M, PIRAZZINI C, BACALINI MG, et al. Immune system, cell senescence, aging and longevity--inflamm-aging reappraised. **Curr Pharm Des.** 2013;19(9):1675-9.
- SANTOS AR, SUFFYS PN, VANDERBORGHT PR, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis.** 2002 Dez 1;186(11):1687-91.
- SAUNDERSON P, GROENEN G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. **Lepr Rev.** 2000 Mar;71(1):34-42.
- SCHENK M, KRUTZIK SR, SIELING PA, LEE DJ, TELES RM, OCHOA MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. **Nat Med.** 2012 Mar 25;18(4):555-63.
- SCOLLARD DM, ADAMS LB, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, TRUMAN RW, WILLIAMS DL. The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews.** 2006;19(2):338-381.

SHEPARD CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. **The Journal of Experimental Medicine**. 1960;112(3):445-54.

SILVA BJA, BARBOSA MGdM, ANDRADE PR, FERREIRA H, NERY JAdC, CORTE-REAL S, et al. Autophagy is an innate mechanism associated with leprosy polarization. **PLoS Pathog**. 2017;13(1): e1006103.

SPENCER JS, KIM HJ, WHEAT WH, CHATTERJEE D, BALAGON MV, CELLONA RV, et al. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clin Vaccine Immunol**. 2011 Fev;18(2):260-7.

SUTARIA N, LIU CT, CHEN TC. Vitamin D Status, Receptor Gene Polymorphisms, and Supplementation on Tuberculosis: A Systematic Review of Case-Control Studies and Randomized Controlled Trials. **J Clin Transl Endocrinol**. 2014 Dez 1;1(4):151-160.

TRAUTMAN JR. A brief history of Hansen's disease. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**. 1984;60(7):689-695.

VISSA VD, BRENNAN PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol**. 2001;2(8):reviews1023.

LEIDO DIREITO AUTORAL
Todos os direitos reservados e protegidos
pela Lei 9.610/1998.
Este arquivo não pode ser reproduzido ou
transmitido sejam quais forem os meios
empregados: eletrônicos, mecânicos,
fotográficos ou quaisquer outros.

