



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS APLICADAS À DERMATOLOGIA



**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *LRRK2* E *IRGM* COM A
SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE**

SAMUEL HENRIQUE MALCHER DE CASTRO

MANAUS
2021

SAMUEL HENRIQUE MALCHER DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *LRRK2* E *IRGM* COM A
SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação Alfredo da Matta como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Dermatologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Leturiondo

**MANAUS
2021**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

C355a Castro, Samuel Henrique Malcher de
Avaliação de polimorfismos nos genes LRRK2 e IRGM
com a suscetibilidade à hanseníase / Samuel Henrique
Malcher de Castro. Manaus : [s.n], 2021.
61 f.: color.; 28 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Dermatologia - Universidade do Estado do
Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientador: Leturiondo, André Luiz

1. Hanseníase. 2. Caso-controle. 3. SNP. 4.
LRRK2. 5. IRGM. I. Leturiondo, André Luiz (Orient.).
II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Avaliação de
polimorfismos nos genes LRRK2 e IRGM com a
suscetibilidade à hanseníase

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

DEDICATÓRIA

Em memória de meus avós Frank e Raimunda Castro, meu tio Wylhams Castro e minha ex-professora Maria Regilda de Araújo Fernandes.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pela graça de me ceder esse desafio e por ter me sustentado todos os dias com Seu infinito amor, misericórdia e bondade.

Aos meus pais Sr. Lúcio Castro e Sra. Delma Malcher pelo apoio incondicional, pelas orações e por todo o sacrifício que fizeram por mim, sempre me incentivando a seguir em frente e não desistir.

Ao meu orientador, Dr. Milton Moraes, pela confiança do projeto e por todos os conhecimentos que pôde me transmitir.

Às minhas irmãs, Samilly e Kamilla, por estarem sempre torcendo por mim e me desejando todo o sucesso.

À minha namorada e companheira, Kerciany Santiago, por sempre me incentivar, aconselhar e também pela paciência e pelo seu amor e cuidado.

Aos demais familiares, pelas preces e pelo carinho que sempre tiveram por mim.

Aos meus amigos, pela positividade e por se alegrarem com minhas conquistas. Aos meus companheiros do mestrado, pela troca de experiências, sorrisos e risadas, pelo apoio e, acima de tudo, pela união.

Aos meus professores da graduação, especialização e mestrado, pela transmissão de conhecimento e pela participação na minha formação.

Aos meus avós Frank e Raimunda Castro (*in memoriam*), ao meu tio Wyllhams Castro (*in memoriam*), e minha professora Maria Regilda (*in memoriam*), que certamente se orgulhariam de mim e se alegrariam com cada conquista, e aos quais dedico esse trabalho.

Aos meus amigos, Júlio Sampaio (Biblioteca - FUAM), Samuel Rufino (CPD – FUAM), Dr. Felipe Jules de Araújo Santos (FUAM) e Isabela Espasandin Martins (Fiocruz – IOC), pela parceria e por toda a ajuda que me deram na elaboração desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, da Fundação Alfredo da Matta, Cynthia, Camila e Ariani, pela amizade, companheirismo, incentivo e por me oferecerem todo o suporte necessário.

Ao Dr. André Leturiondo, pela parceria, pelos conselhos, almoços, lanches, puxões de orelha (quando necessário), por ter contribuído com meu

crescimento profissional e pessoal, por acreditar no meu potencial e por ter sido como um pai para mim em vários momentos.

Aos meus alunos, pela positividade e por serem a motivação de meus esforços.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia. À Dra. Carolina Talhari pelo excelente trabalho na coordenação do curso, por todos os ensinamentos passados à nós e pelo financiamento do projeto.

À Universidade do Estado do Amazonas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Resposta imune no polo tuberculoide.....	6
Figura 2 - Resposta imune no polo virchowiano.....	7
Figura 3 - Estrutura da proteína LRRK2.....	13
Figura 4 - LRRK2 na via de sinalização intracelular NFAT.	15
Figura 6 - LRRK2 na via de sinalização de NFkB.	16
Figura 7 - Função de LRRK2 na manutenção da homeostase lisossomal.	17
Figura 8 - IRGM na resposta inata.	19
Figura 9 – Genótipo fornecido pela discriminação alélica por meio da intensidade das fluorescências..	25
Figura 10 - Gráfico de discriminação alélica em clusters..	25
Figura 11 - Gráfico de DL para as variantes em <i>LRRK2</i> e <i>IRGM</i>	33
Tabela 1 - Genes e variantes de associação em <i>loci</i> 6p21	10
Tabela 2 - Genes e variantes associadas à hanseníase identificadas em estudos independentes	11
Tabela 3 - Variantes selecionadas nos genes <i>LRRK2</i> e <i>IRGM</i>	23
Tabela 4 - Características gerais de casos e controles.....	27
Tabela 5 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as variantes em <i>LRRK2</i> e <i>IRGM</i>	28
Tabela 6 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores em genes candidatos com a hanseníase.....	28
Tabela 7 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores entre controles e forma operacional PB	30
Tabela 8 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores entre controles e forma operacional MB.....	31
Tabela 9 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores entre as formas PB e MB	32
Tabela 10 - Associação de frequências de haplótipos em <i>LRRK2</i> entre casos e controles.....	33
Tabela 11 - Associação de frequências de haplótipos em <i>LRRK2</i> entre controles e forma operacional PB.	34

Tabela 12 - Associação de frequências de haplótipos em <i>LRRK2</i> entre controles e forma operacional MB.....	34
Tabela 13 - Associação da frequência de haplótipos em <i>IRGM</i> entre casos e controles.....	35
Tabela 14 - Associação da frequência de haplótipos em <i>IRGM</i> entre controles e forma operacional PB.....	35
Tabela 15 - Associação da frequência de haplótipos em <i>IRGM</i> entre controles e forma operacional MB.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amazonas
ANK	<i>Ankirin domain</i>
AP-1	<i>Activator protein 1 transcription factor</i>
ARM	<i>Armadillo repeat domain</i>
ASC	Análise de Segregação Complexa
ATG16L1	<i>Autophagy related 16 Like 1</i>
BCG	Bacilo calmette-guérin
CARD9	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 9</i>
CD163	<i>Cluster of differentiation 163</i>
CD209	<i>Cluster of differentiation 209</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
DD	Dimorfa-dimorfa
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DT	Dimorfa-tuberculoide
DV	Dimorfa-virchowiana
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas
FLG	<i>Filaggrin gene</i>
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical – Dr. Heitor Vieira Dourado
FUAM	Fundação Alfredo da Matta
GWAS	<i>Genome wide association study</i>
GWLS	<i>Genome wide linkage study</i>
HIF1A	<i>Hypoxia induced factor 1 A</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
IFN- γ	<i>Interferon gama</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15

IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL23R	<i>Interleukina 23 receptor</i>
IL-27	Interleucina 27
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IRGA	<i>Immunity-related GTPase family A protein</i>
IRGB	<i>Immunity-related GTPase family B protein</i>
IRGC	<i>Immunity-related GTPase family C protein</i>
IRGD	<i>Immunity-related GTPase family D protein</i>
IRGM	<i>Immunity-related GTPase family M protein</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LACC1	<i>Laccase multicopper oxidoreductase domain containing 1</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LILRA2	<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A 2</i>
LRR	<i>Leucine-rich repeat domain</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LTA	<i>Lymphotoxin alfa</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. lepromatosis</i>	<i>Mycobacterium lepromatosis</i>
MAF	<i>Minor allelic frequency</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MB	Multibacilar
MDT	<i>Multidrug therapy</i>
MRC 1	<i>Manose C receptor</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88 protein</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFkB	<i>Nuclear fator kappa B</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing 2</i>

NRON	<i>Non-coding repressor of NFAT</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Pará
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
qPCR	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
RCAN-1	<i>Regulator of calcineurin 1</i>
RIPK2	<i>Receptor interacting serine/threonine kinase 2</i>
RT-1	Reação tipo 1
RT-2	Reação tipo 2
SLC29A3	<i>Solute carrier family 29 member 3</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TBK-1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	<i>T helper 1</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TLR-1	<i>Toll-like receptor 1</i>
TLR-2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i>
TRAF-6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
T reg	T reguladoras
TT	Tuberculoide
TYK2	<i>Tyrosine kinase2</i>
ULK-1	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VV	Virchowiana (o)

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa que afeta, principalmente, a pele, mucosas e nervos periféricos, podendo levar a incapacidades físicas, muitas vezes irreversíveis. O diagnóstico tardio e a consequente transmissão ativa da doença, tem mantido a incidência num patamar alto no Brasil, acima de 27 mil casos/ano, e praticamente estável na última década. Os estudos genéticos de associação têm sido muito importantes na identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), associados a suscetibilidade à doença. O conhecimento dessas variações genéticas e do perfil de resposta imunológica do hospedeiro podem ajudar a subsidiar melhor entendimento da patogênese da hanseníase e, talvez, desenvolvimento de novos instrumentos para o diagnóstico precoce, tratamento imediato ou quimioprevenção. Nesse contexto, o presente estudo teve como finalidade, verificar associação, em um desenho do tipo caso-controle populacional, a presença de variantes nos genes *LRRK2* (rs7962370, rs34637584 e rs7133914) e *IRGM* (rs13361189 e rs11167514) que poderiam representar risco ou proteção à hanseníase na população de Manaus. A genotipagem dos SNPs selecionados em cada um dos genes foi realizada através de qPCR, por discriminação alélica, em 412 casos e 967 controles, registrados na Fundação Alfredo da Matta. No presente estudo, não encontramos associações significativas destas variantes à hanseníase na população amazonense. Curiosamente, alguns desses SNPs foram associados em estudos anteriores realizados em populações brasileiras ou estrangeiras reforçando a necessidade de estudos no Amazonas que apresentem variantes específicas associadas à doença. Há a necessidade de buscar novos marcadores que possam ajudar a esclarecer o papel da genética no entendimento dos mecanismos associados à patogênese da hanseníase.

Palavras-chaves: Hanseníase; caso-controle; SNP; *LRRK2*; *IRGM*.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease that mainly affects the skin, mucous membranes and peripheral nerves, and can lead to physical disabilities, often irreversible. Late diagnosis and the consequent active transmission of the disease, the incidence has maintained a high and stable level in Brazil, more than 27 000 cases / year in the last decade. Genetic association studies have been very important in the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with susceptibility to disease. Knowledge of these genetic variations and the host's immune response profile can help support a better understanding of the pathogenesis of leprosy and, perhaps, the development of new tools for early diagnosis, immediate treatment or chemoprophylaxis. In this context, the present study aimed to verify the association, in a population case-control design, the presence of variants in the *LRRK2* (rs7962370, rs34637584 and rs7133914) and *IRGM* (rs13361189 and rs11167514) genes that could represent risk or protection to leprosy in the population of Manaus. The genotyping of the SNPs selected in each of the genes was performed using qPCR, for allelic discrimination, in 412 cases and 967 controls, registered at the Alfredo da Matta Foundation. In this study, we did not find significant associations of these variants to leprosy in the Amazonian population. Curiously, some of these SNPs have been previously associated in Brazilian or foreigners populations reinforcing the need to study the Amazonian population that present specific variants associated with leprosy. There is a need to find new markers that can help clarify the role of genetics in understanding the mechanisms associated with the pathogenesis of leprosy.

Keywords: Leprosy; case-control; SNP; *LRRK2*; *IRGM*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase: aspectos gerais.....	3
1.2 Imunologia	5
1.3 Genética.....	9
1.3.1 Gene <i>LRRK2</i> :.....	13
1.3.2 Gene <i>IRGM</i> :	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Aspectos éticos	22
3.2 Desenho e local do estudo.....	22
3.3 População de estudo e delineamento caso-controle.....	22
3.4 Seleção de SNPs	23
3.5 Genotipagem dos SNPs.....	23
3.6 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO:	37
6 CONCLUSÃO:.....	45
7 EQUIPE DO PROJETO.....	46
8 ORÇAMENTO	47
9 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença dermatoneurológica que persiste como um problema de saúde pública em vários países. Mesmo com a adoção de medidas que permitiram uma diminuição significativa na sua prevalência, como a introdução da terapia multidroga (MDT) e a implantação de uma estratégia global para redução de casos, a incidência da hanseníase se manteve praticamente constante na última década (1). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que a transmissão contínua do *Mycobacterium leprae*, seu principal agente etiológico, e o *Mycobacterium lepromatosis* tem sido responsável por mais de 200.000 casos novos, anualmente (2).

O Brasil é um dos países que ainda não alcançaram a meta proposta pela OMS (1 < 10.000 habitantes) para eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, sendo responsável por mais de 80% dos casos reportados nas Américas, com mais de 27 mil casos novos registrados no ano de 2019 (2). Alguns fatores para esta manutenção podem ser destacados, como: treinamento insuficiente para os profissionais de saúde envolvidos, dificuldade no diagnóstico laboratorial, limitação de profissionais experientes com a doença, redução das campanhas regionais de busca ativa e as dificuldades no diagnóstico clínico precoce (3).

A detecção dos novos casos é difícil, principalmente nas fases iniciais da doença, e mesmo a experiência e habilidade profissional, algumas vezes não são suficientes para um diagnóstico preciso (4). Apresentações clínicas como as formas neurais pura, indeterminada e tuberculoide, com lesão única (5), e pacientes multibacilares que não apresentam os sinais cardinais (6), são consideradas como de difícil resolução clínica. Dermatoses semelhantes a hanseníase, como o lúpus eritematoso, leishmaniose cutânea, tuberculose cutânea, pitíriase, farmacodermia, entre outras, também podem ser confundidoras (7).

As medidas de intervenção precoce são importantes para o controle e a redução dos casos de hanseníase, e dentre estas medidas, destaca-se a vigilância de contatos domiciliares, uma estratégia eficiente para a detecção de novos casos e que possibilita uma intervenção definitiva na cadeia de transmissão (8,9).

Os testes laboratoriais se mostram como ferramentas importantes no auxílio ao diagnóstico clínico, e monitoramento de casos e contatos. Mas a ausência de um teste padrão-ouro e as limitações de outros métodos complementares, ainda são obstáculos para a obtenção de um diagnóstico preciso (10). A baciloscopia e a histopatologia, apesar de específicas e de baixo custo, possuem baixa sensibilidade, especialmente nos casos PB (11).

Por outro lado, os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), tanto convencional quanto em tempo real (qPCR), demonstram uma grande sensibilidade, sendo indicados para os casos onde a baciloscopia e o exame histopatológico são inconclusivos, ou no auxílio do diagnóstico diferencial (12). Enquanto que as técnicas aplicadas aos estudos genômicos procuram uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia de várias doenças complexas, como a hanseníase, por exemplo (13).

Os recentes estudos revelaram que a genética do hospedeiro é um fator crucial para a suscetibilidade e definição da forma clínica da doença, visto que a infecção pelo *M. leprae* é necessária, mas não é suficiente para que o indivíduo venha desenvolvê-la (14). Diversas regiões cromossômicas e variantes alélicas foram identificadas a partir dos estudos de ligação e associação genômica por análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes candidatos, muitos deles envolvidos na regulação da resposta imune ao bacilo (15), como *TLR*, *IFN- γ* , *TNF*, *IL10*, *NOD2* e *MRC1* (16).

Estudos genéticos de caso-controle identificaram associações à hanseníase e à tuberculose em polimorfismos nos genes *LRRK2* e *IRGM* em populações do Vietnã (17), China (18–20) e Irã (21). Porém, estes estudos devem ser validados em diferentes populações.

Conhecer o padrão genético de susceptibilidade à hanseníase, numa determinada população, pode indicar os prováveis indivíduos com maior chance de adoecimento (entre os contatos, por exemplo) (22). Deste modo, medidas profiláticas nessas pessoas, poderão ser adotadas, tais como a quimioprofilaxia (rifampicina, dose única) ou a imunoprofilaxia (BCG) (23).

Nosso estudo pretende investigar se polimorfismos de base única nos genes *LRRK2* e *IRGM* estão associados com a hanseníase, em uma amostra

de voluntários de Manaus (AM), que apresenta uma importante contribuição de ancestralidade nativo-americana.

1.1 Hanseníase: aspectos gerais

Trata-se de uma doença infectocontagiosa de evolução crônica que acomete, principalmente, a pele, as mucosas e os nervos periféricos, e com menor frequência os olhos, gânglios linfáticos e órgãos internos (24). Outrora conhecida como lepra, é uma das patologias mais antigas que se tem registros, datados de aproximadamente 6.500 anos atrás, em regiões como o Oriente Médio, China e Índia (25).

Seu principal agente causador é o *Mycobacterium leprae*, identificado em 1873, pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen (25). Trata-se de um bacilo álcool-ácido resistente, não cultivável, de crescimento lento e intracelular obrigatório, possuindo afinidade por macrófagos da pele e células de Schwann em nervos periféricos (26).

Recentemente, uma nova espécie foi identificada por Han e colaboradores (2008): o *Mycobacterium lepromatosis*, associado ao desenvolvimento de uma forma de hanseníase virchowiana difusa, em dois casos de imigrantes mexicanos, nos Estados Unidos (27). O sequenciamento de mais de 20 genes, realizado em 2009, evidenciou um compartilhamento genômico de 90,9% entre o *M. lepromatosis* e o *M. leprae* (28). E em 2015, Singh e colaboradores realizaram o sequenciamento do genoma completo desta espécie (29).

A transmissão ocorre, principalmente, pelas vias aéreas, através de exposição de longa duração, a partir de gotículas de secreção nasal e oral de pessoas infectadas com a micobactéria para indivíduos suscetíveis (30).

A doença acomete mais de 200.000 pessoas por ano no mundo, com o Brasil ocupando a 2ª posição em número de novos casos, atrás apenas da Índia (2). Em 2019, foram registrados 27.863 casos novos no país (2), sendo que o estado do Amazonas registrou 406 casos (31). Desse total de casos registrados no estado em 2019, 129 pacientes eram residentes de Manaus (31).

As manifestações clínicas se caracterizam, basicamente, na presença de lesões cutâneas acompanhadas de alteração de sensibilidade térmica, tátil ou dolorosa e em espessamento de nervo periférico (24). A ausência de um diagnóstico correto e um tratamento imediato, pode contribuir para incapacidades físicas irreversíveis (24).

Nos exames laboratoriais de rotina, a baciloscopia é uma técnica utilizada no auxílio ao diagnóstico clínico e para o acompanhamento do tratamento (26). Nessa análise microscópica, utiliza-se a coloração de Ziehl-Neelsen do esfregaço de linfa ou da lesão, para corar os bacilos em vermelho pela fucsina (26). E estes apresentam-se tanto em isolados quanto em aglomerados ou agrupados em globias (26). Geralmente, a positividade no teste é um critério de diagnóstico para pacientes MB, independentemente da quantidade de lesões (32). Mas apesar do seu baixo custo, sua sensibilidade é baixa se comparada a outros métodos laboratoriais de detecção, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (33).

As análises histopatológicas também são importantes no auxílio ao diagnóstico clínico, ajudando na classificação das formas clínicas, uma vez que as características histopatológicas na hanseníase variam de acordo com o tipo de resposta imunológica (24). Na histologia, é possível observar variações na organização de infiltrados, com presença de granulomas bem organizados em biópsias de lesões de pacientes da forma tuberculoide e agregados desorganizados de macrófagos espumosos em biópsias de pacientes virchowianos (34).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) se apresenta como mais sensível e específica que os demais métodos, amplificando regiões específicas do genoma de interesse e em diferentes amostras clínicas (35). Na hanseníase, podem auxiliar nos casos de difícil diagnóstico, como as formas neurais pura, indeterminados e em alguns casos paucibacilares (36). Apesar dos custos elevados de reagentes, equipamentos e de profissionais capacitados, a implantação em centros de referência é uma estratégia necessária para a elucidação dos casos difíceis (12).

Diversas classificações foram sugeridas para a doença ao decorrer dos anos. A classificação de Madrid proposta em 1953 se baseava nas características clínicas e nos aspectos bacteriológicos, imunológicos e

histopatológicos, subdividindo a hanseníase em dois grupos de formas polares estáveis (tuberculoide e virchowiana) e uma intermediária (dimorfa) (37). Mas em 1966, Ridley e Jopling criaram uma nova classificação, adotando subgrupos nas formas intermediárias, compreendendo as formas tuberculoide (TT), dimorfa-tuberculoide (DT), dimorfa-dimorfa (DD), dimorfa-virchowiana (DV) e virchowiana (VV) (38). Assim como a classificação de Madrid, também obedece a critérios clínicos e bacteriológicos, mas enfatiza as apresentações histopatológicas e os padrões de resposta imune (38).

Mas devido à precariedade dos laboratórios de suporte, a OMS propôs, na década de 1980, uma nova classificação para fins operacionais, visando rapidez no tratamento e classificando os doentes em paucibacilares (PB) – casos com até cinco lesões de pele e baciloscopia de raspado intradérmico negativa; e multibacilar (MB) – casos com mais de cinco lesões cutâneas e baciloscopia de raspado intradérmico positiva (39).

O tratamento da hanseníase segue os esquemas padronizados pela OMS conforme a classificação operacional, adotando a terapia multidroga (ou poliquimioterapia), uma combinação de três medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina para as formas multibacilares (MB) por 12 meses (40). Para as formas paucibacilares, o tratamento dura 6 meses, com a combinação de rifampicina e dapsona (40). Outras drogas, como a ofloxacina e a minociclina, podem ser empregadas em caso de resistência ou intolerância a um dos medicamentos utilizados no esquema padrão (40).

1.2 Imunologia

Os padrões imunológicos na resposta ao *M. leprae* são diferenciados, resultando em diferentes perfis clínicos, com dois polos bem definidos (41). No polo tuberculoide predomina um padrão de resposta Th1 CD4+ e Th17, com maior expressão de citocinas indutoras de processo inflamatório e formação de granuloma para a contenção do bacilo, enquanto que no polo virchowiano a atuação de resposta Th2 CD4+ e T Reg e resposta humoral é dominante (38).

Durante a manifestação da forma clínica tuberculoide, o reconhecimento de lipoproteínas tri-aciladas do *M. leprae* pelos TLR 1/2 possibilita o início de

um complexo processo intracelular de sinalizações em cascata que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) (42). Este fator se liga a determinadas regiões promotoras do genoma e induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23, necessárias para a ativação das células Th1 CD4⁺ (42) (Figura 1).

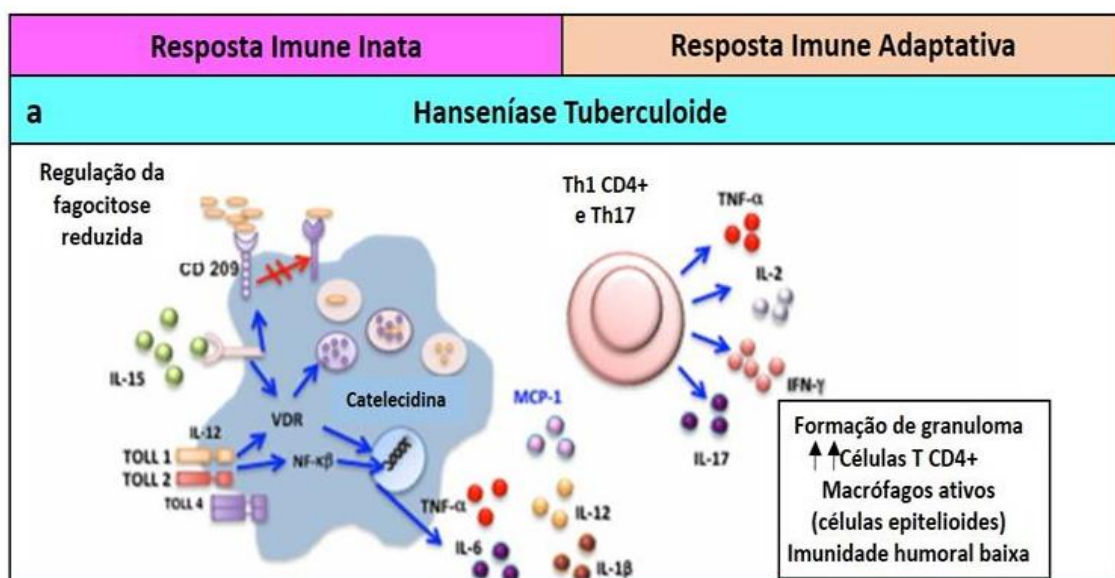


Figura 1 - Resposta imune no polo tuberculoide. A estimulação da via da vitamina D e dos receptores Toll 1 e Toll 2 nos macrófagos culmina na ativação de fatores de transcrição que expressam citocinas ativadoras das células Th1 CD4⁺ e Th17. Estas células, por sua vez, secretam citocinas e auxiliam a organização de granulomas, restringindo o crescimento e proliferação da micobactéria.

Fonte: Adaptado de Fonseca et al., 2018 (42).

Em resposta à esse estímulo, as células Th1 CD4⁺ liberam outras citocinas, como IFN- γ , IL-2 e IL-15, necessárias para a formação do granuloma. A IL-15 estimula a via microbicida dependente da vitamina D, e isso contribui para a regulação da fagocitose pela diminuição da expressão dos receptores CD209, facilitando a digestão do bacilo pelos lisossomos por ação das catelecidinas e beta-defensinas (42). Simultâneo a isso, as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22, expressas pelas células Th17 estimulam o processo inflamatório, o recrutamento de neutrófilos, a ativação de macrófagos e o aprimoramento de células Th1 CD4⁺ (43) (Figura 1).

Já nos pacientes virchowianos, os macrófagos sofrem a inibição da via antimicrobiana dependente de vitamina D e a ativação do LILRA2 (*leukocyte*

immunoglobulin-like receptor subfamily A member 2), que apesar do mecanismo de ativação ainda não ser conhecido, participa indiretamente da inibição de citocinas, como a IL-12, induzidas pelos TLR 1/2 (42). A IL-4 também possui um papel fundamental nesse processo, uma vez que é responsável por regular negativamente estes receptores (42).

A IL-10, por sua vez, ativa o macrófago induzindo uma maior expressão de diferentes receptores, como CD209, CD163 e receptores LDL, responsáveis por facilitar a entrada de componentes lipídicos, glicoproteínas, complexo hemoglobina-haptoglobina e de micobactérias para o meio intracelular (44) (Figura 2).

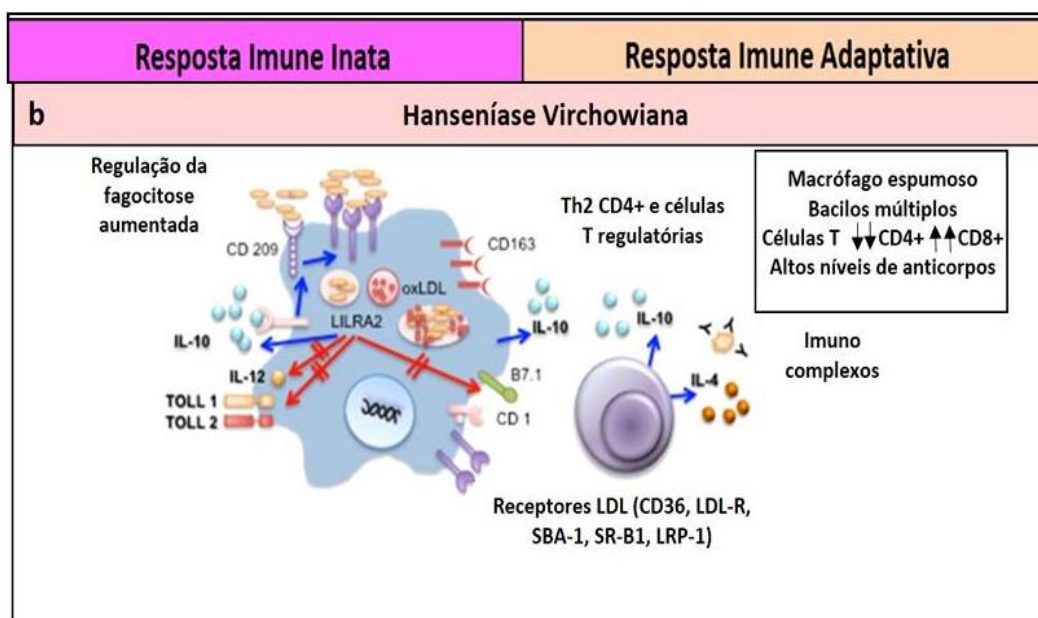


Figura 2 - Resposta imune no polo virchowiano. Um perfil de fenótipo M2 predomina em macrófagos de pacientes do polo virchowiano, resultando em atividades que culminam com a sobrevivência e proliferação do *M. leprae*. Entre eles, a inibição da via de vitamina D e de receptores *Toll* 1 e 2, por um mecanismo mediado pelo LILRA2, a regulação de receptores de fagocitose aumentada de bactérias (CD209) e de LDL e a entrada de haptoglobina-hemoglobina (CD163). A liberação de citocinas pelo macrófago, principalmente a citocina IL-10, colabora para a ativação das células Th2 CD4+.

Fonte: Adaptado de Fonseca et al., 2018 (42).

A expressão aumentada dos receptores CD209 favorece a fagocitose do bacilo e o receptor CD163 facilita a entrada do complexo hemoglobina-haptoglobina, fonte de ferro essencial para a sobrevivência da micobactéria (44). Complementar a isso, os receptores LDL facilitam um acúmulo de lipídios e

proporcionam um aspecto vacuolizado ao macrófago, fornecendo uma fonte de carbono para o bacilo (44). Estes processos direcionam a um perfil de resposta imune mediado por células Th2 CD4+ e T reguladoras, síntese de anticorpos pelos linfócitos B, ausência de granuloma e maior atuação de células T CD8+ (Figura 2).

Além destes mecanismos, existem outros componentes do sistema imunológico que também podem desempenhar papéis cruciais na hanseníase. Apesar do tropismo do *M. leprae* por macrófagos, a atuação das células dendríticas também possuem uma certa relevância na resposta imunológica ao bacilo, mesmo sendo pouco explorada (45). Assim como os macrófagos, estas células também podem exercer a função de fagocitose e participação na formação de granuloma (45).

Em pacientes do polo virchowiano, a entrada do bacilo nestas células é mediada por receptores CD209, o que direciona à fagocitose da micobactéria e expressão do antígeno PGL-1 (*phenolic glycolipid 1*) derivado do *M. leprae* às células Th2 CD4+, aumentando a produção de IL-10 (45). Já em pacientes do polo tuberculoide, já foi descrito que a atuação das células dendríticas na formação do granuloma está ligada à expressão de IDO-1 (*indoleamine 2,3-dioxygenase 1*) (46). Porém, a participação das células dendríticas e os mecanismos com os quais elas podem contribuir para este processo ainda precisam ser melhor esclarecidos (45).

O sistema complemento é outro componente que merece destaque, uma vez que pode desempenhar funções importantes na resposta inflamatória e na opsonização de patógenos (45). Na infecção pelo *M. leprae*, a ativação do sistema complemento se dá após o reconhecimento do antígeno lipoarabinomanano (LAM) por receptores C1 e C3, levando à opsonização do bacilo e, posteriormente, à fagocitose (47). Além disso, já foi demonstrado que o antígeno PGL-1, expresso pela micobactéria, pode se ligar ao C3 e anticorpos IgM, possibilitando a ativação das vias clássica e alternativa (48).

Outros elementos que também possuem grande relevância na resposta imunológica ao *M. leprae* são as moléculas apresentadoras de antígenos. A apresentação de epítomos do bacilo às células T CD4+ pode ocorrer através de dois mecanismos diferentes: 1 - a partir da via do sistema HLA (*human leukocyte antigen*) (49); 2 – por meio da via CD1 (50).

Sabe-se que existem diversas moléculas capazes de se ligar a proteínas do HLA classe I e/ou classe II e que podem ser apresentadas às células T CD4+ por macrófagos e células dendríticas. Vários destes componentes podem contribuir para a indução da síntese de IFN- γ e ativação da resposta imune celular, principalmente no polo tuberculoide (51). Por outro lado, a via CD1 consiste na apresentação de antígenos glicolipídicos para a ativação das células T CD4+, como o ácido micólico e o lipoarabinomanano (50,52).

Apesar dos conhecimentos atuais e dos avanços na compreensão da fisiopatologia da hanseníase, ainda são necessários mais estudos para um melhor entendimento sobre os mecanismos imunológicos na resposta ao *M. leprae*, com a finalidade de responder questões ainda não resolvidas, bem como possibilitar novas medidas de diagnóstico e intervenção.

1.3 Genética

As primeiras buscas por evidências da influência genética na hanseníase iniciaram-se por meio de estudos genéticos epidemiológicos em gêmeos, avaliando a taxa de concordância de apresentações clínicas entre monozigóticos (80%) e dizigóticos (20%) (53). Mais adiante, foram empregadas as técnicas de análise de segregação complexa (ASC), que possibilitaram a identificação de padrões hereditários e a presença de um fator genético principal (54). No estudo realizado por Lázaro e colaboradores (2010), utilizando essa metodologia, concluíram que na população de Colônia de Santo Antônio do Prata, em uma área endêmica no estado do Pará, a transmissão da hanseníase segue um padrão de herança codominante e a suscetibilidade à doença é fortemente influenciada por um efeito de gene principal (55).

Atualmente, um dos maiores objetivos da genética é a identificação de genes e variantes genéticas que participem do controle da ocorrência de uma doença complexa. Na hanseníase, a hipótese mais aceita é que há uma participação de diversos conjuntos de genes no controle das diferentes fases da doença, desde a infecção pelo *M. leprae* até a determinação da forma clínica e, em alguns casos, a ocorrência de episódios reacionais (16).

Para que esses genes e SNPs (*single nucleotides polymorphisms*) sejam identificados, estudos de ligação, como GWLS (*genome-wide linkage studies*) ou de associação, GWAS (*genome-wide association study*), tem sido utilizados (56). As análises de ligação consistem no mapeamento de segmentos cromossômicos e visam observar evidências de co-segregação de regiões genômicas e a doença através das gerações de uma família (56). Já os estudos de associação possuem uma sensibilidade maior no rastreamento de genes candidatos e polimorfismos que possam estar envolvidos no controle da suscetibilidade a uma doença (56). Estes estudos se baseiam na comparação das frequências alélicas, genotípicas e de carreadores entre indivíduos afetados e sadios em uma população, com a finalidade de verificar uma associação de risco ou proteção à doença (56).

Essas variantes podem estar localizadas na região promotora, em regiões codificadoras (éxons) e não codificadoras (íntrons) (57). Quando ocorrem na região codificante do DNA, podem levar a mudança do aminoácido (*missense*) ou não, denominada de mutação silenciosa ou sinônima (57).

Os recentes estudos levaram a avanços significativos na compreensão do envolvimento do fator genético na hanseníase. Ao longo dos anos, os estudos de ligação genômica rastrearam algumas regiões cromossômicas com potencial para abrigar genes associados com a predisposição à doença e suas formas clínicas, com destaque para o *loci* 6p21, que abriga os genes do sistema HLA (*human leukocyte antigen*), que desempenham papéis importantes, como na apresentação de antígenos, na interação entre as células do sistema imune e na regulação do equilíbrio entre a resposta inata e a resposta adaptativa (58,59).

Os genes do complexo HLA foram um dos primeiros grupos de genes a serem correlacionados com a suscetibilidade à hanseníase, já que a região 6p21 é altamente polimórfica (60). E com isso, vários estudos em diferentes populações foram realizados e os resultados obtidos evidenciaram uma associação entre alguns destes genes e a suscetibilidade à doença (Tabela 1).

Tabela 1 - Genes e variantes de associação em *loci* 6p21

Gene	Alelo/SNP	Fenótipo	Referência	País
------	-----------	----------	------------	------

HLA-A (HLA-I)	A*28	VV	Aguilar-Medina et al, 2017 (61)	México
HLA-DRB1 (HLA-II)	DRB1*15	<i>per se</i>	Zhang et al, 2019 (62)	China
HLA-DR-DQ (HLA-II)	DQA1* 03:03 rs3187964	<i>per se</i>	Zhang et al, 2019 (62) Gzara et al, 2020 (63)	China Vietnã
TNF (HLA-III)	rs1800629	<i>per se</i>	Oliveira et al, 2016 (64)	Brasil
LTA (HLA-III)	rs13192469	<i>per se</i>	Ali et al, 2012 (65)	Índia

Os estudos de associação também permitiram a identificação de outros genes não ligados ao sistema HLA, sendo a maioria destes envolvidos nas vias de resposta imunológica ao bacilo (16), como os genes de receptores de membrana ou citosólicos, de moléculas transdutoras de sinais, de mediadores da atividade microbicida e de processo inflamatório (59). Vários estudos nestes genes candidatos foram replicados em diferentes populações, com o objetivo de verificar a relação destes com a suscetibilidade à hanseníase em diferentes populações (16), com alguns deles detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 - Genes e variantes associadas à hanseníase identificadas em estudos independentes

Gene	Localização	Variante	Referência	Associação	País
MRC1	10p13	rs1926736	Alter et al, 2010 (66)	Proteção <i>per se</i> e MB	Brasil
IL-10	1q31.1	rs1800871 (-819)	Alvarado-Arnez et al, 2015 (67)	Risco <i>per se</i>	Brasil
TLR1	4p14	rs4833095 (N248S)	Sales Marques et al, 2013 (68)	Risco <i>per se</i>	Brasil
LACC1	13q14.11	rs3764147 (I254V)	Wang et al, 2018 (69)	Risco <i>per se</i>	China
IFN-γ	12q15	rs2430561	Leturiondo et al, 2020 (22)	Risco <i>per se</i>	Brasil
NOD2	16q12.1	rs8057341	Leturiondo et al, 2020 (22)	Proteção <i>per se</i>	Brasil

CARD9	9q34.3	rs149308743	Liu et al, 2017 (70)	Risco <i>per se</i>	China
FLG	1q21.3	rs146466242	Liu et al, 2017 (70)	Risco <i>per se</i>	China
IL-23R	1p31.3	rs76418789	Liu et al, 2017 (70)	Risco <i>per se</i>	China
IL-27	16p12.1- p11.2	rs181206	Liu et al, 2017 (70)	Risco <i>per se</i>	China
PKRN	6q25 – q26	rs1040079	Mira et al, 2004 (71)	Risco <i>per se</i>	Brasil
		e01(-2599) (C)	Malhotra et al, 2006 (72)	Risco <i>per se</i>	Índia
		rs9365492 rs1335957	Chopra et al, 2013 (73)	Risco <i>per se</i>	Índia
SLC29A3	10q22.1	rs780668	Liu et al, 2017 (70)	Risco <i>per se</i>	China
HIF1A	14q23.2	rs142179458	Wang et al, 2018 (69)	Risco MB	China
TYK2	19p13.2	rs55882953	Liu et al, 2017 (70)	Risco <i>per se</i>	China
LRRK2	12q12	rs3761863	Fava et al, 2016 (17)	Risco RT-1	Vietnã
		rs1427267 rs1873613 rs732374 rs7298930	Wang et al, 2015 (18)	Risco <i>per se</i> e PB	China
		rs1491938	Zhang et al, 2009 (74)	Risco MB	China
		rs1873613	Marcinek et al, 2013 (75)	Risco <i>per se</i> (A) Proteção PB (G)	Índia
IRGM	5q31.3	rs13361189	Yang et al, 2014 (20)	Risco <i>per se</i>	China

Identificar variantes genéticas no hospedeiro, associados com a suscetibilidade a doença em genes envolvidos com a resposta imune inata e adaptativa, talvez seja um dos grandes desafios no entendimento da fisiopatologia da hanseníase. Como se trata de uma doença complexa, a hipótese mais aceita é a de que diferentes genes contribuem na manifestação das formas clínicas e nos processos reacionais (tipos I e II) em conjunto com fatores não genéticos (15). Este estudo visa contribuir na avaliação de

polimorfismos presentes em dois genes (*LRRK2* e *IRGM*), envolvidos principalmente na via da autofagia, com a finalidade de verificar associação com a doença.

1.3.1 Gene *LRRK2*:

O gene *LRRK2*, localizado na região cromossômica 12q12, consiste em 51 éxons e 50 íntrons, sendo responsável por codificar a quinase 2 de repetição rica em leucina (*leucine-rich repeat kinase 2*), também conhecida como dardarina (76). Ela é altamente expressa em neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e células da glia (77).

A *LRRK2* compreende diversos domínios funcionais, envolvidos em processos de interação entre proteínas: um domínio de repetição em *tatu* (ARM); um domínio de repetição anquirina (ANK); um domínio de repetição rico em leucina (LRR); e um domínio WD40 (77). Além disso, ainda possui dois domínios de atividade catalítica: um domínio de complexo Ras (Roc-COR); e um domínio quinase, que se interligam entre si (77). Por conta destes domínios funcionais de interação com outras proteínas, acredita-se que a *LRRK2* se ligue a diversos tipos de moléculas e em diferentes tipos de células (77).

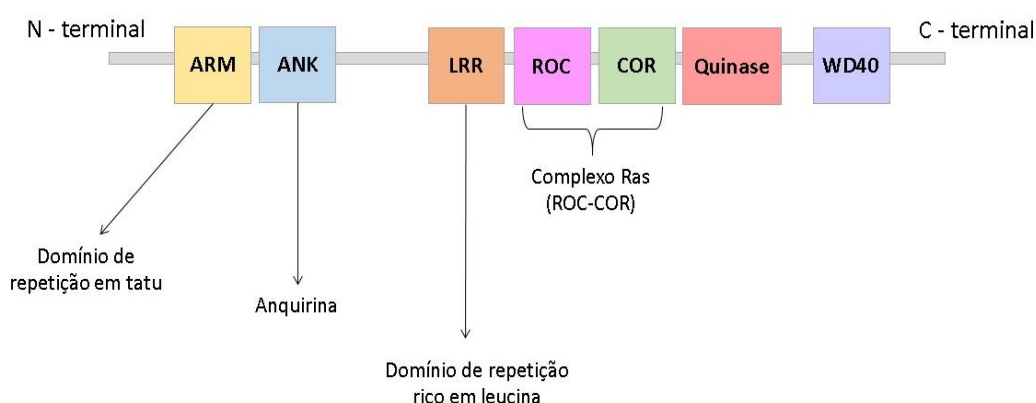


Figura 3 - Estrutura da proteína LRRK2.

Fonte: Adaptado de Berwick et al, 2019 (78).

A expressão de LRRK2 nas células do sistema imune é regulada por estímulo destas células quando expostas à interação com antígenos (77). E por conta disso, tem sido implicada em diversas vias celulares, incluindo as funções mitocondriais, indução de fatores de transcrição e a liberação de neurotransmissores nas células gliais (77). No contexto das vias imunológicas, suas funções têm sido imputadas a dois processos cruciais: a inflamação e a autofagia (77).

As funções de LRRK2 nas vias inflamatórias são variadas, e isso significa que ela está envolvida na regulação de diversas vias de sinalização através de diferentes mecanismos de interação proteica (77). Entre as vias de sinalização na qual essa proteína está envolvida, destacam-se as vias NFAT (*nuclear factor of activated T-cell*) e NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), relevantes para a resposta imunológica a patógenos intracelulares (77,79).

A via do fator de transcrição NFAT é uma das mais importantes na função sinalizadora de LRRK2, uma vez que esta proteína age como um regulador essencial de inibição ou estímulo da atividade do fator de transcrição NFAT-1 (77). A regulação negativa desta via ocorre após a interação da LRRK2 com o complexo NRON (*noncoding RNA repressor of NFAT complex*), processo este que inibe a translocação do fator de transcrição NFAT-1 para o núcleo celular (80). Já na regulação positiva, a LRRK2 fosforila a proteína RCAN-1 (*regulator of calcineurin 1 protein*), que é o principal ativador da atividade de transcrição NFAT, levando um aumento da síntese de NF- κ B e da citocina IL-8, que é um potente regulador da resposta inata inicial a patógenos intracelulares (81) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

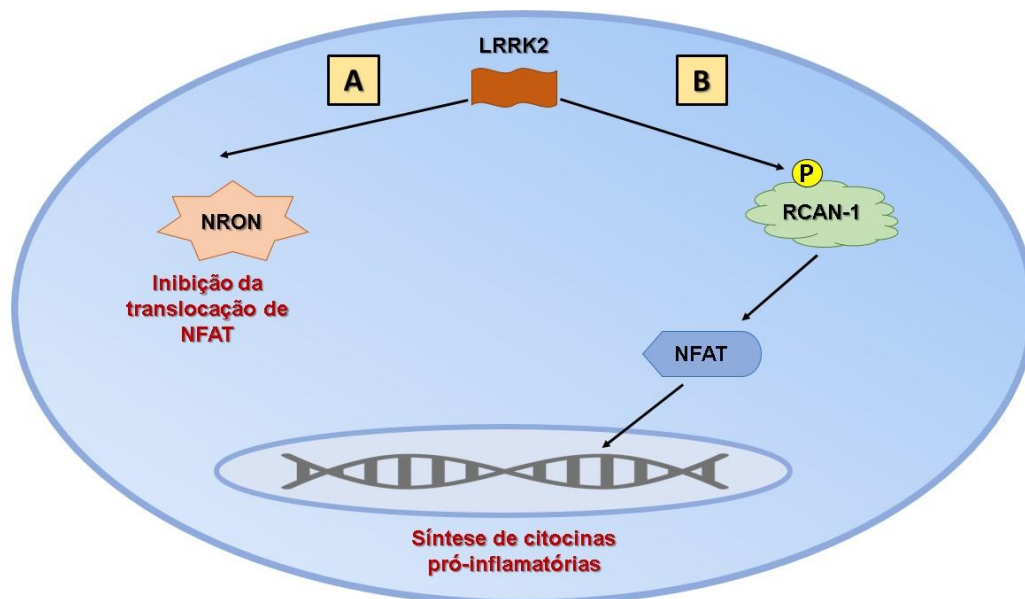


Figura 4 - LRRK2 na via de sinalização intracelular NFAT. **A** – A interação entre LRRK2 e o complexo NRON inibe o deslocamento do fator de transcrição NFAT para o núcleo; **B** – Regulação positiva da via NFAT através da fosforilação de RCAN-1, que ativa o fator de transcrição para a síntese de citocinas.

Fonte: Adaptado de Wallings e Tansey, 2019 (77).

Na via de sinalização de NF- κ B, a LRRK2 pode atuar de duas formas: através da via dos receptores *Toll-like* (TLR) ou por meio da via do receptor de dectina-1 (79). Pela via dos TLR, o reconhecimento de antígenos (como lipopolissacarídeos) induz a atividade das proteínas MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), IKK α/β (*inhibitor of NF κ B kinase*) e TBK-1 (TANK binding kinase-1), e essas moléculas promovem a fosforilação de LRRK2 (79). Esse processo induz a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, possibilitando a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF (82). Já pela via dectina-1, a LRRK2 atua na ativação do complexo TANK-1 e TRAF-6, e este complexo induz a atividade de NF- κ B para a secreção de citocinas pró-inflamatórias (83).

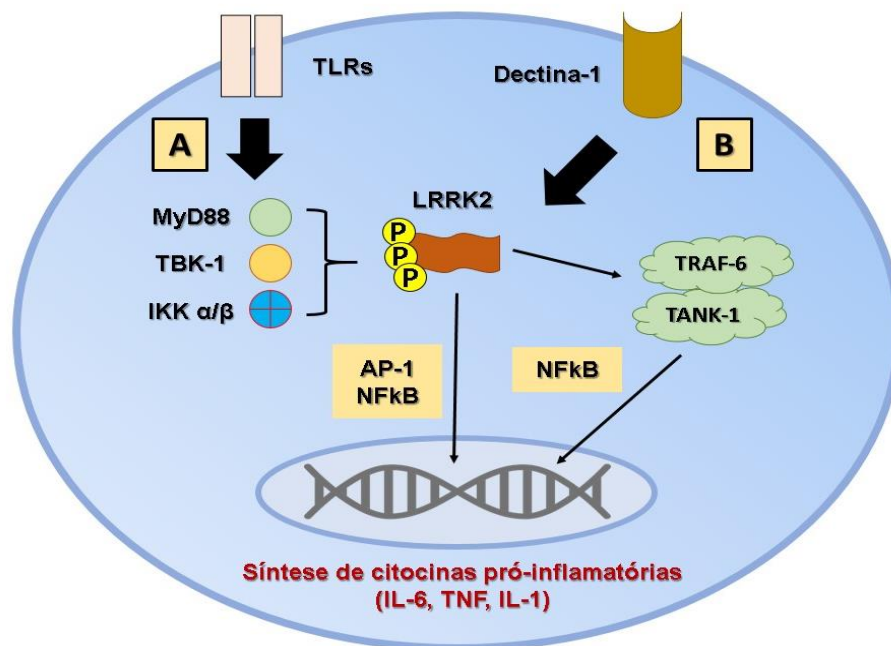


Figura 5 - LRRK2 na via de sinalização de NFκB. **A** – Pela via dos TLR, a fosforilação de LRRK2 por um conjunto de proteínas estimuladas através destes receptores possibilita a ativação de AP-1 e NFκB para a síntese de citocinas pró-inflamatórias; **B** – Na via da dectina-1, a LRRK2 ativa o complexo proteico TRAF-6 / TANK-1, responsáveis pela indução de NFκB para a atividade transcricional.

Fonte: Adaptado de Wallings e Tansey, 2019 (77).

A LRRK2 também possui papéis importantes na regulação da autofagia, um processo indispensável para a eliminação de patógenos intracelulares (79). Um estudo realizado em 2014, demonstrou que o estímulo de receptores TLR-4 por lipopolissacarídeos, em monócitos e macrófagos, induziu a translocação de LRRK2 para a membrana externa de autofagossomos, e que a sua diminuição contribuía com falhas na autofagia (84).

Além disso, também foi relatado que, sob condições de sobrecarga de atividade lisossômica, essa proteína, juntamente com Rab7L1, é recrutada para os lisossomos, onde atua na estabilização de moléculas GTPases, como Rab8 e Rab10, por meio de fosforilação, permitindo a supressão do estresse lisossômico e a regulação positiva de secreção lisossomal (85) (Figura 6).

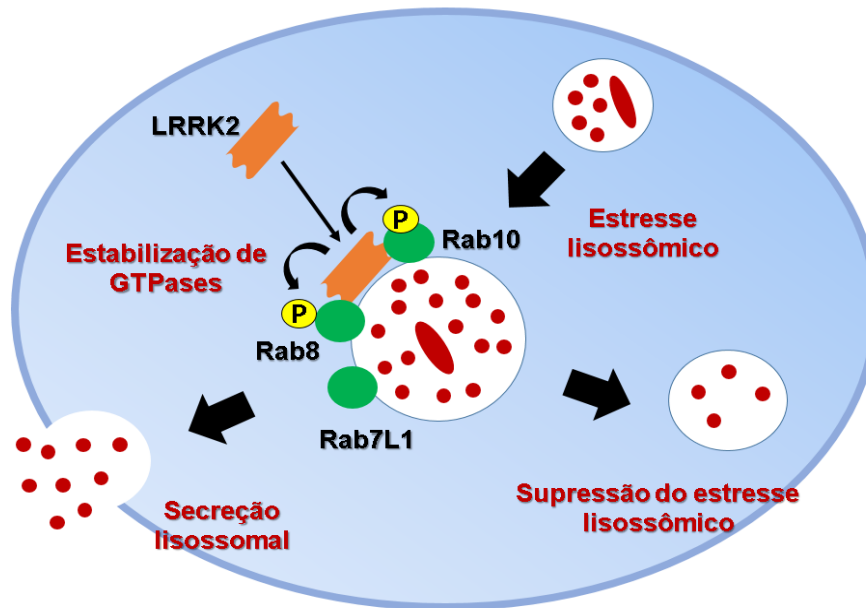


Figura 6 - Função de LRRK2 na manutenção da homeostase lisossomal. Em situações de estresse celular por sobrecarga lisossomal, ocorre o recrutamento de LRRK2 e Rab7L1 para a membrana lisossômica. A LRRK2 fosforila os substratos Rab8 e Rab10, promovendo a estabilização das duas GTPases. Estas, por sua vez, desencadeiam a secreção lisossomal e induzem a supressão do estresse.

Fonte: Adaptado de Wallings e Tansey, 2019 (77).

Levando em conta os seus papéis fisiológicos nestas duas vias, diversos estudos genéticos de associação foram realizados para o *LRRK2*, e isso possibilitou a identificação de diversos polimorfismos neste gene implicados a doenças humanas, como a Doença de Crohn, a Doença de Parkinson e as micobacterioses (78).

Em 2012, um estudo dirigido no Reino Unido identificou uma associação dos SNPs rs11175593 e rs7962370 ao risco à Doença de Crohn (86). Outros polimorfismos, como rs7133914, rs7308720, rs11564148, rs33949390 e rs34778348 estiveram significativamente associados ao risco de desenvolvimento da doença em chineses (87). A variante rara rs34637584 também apresentou associação com esta doença em judeus e árabes (88,89).

Na hanseníase, dezoito polimorfismos do *LRRK2* estiveram associados ao endofenótipo de reação tipo 1 (RT1) em um estudo de caso-controle na população vietnamita (17). Porém, não houve associação com a doença e nem

com as formas operacionais quando dois SNPs (rs7298930 e rs3761863) desse gene foram analisados na população de Manaus, no Brasil, em um estudo caso-controle (22). Outras variantes, como rs1427267, rs1873613, rs732374, rs7298930 e rs1491938 apresentaram associação de risco à hanseníase em uma população do sudoeste da China (18,74), e rs1873613 se mostrou associada com a suscetibilidade à doença na Índia (75).

1.3.2 Gene *IRGM*:

O gene *IRGM* está localizado no *loci* 5q33.1 e abrange um total de 5 éxons e 4 íntrons. Codifica a proteína GTPase M relacionada a imunidade (*immunity-related GTPase M protein*), da família de proteínas GTPases chamadas de IRG, que também compreende outros quatro membros, a saber: IRGA, IRGB, IRGC e IRGD (90). Essas proteínas desempenham funções essenciais na resistência contra infecções por patógenos intracelulares, como protozoários e micobactérias (90).

Na resposta imune inata, a *IRGM* está implicada, principalmente, na regulação da autofagia e modulação da resposta inflamatória (91). A expressão dessa proteína é induzida a partir do reconhecimento de antígenos microbianos, levando à participação em duas vias essenciais de formação do complexo autofágico. Uma dessas vias é a estimulação da enzima AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*), responsável pela ativação de ULK1 (*Unc-51 like autophagy activating kinase 1*) e Beclin-1 (91) (Figura 7).

Simultaneamente, a *IRGM* se associa com o NOD2 e sofre ubiquitinação, promovendo a montagem de fatores de iniciação de autofagia, com a participação de moléculas como ATG16L1, ULK1 e complexo Beclin-1 (91). Esses eventos possibilitam a autofagia e a inibição de resposta inflamatória excessiva (91) (Figura 7).

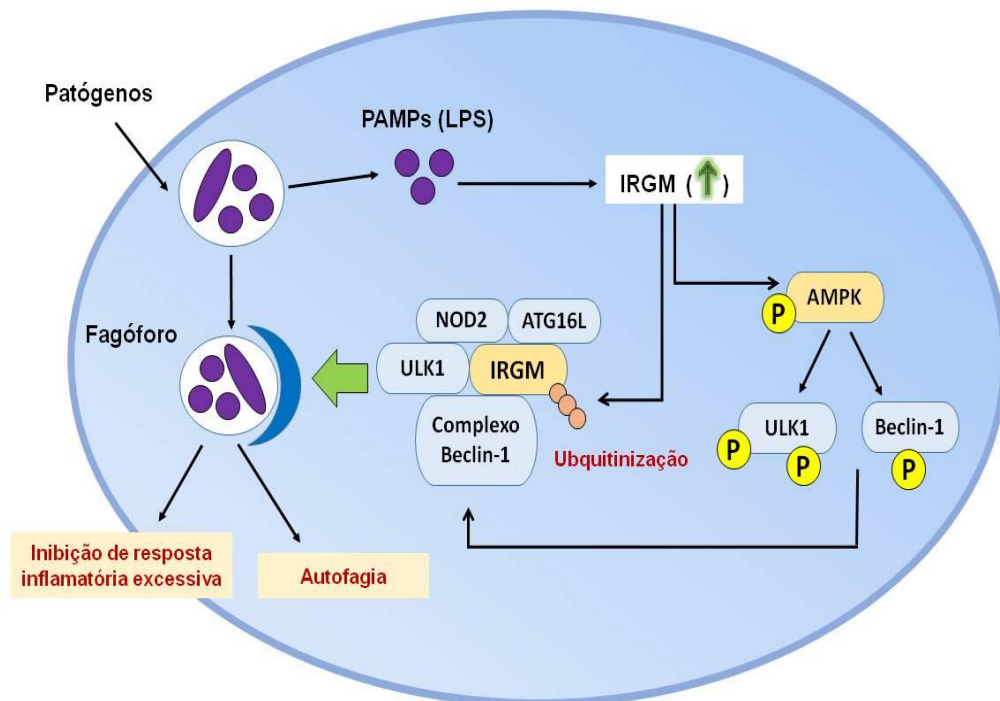


Figura 7 - IRGM na resposta inata. A expressão de IRGM aumenta sob exposição celular a patógenos intracelulares. Esse aumento desencadeia o aumento da função de AMPK e a ativação de ULK1 e Beclin-1. IRGM sofre ubiquitinação após associar-se com NOD2 e esse processo induz a formação de fatores de iniciação, que contribuem diretamente com a regulação positiva da autofagia e com a supressão de resposta inflamatória excessiva.

Fonte: Adaptado de Chauhan et al, 2015.

A IRGM também pode atuar como um mediador de processo inflamatório. O estudo dirigido por Kim e colaboradores (92), demonstrou que a IRGM, induzida por interferons desempenha um papel de regulação na via de sinalização de receptores TLR, podendo assim ajustar a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-4 e IL-6.

Levando em conta as suas funções na resposta imune inata, vários estudos de associação genética foram realizados com polimorfismos no gene *IRGM*, sendo que alguns deles mostraram-se correlacionados a doenças como neoplasias, Doença de Crohn e micobacterioses em diversas populações (19–21,93–98).

Na Doença de Crohn, os polimorfismos rs13361189 e rs4958847 apresentaram associação significativa ao risco de suscetibilidade à doença em ingleses (99). Estas mesmas variantes também foram analisadas em um

estudo caso-controle na Romênia, evidenciando que o SNP rs4958847 confere um efeito protetor ao câncer gástrico (93).

Nas micobacterioses, os estudos de associação com polimorfismos em *IRGM* também foram aplicados na tuberculose e na hanseníase. Na tuberculose, as variantes rs10065172, rs10051924 e rs13361189 apresentaram um efeito protetor contra a progressão latente da doença na população da China (19), e na população iraniana, com os SNPs rs4958843 e rs4958846 (21). Já na hanseníase, um estudo de caso-controle na população chinesa, realizado por Yang e colaboradores (2014), identificou uma associação de risco com a variante rs13361189 (20).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores genéticos em *LRRK2* e *IRGM* com a suscetibilidade a hanseníase.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar frequência de alelos, genótipos e carreadores nos SNPs estudados;
- b) Verificar associação de SNPs nos genes *LRRK2* e *IRGM* com a hanseníase *per se* entre casos e controles;
- c) Verificar associação de SNPs nos genes *LRRK2* e *IRGM* com as classificações operacionais PB x MB, MB x grupo controle e PB x grupo controle;
- d) Avaliar associação dos haplótipos dos SNPs nos genes *LRRK2* e *IRGM* com a suscetibilidade à hanseníase.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este trabalho fez parte de um projeto mais abrangente, intitulado **Marcadores moleculares, genéticos e sorológicos na hanseníase: suporte ao diagnóstico clínico de pacientes e vigilância dos contatos**, coordenado pelo Dr. André Luiz Leturiondo e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação “Alfredo da Matta” sob o nº 555.620-13/03/2013. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 Desenho e local do estudo

Trata-se de um estudo de caso-controle observacional, executado no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta, em Manaus (AM).

3.3 População de estudo e delineamento caso-controle

Foram utilizadas amostras de sangue total de 1374 voluntários (407 casos de hanseníase e 967 controles) para a realização do estudo genético.

Foram classificados como casos, indivíduos diagnosticados com hanseníase conforme critérios clínicos e laboratoriais (baciloscopia e análise histopatológica) e tratados como paucibacilares ($n = 130$) ou multibacilares ($n = 277$), seguindo o manual operacional do Ministério da Saúde. Nenhum dos pacientes apresentava comorbidades.

Além disso, foram classificados como controles, indivíduos saudáveis usuários do SUS que procuraram a FUAM com o objetivo de conseguir um atestado dermatoneurológico, um dos pré-requisitos documentais exigidos pela indústria, comércio ou setor de entretenimento afim de conseguirem uma colocação no mercado de trabalho. Entraram como voluntários somente os indivíduos que não apresentavam lesões sugestivas de hanseníase e sem

histórico da doença na família.

3.4 Seleção de SNPs

Os SNPs estudados neste trabalho foram selecionados utilizando-se diferentes ferramentas de bioinformática, no sentido de buscar polimorfismos localizados nas regiões dos genes *LRRK2* e *IRGM*, com um maior potencial de terem algum papel funcional nas proteínas codificadas pelos mesmos. Concomitantemente, dados da literatura também foram levados em consideração, tais como estudos recentes que mostraram associação à hanseníase na população chinesa (20) e para outras doenças, como o parkinsonismo e a Doença de Crohn (86,88,89,94).

A seleção de polimorfismos foi realizada junto ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) / Fiocruz - Rio de Janeiro). As informações dos SNPs candidatos selecionados para os genes *LRRK2* e *IRGM* estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Variantes selecionadas nos genes *LRRK2* e *IRGM*.

SNP	Gene	Alelos	Localização
rs7962370	<i>LRRK2</i>	G / A	Íntron (3'UTR)
rs34637584	<i>LRRK2</i>	G / A	Éxon 41 (<i>missense</i>)
rs7133914	<i>LRRK2</i>	G / A	Éxon 30 (<i>missense</i>)
rs13361189	<i>IRGM</i>	T / C	Íntron (5'UTR)
rs11167514	<i>IRGM</i>	G / C	Íntron

3.5 Genotipagem dos SNPs

O DNA das amostras de sangue provenientes dos indivíduos participantes deste estudo foi obtido através do método de extração por coluna de afinidade, utilizando-se o *kit Dneasy Blood & Tissue*, de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN). Em seguida, foram realizadas as genotipagens das amostras, a partir da técnica de PCR em Tempo Real

(qPCR) por discriminação alélica.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando-se o equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)*, seguindo as condições de ciclagem padrão em três etapas: 1 – **desnaturação** a 95°C, para separação da dupla fita de DNA através do rompimento das ligações de hidrogênio; 2 – **anelamento** a 60°C, fase na qual ocorre a ligação dos *primers* e da sonda em suas regiões-alvo; 3 – **extensão** a 72°C, na qual ocorre a síntese de uma nova cadeia de DNA.

A discriminação alélica foi realizada com o emprego do sistema Taqman (*Applied Biosystems*), onde são utilizados os *primers* iniciadores e sondas específicas para cada um dos polimorfismos analisados. Este sistema se baseia na detecção da intensidade de fluorescência emitida por sondas marcadas com fluoróforos específicos para cada alelo. Cada ensaio continha um par de *primers* e um par de sondas *TaqMan MGB (Life Technologies)* marcadas com fluorescência VIC (verde) ou FAM (azul), direcionados para o polimorfismo que se queria identificar, ou seja, cada alelo marcado com uma fluorescência específica.

Sendo assim, os ensaios foram preparados em placas de 96 poços, com um volume final de 5µl. Em cada reação, foram adicionados: 2,5 µl de Taqman Genotyping Master Mix (*Applied Biosystems*); 1,375 µl de água; 0,125µl do reagente ensaio Taqman, contendo os primers e as sondas específicos para cada SNP e; 1µl de DNA genômico. Os reagentes contendo os pares de iniciadores e sondas foram adquiridos através do serviço de “*Assay-by-Design*” da *Applied Biosystems*.

As análises para determinação dos genótipos foram realizadas a partir do StepOne Software v2.3. Os genótipos são determinados levando-se em consideração a apresentação dos sinais de fluorescência para cada reação individualmente (Figura 8) juntamente com a apresentação das reações na placa em análise em conjunto, onde cada uma (representada por um ponto) é agrupada em *clusters* de acordo o seu perfil de fluorescência (Figura 9).

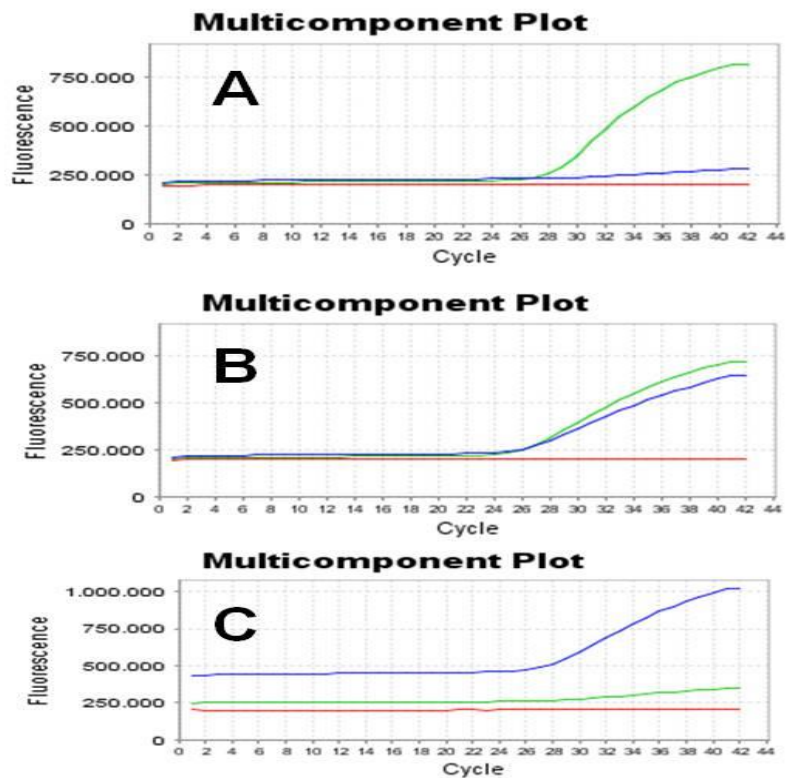


Figura 8 – Genótipo fornecido pela discriminação alélica por meio da intensidade das fluorescências. Os corantes VIC (verde) e FAM (azul), na técnica de qPCR, mostram os três possíveis genótipos. **A:** homozigoto selvagem; **B:** heterozigoto; **C:** homozigoto polimórfico.

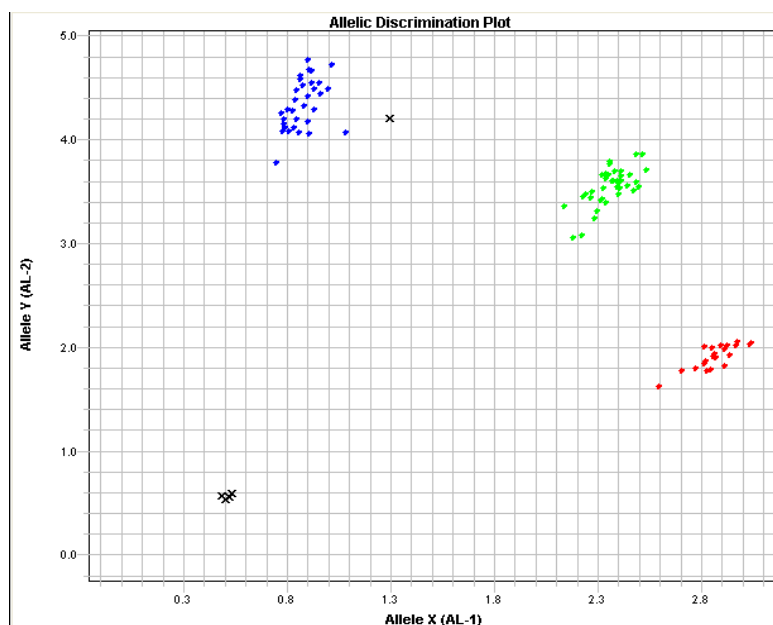


Figura 9 - Gráfico de discriminação alélica em clusters. Os pontos de fluorescência em vermelho (VIC) indicam homozigose para alelo X, enquanto que os azuis (FAM) indicam homozigose para alelo Y e os pontos em verde indicam heterozigose.

Fonte: Applied Biosystems, 2010

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R versão 3.4.3 para Windows, utilizando-se os pacotes "Genetics", Rms, SNPassoc e Haplo.Stats (<https://www.r-project.org>) (100).

As frequências alélicas e genóticas para cada SNP foram comparadas entre os grupos de casos e controles, a partir de modelos de regressão logística com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%), com e sem ajuste para as variáveis: gênero, idade e ancestralidade (NAM, AFR e EUR). Foi utilizada a razão de chances (OR) como medida de associação.

O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar a proporção entre os gêneros masculino e feminino nos dois grupos e para verificar possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). A diferença entre a média de idade dos participantes destes grupos foi calculada por meio do teste T de Student ($P < 0,0001$).

As análises dos padrões de desequilíbrio de ligação (DL) para os SNPs candidatos em *LRRK2* e *IRGM* no grupo controle foram realizadas a partir do software Haploview versão 4.2 (101), utilizando-se o coeficiente r^2 .

4 RESULTADOS

Um total de 1374 amostras, divididas entre casos e controles, foram analisadas, com diferenças significativas na média de idade ($P < 0.0001$) e na frequência de gênero ($P < 0.0001$) entre estes dois grupos. A classificação operacional mais frequentemente observada no grupo de pacientes foi de MB (68,1%) (Tabela 4). Os dados referentes a estes pacientes também são referidos no trabalho de Leturiondo e colaboradores (2020) (22).

Tabela 4 - Características gerais de casos e controles.

Variáveis	Casos n= 407	Controles n= 967
Class. operacional		
PB	130 (31,9%)	-
MB	277 (68,1%)	-
Idade^a	43.6 ± 15.0	29.8 ± 7.9
Gênero^b		
Masculino	280 (68,8%)	526 (54.4%)
Feminino	127 (31,2%)	441 (45.6%)

Abreviações: PB, paucibacilar; MB, multibacilar.

Teste T de Student para idade entre casos e controles ($P < 0.0001$); Teste do Qui-quadrado para sexo ($P < 0.0001$);

Dados mostrados como média ± desvio padrão.

^a Teste T de Student.

^b Teste do Qui-quadrado.

Dos cinco SNPs estudados, somente uma variante, *LRRK2* rs7133914, foi excluída das análises por ter apresentando desvio do EHW no grupo dos controles ($P < 0,05$) (

Tabela 5). Nos ensaios de genotipagem, as análises do EHW funcionam como um controle de qualidade na população de indivíduos saudáveis. Sendo assim, os desvios nesse equilíbrio podem indicar uma possível atuação de

forças evolutivas na população estudada ou, mais provavelmente, interferências analíticas. A variante rara rs34637584 se apresentou monomórfica para o grupo controle e, por isso, não foi incluída na análise do EHW.

Tabela 5 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as variantes em *LRRK2* e *IRGM*

Gene	SNP	P-valor (controles) ^a	P-valor (pacientes) ^a
<i>LRRK2</i>	rs7962370	0,7942	0,8313
<i>LRRK2</i>	rs7133914	0,0117	0,7430
<i>IRGM</i>	rs13361189	0,4540	0,6052
<i>IRGM</i>	rs11167514	0,4861	0,2269

^a Teste do Qui-quadrado.

Quando comparados os grupos de pacientes diagnosticados com hanseníase *per se* e indivíduos saudáveis, não houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs localizados em *IRGM* e *LRRK2*. **(Erro! Fonte de referência não encontrada.)**.

O SNP rs34637584, em *LRRK2*, demonstrou associação de proteção para heterozigose no genótipo AG antes das correções ($P = 0,009$), mas que não se sustentou após o ajuste para as covariáveis sexo, idade e ancestralidade (OR = 0.67; IC 95%; $P = 0,0561$). O alelo mutante A esteve presente somente em indivíduos adoentados **(Erro! Fonte de referência não encontrada.)**.

Tabela 6 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores em genes candidatos com a hanseníase.

SNP	Genótipo N (%)	Controles N (%)	Pacientes N (%)	OR (IC 95%)	P-valor	OR ^a Ajustada (IC 95%)	P-valor ^a
-----	-------------------	--------------------	--------------------	----------------	---------	--------------------------------------	----------------------

rs7962370 LRRK2	AA	21 (2,2)	8 (2)	0.88 (0.38-2.01)	0.7652	0.97 (0.37-2.56)	0.9632
	AG	236 (24,5)	94 (23)	0.92 (0.70-1.21)	0.5615	0.90 (0.66-1.24)	0.5422
	GG ^b	706 (73,3)	305 (75)				
	Total	963	407				
Alelo	A	0.14	0.14	0.92 (0.66-1.29)	0.6552	0.92 (0.63-1.36)	0.7082
	G ^b	0.86	0.86				
Carreador	AA/AG	257 (27)	102 (25)	0.91 (0.70-1.19)	0.5318	0.91 (0.67-1.23)	0.5539
rs34637584 LRRK2	AG	0 (0)	2 (0,5)	0.63 (0.44-0.89)	0.0093	0.67 (0.44-1.01)	0.0561
	GG ^b	966 (100)	405 (99,5)	0.93 (0.71-1.20)	0.5738	0.93 (0.68-1.27)	0.6690
	Total	966	407				
	Alelo	A	0.00	0.005	0.81 (0.64-1.03)	0.0879	0.84 (0.63-1.10)
	G ^b	1.00	0.95,5				
Carreador	AG	0 (0)	2 (0,5)	0.84 (0.65-1.07)	0.1593	0.85 (0.64-1.15)	0.2976
rs13361189 IRGM	CC	36 (4)	14 (3)	0.90 (0.47-1.70)	0.7539	0.83 (0.40-1.71)	0.6264
	CT	283 (29)	114 (28)	0.93 (0.72-1.21)	0.6170	0.86 (0.64-1.16)	0.3370
	TT	646 (67)	278 (69)				
	Total	965	406				
Alelo	C	0.18	0.17	0.94 (0.69-1.27)	0.6909	0.88 (0.62-1.24)	0.4749
	T ^b	0.82	0.83				
Carreador	CC/CT	319 (33)	128 (31)	0.93 (0.72-1.19)	0.5812	0.86 (0.64-1.14)	0.3047
rs11167514 IRGM	CC	43 (4)	21 (5)	1.14 (0.66-1.97)	0.6196	1.14 (0.61-2.13)	0.6624
	CG	304 (32)	125 (31)	0.96 (0.74-1.24)	0.7876	0.88 (0.66-1.18)	0.4227
	GG ^b	613 (64)	261 (64)				
	Total	960	407				
Alelo	C	0.20	0.21	1.01 (0.75-1.34)	0.9319	0.96 (0.69-1.34)	0.8333
	G ^b	0.80	0.79				
Carreador	CC/CG	347 (36)	146 (36)	0.98 (0.77-1.25)	0.9233	0.91 (0.69-1.21)	0.5480

Abreviações: OR, *odds ratio*; SNP, *single nucleotide polymorphism*. Os valores em negrito expressam resultados estatisticamente significativos.

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Também realizamos análises de associação a partir dos mesmos modelos de regressão logística, comparando os pacientes diagnosticados como paucibacilares (PB) e multibacilares (MB), respectivamente, com o grupo de indivíduos saudáveis. Além disso, também foram realizadas análises comparando os grupos de pacientes PB e MB. Não encontramos associações estatísticas significativas para estes modelos de comparação (Tabela 8 e Tabela 9).

Tabela 7 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores entre controles e forma operacional PB

SNP	Genótipo N (%)	Controles N (%)	PB N (%)	OR (IC 95%)	P-valor	OR ^a Ajustada (IC 95%)	P-valor ^a
rs7962370 LRRK2	AA	21 (2)	1 (1)	0.32 (0.04-2.45)	0.2765	0.40 (0.05-3.10)	0.3807
	AG	236 (25)	26 (20)	0.75 (0.47-1.18)	0.2261	0.77 (0.48-1.24)	0.2898
	GG ^b	706 (73)	103 (79)				
	Total	963	130				
Alelo	A	0.14	0.11	0.71 (0.39-1.28)	0.2602	0.74 (0.40-1.36)	0.3458
	G ^b	0.86	0.89				
Carreador	AA/AG	257 (27)		0.72 (0.46-1.12)	0.1501	0.74 (0.47-1.18)	0.2189
rs13361189 IRGM	CC	36 (4)	4 (3)	0.78 (0.27-2.24)	0.6449	0.85 (0.28-2.51)	0.7729
	CT	283 (29)	33 (26)	0.81 (0.53-1.24)	0.3526	0.76 (0.49-1.19)	0.2405
	TT	646 (67)	92 (71)				
	Total	965	129				
Alelo	C	0.18	0.16	0.83 (0.50-1.38)	0.4886	0.82 (0.49-1.37)	0.4534
	T ^b	0.82	0.84				
Carreador	CC/CT	319 (33)		0.81 (0.54-1.22)	0.3198	0.77 (0.51-1.18)	0.2409
rs11167514 IRGM	CC	43 (4)	6 (5)	0.97 (0.40-2.35)	0.9497	1.03 (0.41-2.57)	0.9446
	CG	304 (32)	36 (28)	0.82 (0.54-1.24)	0.3591	0.79 (0.52-1.22)	0.3004
	GG ^b	613 (64)	88 (67)				
	Total	960	130				
Alelo	C	0.20	0.18	0.88 (0.55-1.42)	0.6213	0.88 (0.54-1.43)	0.6187
	G ^b	0.80	0.82				
Carreador	CC/CG	347 (36)		0.84 (0.57-1.24)	0.3917	0.82 (0.55-1.23)	0.3532

Abreviações: OR, *odds ratio*; SNP, *single nucleotide polymorphism*. Os valores em negrito expressam resultados estatisticamente significativos.

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Tabela 8 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores entre controles e forma operacional MB

SNP	Genótipo N (%)	Controles N (%)	MB N (%)	OR (IC 95%)	P-valor	OR ^a Ajustada (IC 95%)	P-valor ^a
rs7962370 LRRK2	AA	21 (2)	7 (3)	1.16 (0.48-2.77)	0.7307	1.54 (0.51-4.61)	0.4389
	AG	236 (25)	68 (24)	1.00 (0.73-1.37)	0.9648	1.03 (0.71-1.49)	0.8699
	GG ^b	706 (73)	202 (73)				
	Total	963	277				
Alelo	A	0.14	0.15	1.02 (0.70-1.50)	0.8784	1.08 (0.69-1.71)	0.7173
	G ^b	0.86	0.85				
Carreador	AA/AG	257 (27)		1.02 (0.75-1.37)	0.8976	1.06 (0.74-1.52)	0.7362
rs13361189 IRGM	CC	36 (4)	10 (4)	0.96 (0.46-1.98)	0.9221	0.77 (0.32-1.85)	0.5700
	CT	283 (29)	81 (29)	0.99 (0.73-1.33)	0.9686	0.95 (0.66-1.35)	0.7793
	TT	646 (67)	186 (67)				
	Total	965	277				
Alelo	C	0.18	0.18	0.98 (0.70-1.39)	0.9508	0.92 (0.60-1.39)	0.6966
	T ^b	0.82	0.82				
Carreador	CC/CT	319 (33)		0.99 (0.74-1.31)	0.9490	0.92 (0.65-1.30)	0.6727
rs11167514 IRGM	CC	43 (4)	15 (5)	1.23 (0.67-2.27)	0.4970	1.16 (0.55-2.47)	0.6857
	CG	304 (32)	89 (32)	1.03 (0.77-1.38)	0.8044	0.96 (0.68-1.37)	0.8594
	GG ^b	613 (64)	173 (63)				
	Total	960	277				
Alelo	C	0.20	0.21	1.07 (0.77-1.48)	0.6720	1.01 (0.68-1.51)	0.9294
	G ^b	0.80	0.79				
Carreador	CC/CG	347 (36)		1.06 (0.80-1.40)	0.6699	0.99 (0.71-1.38)	0.9664

Abreviações: OR, *odds ratio*; SNP, *single nucleotide polymorphism*. Os valores em negrito expressam resultados estatisticamente significativos.

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Tabela 9 - Associação de frequências de genótipos, alelos e carreadores entre as formas PB e MB

SNP	Genótipo N (%)	PB N (%)	MB N (%)	OR (IC 95%)	P-valor	OR ^a Ajustada (IC 95%)	P-valor ^a
rs7962370 LRRK2	AA	1 (1)	7 (3)	1.00 (0.00-Inf)	1.0000	1.00 (0.00-Inf)	1.0000
	AG	26 (20)	68 (25)	1.00 (0.00-Inf)	1.0000	1.00 (0.00-Inf)	1.0000
	GG ^b	103 (79)	202 (72)				
	Total	130	277				
Alelo	A	0.11	0.15	1.43 (0.75-2.74)	0.2692	1.40 (0.71-2.74)	0.3225
	G ^b	0.89	0.85				
Carreador	AA/AG			1.41 (0.85-2.33)	0.1722	1.39 (0.82-2.34)	0.2111
rs13361189 IRGM	CC	4 (3)	10 (4)	1.00 (0.00-Inf)	1.0000	1.00 (0.00-Inf)	1.0000
	CT	33 (26)	81 (29)	1.00 (0.00-Inf)	1.0000	1.00 (0.00-Inf)	1.0000
	TT	92 (71)	186 (67)				
	Total	129	277				
Alelo	C	0.16	0.18	1.18 (0.67-2.07)	0.5637	1.12 (0.62-2.01)	0.6998
	T ^b	0.84	0.82				
Carreador	CC/CT			1.21 (0.77-1.92)	0.4002	1.15 (0.71-1.85)	0.5635
rs11167514 IRGM	CC	6 (5)	15 (5)	1.00 (0.00-Inf)	1.0000	1.00 (0.00-Inf)	1.0000
	CG	36 (28)	89 (32)	1.00 (0.00-Inf)	1.0000	1.00 (0.00-Inf)	1.0000
	GG ^b	88 (67)	173 (63)				
	Total	130	277				
Alelo	C	0.18	0.21	1.20 (0.71-2.04)	0.4824	1.17 (0.67-2.03)	0.5667
	G ^b	0.82	0.79				
Carreador	CC/CG			1.06 (0.80-1.40)	0.6699	1.20 (0.75-1.90)	0.4361

Abreviações: OR, *odds ratio*; SNP, *single nucleotide polymorphism*. Os valores em negrito expressam resultados estatisticamente significativos.

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Para as análises de desequilíbrio de ligação (DL) nos controles em *LRRK2*, foram incluídos outros dois SNPs já estudados anteriormente nesta

mesma população (22), a saber: rs7298930, rs3761863. O SNP rs7133914 também foi adicionado na análise de DL, junto com rs7962370. Os quatro SNPs não estão em desequilíbrio de ligação ($r^2 < 0,30$) (Figura 11). Por outro lado, no gene *IRGM*, as análises de DL demonstraram que os SNPs rs13361189 e rs11167514 estão em forte desequilíbrio de ligação ($r^2 = 0,83$) (Figura 11).

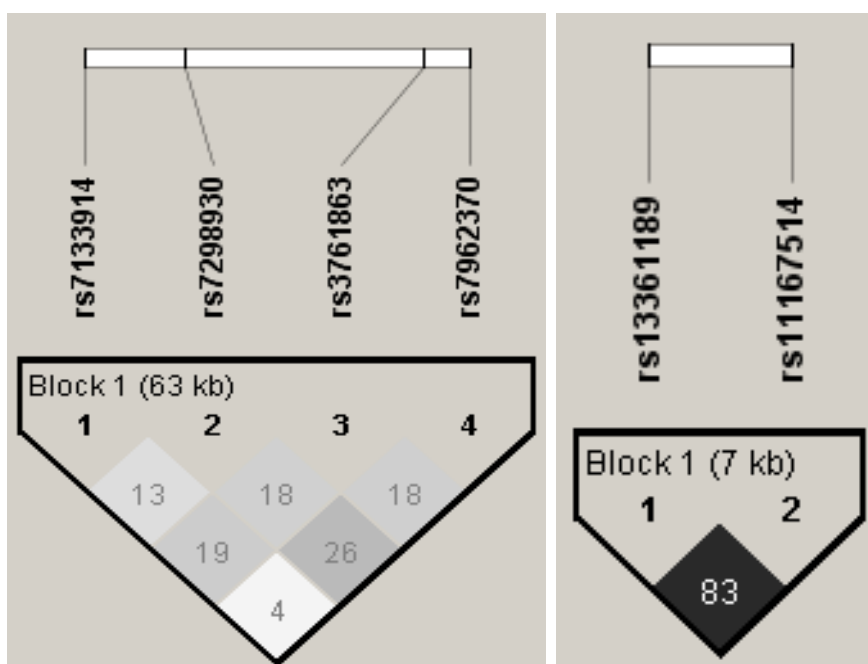


Figura 10 - Gráfico de DL para as variantes em *LRRK2* e *IRGM*

Para as análises de associação envolvendo combinações de haplótipos, utilizamos os SNPs de *LRRK2*: rs7962370, rs7298930 e rs3761863, os dois últimos já estudados anteriormente nesta mesma população (22). A análise de haplótipos para *LRRK2* não apresentou valores estatisticamente significativos entre casos e controles, e também para as formas PB e MB (Tabela 10).

Tabela 10 - Associação de frequências de haplótipos em *LRRK2* entre casos e controles.

Haplótipo	rs7962370 <i>LRRK2</i>	rs7298930 <i>LRRK2</i>	rs3761863 <i>LRRK2</i>	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (IC 95%) ^a	P- valor ^a
-----------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	------------------	------------------	--------------------------	--------------------------

1^b	G	C	C	0,44048	0,46651	-	-
2	A	A	T	0,13831	0,13166	0,97 (0,71 – 1,32)	0,87
3	G	A	C	0,08680	0,09382	0,94 (0,61 – 1,44)	0,79
4	G	A	T	0,13070	0,14250	1,12 (0,82 – 1,53)	0,44
5	G	C	T	0,19715	0,16204	0,78 (0,57 – 1,06)	0,12

Abreviações: OR, *odds ratio*;

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Tabela 11 - Associação de frequências de haplótipos em *LRRK2* entre controles e forma operacional PB.

Haplótipo	rs7962370 <i>LRRK2</i>	rs7298930 <i>LRRK2</i>	rs3761863 <i>LRRK2</i>	OR (IC 95%) ^a	P-valor ^a
1^b	G	C	C	-	-
2	A	A	T	0,81 (0,51 – 1,27)	0,36
3	G	A	C	0,79 (0,43 – 1,45)	0,45
4	G	A	T	1,26 (0,84 – 1,89)	0,25
5	G	C	T	0,66 (0,42 – 1,04)	0,07

Abreviações: OR, *odds ratio*;

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Tabela 12 - Associação de frequências de haplótipos em *LRRK2* entre controles e forma operacional MB.

Haplótipo	rs7962370 <i>LRRK2</i>	rs7298930 <i>LRRK2</i>	rs3761863 <i>LRRK2</i>	OR (IC 95%) ^a	P- valor ^a
1 ^b	G	C	C	-	-
2	A	A	T	1,13 (0,78 – 1,65)	0,49
3	G	A	C	0,94 (0,55 – 1,59)	0,82
4	G	A	T	1,02 (0,69 – 1,52)	0,89
5	G	C	T	0,85 (0,58 – 1,25)	0,43

Abreviações: OR, *odds ratio*;

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Por fim, foram realizadas análises de comparações de haplótipos envolvendo os SNPs rs13361189 e rs11147514 de *IRGM*. Também não encontramos associações de haplótipos com a hanseníase e suas formas operacionais (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação da frequência de haplótipos em *IRGM* entre casos e controles.

Haplótipo	rs13361189 <i>IRGM</i>	rs11147514 <i>IRGM</i>	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (IC 95%) ^a	P- valor ^a
1 ^b	T	G	0,79306	0,79484	-	-
2	C	C	0,18021	0,17445	0,94 (0,73 – 1,22)	0,67
3	T	C	0,02300	0,03071	1,48 (0,81 – 2,71)	0,20

Abreviações: OR, *odds ratio*;

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Tabela 14 - Associação da frequência de haplótipos em *IRGM* entre controles e forma operacional PB.

Haplótipo	rs13361189 <i>IRGM</i>	rs11147514 <i>IRGM</i>	OR (IC 95%) ^a	P-valor ^a
1 ^b	T	G	-	-
2	C	C	0,83 (0,56 – 1,23)	0,35
3	T	C	1,43 (0,60 – 3,39)	0,41

Abreviações: OR, *odds ratio*;

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

Tabela 15 - Associação da frequência de haplótipos em *IRGM* entre controles e forma operacional MB.

Haplótipo	rs13361189 <i>IRGM</i>	rs11147514 <i>IRGM</i>	OR (IC 95%) ^a	P-valor ^a
1 ^b	T	G	-	-
2	C	C	1,00 (0,74 – 1,37)	0,95
3	T	C	1,55 (0,74 – 3,25)	0,23

Abreviações: OR, *odds ratio*;

^a Resultados das análises de regressão logística ajustado para as covariáveis: gênero, idade e ancestralidade.

^b Linha de base. IC 95%, Intervalo de confiança: 95%.

5 DISCUSSÃO:

Este estudo de caso-controle vem contribuir na avaliação de polimorfismos em dois genes (*LRRK2* e *IRGM*) envolvidos na via da autofagia, relacionada com uma efetiva resposta a patógenos intracelulares, como o *M. leprae*, na população de Manaus (AM). Os estudos de variantes genéticas, do tipo SNP, necessitam ser avaliadas em diferentes populações para chegar em um consenso de como esses polimorfismos podem estar influenciando a fisiopatologia da doença.

Para o estudo genético do tipo caso-controle, as amostras estudadas foram alocadas em grupos de 967 indivíduos saudáveis (controles) e 407 pacientes (casos), com hanseníase. A média de idade do grupo controle foi menor que a dos adoentados, uma vez que os indivíduos deste grupo foram jovens em busca de uma colocação no mercado de trabalho. Foram submetidos a um exame dermatoneurológico e somente foram convidados a participar da pesquisa quando não apresentavam lesões de hanseníase ou histórico familiar da doença.

A seleção do grupo controle exige uma atenção especial, pois é importante para a validade interna do estudo genético. Um dos critérios para a seleção de indivíduos no grupo controle é a exposição aos mesmos fatores de risco dos pacientes (102). Os controles de nosso estudo foram selecionados como tal, pelo fato de serem residentes de Manaus (AM), que é uma região endêmica para a hanseníase e submetidos a um exame clínico por profissionais experientes (103).

No grupo de pacientes, avaliamos a faixa etária dos participantes, o gênero e as formas operacionais das amostras analisadas. Nossos resultados demonstram que grande parte dos indivíduos adoentados eram homens e que a forma operacional predominante neste grupo era a multibacilar (MB). Essa predominância de casos em homens e maior ocorrência da forma MB já foi relatada em diversas partes do mundo (104). Uma das razões para essa prevalência da hanseníase multibacilar em indivíduos do gênero masculino é o fato de que os homens são mais negligentes à saúde que as mulheres, e isso faz com que a maioria dos casos sejam detectados posteriormente (105).

Outra razão que, provavelmente, possa estar influenciando essa maior incidência de casos no sexo masculino são fatores hormonais (106). Há uma hipótese de que infecções mais acentuadas, por patógenos intracelulares, estejam ligadas a produção de testosterona, e este hormônio pode estar contribuindo na criação de condições favoráveis ao crescimento e proliferação do microrganismo, nos homens suscetíveis (106). Além disso, outros aspectos como o estilo de vida e comportamentos sociais podem cooperar para maior exposição ao patógeno e progressão para a hanseníase MB nos homens (107).

Em relação à faixa etária dos participantes, observamos que a média de idade dos pacientes apresentou uma diferença significativa em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. Alguns estudos já demonstraram que a idade é um fator que influencia na resposta transcricional de genes relacionados à imunidade, o que pode afetar a efetividade da resposta imune do hospedeiro à infecções, como a redução da eficiência da autofagia ou mudança do perfil de resposta celular para humoral (108,109). No entanto, é necessário que haja mais investigações sobre como estes fatores intrínsecos podem causar impacto na expressão gênica em doenças infecciosas, como a hanseníase. Isto seria importante para uma melhor compreensão sobre como estas diferenças significativas entre gênero e idade entre os indivíduos podem interferir na eficiência da resposta imunológica e no risco à doença (110).

Avaliamos também a ancestralidade dos indivíduos estudados. Casos e controles possuíam ancestralidades semelhantes, o que é de suma importância para um estudo genético de associação, uma vez que a similaridade de ascendência entre os dois grupos pode evitar associações espúrias (111). Por exemplo: vieses como este podem levar a resultados falso-positivos, no caso em que exista uma maior prevalência de uma determinada doença nos grupos comparados, pois a variante genética avaliada pode apontar associação com o fenótipo, mesmo que não seja uma variante de suscetibilidade (111).

Alguns estudos já utilizaram dessa metodologia para melhorar a eficiência e precisão de suas análises. Podemos citar o estudo de Vieira e colaboradores (2015), que observaram uma associação positiva para o gene *EGFR* com a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer gástrico em uma amostra populacional de Belém (PA) (112). No entanto, quando foram realizados os ajustes para a ancestralidade, com o intuito de reduzir vieses, a

associação foi perdida (antes das correções: $P = 0,03$; após os ajustes: $P = 0,06$). Outro estudo que também podemos mencionar é o de Lima-Costa (2016), que analisou uma amostra de indivíduos do estado de Minas Gerais e correlacionou a composição genética ancestral dos indivíduos com a suscetibilidade à Doença de Chagas (113). Observou-se que as ascendências nativo-americana e africana demonstraram forte associação significativa ($P < 0,001$), mesmo após as correções para as covariáveis. Estes estudos citados evidenciam a importância de ajustar os resultados das análises de associação genética com avaliação de variantes de suscetibilidade, uma vez que podem contribuir para uma maior consistência e confiabilidade ao estudo.

Problema de estratificação populacional é outra causa de erro em estudos genéticos de caso-controle (111), sobretudo em populações miscigenadas, levando a necessidade de controlar esta estratificação por meio das correções para a ancestralidade. A estratégia mais adequada para isso é empregar a ancestralidade genômica com base na análise de DNA dos participantes, utilizando um painel de marcadores de polimorfismos em genes não relacionados com o estudo, uma vez que estas características não se alteram com o tempo (114). Desta forma, pode-se utilizá-las para ajustar o efeito de estratificação da população estudada, uma metodologia bastante empregada em amostra de países com populações miscigenadas (115).

Sabe-se que a composição étnica miscigenada brasileira é resultante do cruzamento de três raízes ancestrais: europeus, ameríndios e africanos. Porém, a população do Amazonas e mesmo de Manaus possui um padrão de ancestralidade diferenciado em relação às demais regiões do Brasil, uma vez que detém um percentual maior de ancestralidade ameríndia em sua composição genética (116). Isso se deve aos diversos eventos históricos ocorridos em na região amazônica, desde a sua colonização até a modernidade.

Os eventos de miscigenação da população amazonense se iniciaram no século XVI, com o início das expedições portuguesas, na Amazônia, e instalação de colônias nestas terras que eram habitadas, predominantemente, por populações indígenas, e as alianças militares entre os europeus e tribos nativas que compartilhavam rivais comuns contribuíram para o início do cruzamento entre brancos e ameríndios (117). Mais adiante, no período de

1879 a 1912, a exploração dos recursos naturais ganhou intensidade, sobretudo pelo ciclo da borracha, atraindo imigrantes de diferentes partes do mundo e aumentando ainda mais o número de habitantes (118) assim como a diversidade étnica da região amazônica. E na década de 1960, a implantação da Zona Franca de Manaus e a construção da Rodovia Transamazônica contribuíram para um novo fluxo migratório à região (119). Somados, estes eventos contribuíram para a formação da atual composição étnica de nossa população.

No presente estudo, avaliamos as frequências de alelos, genótipos e carreadores para os polimorfismos nos genes *LRRK2* (rs7962370 e rs34637584) e *IRGM* (rs13361189 e rs11167514), com e sem ajuste para as covariáveis sexo, idade e ancestralidade. Não encontramos associação significativa em nenhum destes SNPs à hanseníase *per se* e nem entre as formas operacionais PB e MB, na população de Manaus.

Devido ao envolvimento na regulação em diversas vias de sinalização na resposta imune do hospedeiro, resolvemos reanalisar o gene *LRRK2*, com novos polimorfismos, a fim de verificar se esses SNPs estavam envolvidos, pelo menos em parte, com a fisiopatologia da hanseníase. Em um estudo recente, analisando o mesmo grupo populacional do presente estudo, os polimorfismos rs3761863 e rs7298930, do gene *LRRK2*, não mostraram associação com a doença (22).

O SNP rs7962370 localiza-se na região intergênica 3'UTR de *LRRK2*, e se caracteriza como uma variante de frequência comum (MAF = 0,17) (120). Este polimorfismo foi associado ao risco com a Doença de Crohn, em uma amostra populacional da Inglaterra (86). Esta doença e a hanseníase compartilham variantes genéticas comuns (121) e a escolha deste SNP poderia levar a uma evidência que ainda não foi encontrada com a hanseníase.

O polimorfismo rs34637584 (c.6055 G>A / p.Gly2019Ser) está localizado no éxon 41 de *LRRK2*, sendo descrito como uma variante missense rara (MAF < 0,01) (120). Os relatos mais significativos de associação deste SNP foram para a Doença de Parkinson em populações de judeus asquenazes e árabes ao norte de África, que a relacionaram a heterozigose para o genótipo AG ao risco de desenvolvimento da doença (88,89). Nosso resultado mostrou que somente dois indivíduos, ambos do grupo de pacientes expressavam o

genótipo mutante AG, que após as correções para as covariáveis, perdeu a associação ($P = 0,0561$; OR = 0,67).

Recentemente, com o advento de novas tecnologias aplicadas à biologia molecular (como o sequenciamento de última geração, NGS) os polimorfismos raros têm ganhado mais evidência em estudos de associação à doenças complexas (122), como a hanseníase. Uma das motivações para isso é a hipótese de que estes SNPs raros podem desempenhar funções mais cruciais na suscetibilidade à estas doenças do que as variantes comuns (123). Esse fato pode ser claramente observado no papel de rs34637584 na Doença de Parkinson, onde essa variante promove o aumento das funções do domínio quinase de LRRK2 (como a fosforilação da peroxiredoxina 3), o que pode resultar em danos neuronais por estresse oxidativo (124).

Outro exemplo da forte influência de rs34637584 na suscetibilidade à doenças é o seu papel fisiológico na infecção por *Salmonella typhimurium*, onde essa variante causa o aumento da atividade quinase de LRRK2 e, conseqüentemente, a acentuada ativação de caspase-1, ocasionando a produção excessiva de IL-1 β e contribuindo para uma melhor resposta inflamatória e controle da infecção nos macrófagos (125).

Uma das dificuldades de se analisar variantes raras em uma população é a necessidade de um grande tamanho amostral, que é um fator determinante para a precisão do estudo (126). Nossa hipótese era de que esse SNP poderia estar enriquecido em nossa população. Mas notamos que se trata de uma variante também rara no nosso grupo de estudo, significando que precisaríamos de um número maior de amostras para aumentar nosso poder estatístico. Entretanto, não é desprezível o achado de aumento mesmo que não significativo de indivíduos heterozigotos entre os pacientes.

Recentemente, uma estratégia alternativa de análise é fazer “*deep sequencing*” de regiões codificantes de interesse como o gene de *LRRK2*. Essa estratégia visa identificar um enriquecimento de variantes raras que potencialmente apresentam o mesmo fenótipo. Esse tipo de associação é comum em doenças genéticas como a fibrose cística onde já se identificou centenas de variantes no genes de CFTR associada à doença (127). Um trabalho liderado pelo brasileiro Vinicius M. Fava (17) realizou uma estratégia semelhante e foi capaz de indicar que há de fato uma variação M2397T

(rs3761863) que é variante de risco para a reação reversa (RR) ou reação do tipo 1 (RT-1). Curioso que, nesse caso, a associação não foi com hanseníase *per se*, mas com a RR, o que indica endofenótipos que podem enviesar os resultados. Essa característica é comum em doenças complexas onde, por exemplo, há nas diferentes populações de estudo, proporções distintas de pacientes com RR. Por isso, o achado em hanseníase *per se* pode ser percebido quando há uma proporção grande no grupo de casos de pacientes em reação reversa, mas quando essa proporção é baixa, não há poder para detecção de sinal de associação.

Portanto, a interpretação desses dados deve sempre ser feita a luz de possibilidade de endofenótipos. Dado o pequeno número de pacientes em RR no nosso grupo, talvez não tenhamos observado a associação nas nossas análises.

Apesar dos nossos resultados não terem apresentado evidências de associação significativa para a hanseníase *per se* ou entre as formas operacionais na população amazonense, não descartamos a possibilidade de que outras variantes desses genes do estudo possam estar relacionadas a hanseníase *per se* ou endofenótipos, como com as formas clínicas da doença ou as reações inflamatórias intensas (reação reversa (ou tipo 1) e eritema nodoso hansênico (ou tipo 2)) (17).

Como dito anteriormente, no estudo de Fava e colaboradores (2016), a variante rs3761863 esteve fortemente associada à reação tipo 1 na população vietnamita, juntamente com outros 17 polimorfismos (17). E em 2020, Leturiondo e colaboradores replicaram o mesmo SNP para a hanseníase *per se* na população amazonense, mas não houve associação significativa (22). Dado o papel fisiológico de *LRRK2* nas vias de sinalização inflamatória, o efeito funcional desta variante compreende um déficit no tempo de meia-vida da proteína e isso ocasiona a translocação do fator de transcrição NFAT para o núcleo, o que intensifica a síntese de citocinas pró-inflamatórias (80), indicando que a fisiopatologia de *LRRK2* na hanseníase se deve à diminuição ou perda de suas funções.

Mesmo com importantes estudos genéticos do tipo caso-controle envolvendo endofenótipos de reação inflamatória, ainda eles são pouco replicáveis. Viés de seleção do grupo controle e idade diferenciada entre os

grupos levam a probabilidade de associações espúrias (128). Como perspectiva futura, pretendemos avaliar os mesmos SNPs do presente estudo com a suscetibilidade à endofenótipos da hanseníase em nossa população.

A variante rs13361189 (g.150843825 T> C) se localiza na região 5' UTR de *IRGM*, de frequência comum (MAF = 0,30) (120). Esta variante foi relatada como um marcador de risco para a hanseníase em uma amostra da população chinesa para os genótipos CT e CC (**CT**: $P = 0,012$; **CC**: $P < 0,001$) (20). Replicando essa variante na população amazonense, não achamos associação significativa de rs13361189 com a hanseníase. Pode ser que essa discordância de resultados entre nosso estudo e o de Yang e colaboradores (2014) seja por conta da diferença entre as frequências de alelos e genótipos, que seguem padrões distintos em cada população (120).

O SNP rs11167514 (g.150851415 G>C) é uma variante intrônica de *IRGM*, caracterizada como de frequência comum (MAF=0,37) (120). Observamos que rs11167514 e rs13361189 estão em forte desequilíbrio de ligação, demonstrando que as duas variantes se encontram no mesmo bin de haplótipos na população amazonense, ou seja, estão sendo segregadas juntos. Uma das causas mais comuns de alto DL são os eventos de miscigenação entre duas ou mais populações (129), alterando as frequências alélicas e genotípicas entre populações etnicamente distintas.

Também procuramos observar a associação de haplótipos das variantes estudadas em *LRRK2* ou *IRGM*, mas não encontramos associação significativa. Estes haplótipos consistem em sequencias de alelos de um ou mais genes próximos na mesma região cromossômica (57). As análises de haplótipos demonstram grande importância nos estudos de associação genética, uma vez que podem contribuir com mais informações sobre um gene, se comparada com a análise de uma única variante (130).

Também não podemos descartar que outras variantes, nos genes avaliados em nosso estudo, possam estar correlacionadas com a manifestação das formas operacionais paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). Dois estudos realizados com *LRRK2*, demonstraram associação de polimorfismos às formas operacionais PB e MB. Em 2013, um estudo de caso-controle, com amostras da Índia, demonstrou que a variante rs1873613 esteve correlacionada com a progressão da hanseníase paucibacilar (PB) (75), enquanto que na China,

Zhang e colaboradores (2009) demonstraram associação do SNP rs1491938 com a forma multibacilar (MB) (74).

Relativamente, são poucos os estudos genéticos que buscam associação da hanseníase com as classificações operacionais (PB e MB) ou as formas clínicas. Para evitar associações espúrias, o tamanho amostral deve ter um poder estatístico forte, afim de avaliar uma verdadeira relação causal e consequentemente um melhor entendimento da manifestação da doença (131). É possível que existam diversos polimorfismos não-associados à hanseníase *per se*, que possam estar correlacionados com as formas PB e MB.

Os resultados obtidos em nossas análises evidenciam as dificuldades de se descobrir marcadores genéticos universais associados com a hanseníase. Um exemplo disto é que, estudando os mesmos polimorfismos, os resultados de associação encontrados aqui, diferem na região sudeste (estudo em andamento da doutoranda Isabela Espasandin Martins). A mesma tendência observada no estudo de Leturiondo e colaboradores (2020), que não encontraram concordância com os estudos de outras regiões do mesmo país analisado (22).

Acreditamos que estudos de associação envolvendo análise de genoma completo e exoma possam ajudar a descobrir novas variantes de associação que possam estar relacionadas à doença. Provavelmente, isto pode auxiliar na identificação de novos marcadores genéticos que possam contribuir com o diagnóstico ou tratamento da doença, medidas de grande importância para a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase e, consequentemente, redução na incidência de casos da doença.

6 CONCLUSÃO:

- a) No presente estudo, não encontramos associações significativas de alelos, genótipos, carreadores e haplótipos para os SNPs dos genes *LRRK2* e *IRGM* para a hanseníase na população amazonense.
- b) Também não encontramos associações significativas das variantes estudadas para as formas operacionais (PB e MB) e grupo controle.
- c) As variantes de *IRGM* (rs13361189 e rs11167514) apresentaram um forte desequilíbrio de ligação ($r^2 = 83$), indicando que segregam juntos.
- d) A ausência de associações significativas nos SNPs estudados possivelmente seja devido aos padrões diferenciados das frequências de alelos, genótipos e haplótipos entre as populações, por conta da ancestralidade. Isso demonstra a necessidade de mais estudos com outras variantes em nossa população.

7 EQUIPE DO PROJETO

Participantes	Vínculo Institucional	Função	Curriculum Lattes
Milton Ozório Moraes	Fiocruz - IOC	Orientador	http://lattes.cnpq.br/761311893177341
Carolina Crusciak Talhari Cortez	FUAM	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/4041028384017266
André Luiz Leturiondo	FUAM	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/1766601123110513
Fabiola da Costa Rodrigues	FUAM	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/3825185683565120
Felipe Jules Araújo Santos	FMT-HVD	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/7339017979671146
Isabela Espasandin Martins	Fiocruz - IOC	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/6781286036371837
Cynthia de Oliveira Ferreira	FUAM	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/3973586912917813
Camila Gurgel dos Santos da Silva	FUAM	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/2609401947184812
Ariani Batista Noronha	FUAM	Colaborador	http://lattes.cnpq.br/0326878422431024

8 ORÇAMENTO

As sondas dos SNPs foram fornecidas pelo Dr. Milton Ozório Moraes, do Laboratório de Hanseníase da Fiocruz-RJ. Os demais reagentes e insumos foram oriundos do projeto aprovado, intitulado: **Marcadores moleculares, genéticos e sorológicos na hanseníase: suporte ao diagnóstico clínico de pacientes e vigilância dos contatos**, coordenado pelo Dr. André Luiz Leturiondo.

Item	Valor Unitário	Quantidade	Valor Total
Master Mix	R\$ 2.560,00	3	R\$ 7.680,00
Conjunto de placas para qPCR (10 unidades)	R\$ 350,00	12	R\$ 4.200,00
Selo	R\$ 10,00	114	R\$ 1.140,00
Ponteiras P10	R\$ 30,00	114	R\$ 3.420,00
Luvras sem talco	R\$ 35,00	2	R\$ 70,00
			Valor total: R\$ 16.510,00

9 REFERÊNCIAS

1. Smith CS, Aerts A, Saunderson P, Kawuma J, Kita E, Virmond M. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017.
2. WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives – Situation de la lèpre (maladie de Hansen) dans le monde, 2019: le moment est venu d'intensifier les initiatives de prévention. *Wkly Epidemiol Rec = Relev épidémiologique Hebd*. 2020;95(36):417–38.
3. Gonçalves A. Realities of leprosy control: updating scenarios. *Rev Bras Epidemiol*. 2014;16(3):611–21.
4. Stefani MM de A. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41 Suppl 2:89–94.
5. Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery J da AC, Moreira SJM, et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(7):944–7.
6. Saunderson P, Gronen G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. *Lepr Rev*. 2015;71(1).
7. Talhari S, Penna GO, Oliveira MLW del R, Gonçalves H de S, Neves RG. *Hanseníase*. 5th ed. Rio de Janeiro: Di Livros; 2015. 217 p.
8. Smith WCS, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. *Lepr Rev* [Internet]. 2014;85(1):2–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974438>
9. Brasil. Diretrizes para a vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, editor. Manuais, Normas e Diretrizes. Brasília; 2016. 58 p.
10. Roset Bahmanyar E, Smith WC, Brennan P, Cummings R, Duthie M, Richardus JH, et al. Leprosy Diagnostic Test Development As a

- Prerequisite Towards Elimination: Requirements from the User's Perspective. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004331.
11. Cavalcanti AAL, Lucena-Silva N, Montarroyos UR, Albuquerque PMCC de. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(5):616–9.
 12. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4).
 13. Pasic MD, Samaan S, Yousef GM. Genomic medicine: New frontiers and new challenges. Vol. 59, *Clinical Chemistry*. 2013. p. 158–67.
 14. Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome*. 2011;22(1–2):19–31.
 15. Fava VM, Dallmann-Sauer M, Schurr E. Genetics of leprosy: today and beyond. Vol. 139, *Human Genetics*. 2020. p. 835–46.
 16. Sauer MED, Salomão H, Ramos GB, D'Espindula HRS, Rodrigues RSA, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. *Clin Dermatol*. 2015;
 17. Fava VM, Manry J, Cobat A, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. A Missense LRRK2 Variant Is a Risk Factor for Excessive Inflammatory Responses in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2).
 18. Wang D, Xu L, Lv L, Su LY, Fan Y, Zhang DF, et al. Association of the LRRK2 genetic polymorphisms with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Genes Immun*. 2015;
 19. Lu Y, Li Q, Peng J, Zhu Y, Wang F, Wang C, et al. Association of autophagy-related IRGM polymorphisms with latent versus active tuberculosis infection in a Chinese population. *Tuberculosis*. 2016;97:47–51.
 20. Yang D, Chen J, Shi C, Jing Z, Song N. Autophagy gene polymorphism is associated with susceptibility to leprosy by affecting inflammatory cytokines. *Inflammation*. 2014;37(2):593–8.
 21. Bahari G, Hashemi M, Taheri M, Naderi M, Eskandari-Nasab E, Atabaki M. Association of IRGM polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *Sci World J*. 2012;2012.

22. Leturiondo AL, Noronha AB, Mendonca CYR, Ferreira C de O, Alvarado-Arnez LE, Manta FS de N, et al. Association of nod2 and ifng single nucleotide polymorphisms with leprosy in the amazon ethnic admixed population. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(5):1–13.
23. Duthie MS, Balagon MF. Combination chemoprophylaxis and immunoprophylaxis in reducing the incidence of leprosy. Vol. 9, *Risk Management and Healthcare Policy*. 2016. p. 43–53.
24. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. Vol. 33, *Clinics in Dermatology*. 2015. p. 26–37.
25. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Soc*. 2008;13(2):76–88.
26. Lastória JC, de Abreu MAMM. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol*. 2014;
27. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(6):856–64.
28. Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, et al. Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. *J Bacteriol*. 2009;191(19):6067–74.
29. Avanzi C, Benjak A, Singh P, Cole ST, Schuenemann VJ, Vera-Cabrera L, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;
30. Bratschi MW, Steinmann P, Wickenden A, Gillis TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. Vol. 86, *Leprosy review*. 2015. p. 142–55.
31. Fundação Alfredo da Matta. Informe FUAM 2020. 2020.
32. Dos Santos MAS, Mercadante LM, Pegas ES, Kadunc BV. Relationship between bacilloscopy and operational classification of hansen's disease in patients with reactions. *An Bras Dermatol*. 2018;93(3):454–6.
33. Riello FN, Brígido RTS, Araújo S, Moreira TA, Goulart LR, Goulart IMB. Diagnosis of mycobacterial infections based on acid-fast bacilli test and

- bacterial growth time and implications on treatment and disease outcome. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1).
34. Scollard DM, Dacso MM, Abad-Venida ML. Tuberculosis and Leprosy: Classical Granulomatous Diseases in the Twenty-First Century. Vol. 33, *Dermatologic Clinics.* 2015. p. 541–62.
 35. Carvalho RS, Foschiani IM, Costa MRSN, Marta SN, da Cunha Lopes Virmond M. Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(10):1863–7.
 36. Azevedo M de CS, Ramuno NM, Fachin LRV, Tassa M, Rosa PS, Belone A de FF, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Brazilian J Infect Dis [Internet]. Sociedade Brasileira de Infectologia;* 2017;21(1):71–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.017>
 37. Davison AR, Kooij R, Wainwright J. Classification of leprosy. 1. Application of the Madrid classification of various forms of leprosy. *Int J Lepr.* 1960;28:113–25.
 38. Ridley DS. Classification of Leprosy According to Immunity. *Int J Lepr.* 1966;34(3):255–73.
 39. WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ - Tech Rep Ser.* 1982;No. 675.
 40. WHO. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy. 2018;
 41. Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ.* 1974;51(5):451–65.
 42. Fonseca AB de L, Simon M do V, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptive immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. Vol. 6, *Infectious Diseases of Poverty.* 2017.
 43. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1).
 44. Halvorsen B, Wæhre T, Scholz H, Clausen OP, Von Der Thüsen JH, Müller F, et al. Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam

- cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. *J Lipid Res.* 2005;46(2):211–9.
45. Pinheiro RO, Schmitz V, de Andrade Silva BJ, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, et al. Innate immune responses in leprosy. *Front Immunol.* 2018;9:518.
 46. Von Bubnoff D, Scheler M, Wilms H, Wenzel J, Von Bubnoff N, Häcker G, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65:819–32.
 47. Bahia El Idrissi N, Das PK, Fluiter K, Rosa PS, Vreijling J, Troost D, et al. *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. *Acta Neuropathol.* 2015;129:653–7.
 48. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of mycobacterium *leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1031–8.
 49. Geluk A, van den Eeden SJF, Dijkman K, Wilson L, Kim HJ, Franken KLMC, et al. ML1419c Peptide Immunization Induces Mycobacterium *leprae* -Specific HLA-A*0201–Restricted CTL In Vivo with Potential To Kill Live Mycobacteria. *J Immunol.* 2011;127(3):522–33.
 50. Layre E, Collmann A, Bastian M, Mariotti S, Czaplicki J, Prandi J, et al. Mycolic Acids Constitute a Scaffold for Mycobacterial Lipid Antigens Stimulating CD1-Restricted T Cells. *Chem Biol.* 2009;16(1):82–92.
 51. Geluk A, Ottenhoff THM. HLA and Leprosy in the Pre and Postgenomic Eras. *Hum Immunol.* 2006;69(6):439–45.
 52. Simões Quaresma JA, De Oliveira MFA, Ribeiro Guimarães ÂC, De Brito EB, De Brito RB, Pagliari C, et al. CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: A possible role of dendritic cells in the pathogenesis of mycobacterium *ieprae* infection. *Am J Dermatopathol.* 2009;31(6):527–31.
 53. Chakravartti M, Vogel F. A Twin Study on Leprosy. *Acta Genet Med Gemellol (Roma).* 1975;24(1–2):179–179.
 54. Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *J Clin Invest.* 1987;79(4):1139–43.

55. Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CCO, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis.* 2010;201:1598–605.
56. Cui Y, Li G, Li S, Wu R. Designs for linkage analysis and association studies of complex diseases. Vol. 620, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2010. p. 219–42.
57. Strachan T, Read A. *Genética Molecular Humana*. 4th ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2016. 808 p.
58. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001;2(4):196–204.
59. Abbas AK. *Imunologia Celular e Molecular*. 9th ed. Elsevier Editora Ltda; 2019. 576 p.
60. Fitness J, Tosh K, Hill AVS. Genetics of susceptibility to leprosy. Vol. 3, *Genes and Immunity*. 2002. p. 441–53.
61. Aguilar-Medina M, Escamilla-Tilch M, Frías-Castro LO, Romero-Quintana G, Estrada-García I, Estrada-Parra S, et al. HLA Alleles are Genetic Markers for Susceptibility and Resistance towards Leprosy in a Mexican Mestizo Population. *Ann Hum Genet.* 2017;81(1):35–40.
62. Zhang X, Cheng Y, Zhang Q, Wang X, Lin Y, Yang C, et al. Meta-Analysis Identifies Major Histocompatibility Complex Loci in or Near HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-C as Associated with Leprosy in Chinese Han Population. *J Invest Dermatol.* 2019;139:957–60.
63. Gzara C, Dallmann-Sauer M, Orlova M, van Thuc N, Thai VH, Fava VM, et al. Family-based genome-wide association study of leprosy in Vietnam. *PLoS Pathog.* 2020;
64. Oliveira JM, Rêgo JL, de Lima Santana N, Braz M, Jamieson SE, Vieira TS, et al. The -308 bp TNF gene polymorphism influences tumor necrosis factor expression in leprosy patients in Bahia State, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2016;39:147–54.
65. Ali S, Chopra R, Aggarwal S, Srivastava AK, Kalaiarasan P, Malhotra D, et al. Association of variants in BAT1-LTA-TNF-BTNL2 genes within 6p21.3 region show graded risk to leprosy in unrelated cohorts of Indian population. *Hum Genet.* 2012;131(5):703–16.

66. Alter A, De Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet.* 2010;127(3):337–48.
67. Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Sales-Marques C, Durães SMB, Cardoso CC, Sarno EN, et al. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(9).
68. De Sales Marques C, Brito-De-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248s single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2013;208(1):120–9.
69. Wang D, Fan Y, Malhi M, Bi R, Wu Y, Xu M, et al. Missense Variants in HIF1A and LACC1 Contribute to Leprosy Risk in Han Chinese. *Am J Hum Genet.* 2018;102(5):794–805.
70. Liu H, Wang Z, Li Y, Yu G, Fu X, Wang C, et al. Genome-Wide Analysis of Protein-Coding Variants in Leprosy. *J Invest Dermatol.* 2017;
71. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc H, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VI, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004;427(6975):636–40.
72. 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;14:438–42.
73. Chopra R, Ali S, Srivastava AK, Aggarwal S, Kumar B, Manvati S, et al. Mapping of PARK2 and PACRG Overlapping Regulatory Region Reveals LD Structure and Functional Variants in Association with Leprosy in Unrelated Indian Population Groups. *PLoS Genet.* 2013;9(7).
74. Zhang Z, Liu J-X, Wang K-J, Lu W-S, Du W-L, Han J-W, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *N Engl J Med.* 2009;361(27):2609–18.
75. Marcinek P, Jha AN, Shinde V, Sundaramoorthy A, Rajkumar R, Suryadevara NC, et al. LRRK2 and RIPK2 Variants in the NOD 2-Mediated Signaling Pathway Are Associated with Susceptibility to *Mycobacterium leprae* in Indian Populations. *PLoS One.*

- 2013;8(8):e73103.
76. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004;44(4):601–7.
 77. Wallings RL, Tansey MG. LRRK2 regulation of immune-pathways and inflammatory disease. Vol. 47, *Biochemical Society Transactions*. 2019. p. 1581–95.
 78. Berwick DC, Heaton GR, Azeggagh S, Harvey K. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: Research progresses, but the themes remain the same. Vol. 14, *Molecular Neurodegeneration*. 2019.
 79. Dzamko NL. LRRK2 and the immune system. In: *Advances in Neurobiology*. 2017. p. 123–43.
 80. Liu Z, Lee J, Krummey S, Lu W, Cai H, Lenardo MJ. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat Immunol*. 2011;12:1063–70.
 81. Han KA, Yoo L, Sung JY, Chung SA, Um JW, Kim H, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) stimulates IL-1 β -mediated inflammatory signaling through phosphorylation of RCAN1. *Front Cell Neurosci*. 2017;
 82. Kozina E, Sadasivan S, Jiao Y, Dou Y, Ma Z, Tan H, et al. Mutant LRRK2 mediates peripheral and central immune responses leading to neurodegeneration in vivo. *Brain*. 2018;141(6):1753–69.
 83. Takagawa T, Kitani A, Fuss I, Levine B, Brant SR, Peter I, et al. An increase in LRRK2 suppresses autophagy and enhances dectin-1–induced immunity in a mouse model of colitis. *Sci Transl Med*. 2018;
 84. Schapansky J, Nardoizzi JD, Felizia F, LaVoie MJ. Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy. *Hum Mol Genet*. 2014;
 85. Eguchi T, Kuwahara T, Sakurai M, Komori T, Fujimoto T, Ito G, et al. LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;
 86. Ke X. Presence of multiple independent effects in risk loci of common complex human diseases. *Am J Hum Genet*. 2012;91(1):185–92.
 87. Tan EK, Peng R, Teo YY, Tan LC, Angeles D, Ho P, et al. Multiple

- LRRK2 variants modulate risk of Parkinson disease: A Chinese multicenter study. *Hum Mutat.* 2010;31:561–8.
88. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, et al. LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews . *N Engl J Med.* 2006;354(4):424–5.
89. Lesage S, Dürr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger A-L, Janin S, et al. LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs . *N Engl J Med.* 2006;354(4):422–3.
90. Changotra H. The emerging roles of human immunity-related GTPase M (IRGM) gene. *Int J Comput Biol.* 2015;4(1):55.
91. Chauhan S, Mandell MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell.* 2015;58(3):507–21.
92. Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Bradfield CJ, MacMicking JD. IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host and Microbe.* 2012. p. 432–44.
93. Burada F, Plantinga TS, Ioana M, Rosentul D, Angelescu C, Joosten LA, et al. IRGM gene polymorphisms and risk of gastric cancer. *J Dig Dis.* 2012;13(7):360–5.
94. Lu Y, Li CY, Lin S, Sen Y, Yuan P. IRGM rs13361189 polymorphism may contribute to susceptibility to Crohn's disease: A meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2014;8(2):607–13.
95. Palomino-Morales RJ, Oliver J, Gómez-García M, López-Nevot MA, Rodrigo L, Nieto A, et al. Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: A meta-analysis approach. *Genes Immun.* 2009;10(4):356–64.
96. Che N, Li S, Gao T, Zhang Z, Han Y, Zhang X, et al. Identification of a novel IRGM promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21–22):1645–9.
97. Yuan L, Ke Z, Ma J, Guo Y, Li Y. IRGM gene polymorphisms and haplotypes associate with susceptibility of pulmonary tuberculosis in Chinese Hubei Han population. *Tuberculosis.* 2016;96:58–64.
98. Xie H, Li C, Zhang M, Zhong N, Chen L. Association between IRGM polymorphisms and tuberculosis risk. Vol. 96, *Medicine (United States).* 2017.

99. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.* 2007;39(7):830–2.
100. R Core Computing Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017.
101. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;
102. Rêgo MA V. Case-Control Studies: a Brief Review. *Gaz Médica da Bahia.* 2010;80(1):101–10.
103. Santos K, Corrêa R, Rolim I, Pascoal L, Ferreira A. Strategies for control and surveillance of leprosy contacts: integrative review. *Saúde em Debate.* 2019;43(121):576–91.
104. World Health Organization. WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organization technical report series. 2012.
105. Ministério da Saúde. Nota Informativa Conjunta - Alerta para o exame sistemático de hanseníase na população masculina e em idosos [Internet]. Brasília; 2016. Available from: <https://central3.to.gov.br/arquivo/344609/>
106. Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker M de A, Nery JA da C, Jerônimo SMB, et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(2).
107. Schraiber LB. Healthcare needs, public policies and gender: The perspective of professional practices. *Cien Saude Colet.* 2012;17(10):2635–44.
108. Carr EJ, Dooley J, Garcia-Perez JE, Lagou V, Lee JC, Wouters C, et al. The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol.* 2016;17:461–8.
109. Heppner HJ, Cornel S, Peter W, Philipp B, Katrin S. Infections in the Elderly. *Critical Care Clinics.* 2013.
110. Piasecka B, Duffy D, Urrutia A, Quach H, Patin E, Posseme C, et al. Distinctive roles of age, sex, and genetics in shaping transcriptional variation of human immune responses to microbial challenges. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 2018;115(3):448–97.
111. Thomas DC, Witte JS. Point: Population stratification: A problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2002.
 112. Vieira PCM, Burbano RMR, Fernandes DCRO, Montenegro RC, Dos Santos SEB, Sortica VA, et al. Population stratification effect on cancer susceptibility in an admixed population from Brazilian Amazon. *Anticancer Res*. 2015;
 113. Lima-Costa MF, Macinko J, Mambrini JV de M, Peixoto SV, Pereira AC, Tarazona-Santos E, et al. Genomic African and Native American Ancestry and Chagas Disease: The Bambui (Brazil) Epigen Cohort Study of Aging. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5).
 114. Fernanda Lima-Costa M, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep*. 2015;5.
 115. Santos HC, Horimoto AVR, Tarazona-Santos E, Rodrigues-Soares F, Barreto ML, Horta BL, et al. A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: The Brazilian set. *Eur J Hum Genet*. 2016;
 116. Manta FS de N, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS One*. 2013;8(9).
 117. Mendes CMM. A questão da colonização do Brasil: historiografia e documentos. *Imagens da Educ*. 2012;
 118. Cruz AG. Dois séculos de extrativismo e especialização primário-exportadora na Amazônia: uma análise comparada entre os ciclos da borracha e do minério de ferro. *Cad CEPEC*. 2019;
 119. Afonso L de M. Panorama da cidade de Manaus: crise, progresso e cultura na década de 1960. *SOMANLU*. Manaus; 2010;10(2):45–60.
 120. The 1000 Genomes Project. A global reference for human genetic variation. *Nat Artic*. 2015;526:68–74.
 121. Schurr E, Gros P. A Common Genetic Fingerprint in Leprosy and Crohn's

- Disease? *N Engl J Med.* 2009;361:2666–8.
122. Cambri G, Mira MT. Genetic susceptibility to leprosy-from classic immune-related candidate genes to hypothesis-free, whole genome approaches. Vol. 9, *Frontiers in Immunology.* 2018.
 123. Pierre A Saint, Génin E. How important are rare variants in common disease? *Brief Funct Genomics.* 2014;
 124. Angeles DC, Gan BH, Onstead L, Zhao Y, Lim KL, Dachsel J, et al. Mutations in LRRK2 increase phosphorylation of peroxiredoxin 3 exacerbating oxidative stress-induced neuronal death. *Hum Mutat.* 2011;32(12):1390–7.
 125. Liu W, Liu X, Li Y, Zhao J, Liu Z, Hu Z, et al. LRRK2 promotes the activation of NLRC4 inflammasome during *Salmonella Typhimurium* infection. *J Exp Med.* 2017;
 126. Li Q, Zhang H, Yu K. Approaches for evaluating rare polymorphisms in genetic association studies. *Hum Hered.* 2010;
 127. McGinniss MJ, Chen C, Redman JB, Buller A, Quan F, Peng M, et al. Extensive Sequencing of the CFTR gene: Lessons learned from the first 157 patient samples. *Hum Genet.* 2005;118(3–4):331–8.
 128. Fava V, Orlova M, Cobat A, Alcaïs A, Mira M, Schurr E. Genetics of leprosy reactions: An overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(1):132–42.
 129. Laan M, Pääbo S. Demographic history and linkage disequilibrium in human populations. *Nat Genet.* 1997;
 130. Epstein MP, Satten GA. Inference on Haplotype Effects in Case-Control Studies Using Unphased Genotype Data. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1316–29.
 131. Gaschignard J, Grant AV, Thuc N Van, Orlova M, Cobat A, Huong NT, et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(5).

