



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**



**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL12RB2 E
IFN- γ EM PACIENTES PORTADORES DE HANSENÍASE**

GEORGE ALLAN VILLAROU CO DA SILVA

Manaus - AM

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**

GEORGE ALLAN VILLAROUÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL12RB2 E
IFN- γ EM PACIENTES PORTADORES DE HANSENÍASE**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da
Universidade Federal do Amazonas, como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Imunologia.**

**Orientadora: Prof^a Doutora Lucia de Paula
Coorientador: Prof Doutor Felipe Gomes Naveca**

**MANAUS
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA
E APLICADA**

GEORGE ALLAN VILLAROUÇO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL12RB2 E IFN- γ EM
PACIENTES PORTADORES DE HANSENÍASE**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública realizada
em/...../.....

Banca examinadora

Presidente: Nome: Prof^a Doutora Lucia de Paula
Instituição: Universidade Federal do Amazonas
Assinatura:

Examinador (a): Nome:.....
Instituição:
Assinatura:

Examinador (a): Nome:.....
Instituição:
Assinatura:

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, em especial à minha mãe Vera Lúcia e pai Zenildo Leite pela dedicação e compreensão da minha ausência em alguns momentos durante estes anos acadêmicos.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora Profa. Dra. Lúcia de Paula pela oportunidade em participar de seu grupo de pesquisa e realização deste estudo, assim como também por toda sua compreensão e apoio durante estes anos acadêmicos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca quem teve uma grande contribuição ao compartilhar sua experiência e seus conhecimentos em Biologia Molecular, sendo essenciais para a realização deste estudo.

Agradeço à Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM) pelo espaço concedido a realização do estudo, assim como toda a equipe envolvida na pesquisa, desde a equipe da enfermagem, em especial às enfermeiras Maria Marlice e Maria Cilene, à equipe médica especializada, Dra. Maria das Graças, Dra. Evenilda Braga e Dra. Paula Frassinetti que auxiliaram na coleta dos pacientes para o projeto. À Vanha e à Marilva pela preciosa ajuda na coleta de amostras dos indivíduos controles.

Agradeço também aos amigos de Laboratório: Maísa Pôrto, Isabella Passos, Juliana, André Leturiondo, Daniel Dutra e a Cíntia Ferreira pelo apoio e motivação.

Aos Prof. Dr Luiz Antônio Boechat e Profa. Dra. Aya Sadahiro pelo auxílio na aplicação de testes estatísticos.

À Profa. Adriana Malheiro e ao MsC João Paulo Pimentel pela realização e análise da citometria de fluxo.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização do estudo e assim como a CAPES pelo financiamento à bolsa concedida.

Agradeço de coração ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada e aos meus queridos Professores que tanto contribuíram para a minha formação acadêmica.

Por fim e não menos importante, agradeço à minha família, aos meus pais e irmãos pela dedicação, apoio e incentivo nestes anos acadêmicos e, assim como, à minha namorada Aline Silva pelo apoio e compreensão, sem vocês essa conquista não seria possível, obrigado a todos.

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa caracterizada por apresentar diferentes formas clínicas que estão associadas com o tipo de resposta imune ao *Mycobacterium leprae*. Polimorfismos genéticos presentes no primeiro íntron de $IFN-\gamma$ podem apresentar importante papel na regulação da resposta imune, podendo resultar em consequências funcionais na transcrição do gene. Estudos anteriores identificaram a presença de cinco polimorfismos na região promotora de *IL12RB2*, sendo que estes polimorfismos poderiam suprimir fatores de transcrição na expressão de $IL12R\beta 2$, afetando o desenvolvimento da resposta imune celular. No presente estudo investigamos uma possível associação do SNP +874, do microssatélite de *IFN-\gamma* e de polimorfismos presentes na região promotora de *IL12RB2* com a susceptibilidade à hanseníase ou com desenvolvimento das formas clínicas em pacientes dos Estados da Amazônia Legal brasileira. O sequenciamento nucleotídico foi realizado em 118 pacientes com hanseníase e 114 indivíduos controles, assim como a imunofenotipagem de células T $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD69^+$ pela citometria de fluxo. Entre pacientes com hanseníase e indivíduos controles, assim como entre pacientes PB e MB não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos estudados nos polimorfismos de *IL12RB2*. Os polimorfismos -1035, -1023 e -464 apresentam uma correlação absoluta ($p < 0,0001$) havendo combinação de um mesmo genótipo nas respectivas posições. O microssatélite com 16 repetições foi significativamente associado com pacientes PB quando comparado aos pacientes MB ($p = 0,019$). Indivíduos homozigóticos ao alelo +874 A apresentaram maiores níveis de $IFN-\gamma$ e maior média de células T $CD4^+$ e $CD69^+$. Nossos dados sugerem que polimorfismos presentes no primeiro íntron de *IFN-\gamma* e da região promotora de *IL12RB2* não estão associados com a susceptibilidade à hanseníase. No entanto, o genótipo +874 A/A e 16 repetições de CA de *IFN-\gamma* podem estar relacionados à alta resposta imune celular observada nestes pacientes, sendo também mais frequentemente encontrados em pacientes PB.

Palavras-chave: Hanseníase, Imunidade celular, Citocina, Polimorfismo.

Abstract

Leprosy is an infectious disease characterized by different clinical forms that are associated with the type of immune response against *Mycobacterium leprae*. Polymorphisms present in the first intron of IFN- γ may have an important role in the regulation of the immune response, which could have functional consequences for gene transcription. Later studies identified the presence of five polymorphisms in the IL12RB2 promoter region, these polymorphisms may act as transcriptional factors that suppress IL12R β 2 expression and affect the development of cellular immune response. In the present study we investigated a possible association of the +874 T/A SNP and IFN- γ , microsatellite and polymorphisms present in the IL12RB2 promoter region associated with susceptibility to leprosy or with development of clinical forms in patients from Brazilian Legal Amazon states. Nucleotide sequencing was performed with samples from 118 leprosy patients and 114 control subjects, as well as immunophenotyping of CD4⁺, CD8⁺ and CD69⁺ T cells by flow cytometry. Between leprosy patients and control subjects, as well as between PB and MB patients, no significant differences were observed among the studied genotypes in the polymorphisms of IL12RB2. The polymorphisms -1035, -1023 and -464 present an absolute correlation ($p < 0.0001$) having a combination of the same genotype in these positions. The microsatellite encoding 16 CA repeats was significantly associated with PB compared to MB patients ($p = 0.019$), being individuals homozygous for the +874 A allele present in IFN- γ and the mean level of CD4⁺ and CD69⁺ T cells was higher. Our data suggest that polymorphisms present in the first intron of IFN- γ and of the IL12RB2 promoter region are not associated with susceptibility to leprosy; nevertheless, the +874 A/A genotype and microsatellite encoding 16 CA repeats may be related to a higher cellular immune response in patients and are consistently more frequently detected in PB patients.

Keywords: Leprosy; Cellular immunity; Cytokine; Polymorphism.

Lista de abreviaturas

BB – Borderline
BT – Borderline Tuberculoide
BV – Borderline Virchowiano
CEP – Comitê de Ética e Pesquisa
CMI – Imunidade Mediada por Células
DAP – ácido de diaminopropiônico
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
I – Indeterminada
IB – Índice Baciloscópio
IFN- γ – Interferon Gama
IL12RB2 – Subunidade β 2 do receptor de IL12
IL – Interleucina
JAK – Janus associado à quinase
Kb – Kilobase
LT- α – Linfoxina- α
MH – Mal de Hansen
MB – Multibacilar
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos
NK – Natural Killer
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NOD – Receptores de domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PB – Paucibacilar
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PQT – Poliquimioterapia
SNP – Polimorfismo de base única
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th – Célula T auxiliar
TLR – Receptor Toll-Like
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-alfa
TT – Tuberculoide
TYK – Tirosina quinase
VV – Virchowiano (a)

Sumário

	Pág.
1. Introdução	10
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1 Epidemiologia da hanseníase	12
2.2 Agente etiológico	14
2.3 Patogenia	15
2.4 Classificação da hanseníase	15
2.5 Manifestações clínicas e imunológicas	16
2.6 Resposta imunológica ao <i>Mycobacterium leprae</i>	18
2.7 IL12R e sinalização intracelular	20
2.8 A influência da genética na hanseníase	21
2.9 Polimorfismos genéticos	22
2.10 Polimorfismos genéticos de IFN- γ	23
2.11 Polimorfismos genéticos de IL12RB2	24
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. Metodologia	28
4.1 Tipo de estudo	28
4.2 Aspectos éticos	28
4.3 População de estudo	28
4.4 Pacientes com hanseníase	28
4.5 Grupo controle	29
4.6 Material biológico	30
4.7 Extração de DNA	30
4.8 Quantificação do DNA extraído	30
4.9 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
4.10 PCR de IL12RB2 e IFN- γ	31
4.11 Eletroforese em gel de agarose	33
4.12 Purificação do produto da PCR para a reação de sequenciamento	34
4.13 Reação de sequenciamento	34
4.14 Purificação do produto da reação de sequenciamento	35
4.15 Eletroforese capilar	35
4.16 Análise de polimorfismos genéticos	35
4.17 Citometria de fluxo	35
4.18 Quantificação de IFN- γ pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	36
4.17 Análise estatística	36
5. Referências	38
Artigo Original - 1	50
Artigo Original - 2	65
Anexos	78

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença causada pelo *Mycobacterium leprae* (RIDLEY, 1978), transmitida principalmente por pacientes multibacilares (MB) na ausência de tratamento (Brasil, Ministério da Saúde, 2005; FOSS, 1999). Após a infecção o bacilo pode ser eliminado pela resposta imunológica do hospedeiro, no entanto, devido às falhas na resposta imune ocorre o desenvolvimento da doença que acomete principalmente pele e nervos, havendo a possibilidade de causar incapacidades e deformidades (DUERKSEN, 1997).

Segundo os relatos da Organização Mundial da Saúde (OMS), ao longo dos anos de 2004 a 2010 houve uma breve redução do número de novos casos detectados no Brasil, tendo sido o registro de 49.384 casos detectados em 2004 reduzido para 34.894 casos em 2010 (OMS, 2011). A redução do número de novos casos detectados reflete a existência do Programa de Controle da Hanseníase e do emprego da poliquimioterapia (PQT) no tratamento dos pacientes (GOULART *et al.*, 2002; OMS, 2006).

Nos últimos relatos da OMS recebidos de 130 países, o número de novos casos detectados foi de 228.474 em 2010 com uma prevalência de 3,93/100.000 habitantes, enquanto que os dados coletados no primeiro trimestre de 2011 mostram uma redução para 192.246 novos casos detectados (OMS, 2011).

Na América do Sul, o Brasil apresenta os maiores índices da doença (DUERKSEN, 1997). As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentam os maiores índices de hanseníase do país (MAGALHÃES e ROJAS, 2007). Atualmente o coeficiente de detecção da hanseníase no Estado do Amazonas encontra-se em 1,13/10.000 habitantes, e assim como a prevalência em 15,44/100.000 habitantes (Brasil, Ministério da Saúde, 2011).

A hanseníase apresenta diversas formas clínicas, podendo ser classificada em: indeterminada (I), tuberculoide (TT), borderline tuberculoide (BT), borderline (BB), borderline virchowiano (BV) e virchowiano (VV). No grupo paucibacilar estão agrupadas as formas I, TT e BT enquanto as formas BB, BV e VV são agrupadas como multibacilares (JACOBSON e KRAHENBUHL, 1999).

Entre as diferentes formas clínicas observa-se alteração da resposta imune. Nos pacientes com a forma TT nota-se uma forte resposta imune mediada por células, enquanto nos pacientes com a forma VV há ausência ou pouca resposta celular (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Devido ao *M. leprae* ser um micro-organismo de característica intracelular, a resposta imune mediada por células é essencial na eliminação do mesmo (FOSS, 1999), havendo a participação principalmente de macrófagos e linfócitos T CD₄⁺ Th1, que atuam produzindo interferon gama (IFN- γ) e ativam macrófagos a produzir reativos de oxigênio e de nitrogênio, auxiliando na eliminação de micro-organismos intracelulares (JANEWAY *et al.*, 2007).

Pacientes TT apresentam padrão de citocinas predominantemente Th1 (MENDONÇA *et al.*, 2008) com inflamação granulomatosa e, conseqüentemente, baixa carga bacilar (SCOLLARD *et al.*, 2006; FOSS, 1999). Ao contrário, pacientes VV apresentam um perfil de resposta imune Th2, com elevada produção de anticorpos, os quais são ineficazes na eliminação do *M. leprae* (TOUW *et al.*, 1982) e deste modo, apresentam grande quantidade de bacilos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm sido realizados destacando associação entre polimorfismos genéticos de citocinas e susceptibilidade a certas doenças, como o polimorfismo +874 T/A de IFN- γ relacionado com susceptibilidade ao *Toxoplasma gondii* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). Além disso, polimorfismos genéticos na região 5' de *IL12RB2* foram associados com a forma lepromatosa da hanseníase na população japonesa (OHYAMA *et al.*, 2005). Deste modo é de fundamental importância averiguar a ocorrência destes polimorfismos na população amazonense para investigar possível envolvimento destes polimorfismos na resposta imunológica nesta população. No presente estudo foram avaliados polimorfismos genéticos nos genes de *IL12RB2* e IFN- γ em pacientes com hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia da Hanseníase

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica, proveniente da infecção causada pelo *Mycobacterium leprae* e transmitida de pessoa para pessoa, no convívio com doentes multibacilares (MB) sem tratamento (Brasil, Ministério da Saúde, 2005; FOSS, 1999). A hanseníase também é conhecida como Mal de Hansen (MH) e apesar de não ser mortal, constitui um sério problema de saúde pública em muitos países de quase todos os continentes (TALHARI *et al.*, 2006). É mais bem compreendida como doença de dupla associação, sendo uma infecção micobacteriana que resulta no desenvolvimento de resposta imune mediada por células e também pode causar neuropatia periférica (SCOLLARD *et al.*, 2006). A via de transmissão dos micro-organismos é principalmente pelas vias aéreas superiores através de lesões da mucosa nasal, boca e laringe. Não há evidências de veiculação dos bacilos via fômites, artrópodes e insetos hematófagos na transmissão da doença (DUERKSEN, 1997).

A hanseníase não teria a importância que tem se fosse apenas uma doença de pele contagiosa. No entanto, sua predileção pelos nervos periféricos é responsável por causar incapacidades e deformidades nos pacientes (DUERKSEN, 1997). A hanseníase é endêmica no Brasil com aproximadamente 23,3% dos pacientes apresentando graus de incapacidade I e II. Esta situação afeta a vida de milhares de pessoas, devido à hanseníase comprometer o indivíduo imunologicamente, bem como também afetar sua capacidade de sentir dor, visão e tato, tornando os pacientes mais vulneráveis aos riscos de acidentes, como queimaduras, feridas, infecções, amputações e deformidades permanentes, entre outros (Brasil, Ministério da Saúde, 2008^A). Essa preocupação estendeu-se aos direitos humanos em geral e aos direitos específicos para as pessoas afetadas pela hanseníase que já apresentem alguma incapacidade (Brasil, Ministério da Saúde, 2008^B).

O diagnóstico da hanseníase é principalmente realizado através de análise de lesões de pele e/ou nervos espessados e perda sensorial, havendo também a possibilidade de a doença afetar outras áreas, como os olhos, o nariz e os testículos (JACOBSON e KRAHENBUHL, 1999).

Há registro da doença em muitos países de diferentes continentes, havendo no final do século XX aproximadamente um milhão de pacientes em registro ativo, dos quais muitos são encontrados em países com condições sócio-econômica pouco desenvolvidas (DUERKSEN, 1997). Segundo os relatos recebidos de 130 países, o número de novos casos detectados foi de 228.474 em 2010 com prevalência de 3,93/100.000 habitantes, enquanto os dados coletados no primeiro trimestre de 2011 mostram redução para 192.246 novos casos detectados (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2011).

A hanseníase encontra-se mais frequente em nove países, os quais ainda representam um sério problema de saúde pública. Estes países somam ao todo 84% da prevalência e 88% da detecção mundial, e são: Angola, Brasil, República Africana Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e Unidade Republicana da Tanzânia (OMS, 2005). Tais países endêmicos ainda permanecem com alta prevalência, mesmo com intensa atividade no controle da doença (Brasil, Ministério da Saúde, 2008^C). Ao longo dos anos de 2004 a 2010 houve breve redução do número de novos casos detectados no Brasil, tendo o registro de 49.384 casos detectados em 2004 para 34.894 casos em 2010 (OMS, 2011). Embora, estes dados indiquem diminuição no coeficiente de detecção da doença no Brasil, para 1,24/10.000 habitantes em 2011 (Brasil, Ministério da Saúde, 2011), a meta esperada para 2010 não foi alcançada, uma vez que a proposta da OMS era de prevalência inferior a 1/10.000 habitantes (OMS, 2009).

O Brasil é o país da América do Sul que tem o maior número de casos registrados com variações nas taxas de prevalência entre as diferentes regiões. Os maiores índices são encontrados nas Regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste, respectivamente, com destaque para Mato Grosso e Tocantins com coeficiente de detecção de 7,52 e 5,91 para 10.000 habitantes, respectivamente. Atualmente a prevalência da hanseníase no Estado do Amazonas encontra-se em 1,13/10.000 habitantes e a prevalência em 15,44/100.000 habitantes (Brasil, Ministério da Saúde, 2011).

Os programas de controle de doenças em países endêmicos, em parceria com a OMS, implementaram em 1981 a poliquimioterapia no tratamento de pacientes com hanseníase e desde então, houve grande expectativa de cura e redução destes índices de hanseníase (GOULART *et al.*,

2002). O controle da hanseníase tem reduzido drasticamente o número de pacientes nas últimas décadas, no entanto, ainda há um número significativo de pacientes com hanseníase nos países da África, da Ásia e da América Latina (OMS, 2006).

2.2 Agente etiológico

O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente de crescimento lento, que realiza uma divisão binária entre 12 a 21 dias (GOULART *et al.*, 2002).

A parede celular das micobactérias é constituída por uma camada de peptideoglicano, galactano, arabinogalactano, lipomanana, lipoarabinomanana, N-acetilglucosamina e N-glicolilmuramato. Os componentes de N-acetilglucosamina e N-glicolilmuramato encontram-se ligados a uma camada de galactano adjacente à camada de peptideoglicano através do arabinogalactano. O *M. leprae* também apresenta uma camada mais externa e uma cápsula contendo ácido micólico e glicolípido fenólico-I (PGL-I) (SCOLLARD *et al.*, 2006).

A parede celular do *M. leprae* apresenta composição semelhante à de outras micobactérias, com um complexo de ácidos micólicos-arabinogalactana-peptideoglicanos ligados covalentemente. No entanto, uma característica do *M. leprae* que o diferencia das outras espécies de micobactérias baseia-se na razão de arabinose para galactose, sendo a primeira presente em grandes quantidades no *M. leprae* (DRAPER *et al.*, 1987). Outra diferença entre as espécies de micobactérias está no PGL-I, pois diferentemente das demais micobactérias o PGL-I de *M. leprae* é constituído de 2,3-di-O-metil-6-deoxihexose, 3-O-metil-deoxihexose e de um 3,6-di-O-metilhexose, composição esta que permite distinguir das outras espécies (HUNTER e BRENNAN, 1981). O PGL-I apresenta atividade antigênica, com altos níveis de anticorpos (HUNTER *et al.*, 1982; TEUSCHER *et al.*, 1985).

O peptideoglicano do *M. leprae* pode apresentar em sua composição resíduos de ácido de diaminopropiônico (DAP) e de glicina que permitem que o bacilo escape do reconhecimento pelos receptores de domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo 1, 2 (NOD1 e NOD2, respectivamente) presentes no citosol das células, e desta forma evite a resposta imune inata do hospedeiro (MAHAPATRA *et al.*, 2008). Além disso, no *M. leprae* é observada

redução genômica quando comparado ao *M. tuberculosis*, porém persistindo genes essenciais para a produção de enzimas importantes que possibilitam a sobrevivência do bacilo nas células do hospedeiro (COLE *et al.*, 2001).

2.3 Patogenia

A mucosa nasal, além de fonte de eliminação é também a principal via de penetração do bacilo no organismo. Na maioria das vezes a resposta imune é eficaz na eliminação destes bacilos, porém, em outros casos há a passagem das bactérias para o sangue e, conseqüentemente, disseminação para a pele, os nervos e/ou as vísceras (TALHARI *et al.*, 2006). O bacilo de *M. leprae* apresenta preferência por regiões frias do corpo, além de apresentar tropismo por células de Schwann, sendo os bacilos livres capturados por macrófagos (GOULART *et al.*, 2002).

O *M. leprae* é encontrado nos fagossomos de macrófagos infectados, sendo que o mesmo impede a fusão do lisossomo e formação do fagolisossomo. Em estudos experimentais com camundongos é observada a fusão do lisossomo ao fagossomo em um período mínimo de 14 horas após a infecção (SIBLEY *et al.*, 1987). Assim como, observa-se um rápido desenvolvimento de resposta inflamatória localizada com hiperplasia dos linfonodos e recrutamento de linfócitos TCD₄⁺ e TCD₈⁺ (DUTHIE *et al.*, 2007).

A disseminação de bacilos pelo organismo resulta no aumento da carga bacilar nos macrófagos, células endoteliais linfáticas e nos vasos sanguíneos. Conseqüentemente o *M. leprae* pode também circundar nervos periféricos, ocupando mais intensamente a camada externa e podendo sobrecarregar a camada mais interna do nervo (SCOLLARD *et al.*, 1999).

2.4 Classificação da hanseníase

A hanseníase como outras doenças, tem recebido numerosas classificações e nos últimos anos, a OMS tem estimulado países endêmicos a classificarem os pacientes segundo o número de lesões cutâneas, facilitando a indicação do tratamento a ser adotado no tratamento do paciente (Brasil, Ministério da Saúde, 2005).

O sistema de classificação de Ridley-Jopling é realizado com base nos parâmetros clínicos, tais como lesões cutâneas, alterações motoras e

sensoriais e na análise histopatológica de biópsia da lesão. Com base a estes parâmetros a hanseníase pode ser classificada em tuberculoide (TT), borderline tuberculoide (BT), borderline (BB), borderline virchowiano (BV) e virchowiano (VV) (JACOBSON e KRAHENBUHL, 1999).

Para a OMS a classificação dos pacientes com hanseníase pode ser realizada segundo o número de lesões e troncos nervosos afetados, sendo que pacientes com lesão única ou com duas a cinco lesões (formas I, TT e BT) são classificados como hanseníase paucibacilar (PB) e pacientes com mais de cinco lesões (formas BB, BV e VV) como multibacilar (MB) (JACOBSON e KRAHENBUHL, 1999). Segundo outros critérios também estabelecidos pela OMS em 1982, os pacientes paucibacilares apresentam índice baciloscópio (IB) inferior a 2, enquanto pacientes MB apresentam IB igual ou superior a 2. No entanto, há algumas exceções, como nos casos de pacientes classificados como TT ou BT segundo avaliação clínica que apresentam IB igual ou superior a 2. A avaliação clínica é de fundamental importância, porém a mesma deve ser realizada em associação com outros exames laboratoriais, como a baciloscopia e histopatologia, para uma real visão do problema e deste modo aplicar um melhor tratamento ao paciente (PARKASH, 2009).

2.5 Manifestações clínicas e imunológicas

De um modo geral, a hanseníase tem início com a forma indeterminada, caracterizada pelo aparecimento de manchas hipocrômicas, com alteração da sensibilidade, ou simplesmente por áreas de hipoestesia na pele (ARAÚJO, 2003). De acordo com a resposta imune mediada por células (CMI) a ser desenvolvida, a forma indeterminada pode evoluir para cura ou para uma das outras formas clínicas (FOSS, 1999).

Pacientes TT apresentam intensa CMI e hipersensibilidade tardia, com isso apresentam lesões em placa ou máculas bem demarcadas, em geral com hipoestesia, hipopigmentação, inflamação granulomatosa e destruição dos bacilos (SCOLLARD *et al.*, 2006; FOSS, 1999). A resposta imune é mediada principalmente por linfócitos T CD₄⁺ e macrófagos que atuam em conjunto na eliminação do *M. leprae* (HAANEN *et al.*, 1991). Estes pacientes normalmente apresentam lesões escamosas, secas, sem pelos e em estado de anestesia, resultante da destruição de fibras nervosas (WALKER e LOCKWOOD, 2006).

Os granulomas formados são importantes não somente na composição de barreira que impede a disseminação do bacilo, mas como também na formação de um ambiente favorável para as células do sistema imunológico atuarem na destruição do micro-organismo (ALGOOD *et al.*, 2005). Nos granulomas são encontrados muitos tipos celulares como linfócitos T e B, macrófagos e neutrófilos (ALGOOD *et al.*, 2004). Nos granulomas de pacientes com a forma clínica tuberculoide é observada organização de macrófagos circundados por linfócitos TCD₄⁺ e, subsequentemente linfócitos TCD₈⁺, enquanto que nos pacientes VV é observado granuloma difuso (MODLIN *et al.*, 1988; OCHOA *et al.*, 2001). As linfócitos TCD₈⁺ são produtoras de granulolisinas em grande escala, sendo observada correlação de células produtoras de granulolisinas com as formas clínicas da hanseníase (OCHOA *et al.*, 2001).

Linfócitos TCD₄⁺ Th1 estão presentes em grandes quantidades em pacientes tuberculoides, responsáveis pela produção de Interferon-Gama (IFN- γ), Interleucina-2 (IL-2) e Linfotoxina- α (LT- α). Especificamente IFN- γ e LT- α atuam sobre outras células como leucócitos, células endoteliais, queratinócitos e em fibroblastos induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, deste modo, estimulando a vasodilatação e o recrutamento de células da imunidade inata (SPELLBERG e EDWARDS, 2001).

Em pacientes VV, que não apresentam resistência ao *M. leprae*, são observadas lesões pouco demarcadas ou nodulares por todo o corpo, contendo grande quantidade de bacilos (SCOLLARD *et al.*, 2006) e altos níveis de anticorpos IgM (CHO *et al.*, 1983). Há também envolvimento da mucosa nasal, com o risco de congestão nasal e epistaxe, podendo resultar em deformidades e comprometimento da cavidade nasal anterior (WALKER e LOCKWOOD, 2006).

Já as formas borderline são caracterizadas por lesões de pele intermediárias entre as formas TT e VV, apresentando desde manchas em placas, máculas ou manchas semelhantes a nódulos, como encontrado em pacientes VV (WALKER e LOCKWOOD, 2006).

Nas diferentes formas clínicas da hanseníase, são encontradas variações nas populações de linfócitos T (CD₃⁺), correspondendo

aproximadamente 61% nas lesões de pacientes com a forma tuberculoide e de 40% nas lesões de VV (MODLIN *et al.*, 1988).

Em pacientes VV é notável resposta favorável com administração intradérmica de IL-2 recombinante, devido ao recrutamento de novas células mononucleares que atuam na defesa do organismo. Embora a administração de IL-2 promova melhora ao paciente, a mesma é insuficiente em promover a cura, sendo observada expansão do bacilo em 21 dias após a última injeção de IL-2, sugerindo que esta citocina apresenta um importante papel na migração de novas células para o local da infecção (KAPLAN *et al.*, 1989).

O teste Mitsuda é amplamente utilizado para avaliar a CMI nos pacientes com hanseníase através de injeção intradérmica de bacilos mortos, sendo que nos pacientes TT o teste é positivo enquanto para os pacientes VV negativo. Nos pacientes BV, BB e BT, há redução progressiva da resposta CMI acompanhada pelo aumento de lesões de pele e nervos afetados, com aumento dos níveis de anticorpos e de bacilos, e com isso o teste Mitsuda está sujeito a apresentar resultados variáveis (GOULART *et al.*, 2002).

2.6 Resposta imunológica ao *Mycobacterium leprae*

A resposta CMI é o principal mecanismo efetor dos linfócitos TCD₄⁺ Th1 que atuam contra micro-organismos intracelulares que sobrevivem e se replicam dentro de fagócitos ou em células não-fagocíticas (OCHOA *et al.*, 2001; ABBAS *et al.*, 2008).

As micobactérias apresentam lipoproteínas conservadas em sua superfície que atuam na ativação dos monócitos via receptores Toll-like (TLR), induzindo a produção de Interleucina-12 (IL-12), citocina que estimula a produção de IFN- γ em células Natural Killer (NK) e na polarização e amplificação da resposta Th1 contribuindo para a imunidade protetora do hospedeiro (BRIGHTBILL *et al.*, 1999; ABBAS *et al.*, 2008).

Lipoproteínas presentes na superfície de *M. leprae* medeiam ativação celular induzindo a síntese de IL-12p40 via TLR2 e TLR2-TLR1 (KRUTZIK *et al.*, 2003). O TLR2 apresenta importante papel na resposta imune frente ao *M. leprae*. No entanto, não somente o TLR2 está envolvido no reconhecimento do bacilo, uma vez que há redução parcial na ativação de macrófagos e produção de IL-12 com anti-TLR2 (KRUTZIK *et al.*, 2003; MAEDA *et al.*, 2005). Contudo,

a expressão de receptores TLR no local da lesão é determinante para a evolução da doença (KRUTZIK et al., 2003), assim como, mutações presentes no TLR2 podem influenciar no desequilíbrio de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (KANG et al., 2004).

Com a invasão do micro-organismo ao hospedeiro, os fagócitos, tais como as células dendríticas migram aos linfonodos e apresentam antígenos às células T e em conjunto com as citocinas produzidas estimulam a diferenciação dos linfócitos T em linfócitos Th1 ou Th2 (XU et al., 2004). Os linfócitos TCD₄⁺ Th1 produzem IFN- γ , que atua na ativação dos macrófagos, auxiliando na destruição de micro-organismos intracelulares (BARRIE e PLEVY, 2005).

Assim como a IL-12 e o IFN- γ , o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) exerce importante papel na formação de granulomas e no controle de infecções micobacterianas, assim como na indução de quimiocinas essenciais para a migração de células para o local da infecção. Estudos relatam o TNF- α como principal regulador de direcionamento celular para o tecido (ALGOOD et al., 2005; ALGOOD et al., 2004)

Durante a infecção pelo *M. leprae*, há o desencadeamento de resposta inflamatória, havendo aumento do número de células nos linfonodos, tais como células dendríticas, granulócitos, macrófagos e linfócitos T CD₄⁺ e CD₈⁺. Também ocorre aumento na produção de IFN- γ , indicando que *M. leprae*, estimula a expansão de células e induz a produção de IFN- γ nos linfonodos (DUTHIE et al., 2007). Elevada produção de IFN- γ é observada em pacientes TT (HAANEN et al., 1991), enquanto há redução ou ausência desta citocina nos pacientes VV ou BV, sendo este efeito relacionado com a redução da resposta imune celular (NOGUEIRA et al., 1983; HUSSAIN et al., 1999; LIBRATY et al., 1997). Com a neutralização de IFN- γ tem sido observada produção significativa de IL-10 nas formas TT e VV, resultando em crescimento bacteriano. Portanto, o IFN- γ exerce importante papel na regulação de IL-12 e IL-10 em monócitos nos pacientes com hanseníase (LIBRATY et al., 1997; SUGAWARA et al., 1999).

Estudo em modelo experimental demonstra que o PGL-I do *M. leprae* pode atuar na supressão da resposta imunológica, afetando a proliferação de

populações de linfócitos TCD₄⁺ e TCD₈⁺ (HASHIMOTO *et al.*, 2002). Assim como, o bacilo induz em monócitos a produção de quimiocinas inibitórias como proteínas quimiotáticas de monócitos MCP-1 (SINSIMER *et al.*, 2010).

A resposta imunológica dos pacientes com hanseníase é mediada em parte pela liberação de citocinas, havendo uma dinâmica entre IFN- γ , IL-10 e IL-12. No contato com o *M. leprae* é observada produção de IL-12 em todas as formas clínicas, porém, com baixa produção nos pacientes VV (LIBRATY *et al.*, 1997), que pode também estar associada com a produção da IL-10 durante a infecção bacteriana, visto que a presença desta citocina tem sido relacionada com a supressão de mediadores inflamatórios (KANG *et al.*, 2004).

2.7 IL12R e sinalização intracelular

O receptor de IL-12 (IL12R) é um heterodímero constituído por duas subunidades β 1 e β 2 (PRESKY *et al.*, 1996) sendo uma estrutura de fundamental importância para a ligação de IL-12 nas superfícies das células NK e linfócitos T durante a resposta imune inata ou adaptativa. Em humanos, as cadeias β 1 e β 2 exercem um importante papel na transdução de sinal (GATELY *et al.*, 1998). Embora somente a cadeia β 2 contenha resíduos de tirosina quinase necessários para sinalização celular, as cadeias β 1 e β 2 são essenciais para proporcionar maior estabilidade na ligação IL-12/IL12R (ROGGE *et al.*, 1997).

O IL12R não é expresso na superfície de linfócitos T *naïve*, sugerindo que a apresentação de antígenos aos linfócitos T induz a expressão do receptor nestas células, uma vez que é encontrada maior número de IL12R β 2 sobre linfócitos T ativados (ROGGE *et al.*, 1997; SZABO *et al.*, 1997). A ligação da citocina IL-12 ao IL12R envolve inúmeras interações, primeiramente a subunidade IL-12p40 interage com a cadeia β 1 e posteriormente as subunidades IL-12p40 e p35 ligam-se a cadeia β 2 do receptor (PRESKY *et al.*, 1998).

Com a ligação de IL-12 ao IL12R ocorre a fosforilação de proteínas da família quinase como Janus associado à quinase 2 (JAK2) e Tirosina quinase 2 (TYK2) em linfócitos T e NK (BACON *et al.*, 1995; ZOU *et al.*, 1997), assim como, fosforilação e transdução de sinais ativadores da transcrição 3 e 4 (STAT-3) e (STAT-4) (ROGGE *et al.*, 1997; JACOBSON *et al.*, 1995). Contudo,

outros fatores de transcrição como GATA-3 podem atuar na inativação de T-bet e conseqüentemente inativando a expressão de STAT-4 sobre estas células (USUI *et al.*, 2003), portanto, afetando a diferenciação de linfócitos Th1.

2.8 A influência da genética na hanseníase

A hanseníase é considerada uma doença multifatorial, com envolvimento de diferentes fatores no desenvolvimento da doença, sendo o ambiente, a micobactéria e o hospedeiro considerados como principais fatores de risco para a hanseníase (MORAES *et al.*, 2006). No entanto, são poucos os indivíduos infectados que desenvolvem a doença, com aproximadamente 0,1 a 1% dos indivíduos da população sendo suscetíveis à hanseníase (BAYLEY *et al.*, 2004). Além disso, populações com etnias diferentes e que convivem em uma mesma área apresentam diferenças na prevalência da doença (MORAES *et al.*, 2006).

Quando considerado o patógeno em si com um possível fator de risco, há algumas contradições, devido à baixa diversidade genética do microrganismo (MOET *et al.*, 2006). Estudos genéticos humanos têm sido altamente informativos, indicando que fatores genéticos podem influenciar na susceptibilidade ao *M. leprae* (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Deste modo, a genética do indivíduo pode atuar como um fator determinante no desenvolvimento de infecções crônicas causadas por microrganismos intracelulares. Assim como, podendo está associada com a susceptibilidade ou desenvolvimento da hanseníase, resultando num equilíbrio entre a imunidade efetora do hospedeiro e a multiplicação do patógeno (BAYLEY *et al.*, 2004).

A genética do indivíduo pode estar envolvida no desenvolvimento da hanseníase em dois momentos, primeiramente com a hanseníase *per se*, ou seja, independente da forma e manifestação clínica e segundo, podendo estar associada com o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença (PREVEDELLO e MIRA, 2007). Assim como, a genética pode também está associada com os estágios reacionais que podem se manifestar antes, durante ou após o término do tratamento (MOET *et al.*, 2006).

Uma vez infectado, a resposta imunológica do hospedeiro é de extrema importância no controle da infecção e durante estas alterações fisiológicas do

organismo, podendo influenciar na resolução da mesma ou na evolução de uma das formas clínicas da hanseníase (MORAES *et al.*, 2006; MOET *et al.*, 2006). Contudo, os genes envolvidos na resposta imunológica ao *M. leprae* podem ser importantes alvos para estudos genéticos nos pacientes (PREVEDELLO e MIRA, 2007), visto que alguns polimorfismos genéticos estão relacionados com baixa produção de citocinas (MORAES *et al.*, 2006), influenciando deste modo no desenvolvimento das diferentes formas clínicas (BAYLEY *et al.*, 2004).

Alguns autores relatam uma possível existência de polimorfismos regulatórios que atuam no controle da expressão gênica, e estes polimorfismos poderiam estar presentes em regiões não codificadoras (HUDSON, 2003). A identificação de oito SNP na região promotora de TNF, resulta numa possível interferência destas variações nucleotídicas na ligação de fatores de transcrição, podendo afetar os níveis de mRNA da citocina (BAYLEY *et al.*, 2004). Para o início da transcrição a RNA polimerase II (Pol II) necessita de uma fosforilação em seu domínio C-terminal, para então tornar-se ativada, ativação esta que poderia ser afetada devido à variação de nucleotídeo na região promotora do gene, resultando em uma expressão gênica reduzida (HUDSON, 2003).

2.9 Polimorfismos genéticos

Os alelos variantes surgiram por mutação nos genes em algum momento no passado. Se existirem pelo menos dois alelos relativamente comuns do *locus* na população, diz-se que o *locus* exibe polimorfismo, considerando uma variante comum quando encontrada em mais de 1% de cromossomos na população geral, a variante constitui o que é conhecido como polimorfismo genético. Além de um alelo normal ou dois alelos polimórficos normais, os *loci* também podem possuir um ou mais alelos variantes raros. Alguns desses alelos raros foram originalmente identificados por causarem doenças genéticas, e outros podem aumentar a susceptibilidade à doença. Alguns polimorfismos são devidos às variantes que consistem em deleções, duplicações, triplicações e assim por diante, de centenas a milhões de pares de bases de DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

No genoma humano, vários genes têm sido associados com a hanseníase e com as diferentes formas clínicas, porém em algumas populações não observa-se nenhuma associação genética (WALKER e LOCKWOOD, 2006), quando associado um gene com a susceptibilidade a hanseníase, em uma outra população o mesmo pode estar associado com a resistência (MORAES *et al.*, 2006).

2.10 Polimorfismos genéticos de IFN- γ

O gene de IFN- γ apresenta importante papel imunológico e está localizado no cromossomo 12q24.1, sendo constituído de quatro éxons e três íntrons distribuídos em aproximadamente seis kilobases (Kb). Algumas variações genéticas estão presentes em regiões não codificantes, embora este gene seja caracterizado por apresentar poucos polimorfismos genéticos (PACHECO *et al.*, 2008).

Os primeiros relatos de variações genéticas presentes em IFN- γ foram apresentados por Pravica e colaboradores em 1999. Neste estudo, os autores relacionaram a presença do alelo com 12 repetições de CA denominado de alelo 2 com uma maior produção de IFN- γ *in vitro*. Os maiores níveis da citocina foram encontrados quando em homozigose para o mesmo alelo, sugerindo deste modo, o importante papel desta variante na regulação da expressão gênica.

Posteriormente foi descrita correlação absoluta do alelo 2 com o polimorfismo nucleotídico individual (SNP) +874T/A adjacente ao microsatélite no primeiro íntron de IFN- γ . Curiosamente, todos os indivíduos com o alelo +874 T apresentariam o alelo 2 com 12 repetições de CA. Portanto, o SNP +874 (rs2430561) também tem sido relacionado com os níveis de citocina produzida (PRAVICA *et al.*, 2000).

O SNP +874 é caracterizado pela alteração de Timina para Adenina (T>A) (PRAVICA *et al.*, 2000) e a localização deste SNP coincide com o local de ligação do Fator nuclear kappa B (NF- κ B) (HEINMEYER *et al.*, 1998) e deste modo, tal SNP afeta a transcrição do gene de IFN- γ .

O NF- κ B é um fator de transcrição que reconhece a sequência ANTYYC como sítio de ligação para a transcrição gênica, o N representando algum

nucleotídeo não específico e o Y podendo ser uma Citosina ou Timina (SICA et al., 1992). Nas proximidades da posição +874 do gene de IFN- γ é encontrada a combinação de AATCTC quando o alelo +874 T está presente. Portanto, o SNP +874 T/A está relacionado com diferentes níveis de IFN- γ produzido, devido à alteração do sítio de ligação do NF- κ B quando na presença do alelo A, deste modo, influenciando em falhas na transcrição do gene (PRAVICA et al., 2000).

Assim como descrito para a tuberculose, o SNP +874 T/A tem sido relacionado com a susceptibilidade à toxoplasmose (VALLINOTO et al., 2010; SELMA et al., 2011; MOSAAD et al., 2010). Indivíduos com o genótipo A/A na posição +874 produzem menos IFN- γ quando comparados aos indivíduos dos genótipos T/T e T/A. Este fato sugere um possível mecanismo que poderia explicar a relação do genótipo A/A ao dano ocular causado pelo *T. gondii* (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Entre os diferentes genótipos são encontradas variações na concentração de IFN- γ no plasma de pacientes com tuberculose e de indivíduos controles, sendo os maiores níveis encontrados em indivíduos homocigóticos para o alelo T. Portanto, de acordo com o número de cópias do alelo A, há certa redução da ativação da resposta imune celular e conseqüentemente maior chance de desenvolver a doença, sendo o genótipo A/A relacionado com o desenvolvimento da tuberculose extrapulmonar (VALLINOTO et al., 2010).

2.11 Polimorfismos genéticos de IL12RB2

O gene *IL12RB2* humano, localizado no cromossomo 1p31.2, codifica a cadeia β 2 do receptor de IL-12, e apresenta importante papel na transdução de sinais intracelulares. A expressão da cadeia β 1 na superfície celular pode estar alterada devido à mutações presentes no gene de *IL12RB2* (SAKAI et al., 2001).

Os primeiros relatos de variações genéticas presentes na região promotora do gene *IL12RB2* estariam relacionados na regulação da expressão da cadeia β 2 do receptor e foram destacados por Rietschoten e colaboradores em 2001. Atividade transcricional de *IL12RB2* tem sido observada sobre

diferentes fragmentos da região promotora do mesmo, sendo que o fator de transcrição NFATc2 atua como regulador da expressão de *IL12RB2*, assim como, fatores de transcrição da família SP-1 atuam na expressão do receptor (RIETSCHOTEN et al., 2001). A partir de então, foi levantada a hipótese de que SNP presentes em locais de ligação de fatores de transcrição na região promotora influenciariam na expressão deste receptor.

O fator de transcrição GATA-3 afeta a sinalização mediada pela IL-12 por suprimir a expressão da cadeia $\beta 2$ de IL12R e desta forma afeta o desenvolvimento de linfócitos TCD₄⁺ Th1 (OUYANG et al., 1998). Curiosamente, foi identificada presença de cinco SNP na região promotora de *IL12RB2*, sendo estes -237 C/T, -464 A/G, -1023 A/G, -1033 T/C e -1035 A/G. Dentre estes SNP três estão relacionados com a formação de local de ligação para GATA, sendo que a combinação -1035G/-1033T, e o alelo -464 A criam local de ligação para GATA na fita consenso reversa (RIETSCHOTEN et al., 2004).

O SNP na posição -464 da região promotora de *IL12RB2* é de particular interesse, devido haver aumento na atividade transcricional da cadeia $\beta 2$ do receptor quando há substituição de A para G (A>G). Deste modo, pode-se sugerir que quando o alelo -464 A presente, pode influenciar na polarização para linfócitos Th2, devido à redução na produção de IL-12R $\beta 2$ (RIETSCHOTEN et al., 2004).

Em estudos posteriores foram identificados 12 SNP presentes na região promotora de *IL12RB2*: -1047 del/T, -1035 A/G, -1033 T/C, -1023 A/G, -650 del/G, -568 A/C, -557 T/C, -550 T/C, -464 A/G, -464 A/C, -202 T/C, e -188 A/C em pacientes de hanseníase. Embora, os SNP -1035 A/G, -1023 A/G, -650 del/G e -464 A/G tenham sido associados com a forma multibacilar da doença, estes pacientes apresentam altos níveis de resposta imune humoral (OHYAMA et al., 2005).

Em estudos de casos-controles, os SNP -1035 A/G, -1023 A/G, -650 del/G e -464 A/G também têm sido associados com doença periodontal, sendo encontrada maior frequência destes SNP na forma mais agressiva da doença (TAKEUCHI-HATANAKA et al., 2008).

Maior expressão de *IL12RB2* tem sido observada no haplótipo -1035A/-1023A/-650G/-464A. Contudo, os SNP presentes na região promotora de

IL12RB2 podem causar diferenças na intensidade da resposta imune mediada por células entre os pacientes (OHYAMA *et al.*, 2005; TAKEUCHI-HATANAKA *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar polimorfismos genéticos presente na região 5' do gene *IL12RB2* e no primeiro íntron de *IFN- γ* em pacientes com hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta.

3.2 Objetivos específicos:

- 1) Analisar polimorfismos genéticos de base única (SNP) na região 5' do gene de *IL12RB2*;
- 2) Analisar o polimorfismo genético na posição +874 T/A do gene de *IFN- γ* ;
- 3) Comparar as frequências genotípicas e alélicas de +874 de *IFN- γ* entre pacientes com hanseníase e indivíduos controle;
- 4) Comparar as frequências genotípicas e alélicas da região 5' de *IL12RB2* entre pacientes com hanseníase e indivíduos controle;
- 5) Avaliar uma possível relação dos polimorfismos estudados com as formas clínicas segundo a classificação operacional e Ridley-Jopling;
- 6) Avaliar uma possível relação dos polimorfismos estudados com dados clínicos.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Estudo transversal de casos e controles com componente analítico. Este estudo foi proposto a partir dos objetivos contemplados pelo projeto “Avaliação do perfil imunológico e de polimorfismos genéticos em pacientes portadores de hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta”, coordenado pela Profa. Dra. Lúcia de Paula. Projeto este que faz parte do Programa de Desenvolvimento Científico Regional (DCR) fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O projeto acima é detentor de liberação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (CEP – FUAM), sob parecer consubstanciado nº 019/2008 (Anexo I).

4.2 Aspectos éticos

Todos os procedimentos descritos neste projeto apresentam o consentimento do CEP da Fundação Alfredo da Matta sob parecer 002/10 (Anexo II).

4.3 População de estudo

A população de estudo foi constituída de 232 indivíduos, dentre os quais, 118 pacientes com hanseníase e 114 indivíduos controles atendidos na FUAM.

4.4 Pacientes com hanseníase

Os participantes convidados a participar deste estudo foram indivíduos de ambos os sexos, atendidos na FUAM, com procedência dos Estados da Amazônia Legal, com idade entre 18 e 65 anos. O diagnóstico da hanseníase foi realizado com o apoio de médicos especializados do corpo clínico da FUAM. Assim como, para complementação do diagnóstico do paciente foram realizados exames como baciloscopia e histopatológico da lesão cutânea. Após a confirmação do diagnóstico clínico o paciente foi convidado a participar do

estudo, momento este em que foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo III). Durante aplicação do TCLE foi realizado uma explicação sobre o estudo e em seguida realizada a entrevista do paciente, utilizando formulário para coleta de informações pessoais e do quadro clínico do paciente (Anexo IV).

Os pacientes foram classificados segundo o sistema de classificação de Ridley e Jopling, a qual se baseia sobre os aspectos clínicos e histológicos do paciente, sendo observada a presença de infiltrado granulomatoso característico de intensa resposta imune celular encontrada em pacientes do pólo tuberculoide, enquanto em pacientes multibacilares observa-se infiltrado inflamatório difuso e predomínio de resposta imune humoral. Assim como, foram também classificados de acordo com a classificação operacional em paucibacilar (PB) e em multibacilar (MB), sendo os pacientes PB caracterizados por apresentar menos de 5 lesões de pele e índice baciloscópico (IB) igual a zero, enquanto os pacientes MB apresentam a partir de 5 lesões de pele e IB maior que zero. Os pacientes PB foram ainda classificados como formas: indeterminada (I), tuberculoide (TT) ou borderline-tuberculoide (BT), enquanto que os pacientes MB: em borderline-borderline (BB), borderline-virchowiano (BV) ou virchowiano (VV).

Foram excluídos do presente estudo mulheres gestantes, pacientes apresentando alguma imunodeficiência ou com alguma doença infecciosa, assim como pacientes indígenas e pacientes cosanguíneos (até 3º grau de parentesco com pacientes incluídos). Estas informações foram adquiridas no ato da entrevista e na busca de prontuários do paciente seis meses após a inclusão do mesmo no estudo.

4.5 Grupo controle

O grupo controle foi constituído de indivíduos provenientes também da FUAM, sendo pacientes sem evidências clínicas atuais ou pretéritas de hanseníase, sem relação de parentesco entre si e sem relação de parentesco com pacientes hanseníacos e com idade de 18 a 65 anos. A abordagem foi realizada após coleta de sangue para exames solicitados, sendo realizada uma explicação sobre o estudo e em seguida realizada entrevista do paciente, utilizando formulário para coleta de informações pessoais e aplicação do TCLE

(Anexo V). Foram excluídos do estudo indivíduos com alguma doença infecciosa ou com alguma imunodeficiência diagnosticada, histórico de hanseníase ou que apresentassem algum grau parentesco com pacientes portadores de hanseníase.

4.6 Material biológico

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo contendo anti-coagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) dos pacientes com hanseníase e dos indivíduos controles. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta onde foi realizada a extração de DNA.

4.7 Extração de DNA

A extração de DNA foi utilizado o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, catálogo [A1120](#)), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de sangue periférico dos pacientes foram centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (RPM) em centrífuga de bancada durante 10 minutos, sendo coletados 100 µL da camada de leucócitos, acrescentados 500 µL de solução salina fisiológica tamponada com fosfato (PBS pH 7,4) para lavagem da amostra. Em seguida as amostras foram novamente centrifugadas a 3000 RPM durante 10 minutos, seguindo-se as etapas de extração de DNA proposto pelo fabricante do Kit.

4.8 Quantificação do DNA extraído

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro de microvolume, em comprimentos de onda de 260 e 280 nm (ATCGene, ASP-3700). Após a homogenização da amostra foram utilizados 2 µL para quantificação do DNA em ng/µL e determinação da pureza através da razão entre a absorbância 260/280nm.

4.9 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores da região promotora de *IL12RB2* foi utilizada a sequência publicada no banco *GenBank*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) localizado na página do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com o número de acesso "AL389925.10", correspondente a mesma sequência utilizada por Ohyama e colaboradores 2005, enquanto para *IFN- γ* foi utilizada a sequência J00219 como referência para elaboração dos iniciadores.

Para a visualização da sequência e elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores foi utilizado a ferramenta de bioinformática *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999). Esta ferramenta foi empregada para o desenho e alinhamento dos iniciadores com as respectivas sequências de referência.

Para o gene de *IFN- γ* realizamos somente o desenho do iniciador senso, sendo utilizado o *anti-senso* no qual foi descrito por Bozzi e colaboradores, 2009.

Após a determinação das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estes foram analisados com auxílio do programa *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) com intuito de verificar uma possível inespecificidade com alguma outra sequência de não interesse.

4.10 PCR de IL12RB2 e IFN- γ

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas para amplificação da região de interesse de cada gene.

Nas PCR foram utilizados Platinum[®] Taq DNA Polimerase contendo Tampão Rxn (10X), MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, catálogo: 10966-030), dNTP Mix (10 μ M) (Fermentas, catálogo: R0192), iniciadores (10 μ M) (Invitrogen) e amostra de DNA em uma concentração final para reação contendo aproximadamente de 50-200 ng.

Para a amplificação da região promotora de *IL12RB2* foram utilizados o iniciador senso 5'CAGAAAAGATCAGCAAATTTAGGATATTTGG3' que se hibridiza entre as posições 59293 e 59323, segundo a sequência AL389925.10 (Fig. 1). O iniciador anti-senso 5'TCACCACTCCCGTATAGGTCCC3' se hibridiza entre as posições 60220 e 60199 (Fig. 2), sendo o produto final de 928 pares de bases (pb).



Fig. 1: Alinhamento do iniciador senso de *IL12RB2*.

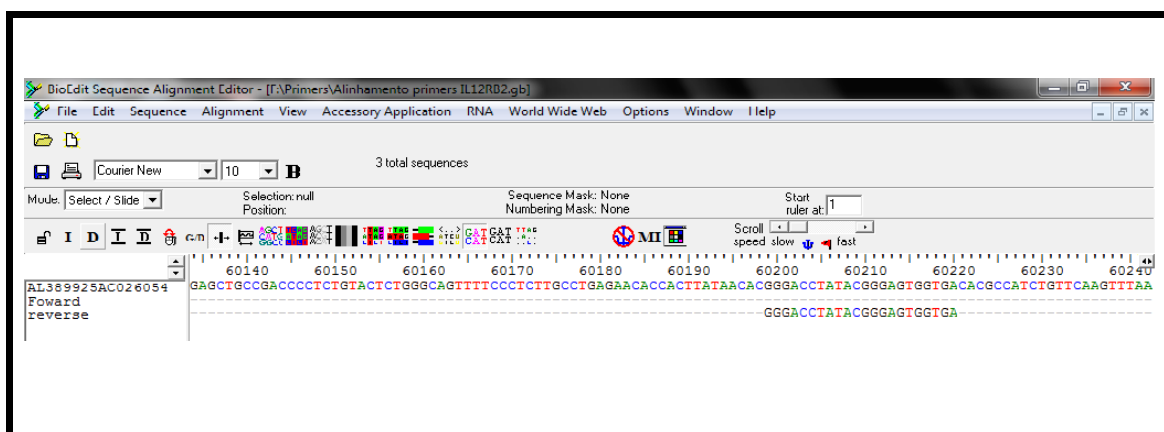


Fig. 2: Alinhamento do iniciador anti-senso de *IL12RB2*.

Obs: A sequência do iniciador correspondente encontra-se em reverso complementar na Fig. 2 para alinhamento do iniciador com a sequência no programa.

Para a amplificação do primeiro íntron de *IFN-γ* foram utilizados os iniciadores senso 5' TCGTTGCTCACTGGGATTTTG 3' e o iniciador anti-senso 5' CATCTACTGTGCCTTCCTGT 3', sendo o anti-senso descrito por Bozzi e colaboradores 2009, com um produto de 322 pb.

Os volumes e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR para *IL12RB2* e de *IFN-γ* estão descritos na Tabelas 1.

Tabela 1: Volume e concentração final de reagentes utilizados para a amplificação da região promotora de *IL12RB2* e *IFN- γ* .

Reagente	Volume na Reação	Concentração Final
Tampão (10X)	2,5 μ L	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 μ L	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 μ L	0,2 μ M
Iniciador (10 μ M)	1 μ L (cada iniciador)	0,4 μ M
Taq (5 U/ μ L)	0,2 μ L	1 Unidade
Total	25 μL	

Após a quantificação do DNA da amostra foram determinados os volumes utilizados na PCR e assim os volumes utilizados de cada reagente (Tabela 1) utilizou-se água ultra-pura para completar o volume final de 25 μ L.

A PCR foi realizada em um termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems). O programa utilizado na reação de PCR foi: uma etapa para desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 65°C para *IL12RB2* e 61°C para *IFN- γ* por 30 segundos e uma etapa para extensão a 72°C por um minuto, seguindo-se de extensão final a 72°C durante sete minutos.

4.11 Eletroforese em gel de agarose

Para a confirmação da amplificação dos genes de *IL12RB2* e *IFN- γ* os *amplicons* foram separados em gel de agarose a 1% corado com *SYBR Safe* (Invitrogen, catálogo: [S33102](#)). Foram adicionados ao gel de agarose 5 μ L do produto da PCR e 1 μ L de *Loading Dye* (Qiagen, catálogo: [1037650](#)). A eletroforese foi realizada em cuba alimentada por fonte de eletroforese a 100 V, 100mA, constantes durante 50 minutos.

A amplificação das PCR foi confirmada quando observado fragmento de DNA com tamanho correspondente a 322 pb para *IFN- γ* e de 928 pb para *IL12RB2*, comparados com o padrão de peso molecular de 100 pb *DNA ladder plus* (Gibco, catálogo: [10787-018](#)).

4.12 Purificação do Produto da PCR para a reação de sequenciamento

A purificação de cada do produto da PCR foi realizada através do Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, catálogo: [A9281](#)), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram utilizados nas reações de sequenciamento.

4.13 Reação de Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento de cada gene foram utilizados os mesmos iniciadores utilizados na PCR, sendo utilizados em reações individualizadas, utilizando o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, catálogo: [4337455](#)). Para o sequenciamento de *IL12RB2* foram utilizados aproximadamente de 5-20 ng de DNA da amostra, enquanto para *IFN- γ* foi utilizado de 3-10 ng de DNA, as diferenças das concentrações de DNA de cada gene são recomendadas em função do tamanho do fragmento a ser sequenciado. Os reagentes utilizados na reação e seus respectivos volumes estão descritos na Tabela 2.

A determinação do volume de DNA purificado a ser utilizado na reação de sequenciamento foi de acordo com a quantificação do mesmo, após a leitura da amostra realizada no espectrofotômetro (ATCGene ASP-3700). Após quantificação do purificado da PCR foram determinados os volumes utilizados na reação de sequenciamento, assim como os volumes utilizados de cada reagente (Tabela 2) utilizou-se água ultra-pura para completar o volume final de 10 μ L.

Tabela 2: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento

Reagente	Volume na reação
BigDye® Terminator v 3.1 (Applied Biosystems)	0.3 μ L
Tampão BigDye 5x	2 μ L
Iniciador a 3,3 μ M (Senso ou Anti-senso)	1 μ L

O programa utilizado na reação de sequenciamento foi de acordo com Platt e colaboradores 2007, consistindo de uma etapa inicial de desnaturação a

96° por um minuto, 15 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridização do iniciador a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por um minuto e 15 segundos, seguindo com 5 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por um minuto e 30 segundos, e 5 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por dois minutos.

4.14 Purificação do produto da reação de sequenciamento

Após término da reação de sequenciamento foram realizadas as etapas de purificação da mesma, de acordo com o protocolo de purificação EtOH/EDTA/Acetato de Sódio (Applied Biosystems) (Anexo VI).

4.15 Eletroforese capilar

A separação dos fragmentos de DNA gerados na reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

4.16 Análise de polimorfismos genéticos

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o software *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems, v5.3.1), alinhadas com as respectivas sequências de referência para cada gene utilizando o software SeqMan (DNASTAR Lasergene, v7.0) para montagem dos *contigs* e identificação dos polimorfismos presentes.

4.17 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada com utilização de anticorpos conjugados com fluorocromos para identificação de população de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺ e CD4⁺), linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺ e CD8⁺) e linfócitos T ativos (CD69⁺). O anticorpos foram marcados com os seguintes anticorpos: anti-CD4⁺ fluorocromo PE, anti-CD8⁺ com FITC, anti-CD3⁺ com TC e anti-CD69⁺ com FITC (Becton–Dickinson, Califórnia). Além de tubo controle sem marcação, foi utilizada marcação com anti-CD3⁺, anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺ e anti-CD69⁺.

Após procedimento de marcação com anticorpos, e tratamento com solução de lise de hemácias (*FACS Lysing solution*, BD) foram realizadas etapas de lavagens com PBS e posteriormente realizada leitura no citômetro.

Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos, sendo identificada e selecionada a população de linfócitos. A análise foi realizada em citômetro de Fluxo FACS Calibur (Becton–Dickinson Immunocytometry Systems, Palo Alto, Califórnia) utilizando o software *CellQuest* (v.3.1).

4.18 Quantificação de IFN- γ pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os níveis de IFN- γ foram quantificados por ELISA sanduíche utilizando kit comercial (Kit BD OptEIA – BD Bioscience, San Diego, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura (anticorpo primário) e incubadas a 4°C *overnight*. Após incubação foi realizado bloqueio com 300 μ L/poço de PBS contendo 1% de tampão de bloqueio soro albumina bovina (BSA) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) e incubação a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 100 μ L das amostras para a quantificação de IFN- γ , seguindo-se incubação por 2 horas a temperatura ambiente.

Após incubação e etapas de lavagem foram adicionados 100 μ L do anticorpo secundário biotilado, seguindo-se incubação por 1 hora a temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada com 100 μ L de solução de substrato tetrametilbenzidina (TMB) (Genzyme Diagnostics) e incubação por 30 minutos. A reação foi finalizada com 50 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N 1M), seguindo-se leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm.

4.19 Análise estatística

A distribuição da população quanto a idade e sexo foi comparada pelo teste de Mann-Whitney e χ^2 , respectivamente. As frequências genótípicas e alélicas foram determinadas através de contagem direta e posteriormente comparados pelo teste χ^2 entre pacientes e indivíduos controles, e assim como entre pacientes PB e MB. Para alguns polimorfismos genéticos de IL12RB2 foi sugerido o teste G para aplicação pelo programa BioEstat devido uma das variáveis estudadas apresentar uma frequência absoluta ≤ 5 , o mesmo foi utilizado para comparação para o microsatélite de IFN- γ . O teste χ^2 foi aplicado em cada população estudada para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O

teste t foi utilizado para comparação das subpopulações de linfócitos T utilizando o software *GraphPad Prism* (v.5.0). O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparação dos níveis de IFN- γ entre os genótipos do polimorfismo +874. A razão de chance ou *odds ratio* (OR) e os valores de p foram calculados utilizando o software BioEstat (v.5.2), sendo considerados significativos valores abaixo de 0,05.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p. 576.
- ALBUQUERQUE, M. C.; ALEIXO, A. L. Q. C.; BENCHIMOL, E. I.; LEANDRO, A. C. C. S.; NEVES, L. B.; VICENTE, R. T.; ALMEIDA, M. G. B.; AMENDOEIRA, M. R. R. **The IFN-g +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility**. Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 104, 2009, p. 451-455.
- ALGOOD, H. M. S.; LIN, P. L.; FLYNN, J. L. **Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis**. Clin. Infec. Dis., Vol. 41, 2005, p. 189–93.
- ALGOOD, H. M. S.; LIN, P. L.; JONES, A.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. **TNF influences chemokine expression of macrophages *in vitro* and that of CD11b+ cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection**. J. Immun., Vol. 172, 2004, p. 6846-6857.
- ARAÚJO, M. G. **Hanseníase no Brasil**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Vol. 36, 2003, p. 373-382.
- BACON, C. M.; VICAR, D. W.; ORTALDO, J. R.; REES, R. C.; O'SHEA, J. J.; JOHNSTON, J. A. **Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: Differential use of janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12**. J. Exp. Med., Vol. 181, 1995, p. 399-404.
- BARRIE, A. M. e PLEVY, S. E. **The interleukin-12 family of cytokines: therapeutic targets for inflammatory disease mediation**. Clin. App. Imm. Rev., Vol. 5, 2005, p. 225-240.

BAYLEY, J. P.; OTTENHOFF, T. H. M.; VERWEIJ, C. L. **Is there a future for TNF promoter polymorphisms?** Gen. Immun., Vol. 5, 2004, p. 315–329.

BOZZI, A.; REIS, B. S.; PEREIRA, P. P.; PEDROSO, E. P.; GOES, A. M. **Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis.** Cytok., Vol. 48, 2009, p. 212-217.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6ª Ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de prevenção de incapacidades.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3ª Ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2008^A.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hanseníase e direitos humanos: direitos e deveres dos usuários do SUS.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008^B.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3ª Ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2008^C.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica Hanseníase Brasil – 2011.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011.

- BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R.; YANG, R. B.; BELISLE, J. T.; BLEHASKI, J. R.; MAITLAND, M.; NORGDARD, M. V.; PLEVY, S. E.; SMALE, S. T.; BRENNAN, P. J.; BLOOM, B. R.; GODOWSKI, P. J.; MODLIN, R. L. **Lipoproteins through toll-like receptors host defense mechanisms triggered by microbial.** Science, Vol. 285, 1999, p. 732-736.
- CHO, S. N. ;YANAGIHARA, D. L.; HUNTER, S. W.; GELBER, R. H.; BRENNAN, P. J. **Serological specificity of phenolic glycolipid 1 from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy.** Infect. Immun., Vol. 41, 1983, p. 1077-1083.
- COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J. **Massive gene decay in the leprosy bacillus.** Nature, Vol. 409, 2001, p.1007–11.
- DRAPER, P.; KANDLER, O.; DARBRE, A. **Peptidoglycan and arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*.** J. Gen. Microbiol., Vol. 133, 1987, p. 1187–1194.
- DUERKSEN, F. **Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase.** American Leprosy Missions, 1997.
- DUTHIE, M. S.; REECE, S. T.; LAHIRI, R.; GOTO, W.; RAMAN, V. S.; KAPLAN, J.; IRETON, G. C.; BERTHOLET, S.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHS, J. L.; REDD, S. G. **Antigen-specific cellular and humoral responses are induced by intradermal *Mycobacterium leprae* infection of the mouse ear.** Infec. Immun., 2007, p. 5290–5297.
- FOSS, N. T. **Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos.** An. Bras. Dermatol., Vol. 74, 1999, p. 113-119.
- GATELY, M. K.; RENZENTTI, L. M.; MAGRAM, J.; STERN, A. S.; ADORINI, L.; GUBLER, U.; PRESKY, D. H. **The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses.** Annu. Rev. Immunol., Vol. 16, 1998, p. 495–521.

- GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. **Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae***. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Vol. 35, 2002, p. 365- 375.
- HAANEN, J. B. A. G.; MALEFIJT, R. W.; RES, P. C. M.; KRAAKMAN, E. M.; OTTENHOF, T. H. M.; VRIES, R. R. P.; SPITS, H. **Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria**. J. Exp. Med., Vol. 174, 1991, p. 583-592.
- HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucl. Acids. Symp., Vol. 41, 1999, p. 95-98.
- HASHIMOTO, K.; MAEDA, Y.; KIMURA, H.; SUZUKI, K.; MASUDA, A.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M. ***Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function**. Infec. Immun., Vol. 70, 2002, p. 5167–5176.
- HEINMEYER, T; WINGENDER, E.; REUTER, I.; HERMJAKOB, H.; KEL, A.E.; KEL, O.V.; IGNATIEVA, E.V.; ANANKO, E.A.; PODKOLODNAYA, O.A.; KOLPAKOV, F.A.; PODKOLODNY, N.L.; KOLCHANOV, N.A. **Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL**. Nucleic Acids Res., Vol. 26, 1998, p. 362-367.
- HUDSON, T. J. **Wanted: regulatory SNPs**. Nat. Genet., Vol. 33, 2003, p. 439-440.
- HUNTER, S. W.; FUJIWARAS, T.; BRENNANG, P. J. **Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae***. J. Biol. Chem., Vol. 257, 1982, p. 15072-15078.

- HUNTER, S. W. e BRENNAN, P. J. **A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity.** J. Bacteriol., Vol. 147, 1981, p. 728-735.
- HUSSAIN, R.; KIFAYET, A.; DOJKI, M.; DOCKRELL, H. M. **Selective correlation of interferon- γ , tumour necrosis factor- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with immunoglobulin G1 and immunoglobulin G3 subclass antibody in leprosy.** Immun., Vol. 98, 1999, p. 238–243.
- JACOBSON, R. R. e KRAHENBUHL J. L. **Leprosy.** Lancet, Vol. 353, 1999, p. 655-660.
- JACOBSON, N. G.; SZABO, S. J.; WEBER-NOR, R. M.; ZHONG, Z.; SCHREIBER, R. D.; DARNELL, J. E.; MURPHY, K. M. **Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4.** J. Exp. Med., Vol. 181, 1995, p. 1755-1762.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SCHLÖMCHIK, M. **Immunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença.** 6ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2007.
- KANG, T. J.; YEUM, C. E.; CHUL KIM, B. C. YOU, E.; CHAE, G. **Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation.** Immun., Vol. 112, 2004, p. 674–680.
- KAPLAN, G.; KIESSLING, R.; TEKLEMARIAM, S.; HANCOCK, G.; SHEFTEL, G., JOB, C. K.; CONVERSE, P.; OTTENHOFF, T. H. M.; BECKBLEUMINK, T. M.; DIETZ, M.; COHN, Z. A. **The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin 2.** J. Exp. Med., Vol. 169, 1989, p. 893-907.

- KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; UEMATSU, S.; NG, Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P. J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N. NORGARD, M. V.; BRENNAN, P. J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. **Activation and regulation of toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy.** Nat. Med., Vol. 9, 2003, p. 525-532.
- LIBRATY, D. H.; AIRAN, L. E.; UYEMURA, K.; JULLIEN, D.; SPELLBERG, B.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. **Interferon-g differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy.** J. Clin. Invest., Vol. 99, 1997, p. 336–341.
- MAEDA, Y.; MUKAI, T.; SPENCER, J.; MAKINO, M. **Identification of an immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*.** Infec. Immun., Vol. 73, 2005, p. 2744-50.
- MAGALHÃES, M. C. C. e ROJAS, L. I. **Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil.** Epidemiol. Serv. Saúde, Vol. 16, 2007, p. 75-84
- MAHAPATRA, S; CRICK, D. C.; MCNEIL, M. R.; BRENNAN, P. J. **Unique structural features of the peptidoglycan of *Mycobacterium leprae*.** J. Bacteriol., Vol. 190, 2008, p. 655–661.
- MENDONÇA, V. A.; MELO, G. E. B. A.; TEIXEIRA, A. L. **Imunologia da hanseníase.** An. Bras. Dermatol., Vol. 83, 2008, p. 343-350.
- MODLIN, R. L.; MELANCON-KAPLAN, J.; YOUNG, S. M.; **Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 1988, p. 1213–7.
- MOET, F. J.; PAHAN, D.; SCHURING, R. P.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J. H. **Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy.** J. Infect. Dis., Vol. 193, 2006, p. 346–53.

MORAES, M. Z.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. **Genetics of host response in leprosy.** *Lepr. Rev.*, Vol. 77, 2006, p. 189–202.

MOSAAD, Y.M.; SOLIMAN, O.E.; TAWHID, Z.E.; SHERIF, D.M., **Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in egyptian children with tuberculosis.** *Scand J. Immun.*, Vol. 72, 2010, p. 358-364.

NOGUEIRA, N.; KAPLAN, G.; LEVY, E.; SARNO, E. N.; KUSHNER, P.; GRANELLI-PIPERNO, A.; VIEIRA, L.; GOULD, V. C.; LEVIS, W.; STEINMAN, R.; YIP, Y. K.; COHN, A. **Defective in interferon γ production in leprosy: Reversal with antigen and Interleukin 2.** *J. Exp. Med.*, Vol. 158, 1983, p. 2165-2170.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Thompson & Thompson, **Genética Médica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OCHOA, M. T.; STENGER, S.; SIELING, P. A.; THOMA-USZYNSKI, S.; SABET, S.; CHO, S.; KRENSKY, A. M.; ROLLINGHOFF, M.; SARNO, E. N.; BURDICK, A. E.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. **T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy.** *Nat. Med.*, Vol. 7, 2001, p. 174-179.

OHYAMA, H.; OGATA, K; TAKEUCHI, K.; NAMISATO, M.; FUKUTOMI, Y.; NISHIMURA, F.; NARUISHI, H.; OHIRA, T.; HASHIMOTO, K.; LIU, T.; SUZUKI, M.; UEMURA, Y.; MATSUSHITA, S. **Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor b2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity.** *J. Clin. Pathol.*, Vol. 58, 2005, p. 740–743.

OMS, Organização Mundial de Saúde. **Leprosy today.** In *Leprosy Elimination.* 2005.

OMS, Organização Mundial de Saúde. **Leprosy today**. In *Leprosy Elimination*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. www.who.int/lep/en/. 2006.

OMS, Organização Mundial de Saúde. **Leprosy today**. In *Leprosy Elimination*. 2009.

OMS, Organização Mundial de Saúde. **Weekly epidemiological record**. Vol.86, 2011, p. 389-400.

OUYANG, W.; RANGANATH, S. H.; WEINDEL, K. BHATTACHARYA, D.; MURPHY, T. L.; SHA, W. C.; MURPHY, K. M. **Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism**. *Imm.*, Vol. 9, 1998, p. 745–755.

PACHECO, A.G., CARDOSO, C.C., MORAES, M.O. **IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study**. *Hum. Genet.*, Vol. 123, 2008, p. 477-484.

PARKASH, O. **Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis**. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, Vol. 55, 2009, p. 1–5.

PLATT, A. R.; WOODHALL, R. W.; GEORGE, A. L. **Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol**. *Bio.Tech.*, Vol. 43, 2007, p. 58-62.

PRAVICA, V.; ASDERAKIS, A.; PERREY, C.; HAJEER, A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. **In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene**. *Euro. J. Immunogenet.*, Vol. 26, 1999, p. 1-3.

- PRAVICA, V.; PERREY, C.; STEVENS, A.; LEE, J. H.; HUTCHINSON, I. **A single nucleotide polymorphism in the first intron of the Human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production.** Hum. Immun., Vol. 61, 2000, p. 863-866.
- PRESKY, D. H.; MINETTI, L. J.; GILLESSEN, S.; WILKINSON, V. L.; WU, C.; GUBLER, U.; CHIZZONITE, R.; GATELY, M. K. **Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex.** J. Immun., Vol. 160, 1998, p. 2174–2179.
- PRESKY, D. H.; YANG, H.; MINETTI, L. M.; CHUA, A. O.; NABAVI, N.; WU, C.; GATELY, M. K.; GUBLER, U. **A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two b-type cytokine receptor subunits.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, 1996, p. 14002–14007.
- PREVEDELLO, F. V. e MIRA, M. T. **Hanseníase: uma doença genética?** An. Bras. Dermatol., Vol. 82, 2007, p. 451-9.
- ROGGE, L.; MAINO, L. B.; BIFFI, M.; PASSINI, N.; PRESKY, D. H.; GUBLER, U.; SINIGAGLIA, F. **Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells.** J. Exp. Med., Vol. 185, 1997, p. 825–831.
- RIDLEY, D. S. **The pathology of leprosy.** South. As. J. Trop. Med. Pub. Hea., Vol. 9, 1978, p. 205-208.
- RIETSCHOTEN, J. G. I.; SMITS, H. H.; WETERING, D.; WESTLAND, R.; VERWEIJ, C. L.; HARTOG, M. T.; WIERENGA, E. A. **Silencer activity of NFATc2 in the interleukin-12 receptor β 2 proximal promoter in human T helper cells.** J. Biol. Chem., Vol. 276, 2001, p. 34509–34516.
- RIETSCHOTEN, J. G. I.; WESTLAND, R.; BOGAARD, R.; NIESTE-OTTER, M. A.; VEEN, A.; JONKERS, R. E.; POUWKRANN, T. C. T. M.; HARTOG, M.

T.; WIERENGA, E. A. **A novel polymorphic GATA site in the human IL-12Rb2 promoter region affects transcriptional activity.** *Tiss. Ant.*, Vol. 63, 2004, p. 538–546.

SAKAI, T.; MATSUOKA, M.; AOKI, M.; NOSAKA, K.; MITSUYA, H. **Missense mutation of the interleukin-12 receptor {beta}1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium* complex infection.** *Blood*, Vol. 97, 2001, p. 2688-94.

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

SCOLLARD, D. M.; MCCORMICK, G.; ALLEN, J. L. **Localization of *Mycobacterium leprae* to endothelial cells of epineurial and perineurial blood vessels and lymphatics.** *Amer. J. Path.*, Vol. 154, 1999, p. 1611-1620.

SIBLEY, L. D.; FRANZBLAU, S. G.; KRAHENBUHL, J. L. **Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages.** *Infec. Immun.*, Vol. 55, 1987, p. 680-685.

SICA, A.; TAN, T.H.; RICE, N.; KRETZSSCHMAR, M.; GHOSH, P.; YOUNG, H.A. **The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kB binds to the intronic region of the human interferon-g gene at a site related to and interferon-stimulable response element.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 89, 1992, p. 1740-1744.

SINSIMER, D.; FALLOWS, D.; PEIXOTO, B.; KRAHENBUHL, J.; KAPLAN, G.; MANCA, C. ***Mycobacterium leprae* Actively Modulates the Cytokine Response in Naïve Human Monocytes.** *Infec. Immun.*, Vol. 78, 2010, p. 293-300.

- SELMA, W.B.; HARIZI, H.; BOUGMIZA, I.; HANNACHI, N.; KAHLA, I.B.; ZAIENI, R.; BOUKADIDA, J. **Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in tunisian patients.** DNA and Cell Biol., Vol. 30, 2011, p. 379-387.
- SPELLBERG, B. e EDWARDS, J. E. **Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases.** Clin. Infect. Dis., Vol. 32, 2001, p. 76–102.
- SUGAWARA, I.; YAMADA, H.; KANEKO, H.; MIZUNO, S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. **Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice.** Infec. Immun., Vol. 67, 1999, p. 2585–2589.
- SZABO, S. J.; DIGHE, A. S.; GUBLER, U.; MURPHY, K. M. **Regulation of the interleukin (IL)-12R b2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells.** J. Exp. Med., Vol. 185, 1997, p. 817–824.
- TAKEUCHI-HATANAKA, K; OHYAMA, H.; NISHIMURA, F.; KATO-KOGOE, N.; SOGA, Y.; MATSUSHITA, S.; NAKASHO, K.; YAMANEGI, K.; YAMADA, N.; TERADA, N.; TAKASHIBA, S. **Polymorphisms in the 5' flanking region of IL12RB2 are associated with susceptibility to periodontal diseases in the Japanese population.** J. Clin. Period., Vol. 35, 2008, p. 317–323.
- TALHARI, S.; NEVES, R.G. PENNA, G.O.; OLIVEIRA, M.L.W. **Hanseníase.** 4^a Ed., Manaus, 2006.
- TEUSCHER, C.; YANAGIHARA, D.; BRENNAN, P. J.; KOSTER, F. T.; TUNG, K. S. K. **Antibody response to phenolic glycolipid I in inbred mice immunized with *Mycobacterium leprae*.** Infec. Immun., Vol. 48, 1985, p. 474-479.
- TOUW, J.; LANGENDIJK, E. M.; STONER, G. L., BELEHU, A. **Humoral immunity in leprosy: immunoglobulin G and M antibody responses to**

***Mycobacterium leprae* in relation to various disease patterns.** Infect. Immun., Vol. 36, 1982, p. 885-892.

USUI, T.; NISHIKOMORI, R.; KITANI, A.; STROBER, W. **GATA-3 suppresses th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R 2 chain or T-bet.** Imm., Vol. 18, 2003, p. 415–428.

VALLINOTO, A.C.R.; GRAÇA, E.S.; ARAÚJO, M.S.; AZEVEDO, V.N.; CAYRES-VALLINOTO, I.; MACHADO, L.F.A.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R. **IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis.** Hum. Immun., Vol. 71, 2010, p. 692-696.

WALKER, S. L. e LOCKWOOD, D. N. J. **The clinical and immunological features of leprosy.** Bri. Med. Bull., 2006, p. 1-19.

XU, D.; LIU, H.; KOMA, M. **Direct and indirect role of toll-like receptors in T cell mediated immunity.** Cell. Mol. Immun., Vol. 1, 2004, p. 239-246.

ZOU, J.; PRESKY, D. H.; WU, C. Y.; GUBLER, U. **Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits b1 and b2 and JAK kinases.** J. Biol. Chem., Vol. 272, 1997, p. 6073–6077.

Artigo Original - 1

IFN- γ +875 microsatellite polymorphism as a potential protection marker for leprosy patients from Amazonas state, Brazil

G. A. V. Silva^a, M. P. Santos^a, I. M. Passos^a, A. L. Boechat^a, A. Malheiro^{a,b}, F. G. Naveca^{a,c}, L. de Paula^{a,d*}

^aPrograma de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, Universidade Federal do Amazonas – UFAM

^bInstituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, UFAM

^cInstituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia

^dInstituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, UFAM

*Corresponding author: Lucia de Paula at Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Av General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário, Bloco C, Sala 08, Coroadó I, CEP 69077-000, Manaus – AM, Brazil - Phone: 55 (92) 8123-9811. Email: lpaula.bio@hotmail.com

ABSTRACT

Polymorphisms present in the first intron of IFN- γ may have an important role in the regulation of the immune response, which could have functional consequences for gene transcription. Leprosy patients are characterized by different immune responses in different clinical forms. We investigated a possible association of the +874 polymorphism and CA repeats present in the first intron of IFN- γ with susceptibility to leprosy and with the manifestation of the different clinical forms. Nucleotide sequencing was performed with samples from 108 leprosy patients and 113 controls subjects, as well as immunophenotyping of CD4⁺, CD8⁺ and CD69⁺ T cells by flow cytometry. The data showed that there were no significant differences between patients and control subjects, as well as according classification of Ridley-Jopling. However, the A/A genotype was significantly increased in paucibacillary patients ($p = 0.028$) and the microsatellite encoding 16 CA repeats were significantly associated with paucibacillary compared to multibacillary patients ($p = 0.019$). Individuals homozygous for the +874 A allele, the mean level of CD4⁺ and CD69⁺ T cells was higher. Our data suggest that polymorphisms present in the first intron of IFN- γ are not associated with susceptibility to leprosy, nevertheless,

the +874 polymorphism and the CA repeats number encoded in IFN- γ gene may be related to a higher cellular immune response in patients and are consistently more frequently detected in PB patients.

Keywords: Leprosy; Cellular immunity; Cytokine; Polymorphism.

1. Introduction

Leprosy is an infectious disease characterized by different clinical forms that are associated with the type of immune response against *Mycobacterium leprae*. Patients with the tuberculoid form present a higher cellular immune response, while those with the lepromatous show an increased humoral immune response [1]. The cytokine IFN- γ plays an important role in the activation of NK cells and induction of Th-1 cells in the development of the host immune response [2].

The IFN- γ gene is located on chromosome 12q14.1 and consists of four exons with three intervening introns over approximately six kilobases (kb). Although few genetic polymorphisms have been characterized at this locus, some polymorphisms were described in the non-coding region [3]. To our knowledge the first report of an IFN- γ polymorphism, a CA microsatellite in the first intron of the gene that was associated with cytokine levels, was detected by Pravica et al. [4]. In their study, the authors observed higher IFN- γ expression when 2 alleles encoding 12 CA repeats were present in the genome. A second study demonstrated an absolute correlation of 12 CA repeat with the +874 T allele. However, the +874 single-nucleotide polymorphism (SNP) has also been related to IFN- γ production [5].

The +874 SNP coincides with the binding site for the transcription factor NF- κ B [6], therefore, this SNP may have an important role in the regulation of immune responses by affecting NF- κ B-mediated transcription of the IFN- γ gene. The NF- κ B motif is ANTYYC, with N representing any nucleotide and Y representing a cytosine or thymine [7]. When the +874T allele is present, the sequence AATCTC is close to the +874 SNP. However, the +874 T/A polymorphism can affect IFN- γ levels when the A allele is present, the binding site of NF- κ B is altered [5]. This polymorphism has been associated with tuberculosis [8-10] and toxoplasmosis susceptibility [11]. Individuals from Brazil

and Spain with the +874 A/A genotype express lower IFN- γ levels than those with the A/T and T/T genotypes [8,12]. In different states of Brazil, such as Minas Gerais [13], Paraná [14] and Rio de Janeiro [15], the A allele is more frequently found in the population. Accordingly to those data, our hypothesis is that this +874 A/A genotype is associated with the low cellular response observed in multibacillary patients. In the present study, we investigated whether the +874 T/A SNP and the microsatellite CA repeats are associated with susceptibility to leprosy or with the clinical leprosy form that develops in patients from Amazonas state, Brazil.

2. Study subjects and methods

2.1. Study population

The case-control study consisted of 108 patients with leprosy and 113 control subjects between 18 and 65 years of age. All participants were recruited at Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM), a tertiary health facility located in Manaus, Amazonas, Brazil. All included patients were born in the Brazilian Legal Amazon states. Informed consent was obtained from all participants and the study was approved by the institutional Ethical Committee.

Experienced professionals from FUAM performed the leprosy diagnosis using clinical evaluation methods, which included bacteriological and histological tests. Patients with leprosy were classified based on clinical and histological criteria according to the Ridley-Jopling classification system and were also classified as paucibacillary (PB) or as multibacillary (MB). PB leprosy is characterized by the presence of ≤ 5 skin lesions and a bacteriologic index (BI) of 0, the classification is further subdivided into indeterminate (I), tuberculoid (TT) or borderline tuberculoid (BT) leprosy. MB leprosy is characterized by the presence of > 5 skin lesions and a BI > 0 , the classification can be further histologically characterized as mid-borderline (BB), borderline lepromatous (BL), or lepromatous (LL) leprosy. Pregnant women were excluded from the study, as well as patients with any diagnosed immunodeficiency.

The controls were examined clinically and consisted of genetically unrelated individuals. Individuals with any immunodeficiency, infectious disease or a family history of leprosy were not included.

2.2. Biological material

The peripheral blood of control individuals and patients was collected and used for flow cytometry and DNA extraction using the *Wizard® Genomic DNA Purification* Kit, according to manufacturer's instructions (Promega, Madison, Wisconsin). After elution, DNA was stored at -80°C until use.

2.3. Polymerase chain reaction - PCR

Approximately 50-200 ng of DNA from each sample was used for PCR. We designed the forward primer with the sequence 5'-TCGTTGCTCACTGGGATTTTG-3'. The reverse primer used was identical to one reported by Bozzi et al.[13], with the sequence 5'-CATCTACTGTGCCTTCCTGT-3'. The amplified 322 bp products were separated by electrophoresis with a 2% agarose gel.

2.4. Purification of PCR products and nucleotide sequencing

The PCR product was purified with the *Wizard® SV* Kit (Promega, Madison, Wisconsin), and approximately 3-10 ng of DNA was used in the sequencing reaction. Sequencing was performed using *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, California) with same primers used in the PCR. Capillary electrophoresis was performed using the ABI 3130 DNA sequencer and polymer POP-7™.

2.5. Sequence Analysis

The sequences were initially analyzed using the *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems, v5.3.1) software and were further analyzed with *SeqMan* (DNASTAR Lasergene, v7.0) software to generate contigs and for comparison with the IFN- γ reference gene sequence (GenBank ID: J00219).

2.6. Flow cytometry analysis

Flow cytometry was performed using fluorochrome-conjugated antibodies against cell surface antigens to identify the T cells as CD₄⁺ T cells (CD₃⁺ and CD₄⁺), CD₈⁺ T cells (CD₃⁺ and CD₈⁺) or activated T cells (CD₃⁺ and CD₆₉⁺)

(Becton–Dickinson, California). The population of T cells was identified and gated, and 10,000 events were acquired for each sample. The samples were analyzed in FACS Calibur flow cytometer (Becton–Dickinson Immunocytometry Systems, Palo Alto, California) using *CellQuest* (v.3.1) software.

2.7. Statistical analysis

The Mann-Whitney test and the χ^2 test were used to compare the variation in age and sex between the patients and control subjects, respectively. The genotype and allele frequencies present in each population were initially determined by direct counting; χ^2 tests were then performed to compare these factors between patients and control subjects and between paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) patients as well as to compare allele frequency between PB and MB patients. The G test was used to compare genotype frequency and the microsatellite distribution between PB and MB patients. The χ^2 test was applied to each population to investigate the Hardy-Weinberg equilibrium. The odds ratio (OR) and *p* values were calculated using *BioEstat* (v.5.2) software. A t test was used to compare the T-cell subsets using *GraphPad Prism* (v.5.0) software. *p* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Study population

The participants were all born in the Brazilian Legal Amazon states and each had at least a third degree of kinship from the region. There were no differences between patient and control subjects with regard to age, but gender was skewed, with a high prevalence of male patients. The distribution of patients with PB or MB is similar, with 49.1% and 50.9%, respectively (Table 1).

3.2. Genotype and allele frequencies of the IFN- γ +874 A/T polymorphism

The distribution of genotypes in patient and control subjects is at Hardy-Weinberg equilibrium (Table 2). The IFN- γ +874 A/A and A/T genotypes were more often found than the T/T genotypes in both control and leprosy patients. Significantly increased frequencies of the IFN- γ +874 A/A genotype were noted in PB patients (*p* = 0.028, Table 3), as well as in patients with the TT and BT

forms (data not shown). No significant differences the Ridley-Jopling classification were observed between variant genotypes.

Allele frequencies for IFN- γ +874 are given in Table 3. Allele frequencies did not differ significantly between leprosy patients (classified using Ridley-Jopling) and healthy individuals. Additionally, there were no differences observed between PB and MB patients. Strikingly, the data indicated that individuals T carriers +874 locus display a 23% resistance to leprosy when compared to the OR of leprosy patients and controls (Table 2).

3.3. IFN- γ +874 A/T polymorphism and T-cell subsets

We observed a similar distribution of CD $_8^+$ T cells between genotypes (data not shown); however, a higher median of CD $_4^+$ T cells (Fig. 1A), as well as activated T cells (Fig. 1B) was found in individuals homozygous for the +874 A allele.

3.4. +875 CA repeats

Five alleles were identified with 12 to 16 CA repeats after the +874 polymorphism. A larger number of encoded CA repeats was associated with an increased risk of leprosy development, as indicated by the OR data (Table 4).

Allele 2 is found more frequently in control subjects than in patients (Table 4); however, no significant difference was observed. Significant differences were not observed between the clinical forms of leprosy, but allele 6 (encoding 16 repeats) was associated with PB patients (Table 5).

4. Discussion

IFN- γ is an important cytokine that mediates activation of innate immune cells and the development of an adaptive immune response [2]. It has been observed that a robust cellular response can lead to nerve damage in leprosy patients [16]. Previous studies have associated polymorphisms present in the first intron of the IFN- γ gene with cytokine levels in healthy subjects [4,5] and tuberculosis patients [8,12].

Some genetic polymorphisms have different outcomes in ethnically distinct populations [15,17-18]. All participants included in this study were diligently confirmed to be native to location studied, thus avoiding a genetically

heterogeneous population. Age can be directly related to the development of leprosy, as older individuals have a higher risk of developing the disease [19]. To avoid this complication, the populations examined in this study were of a similar age (Table 1).

We observed a higher frequency of the +874 A/A and A/T genotypes, both in patients and control subjects, similar to what has been reported in other studies, including England [5], China [20], Japan [21], Brazil [22] and India [23], indicating similarities on different continents. In Brazil, the allelic frequency among patients is in agreement with previous studies performed in Minas Gerais [13], Paraná [14] and Rio de Janeiro [15]; thus the A allele appears to be common in the Brazilian population and may be related to the high leprosy rates in Brazil. Other studies found that the +874 A/A genotype was present at a higher frequency in tuberculosis patients, whereas heterozygous genotype was more frequent in controls [8,9,12]. Accordingly, the A/A genotype was most frequently found among leprosy patients and the A/T genotype was most frequently found in control subjects (Table 2).

The +874 A/T polymorphism was associated with tuberculosis or disease severity [8,9,12,20,24], in previous studies, individuals homozygous for the A allele had double the likelihood of developing tuberculosis compared to heterozygotes [12,20]. Heterozygosity may play an important role in the transmission of tuberculosis, because is found in a higher proportion of the healthy and tuberculin-positive contacts of tuberculosis patients [12]. Our data indicated that the individuals +874 T carriers demonstrate a 23% resistance to leprosy, which may suggest that this polymorphism plays an important role in the innate immune response.

The expression level of genes involved in the innate immune response, including the toll-like receptor (TLR), nucleotide oligomerization domain receptor 2 (NOD2) and mannose receptor 1 (MRC1), can affect leprosy susceptibility [25]. The polymorphism present in the first intron of IFN- γ may be according with these genes. Thus, based on our findings and on previous studies, the +874 A/A genotype may alter the expression of genes involved in the innate immune and affect an individual's susceptibility to *M. leprae* because the A/A genotype is present more prevalent in patients than in control individuals. However, our

data does not indicate an association between this genotype and the susceptibility to leprosy.

Consistently, healthy subjects and tuberculosis patients homozygous for the A allele possess CD4⁺ T and CD8⁺ T cells producing higher levels of IFN- γ [23]. Curiously, MB patients and control subjects showed a similar frequency of genotypes; nevertheless, the frequency of the A/A genotype was increased in PB patients indicating that this polymorphism could be related to a large cellular immune response.

A previous study observed different effects of 5' *IL12RB2* polymorphisms on NK and T cells. A certain combination of SNPs has been related to increase expression of IL12R β 2 in T cells, while in NK cells, expression was significantly decreased. Possible explanations for these different outcomes include different binding sites for transcriptional factors in NK compared to T cells [26] and the expression of specific and different transcription factors in each cell type. Our data may be in agreement with this finding, considering that the A/A genotype may be associated with a higher expression of IFN- γ in T cells but a decrease in NK cells. The +874 A/A genotype plays a role in the control of the spread of bacilli; however, this genotype provides no protection from *M. leprae* infection.

In previous studies, the +874 A/A genotype and the microsatellite repeat number have been associated with susceptibility to tuberculosis [20,27]; therefore, it is hypothesized that this combination has differential effects on innate and adaptive immunity. The +874 polymorphism is associated with a functional motif, and the A/T and T/T genotypes are associated with higher expression levels of the cytokine in plasma, demonstrating that the cytokine's levels are associated with the number of copies of the T allele [8]. Therefore, individuals homozygous for the A allele have lower IFN- γ levels than those with the A/T and T/T genotypes [12]. Patients with tuberculosis have lower IFN- γ levels than healthy individuals independent of this genotype [8,28]. The +874 A/A genotype and 16 repeats of the microsatellite may be associated with a large cellular immune response.

The +874 A/A genotype may be involved in the control of infection by *M. leprae*, due to this genotype was found more frequently in patients with TT and BT clinical forms (data not shown). Higher IFN- γ production has been observed in

subjects homozygous for the A allele in response to the *M. leprae* [15]. This observation is confirmed in this study; we observed IFN- γ levels above 10 pg/mL in patients with the A/A genotype, whereas T carriers patients had a mean level of 4 pg/mL (data not shown). Higher IFN- γ production may be related to the number of CD₄⁺ T cells and activated T cells (Fig. 1).

Previous studies have shown that allele 2 with 12 CA repeats in the first intron of the IFN- γ gene, is associated with higher levels of cytokine production *in vitro* [4]. The allele with 11 CA repeats is present at a low frequency in the general population [4,20]; recently, this finding has been corroborated [27]. This allele was not found in this study and may be considered a rare allele. The +874 T allele is correlated with the microsatellite allele 2 with 12 CA repeats [5] and we suggest that the alleles +874 A and 16 CA repeats may be associated with higher IFN- γ production and may have an important role in controlling the spread of *M. leprae*.

The functional significance of the +874 polymorphism has been observed in different tuberculosis studies, where the T allele is related to increased cytokine levels [4,5,12]. Though there is some controversy, the A/A genotype has been observed to lead to higher IFN- γ levels, specifically in response to *M. leprae* [15]. In conclusion, our results suggest that the +874 polymorphism is not associated with susceptibility to leprosy; however, the combination of +874 A/A and 16 CA repeats may be associated with a large cellular immune response to *M. leprae*, based on the higher frequency detected in PB patients.

Acknowledgments

We acknowledge the staff of the Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta, especially Dra. Paula Frassinetti Bessa Rebello, Dra. Silmara Navargo Pennini, Dra. Evenilda Braga Fernandes Oliveira and Maria da Graça Souza Cunha for their assistance with patient recruitment, as well as Maria Marlice Mar Nunes and Maria Cilene Dias da Costa for the attention with the patients. We also acknowledge João Paulo Diniz Pimentel for support on flow cytometry.

Financial Support

This study was supported by Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

References

- [1] V.A. Mendonça, R.D. Costa, G.E.B.A. Melo, C.M. Antunes, A.L. Teixeira, **Imunologia da hanseníase**, An. Bras. Dermatol. 83 (2008), pp. 343-350
- [2] H.D. Brightbill, D.H. Libraty, S.R. Krutzik, R.B. Yang, J.T. Belisle, J.R. Blehaski, *et al.* **Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors**, Science 285 (1999), pp. 732-736
- [3] A.G. Pacheco, C.C. Cardoso, M.O. Moraes, **IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study**, Hum. Genet. 123 (2008), pp. 477-484
- [4] V. Pravica, A. Asderakis, C. Perrey, A. Hajeer, P.J. Sinnott, I.V. Hutchinson, **In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene**, Euro. J. Immunogenet. 26 (1999), pp. 1-3
- [5] V. Pravica, C. Perrey A. Stevens, J.H. Lee, I. Hutchinson, **A single nucleotide polymorphism in the first intron of the Human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production**, Hum. Immun. 61 (2000), pp. 863-866
- [6] T. Heinmeyer, E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A.E. Kel, O.V. Kel *et al.* **Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL**, Nucleic Acids Res. 26 (1998), pp. 362-367
- [7] A. Sica, T.H. Tan, N. Rice, M. Kretzschmar, P. Ghosh, H.A. Young, **The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF- κ B binds to the intronic region of the human interferon- γ gene at a site related to and interferon-stimulable response element**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), pp. 1740-1744
- [8] A.C.R. Vallinoto, E.S. Graça, M.S. Araújo, V.N. Azevedo, I. Cayres-Vallinoto, L.F.A Machado *et al.* **IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis**, Hum. Immun. 71 (2010), pp. 692-696
- [9] W.B. Selma, H. Harizi, I. Bougmiza, N. Hannachi, I.B. Kahla, R. Zaieni *et al.* **Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in tunisian patients**, DNA and Cell Biol. 30 (2011), pp. 379-387
- [10] Y.M. Mosaad, O.E. Soliman, Z.E. Tawhid, D.M. Sherif, **Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in egyptian children with tuberculosis**, Scand J. Immun. 72 (2010), pp. 358-364
- [11] M.C. Albuquerque, A.L.Q.C. Aleixo, E.I. Benchimol, A.C.C.S. Leandro, L.B. Neves, R.T. Vicente *et al.* **The IFN- γ +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility**, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (2009), pp. 451-455

- [12] D. López-Maderuelo, F. Arnalich, R. Serantes, A. González, R. Codoceo, R. Madero *et al.* **Interferon- γ and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Pulmonary Tuberculosis**, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 167 (2003), pp. 970–975
- [13] A. Bozzi, B.S. Reis, P.P. Pereira, E.P. Pedroso, A.M. Goes, **Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis**, *Cytokine* 48 (2009), pp. 212-217
- [14] D.S.A. Franceschi, P.S. Mazini, C.C.C. Rudnick, A.M. Sell, L.T. Tsuneto, M.L. Ribas *et al.* **Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil**, *Inter. J. Infec. Dis.* 13 (2009), pp. 493-498
- [15] C.C. Cardoso, A.C. Pereira, V.N. Brito-de-Souza, I.M. Dias-Baptista, V.C. Maniero, J. Venturini *et al.* **IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians**, *Hum. Genet.* 128 (2010), pp. 481-490
- [16] I.M.B. Goulart, G.O. Penna, G. Cunha, **Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae***, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35 (2002), pp. 365-375
- [17] M.Z. Moraes, C.C. Cardoso, P.R. Vanderborght, A.G. Pacheco, **Genetics of host response in leprosy**, *Lepr. Rev.* 77 (2006), pp. 189–202
- [18] A. Moran, X. Ma, R.A. Reich, E.A. Graviss, **No association between the 874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN- γ gene and susceptibility to TB**, *Int. J. Tuber. Lung. Dis.* 11 (2007), pp. 113-115
- [19] F.J. Moet, D. Pahan, R.P. Schuring, L. Oskam, J.H. Richardus, **Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy**, *J. Infect. Dis.* 193 (2006), pp. 346–353
- [20] H.W. Tso, W.K. Ip, W.P. Chong, C.M. Tam, A.K. Chiang, Y.L. Lau, **Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese**, *Genes Immun.* 6 (2005), pp. 358–363
- [21] C. Ito, M. Watanabe, N. Okuda, C. Watanabe, Y. Iwatani, **Association between the severity of Hashimoto's disease and the functional +874 A/T polymorphism in the interferon- γ gene**, *Endocr. J.* 53 (2006), pp. 473-478
- [22] L.H.L.V. Amim, A.G. Pacheco, J. Fonseca-Costa, C.S. Loredó, M.F. Rabahi, M.H. Melo *et al.* **Role of IFN- γ +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects**, *Mol. Biol. Rep.* 35 (2008), pp. 563-566
- [23] S.P. Anand, M. Harishankar, P. Selvaraj, **Interferon gamma gene +874A/T polymorphism and intracellular interferon gamma expression in pulmonary tuberculosis**, *Cytokine* 49 (2010), pp. 130-133
- [24] P. Selvaraj, K. Alagarasu, M. Harishankar, M. Vidyarani, D.N. Rajeswari, P.R. Narayanan, **Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis**, *Cytokine* 43 (2008), pp. 26-33
- [25] C.C. Cardoso, A.C. Pereira, C.S. Marques, M.O. Moraes, **Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome**, *Fut. Microb.* 6 (2011), pp. 533-549

- [26] H. Ohyama, N. Kato-Kogoe, F. Nishimura, K. Takeuchi-Hatanaka, S. Matsushita, K. Yamanegi *et al.* **Differential effects of polymorphisms in the 5' flanking region of IL12RB2 on NK- and T-cell activity**, *J. Interfer. Cytok. Res.* 28 (2008), pp. 563–570
- [27] S. Ding, L. Li, X. Zhu, **Polymorphism of the interferon- γ gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population**, *Hum. Immunol.* 69 (2008), pp. 129-133
- [28] M. Vidyarani, P. Selvaraj, S.P. Anand, M.S. Jawahar, A.R. Adhilakshmi, P.R. Narayanan, **Interferon gamma (IFN) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis**, *Indian J. Med. Res.* 124 (2006), pp. 403-410

TABLES

Table 1. Characteristics of the study population

	Patients (n=108)	Controls (n=113)
Age (years)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Mean	36.4 ± 13.1	36.2 ± 12.5
Gender		
Male	69 (63.9)	42 (37.2)
Female	39 (36.1)	71 (62.8)
Operational classification		
PB	53 (49.1)	
MB	55 (50.9)	
Ridley-Jopling		
TT	9 (8.3)	
BT	28 (25.9)	
BB	7 (6.5)	
BV	19 (17.6)	
VV	29 (26.8)	

Tuberculoid (TT); Borderline-Tuberculoid (BT); Mid-Borderline (BB); Borderline-Lepromatous (BL); Lepromatous (LL). Mann Whitney Test for age between patients and control subjects $p > 0.05$; χ^2 Test for gender $p < 0.0001$.

Table 2. Distribution of genotypes and alleles of +874 IFN- γ in leprosy patients and control subjects.

Genotype/Allele	<i>N</i> (frequency)		OR (95% IC)
	Patients	Controls	
A/A	65 (60.2)	61 (53.9)	1.29 (0.76 - 2.20)
A/T	33 (30.6)	43 (38.1)	0.72 (0.41 - 1.25)
T/T	10 (9.2)	9 (8)	1.18 (0.46 - 3.02)
A	163 (75.5)	147 (73)	1.28 (0.83 - 1.96)
T	53 (24.5)	61 (27)	0.78 (0.51 - 1.20)
T carriers	43 (39.8)	52 (46.1)	0.77 (0.45 - 1.32)

χ^2 Test with contingency table for genotype and allele between patients and control subjects, $p > 0.05$.

Table 3. Distribution of genotypes and alleles of +874 de IFN- γ between PB and MB patients.

Genotype ^a /Allele ^b	N (frequency)		OR (95% IC)
	PB patients	MB patients	
A/A	35 (66.1) ^c	30 (54.5) ^d	1.62 (0.74 - 3.53)
A/T	13 (24.5)	20 (36.4)	0.57 (0.25 - 1.31)
T/T	5 (9.4)	5 (9.1)	1.04 (0.28 - 3.83)
A	83 (78.3)	80 (72.7)	1.35 (0.73 - 2.53)
T	23 (21.7)	30 (27.3)	0.74 (0.40 - 1.38)
T carriers	18 (33.9) ^c	25 (45.5) ^d	0.62 (0.28 - 1.34)

^aG Test for genotype between PB and MB patients, $p=0.089$.

^b χ^2 Test with contingency table for allele between PB and MB patients, $p=0.427$.

^c χ^2 Test for A/A genotype compared T carriers in PB patients, $p=0.028$.

^d χ^2 Test for A/A genotype compared T carriers in MB patients, $p=0.589$.

Table 4. Distribution of +875 CA repeats allele between patients and control subjects.

Allele	Repeats	N (frequency)		OR (IC 95%)
		Patients	Controls	
2	12	40 (36.4)	52 (46)	0.67 (0.39 - 1.15)
3	13	2 (1.8)	3 (2.6)	0.68 (0.11 - 4.14)
4	14	53 (48.2)	47 (41.6)	1.31 (0.77 - 2.22)
5	15	2 (1.8)	2 (1.8)	1.03 (0.14 - 7.43)
6	16	13 (11.8)	9 (8)	1.76 (0.70 - 4.43)

G Test for CA repeats allele between patients and control subjects, $p=0.589$.

Table 5. Distribution of +875 CA repeats allele between paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) patients.

Allele	Repeats	N (frequency)		OR (IC 95%)
		PB patients	MB patients	
2	12	17 (32.1)	23 (43.4)	0.62 (0.28 - 1.36)
3	13	0 (0)	2 (3.8)	-
4	14	25 (47.2)	24 (45.2)	1.08 (0.50 - 2.32)
5	15	0 (0)	2 (3.8)	-
6	16	11 (20.7)	2 (3.8)	6.68 (1.40 - 31.81)

G Test for CA repeats allele between PB and MB patients, $p=0.019$.

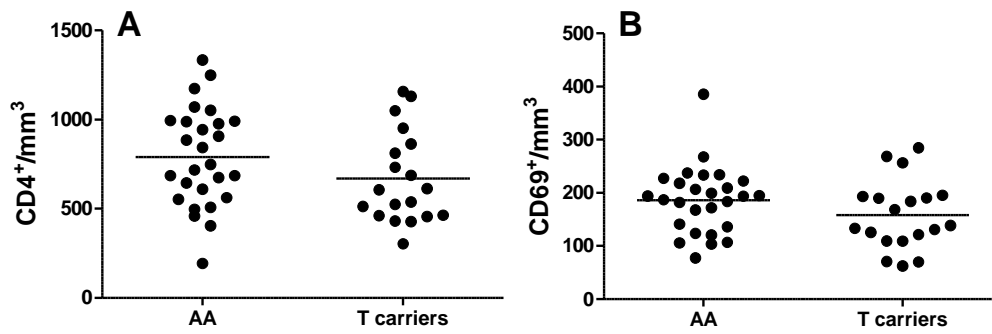


Fig. 1. CD4⁺ and CD69⁺ expressed in T lymphocytes from leprosy patients with AA or T carriers for +874 polymorphism. There were no significant differences in the distribution of CD4⁺ and CD69⁺ T cells in subjects with A/A genotype ($n=27$) or T carriers ($n=19$). $p>0.05$ using t Test.

Artigo Original - 2

Polymorphisms assessment in the promoter region of *IL12RB2* in Amazon leprosy patients

G.A.V. Silva^a, M.P. Santos^a, I. Motta-Passos^a, A.L. Boechat^a, A. Malheiro^{a,b}, R. Ramasawmy^{a,c,d}, F.G. Naveca^{a,e}, L. de Paula^{a,f*}

^aPrograma de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brazil

^bInstituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, UFAM, Brazil

^cFundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Brazil

^dUniversidade Nilton Lins, Brazil

^eInstituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Brazil

^fInstituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, UFAM, Brazil

*Corresponding author: Lucia de Paula at Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Av General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário, Bloco H, Secretaria do Departamento de Morfologia, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil - Phone: 55 (92) 8123-9811. Email: lpaula.bio@hotmail.com

Abstract

Leprosy displays a wide clinical spectrum that is dependent of the type of immune response. We investigate here whether polymorphisms in the promoter region of the *IL12RB2* gene are associated with susceptibility or resistance to clinical forms of leprosy. Nucleotide sequencing of the promoter region of *IL12RB2* encompassing SNPs -1035 A/G, -1033 T/C, -1023 A/G, -650 del/G and -464 A/G was performed on DNA samples from 105 leprosy patients and 108 healthy controls. However, none of the SNPs were associated with susceptibility to the disease or any of its clinical forms. Similarly, haplotype analysis did not show any association. The haplotype -1035A/-1033T/-1023A/-650G/-464A was prevalent, and homozygosity for this haplotype was associated to a lower distribution of CD4⁺ T cells ($p = 0.041$). Our data suggest that polymorphisms present in the promoter region of *IL12RB2* may not be associated with susceptibility to leprosy or its clinical forms.

Keywords: Cellular immunity, Polymorphism, Leprosy, Cytokine, IL12RB2.

1. Introduction

Leprosy is a disease caused by *Mycobacterium leprae* and displays a wide range of clinical manifestations illustrated by two polar responses: tuberculoid or lepromatous leprosy, and various intermediate or borderline forms [1]. The clinical outcome depends mainly on the fine balance of T helper cell-mediated immunity and the genetic background of the host as there is little genotypic variation between strains of *M. leprae*. Leprosy is characterized by the presentation of different immune responses against *M. leprae*, with tuberculoid leprosy being characterized by a stronger T_H1 immune response and lepromatous form by a marked T_H2 response.

The IL-12 family members play an important role during mycobacterial infection, stimulating both the activation and migration of dendritic cells, and the induction and polarization of T_H1 cells [2]. The IL-12 receptor is composed by two β 1 and β 2 subunits and has a key role in innate and adaptive immune response [3]. Several polymorphisms (-237 C/T, -464 A/G, -1023 A/G, -1033 T/C and -1035 A/G) in the promoter region of *IL12RB2* gene have been identified as potentially affecting gene transcription [4,5]. We investigated whether these polymorphisms may be associated with the susceptibility to or the clinical manifestations of leprosy in patients from the Brazilian state of Amazonas.

2. Study subjects and methods

2.1. Study population

The study population comprised 105 leprosy patients and 108 healthy controls aged between 18 and 65 years, as previously described [6]. There were no differences between patients and controls with regard to age (mean 35.4 ± 12.4 and 36.3 ± 12.6 , respectively). Leprosy patient population sizes in this study were similar: 50 (47.6%) for paucibacillary (PB) and 55 (52.4%) for multibacillary (MB) patients.

2.2. Biological material

The Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin) was used to extract DNA from the peripheral blood of all participants with some small modifications, such as the early treatment of samples with phosphate buffered saline (PBS). Subsequent steps were all performed according to manufacturer's instructions. After elution, DNA was stored at -80°C until use.

2.3. Polymerase chain reaction (PCR) and purification of the PCR product

The following pair of primers 5'-CAGAAAAGATCAGCAAATTTAGGATATTTGG-3' and 5'-TCACCACTCCCGTATAGGTCCC-3' as forward and reverse, respectively, were designed encompassing the five polymorphisms for PCR amplification yielding a fragment of 928 base pairs. The PCR product was then purified with the Wizard[®] SV Kit (Promega, Madison, Wisconsin).

2.4. Nucleotide sequencing reaction and sequence analysis

Approximately 5-20 ng of DNA was used in the sequencing reaction. The sequencing was performed using the BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the same primers used for PCR. Capillary electrophoresis was performed using an ABI 3130 DNA sequencer and polymer POP-7[™]. The sequences were initially analyzed using the software programs Sequencing Analysis (Applied Biosystems, v5.3.1) and SeqMan (DNASTAR Lasergene, v7.0) to build contigs and a comparison with the *IL12RB2* reference gene sequence (GenBank ID: AL389925).

2.5. Haplotype analysis

Pairwise nucleotides was calculated using the Haploview (v.4.2), as a measure of the linkage disequilibrium (LD). Haplotypes with frequencies above 1% were classified as relevant. The degree of pairwise between SNPs was analyzed by LD structure, with results having r^2 values >0.8 considered highly intercorrelated and pairs with $r^2 < 0.1$ at linkage equilibrium.

2.6. Flow cytometry analysis

Populations of CD₄⁺ and CD₈⁺ T cells, as well as activated T cells were identified using fluorochrome-conjugated antibodies against surface antigens CD₃, CD₄, CD₈ and CD₆₉ (Becton–Dickinson, California). The T cells were identified and 10,000 events for each sample were acquired and analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (Becton–Dickinson Immunocytometry Systems, Palo Alto, California) using CellQuest (v.3.1) software.

2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The levels of cytokines in serum of patients were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IFN- γ and IL-12 using commercial kit (BD OptEIA – BD Bioscience, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.8. Statistical analysis

The genotype frequencies were determined by direct counting and were subsequently compared in a contingency table by a χ^2 test or G test for genotypes with low frequencies. A χ^2 test was applied to each population to investigate the Hardy-Weinberg equilibrium. The odds ratio (OR) and *p*-values were calculated using the *BioEstat* (v.5.2) software. The t test was used to compare the T-cell subsets and Mann-Whitney test to cytokine levels using GraphPad Prism (v.5.0) software. *p* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Genotype distribution of polymorphisms in the IL12RB2 promoter region

The genotype and allele frequencies of the five polymorphisms -1035 A/G (rs3762315), -1033 T/C (rs11576006), -1023 A/G ([rs3762316](#)), -650 del/G ([rs67901416](#)) and -464 A/G ([rs3762317](#)) are shown in Table 1. Genotype distributions for each SNP were in Hardy-Weinberg equilibrium in both leprosy patients and healthy control groups. Similar genotype and allele frequencies for each SNP were observed in both groups. Additionally, multiple logistic

regression analysis did not show any association with bacteriologic index (BI), leprosy reaction and affected nerves (data not shown).

3.2. Haplotype analysis

As shown in Table 2, haplotype analysis revealed five main haplotypes: haplotype 1 -1035A/-1033T/-1023A/-650G/-464A, haplotype 2 -1035G/-1033T/-1023G/-650del/-464G, haplotype 3 -1035A/-1033C/-1023A/-650del/-464A, haplotype 4 -1035A/-1033T/-1023A/-650del/-464G and haplotype 5 -1035A/-1033T/-1023A/-650G/-464G. The low haplotype diversity is a result of high linkage disequilibrium between the SNPs as shown in the Fig. 1. Curiously, the polymorphisms of the positions -1035, -1023 and -464 present an absolute correlation ($p < 0.0001$) having a combination of the same genotype in their respective positions, representative of a high linkage disequilibrium.

3.3. Haplotypes and T-cell subsets

The distributions of CD₄⁺ and CD₈⁺ T cells, as well as activated T cells were evaluated for correlations with the presence and absence of haplotype 1. A lower mean of CD₄⁺ T cells was observed for haplotype 1 compare to other haplotypes, ($p = 0.041$) (Fig. 2A). Similarly the distribution of CD₈⁺ T cells was lower in carriers for haplotype 1, although these observed differences were not statistically significant (Fig. 2B). Of note, a similar median of activated T cells was observed between the haplotypes with a mean of approximately of 170 cells/ μ L.

3.4. ELISA

The cytokine levels of IL-12p70 and IFN- γ were evaluated for correlations between haplotype 1 and non-haplotype 1. Higher levels of IL-12p70 was observed in carriers homozygous for haplotype 1 compared to non-haplotype 1 (mean 296.5 and 211.2, respectively) (Fig. 2C), whereas a higher mean of IFN- γ was found in non-haplotype 1 (Fig. 2D). However, these differences did not reach statistical significance.

4. Discussion

The IL-12 receptor contributes to development of the innate and adaptive immune response [3]. Differences in the expression of IL12R β 2 has been observed between leprosy clinical forms, with a higher expression in the lesions of tuberculoid patients [7]. The β 2 chain has an important role in the cellular signal transduction due the presence of tyrosine residues in the cytoplasmic domain [3,8]. Previous studies have related genetic polymorphisms of the promoter region with gene expression regulation [9], thus demonstrating an association with lepromatous leprosy [10]. This may be due the formation of binding site to GATA [4], a transcriptional factor involved in the suppression IL12R β 2 expression, which could affect the development of cellular immune responses [5].

A study examining a Japanese population described twelve polymorphisms in the promoter region of the *IL12RB2* gene in leprosy patients [10]. Curiously, the SNPs -568 A/C, -557 T/C and -550 T/C, characterized as conserved regions in our populations, following the allelic combination C/T/T. Our contrary finding may be because all participants included in this present study were confirmed to be of the same geographic origin.

Association of the -1035 A/G, -1023 A/G, -650 delG and -464 A/G polymorphisms in the promoter region of the IL12RB2 gene with the development of lepromatous leprosy has been reported in the Japanese population [10]. Cellular immune response is protective for leprosy; these polymorphisms could be associated with a reduced cellular response. In our study, significant differences among leprosy patients and controls or between PB and MB patients were not observed.

Gene expression studies of *IL12RB2* using isolated fragment of the promoter region encompassing the polymorphisms cloned in pGL3 plasmid and transfected in Jurkat T cells showed the haplotype 1 to correlate with a higher transcriptional activity when compared with other haplotypes [10]. The haplotype 1 was prevalent in our study population. However, no significant differences were found between PB and MB patients.

Another study demonstrated different effects of these genetic polymorphisms depending on the type of cells. An increased transcriptional

activity in NK cells was observed when compared to T cells. A higher expression of IL12R β 2 and IFN- γ were observed in NK cells in the absence of haplotype 1 [11]. NK cells may modulate immune responses in leprosy patients by the production of IFN- γ , which directs the adequate production of cytokine and the development of an adaptive response [12,13]. Here, a higher distribution of CD8⁺ T cells and a significant increase of CD4⁺ T cells in the absence of haplotype 1 was observed in leprosy patients. As leprosy is characterized a disease of high infectivity, the absence of haplotype 1 may be essential for the innate immune protection against infection by *M. leprae*

Higher levels of IL-12p70 were found in individuals homozygous for haplotype 1. However, low levels of IFN- γ were observed in carriers of haplotype 1 suggesting that there may be a deficiency in IL-12/IL12R signaling to IFN- γ production in our study population.

We have attempted to understand the functional features of different types of cells and determine whether a strong innate response or adaptive response would result in better outcomes for patients. The innate immune response may be a key component in determining the outcome of the infection, due to its involvement in the control of infections and the activation of the adaptive response [14]. Altogether, the haplotype 1 was prevalent in leprosy patients and can consequently affect the development cellular immune response, which may be associated with higher levels of IL-10 in MB patients [15]. Previous *in vitro* studies have found a correlation between haplotype 1 and higher cellular activity, although this is contrary to our observations of a similar genotype distribution between PB and MB patients. SNPs of *IL12RB2* may therefore present different effects *in vivo* suggesting the involvement of other immune response genes, as described in previous studies [6,16]. Cytokine expression may also be regulated by the activity of microRNA [17]: for example, the expression of miR-187, which silences the IL-12p40 expression, is dependent on the synthesis of IL-10 [18]. The lack of association with polymorphisms studied in our population may be due to the involvement of other genes that are responsible for the prior activation of *IL12RB2*, as described in previous studies [16,19].

The haplotype and the frequencies observed in this study are in accordance with the subcloned and sequenced haplotype previously described in the Japanese population [10,20], namely three main haplotypes. Additionally, the performed haplotype analysis demonstrated a low diversity of haplotypes, which is characteristic of high linkage disequilibrium between variants studied, thus suggesting that future genome-wide association study (GWAS) insert a single SNP to determine other common variants. As the polymorphisms of the promoter region of *IL12RB2* have been poorly defined, only previously described in Japanese population and currently in a Brazilian population, it would be interesting to investigate the distribution of this haplotypes in different countries which present low rates of the leprosy, such as Europe and North America, to assesses the haplotype frequencies and evaluate whether there are differences between different countries.

In summary, our data suggest that the polymorphisms present in promoter region of *IL12RB2* may not be associated with the susceptibility to leprosy or to its different clinical forms. These polymorphisms, however, may present an important role in the development of the cellular immune response against *M. leprae*. As we hypothesize the involvement other immune response genes, future *in vitro* assays could be performed controlling for the activity of genes such as IL-10 to measure the accurate transcriptional activity of *IL12RB2*. Further studies are required to exclude *IL12RB2* gene as a susceptibility locus in the Brazilian population.

Acknowledgments

We acknowledge the staff of the Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta, especially Maria da Graça Souza Cunha, Paula Frassinetti Bessa Rebello, Silmara Navargo Pennini and Evenilda Braga Fernandes Oliveira for their assistance with patient recruitment, as well as Maria Marlice Mar Nunes and Maria Cilene Dias da Costa for the attention with the patients. We also acknowledge João Paulo Diniz Pimentel for support on flow cytometry.

Financial Support

This study was supported by Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do

Amazonas (FAPEAM). The funding sources had no role in the study design, analysis of the data and the writing or decision to submit the manuscript for publication.

References

- [1] Montoya D and Modlin RL. Learning from Leprosy. Insight into the human innate immune response. *Adv Immunol* 2010; 105:1-24
- [2] Méndez-Samperio P. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease. *Int J Infect Dis* 2010; 14:366-71
- [3] Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu C, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two b-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14002-07
- [4] Rietschoten JGI, Westland R, Bogaard R, Nieste-Otter MA, Veen A, Jonkers RE, Pouw-Kraan TCTM, Hartog MT, Wierenga EA. A novel polymorphic GATA site in the human IL-12Rb2 promoter region affects transcriptional activity. *Tiss Ant* 2004; 63:538-46
- [5] Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immun* 1998; 9:745-55
- [6] Silva GAV, Santos MP, Motta-Passos I, Boechat AL, Malheiro A, Naveca FG, de Paula L. IFN- γ +875 microsatellite polymorphism as a potential protection marker for leprosy patients from Amazonas state, Brazil. *Cytokine* 2012; 60:493-97
- [7] Kim J, Uyemura K, Dyke MKV, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, Modlin RL. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol* 2001; 167:779-86
- [8] Rogge L, Maino LB, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997; 185:825-31
- [9] Rietschoten JGI, Smits HH, Wetering D, Westland R, Verweij CL, Hartog MT, Wierenga EA. Silencer activity of NFATc2 in the interleukin-12 receptor β 2 proximal promoter in human T helper cells. *J Biol Chem* 2001; 276:34509-16
- [10] Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, Naruishi H, Ohira T, Hashimoto K, Liu T, Suzuki M, Uemura Y, Matsushita S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor b2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol* 2005; 58:740-43
- [11] Ohyama H, Kato-Kogoe N, Nishimura F, Takeuchi-Hatanaka K, Matsushita S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nakasho K, Terada N. Differential effects of polymorphisms in the 5' flanking region of IL12RB2 on NK- and T-cell activity. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28:563-69

- [12] Barrera RL, Finiasz M, Fink S, Ilarregui J, Alemán L, Olivares L, Franco MC, Pizzariello G, Sasiain MC. NK cells modulate the cytotoxic activity generated by *Mycobacterium leprae*-hsp65 in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. *Clin Exp Immunol* 2004; 135:105-13
- [13] Guerini FR and Clerici M. NK cells in human disease: An evolving story. *Clin Immunol* 2012; 143:203-06
- [14] Qu H, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Molecular immunity to mycobacteria: knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Int J Infect Dis* 2011; 15:305-13
- [15] Motta-Passos I, Malheiro A, Naveca FG, Passos LFS, Cardoso CRB, Cunha MGS, Santos MP, Silva GAV, Fraporti LS, de Paula L. Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy. *Eur J Dermatol* 2012; 22:488-94
- [16] Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 2011; 6:533-49
- [17] Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* 2009; 45:58-69
- [18] Rossato M, Curtale G, Tamassia N, Casteullucci M, Mori L, Gasperini S, Mariotti B, de Luca M, Mirolo M, Cassatella MA, Locati M, Bazzoni F. IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:E3101-10
- [19] Turvey SE and Hawn TR. Towards subtlety: Understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol* 2006; 120:1-9
- [20] Takeuchi-Hatanaka K, Ohyama H, Nishimura F, Kato-Kogoe N, Soga Y, Matsushita S, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Terada N, Takashiba S. Polymorphisms in the 5' flanking region of IL12RB2 are associated with susceptibility to periodontal diseases in the Japanese population. *J Clin Period* 2008; 35:317-23

TABLES

Table 1: Genotype distribution of polymorphisms in the *IL12RB2* promoter region between leprosy patients and control subjects

SNP	N (Frequency)			
	Patients	Controls	Paucibacillary	Multibacillary
-1035 A/G				
A/A	59 (56.2)	61 (56.5)	27 (54)	32 (58.2)
A/G	36 (34.3)	40 (37)	18 (36)	18 (32.7)
G/G	10 (9.5)	7 (6.5)	5 (10)	5 (9.1)
-1033 T/C				
T/T	75 (71.4)	78 (72.2)	36 (72)	39 (70.9)
T/C	29 (27.6)	28 (25.9)	14 (28)	15 (27.3)
C/C	1 (1)	2 (1.9)	0 (0)	1 (1.8)
-1023 A/G				
A/A	58 (55.3)	61 (56.5)	26 (52)	32 (58.2)
A/G	37 (35.2)	40 (37)	19 (38)	18 (32.7)
G/G	10 (9.5)	7 (6.5)	5 (10)	5 (9.1)
-650 del/G				
del/del	21 (20)	17 (15.7)	10 (20)	11 (20)
del/G	51 (48.6)	53 (49.1)	26 (52)	25 (45.5)
G/G	33 (31.4)	38 (35.2)	14 (28)	19 (34.5)
-464 A/G				
A/A	51 (48.6)	52 (48.2)	24 (48)	27 (49.1)
A/G	43 (40.9)	47 (43.5)	21 (42)	22 (40)
G/G	11 (10.5)	9 (8.3)	5 (10)	6 (10.9)

Contingency table was applied to compare genotype frequencies between leprosy patients and control subjects, and between PB and MB patients, being used the χ^2 test and G test. No statistical significant results were observed between the populations, $p > 0.05$

Table 2: Haplotypes of the promoter region of *IL12RB2* present in the study population

Haplotype	N (Frequency %)						
	-1035	-1033	-1023	-650	-464	Patients	Controls
S							
1	A	T	A	G	A	110 (52.4)	118 (54.6)
2	G	T	G	del	G	54 (25.7)	52 (24.1)
3	A	C	A	del	A	29 (13.8)	26 (12)
4	A	T	A	del	G	6 (2.8)	7 (3.2)
5	A	T	A	G	G	4 (1.9)	3 (1.4)

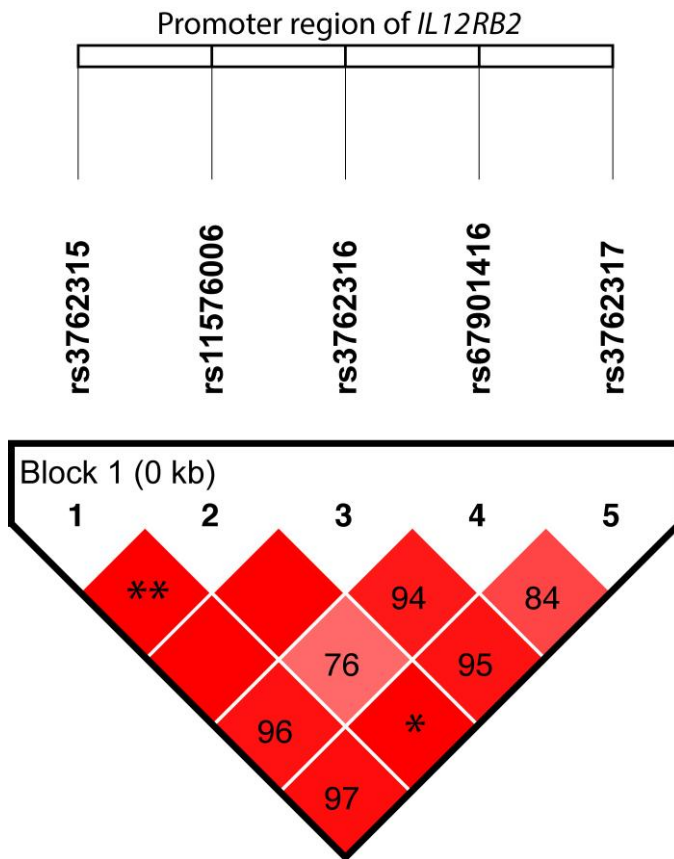


Fig. 1: Linkage disequilibrium structure of the promoter region of *IL12RB2*. The LD structure shows SNP rs11576006 in linkage equilibrium with SNPs rs3762315 and [rs3762317](#), r^2 values 0.063 and 0.078, respectively, whereas the SNPs rs3762315, [rs3762316](#), [rs67901416](#) and [rs3762317](#) are in linkage disequilibrium (r^2 values between 0.42 and 0.97), with the SNPs rs3762315 and [rs3762316](#) being highly intercorrelated ($r^2 = 0.97$). * $r^2 = 0.078$ and ** $r^2 = 0.063$.

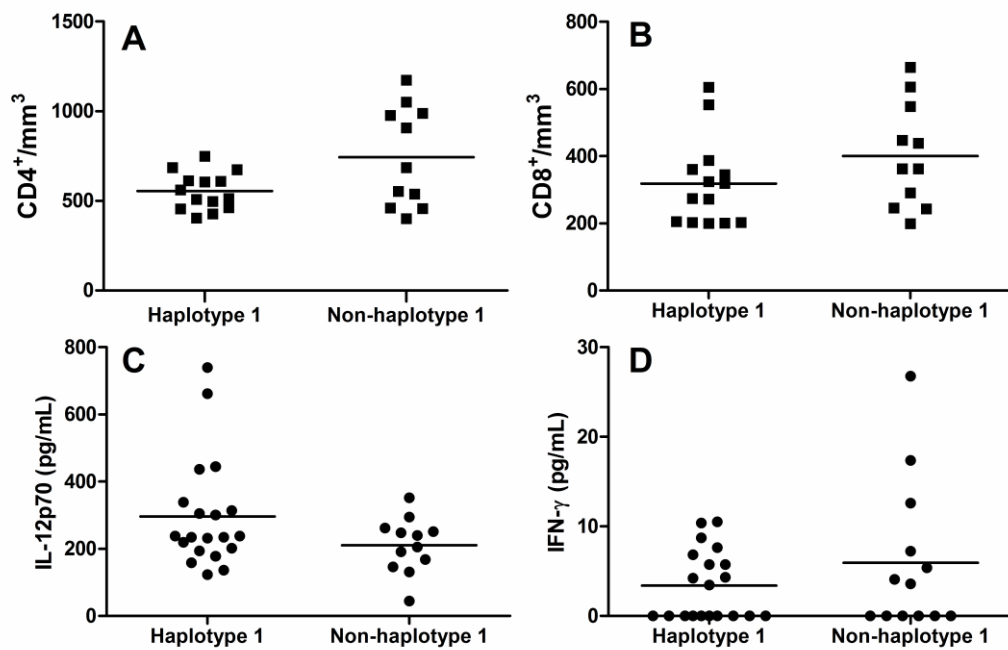


Fig. 2: Distribution of CD4⁺ (A) and CD8⁺ T cells (B), IL-12p70 (C) and IFN- γ (D) levels in leprosy patients with haplotype 1 or non-haplotype 1. (A) A significant difference was observed in the distribution of CD4⁺ T cells between haplotypes, $p = 0.041$ (t test). (C-D) There were no significant differences in the measured levels of cytokine between the haplotypes, $p > 0.05$ (Mann-Whitney test).

ANEXOS

Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta para realização do “Projeto DCR”.



Governo do Estado do Amazonas
Secretaria de Estado da Saúde
FUNDAÇÃO “ALFREDO DA MATTA”
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO Nº 019/2008

I. IDENTIFICAÇÃO

Protocolo CEP-FUAM: FR – 198924 N° CAAE-0009.0.266.000-08
Título do Projeto: “Avaliação do perfil imunológico e de polimorfismos genéticos em pacientes portadores de hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta”
Pesquisadora Responsável: Lúcia de Paula
Local de Origem (instituição vinculada): Fundação Alfredo da Matta
Local de Realização (instituição sediadora): Fundação Alfredo da Matta
Data de Apresentação ao CEP-FUAM: 12/06/2008 Data da Reunião: 04/07/2008
Grupo/Área Temática: Grupo II Área do Conhecimento: Medicina

II. OBJETIVOS DO PROJETO

Objetivo geral:

Avaliar o perfil de resposta imune e polimorfismos nos genes IL12B, IL12RB1 e IL23 em amostras de pacientes com hanseníase, atendidos na Fundação Alfredo da Matta em associação ao quadro clínico durante o tratamento quimioterápico.

Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil de resposta imune (RI) celular circulante através de marcadores de superfície por citometria de fluxo;
2. Analisar a produção de citocinas em biópsia de lesão através de PCR;
3. Analisar a produção de citocinas no soro através de ELISA;
4. Analisar polimorfismos para IL12B, IL12RB1, IFN-g e IL23R nos leucócitos através de PCR;
5. Correlacionar os resultados do projeto com os dados clínicos dos pacientes

III. RESUMO DO PROJETO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* com amplo espectro clínico e histopatológico, afetando predominantemente pele, mucosas e nervos periféricos. A doença apresenta grande diversidade de formas clínicas relacionadas com padrões imunológicos distintos. A resposta imune Th1 tem um papel fundamental na hanseníase, uma vez que protege o indivíduo limitando a disseminação do bacilo. Contudo, há diversos aspectos a serem esclarecidos, tais como a resposta imune exacerbada, na qual está diretamente envolvida na patologia do nervo e pele. Contudo, o padrão de resposta imune Th2 também pode ser observado, sendo que os indivíduos acometidos exibem altos títulos de anticorpos contra antígenos de *M. leprae*, sem conferir proteção significativa, pois há disseminação bacilar. O perfil de resposta imune Th1 e Th2 tem sido amplamente estudado em diversas doenças, e recentemente outro perfil de resposta imune o Th17, envolvido principalmente nas respostas inflamatórias, tem sido descrito em doenças auto-imunes e em doenças infecciosas por *Klebsiella* e *Candida*, contudo na hanseníase o estudo da importância da resposta Th17 ainda não tem sido relatado. Neste sentido, o projeto visa avaliar o perfil imunológico e genético dos pacientes com hanseníase caracterizando: os fenótipos celulares, o papel das citocinas envolvidas na resposta Th1, Th2 e Th17, bem como, o polimorfismo de genes relacionados à resposta imune que podem estar associados à suscetibilidade a doença. A realização deste projeto, certamente, fornecerá a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na imunopatogenia da hanseníase.

IV. ANÁLISE DOS ELEMENTOS METODOLÓGICOS

Av Codajás, n.º. 24 - Cochoelrinha Cep.: 69065-130 - Fone: 3663-4747/Fax: 3663-3155
E-Mail: cep@fuam.am.gov.br



Governo do Estado do Amazonas
Secretaria de Estado da Saúde
FUNDAÇÃO "ALFREDO DA MATTA"
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



(Resolução CNS 196/96 e complementares)

Estrutura do protocolo: Adequado.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado.

Retorno de benefícios para o sujeito e / ou comunidade: Adequado.

Informação adequada quanto ao financiamento: Adequado.

Orçamento: Valor total do projeto: R\$ 170.025,60

Cronograma de execução: Adequado.

Recursos humanos envolvidos e orçamento: Adequados.


**V. COMENTÁRIOS DO RELATOR REFERENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E
COMPLEMENTARES:**

O presente protocolo de pesquisa apresenta clareza e objetividade, os quais atende as normas constantes na Resolução CNS 196/96.

VI. Parecer

Aprovado.

Manaus, 02 de outubro de 2008.


ROSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ
Coordenadora do CEP

Anexo II – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta para realização do “Projeto De Dissertação”.



Governo do Estado do Amazonas
Secretaria de Estado da Saúde
FUNDAÇÃO “ALFREDO DA MATTA”
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Manaus, 29 de março 2010

Parecer 002/10 – CEP/FUAM


A Pesquisadora:

Lúcia de Paula

Assunto: Parecer

Em atenção ao Vosso encaminhamento do projeto de mestrado dos alunos **George Allan Villarouco da Silva e Maísa Porto dos Santos: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE HANSENÍASE**, entendemos que o referido projeto já tem aprovação deste Comitê, **PARECER Nº 019/2008** e o que está sendo informado é apenas ampliação do número amostral.

Respeitosamente,


ROSSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado aos Pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DESTINADO AOS PACIENTES DA PESQUISA

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação de polimorfismos genéticos em pacientes portadores de Hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre alterações genéticas, isto é, verificando se a genética do paciente pode estar relacionada com o desenvolvimento da doença.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo serão coletados 5 mL de sangue para análise laboratorial a ser realizada na Fundação Alfredo da Matta.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto será o da picada da agulha, que será realizada no mesmo momento da coleta para a realização dos exames solicitados.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento da genética e proteção da doença, podendo auxiliar futuramente no tratamento da doença.

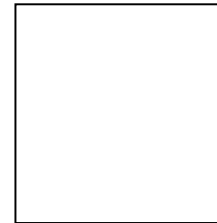
VOLUNTARIEDADE E CONFIDENCIALIDADE: A participação neste estudo é voluntária, sendo, portanto, os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento. Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais e não será divulgada a identidade dos participantes.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado para os testes laboratoriais e será armazenado para estudos posteriores.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, autorizo o (a) menor _____ a participar do estudo em questão.

Manaus, ___/___/_____



(Impressão dactiloscópica)

Assinatura do participante

Nome do participante

Assinatura do pesquisador

Nome do pesquisador

Este formulário foi lido para _____ (nome do participante) em ___/___/___ pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

Assinatura da Testemunha

Nome da testemunha

Importante: Deverá ser feito em duas (02) vias, ficando uma com o sujeito da pesquisa

Anexo IV – Formulário para coleta de informações pessoais e quadro clínico do paciente

INICIAIS DO PACIENTE					PROTÚRIO DO PACIENTE					DATA DA VISITA				
-----------------------------	--	--	--	--	-----------------------------	--	--	--	--	-----------------------	--	--	--	--

DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO PACIENTE

IDADE <input type="text"/>			
EXAME DERMATOLÓGICO E EXAMES COMPLEMENTARES			
Início dos sintomas No de meses _____	Tipo de lesão 1. Mácula <input type="checkbox"/> 2. Placa <input type="checkbox"/> 3. Pápula <input type="checkbox"/> 4. Infiltração difusa <input type="checkbox"/> 5. Nódulo <input type="checkbox"/> 6. Área anestésica <input type="checkbox"/>	Cor da lesão 1. Hipocrômica <input type="checkbox"/> 2. Eritematosa <input type="checkbox"/> 3. Hiperocrômica <input type="checkbox"/> 4. Normocrômica <input type="checkbox"/>	Sensibilidade 1. Alterada <input type="checkbox"/> 2. Duvidosa <input type="checkbox"/> 3. Normal <input type="checkbox"/>
Número de lesões <input type="text"/>	Baciloscopia 1. Positiva <input type="checkbox"/> 2. Negativa <input type="checkbox"/> Resultado do IB _____		
CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL			
1. Paucibacilar (até 5 lesões cutâneas) <input type="checkbox"/>		2. Multibacilar (mais de cinco lesões cutâneas) <input type="checkbox"/>	
CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA			
1. Hanseníase Indeterminada <input type="checkbox"/>		2. Hanseníase Tuberculoide <input type="checkbox"/>	
4. Hanseníase Borderline Tuberculoide <input type="checkbox"/>		3. Hanseníase Lepromatosa <input type="checkbox"/>	
6. Hanseníase Borderline Lepromatosa <input type="checkbox"/>		5. Hanseníase Borderline Borderline <input type="checkbox"/>	

Assinatura e carimbo do medico examinador

Anexo V – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado aos Indivíduos Controles

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DESTINADO AOS PARTICIPANTES DO GRUPO CONTROLE DA PESQUISA

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação de polimorfismos genéticos em pacientes portadores de Hanseníase.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre alterações genéticas, isto é, verificando se a genética do paciente pode estar relacionada com o desenvolvimento da doença.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo serão coletados 5 mL de sangue para análise laboratorial a ser realizada na Fundação Alfredo da Matta.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento da genética e proteção da doença, podendo auxiliar futuramente no tratamento da doença.

VOLUNTARIEDADE E CONFIDENCIALIDADE: A participação neste estudo é voluntária, sendo, portanto, os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento. Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais e não será divulgada a identidade dos participantes.

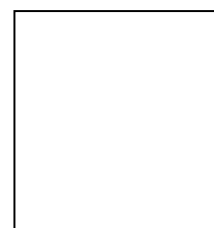
USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado para os testes laboratoriais e solicitamos autorização para armazenamento e utilização para estudos posteriores sujeitos à submissão no Comitê de Ética em pesquisa.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Manaus, ___/___/____

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador



(Impressão dactiloscópica)

Nome do participante

Nome do pesquisador

Anexo VI – Protocolo de purificação EtOH/EDTA/Acetato de Sódio (Applied Biosystems)

PROTOCOLO EtOH/EDTA/ACETATO DE SÓDIO. – BULA BIGDYE V3.1 APPLIED BIOSYSTEM

Para precipitar reações de 10 μ L em placas com 96 poços:

1. Remova a placa do termociclador e centrifugue 1 min 2000 RCF;
2. Adicionar 1 μ L de EDTA 125mM a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços.

3. Adicionar 1 μ L de acetato de sódio 3M (pH 5,2) a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o acetato foi adicionado no fundo dos poços.

4. Adicionar 25 μ L de EtOH 100% gelado, a cada um dos poços;
5. Sele a placa com *strips* e misture por inversão (4x);
6. Incube por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz;
7. Centrifugue a 2.000 RCF por 45 minutos ou 3.000 RCF por 30 minutos;

Importante: o próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível, então faça um spin na placa por mais 2 minutos antes de recomeçar

8. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Obs: Antes de inverter a placa, desprezei o conteúdo da mesma na pia junto com uma leve batida na mesa. Após esta centrifugação, programá-la para a temperatura de 4°C

9. Adicione 35 μ L de EtOH a 70% em cada um dos poços;
10. Centrifugue por 15 minutos, à 4°C e 1.650 RCF;

Obs: Caso tenha esquecido a programação para 4°C, acione o FAST temperatura

11. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Nota: comece a contar o tempo assim que o rotor começar a se mover.

12. Incube a placa à 52°C por 15 minutos, cobrir com papel alumínio (termociclador-2-Mastercycler)
13. Se não for colocar no sequenciador imediatamente, congelar a placa seca ao abrigo da luz;

14. No momento de sequenciar ressuspender com 10 uL de formamida Hi-Di, lavando as paredes dos poços;
15. Aqueça a placa 95°C por 1 minuto, monte e coloque no sequenciador.