



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Giovanna Valle Germano**

**Estudo de associação do polimorfismo de base única  
-336A/G no gene *CD209* com a hanseníase em população  
de área endêmica brasileira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Nieto Brito de Souza

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carla Pereira Latini

**Botucatu**

**2017**

Giovanna Valle Germano

Estudo do polimorfismo de base única -336A/G no gene *CD209* com a hanseníase em população de área endêmica brasileira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Nieto Brito de Souza

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carla Pereira Latini

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Germano, Giovanna Valle.

Estudo de associação do polimorfismo de base única -336A/G no gene *CD209* com a hanseníase em população de área endêmica brasileira / Giovanna Valle Germano. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Vânia Nieto Brito de Souza

Coorientador: Ana Carla Pereira Latini

Capes: 21100004

1. *Mycobacterium leprae*.
2. Polimorfismo (Genética).
3. Hanseníase.
4. Resposta imune.
5. Células dendríticas.
6. Saúde pública.

Palavras-chave: DC-SIGN; Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Polimorfismo de base única.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”  
(Simone de Beauvoir)

## **DEDICATÓRIA**

Ofereço esse trabalho para a minha mãe Maria Augusta Valle Germano, que desde criança infundiu em meu coração o desejo de trilhar o caminho dos estudos para que eu tivesse uma vida diferente daquela que conhecíamos. Ofereço ao meu irmão Thiago Francisco Germano, que sempre me apoiou e me ajuda a acreditar nesse sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por me inspirar em todas as circunstâncias da minha vida e permitir que através dos estudos eu possa adquirir novos conhecimentos e assim, de alguma maneira, contribuir para o desenvolvimento de uma sociedade melhor.

A Nossa Senhora Aparecida, que intercedeu a Deus por mim para que Ele ouvisse todas as minhas súplicas, aflições e necessidades. Este trabalho é fruto de uma promessa atendida onde recorri à intercessão de Nossa Senhora Aparecida.

A minha mãe, que me acompanhou em todo esse período e me ajudou em todos os passos, e várias vezes até abdicou de certas coisas para estar comigo. Sei que ela se realizou em mim por meio desse trabalho.

A minha orientadora Vânia, que me deu essa oportunidade, por ter confiado em mim e me orientar com tamanha dedicação.

A minha coorientadora Ana Carla, que se dedicou em me ajudar a realizar esse trabalho, e me ensinou desde conceitos simples de genética até os mais complicados envolvendo epidemiologia genética.

A bióloga Priscila Balallai, que me ajudou com as qPCRs. Obrigada pelas dicas e orientações.

A minha prima Natália, quem tornou meus dias mais leves com sua companhia durante passeios tão gostosos que costumamos fazer, e por ser a irmã que sempre quis ter, que me apoia em todas as minhas decisões sem nenhum pré-julgamento.

Aos meus amigos do Lauro, Rodrigo por ter me ajudado com os experimentos e as análises, e por ser um amigo tão verdadeiro. À Bruna por ser tão carinhosa, companheira e prestativa. Vocês me deram força em meus dias mais difíceis e viveram comigo cada passo desse momento tão intenso. Ao Élderson por ter me ajudado em pequenos detalhes de configuração e compartilhado momentos simples através das nossas experiências. A Keren e a Mariane por deixarem mais divertidos os meus dias com suas brincadeiras.

Ao Bruno, que sempre me apoiou e me fez acreditar em mim, mesmo quando eu achei que não conseguia mais. Por ter tanta paciência em me escutar, e estar comigo quando eu não pude participar das reuniões entre amigos e familiares.

Ao meu irmão Thiago e minha cunhada Melissa por me apoiarem nas minhas decisões e compreenderem a minha ausência em muitos momentos em família.

Ao Érick e Ulisses, que todas as vezes me socorreram nos momentos em que tive dificuldades com falhas técnicas que ocorreram durante a construção do trabalho.

## RESUMO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, ainda é considerada um relevante problema de saúde pública no Brasil, afetando o sistema nervoso periférico o que pode resultar em incapacidades físicas. É considerada uma doença complexa e durante a interação patógeno-hospedeiro o *background* genético do hospedeiro pode determinar o curso da doença que se apresenta de modo espectral abrangendo desde lesões localizadas até a doença disseminada com elevado índice bacilar. Neste estudo, avaliamos na população brasileira a associação com hanseníase do SNP -336A/G (rs4804803) no gene *CD209*, responsável por codificar o receptor DC-SIGN que está presente na superfície das células dendríticas e que participa do reconhecimento do *M. leprae*. A população de estudo incluiu 835 indivíduos do município de Rondonópolis-MT (424 controles e 411 casos). O genótipo GG deste SNP foi associado com a forma multibacilar da hanseníase (OR 4.52; IC 1.01-20.09; p=0.0472) e o alelo A foi associado com a proteção contra a forma multibacilar (OR 0.22; IC 0.05-0.98; p=0.0478). Realizamos estudos funcionais empregando células dendríticas estimuladas com antígenos do bacilo e verificamos que os portadores do alelo G expressaram níveis menores dos receptores DC-SIGN e CD80 e secretaram menos TNF e mais TGF- $\beta$ 1 frente a antígenos do bacilo. Em conjunto, esses dados sugerem menor eficiência dos portadores do alelo G em ativar a resposta imune eficaz contra o *M. leprae*.

**Palavras-chave:** DC-SIGN, *Mycobacterium leprae*, hanseníase, polimorfismos de base única



## ABSTRACT

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, is still considered a relevant public health problem in Brazil, affecting the peripheral nervous system which can result in physical disabilities. It is considered a complex disease and during pathogen-host interaction the genetic background of the host determine the course of the disease that presents in a spectral range from localized lesions to the disseminated disease with high bacillary index. In this study, we evaluated in the Brazilian population the association with leprosy of -336A/G (rs4804803) SNP in the *CD209* gene. This gene encodes DC-SIGN receptor, that is present on the surface of dendritic cells and participates in the recognition of *M. leprae*. The study population included 835 individuals (424 controls and 411 cases). The GG genotype of this SNP was associated with the multibacillary form of leprosy (OR 4.52, CI 1.01-20.09,  $p = 0.0472$ ) and the A allele was associated with protection against multibacillary form (OR 0.22, IC 0.05-0.98,  $p = 0.0478$ ). We performed functional studies using dendritic cells stimulated with bacillus antigens and found that carriers of the G allele expressed lower levels of DC-SIGN and CD80 receptors and secreted less TNF and more TGF- $\beta$ 1 against bacilli antigens. Together, these data suggest a lower efficiency of the G allele carriers in activating the effective immune response against *M. leprae*.

**Key words:** DC-SIGN, *Mycobacterium leprae*, leprosy, single nucleotide polymorphism

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1 História da hanseníase.....	11
1.2 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	12
1.3 Transmissão do <i>M. leprae</i> .....	12
1.4 Epidemiologia e tratamento.....	13
1.5 Manifestações clínicas.....	14
1.6 Imunologia da hanseníase.....	16
1.7 Células Dendríticas e o papel do receptor DC-SIGN na hanseníase.....	21
1.8 Genética na hanseníase.....	24
1.9 Genes candidatos e polimorfismos na hanseníase.....	26
1.10 A relação do gene do receptor DC-SIGN com a hanseníase.....	28
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3. Manuscrito.....	31
3.1 Background.....	34
3.2 Methods.....	35
3.2.1 Participants and study design.....	35
3.2.2 SNP Selection.....	36
3.2.3 DNA extraction and SNP genotyping.....	36
3.2.4 Functional study.....	36
3.2.5 Data analysis.....	37
3.3 Results.....	38
3.3.1 rs4804803 (-336A/G) SNP is associated with clinical form of leprosy.....	38
3.3.2 DCs from -336G carriers have lower expression of DC-SIGN and CD80 in response to <i>M. leprae</i> antigen.....	38
3.3.3 DCs from -336G carriers produce lower levels of the TNF and higher levels of TGF- $\beta$ 1.....	39
3.4. Discussion.....	39
3.5. References.....	42
Figure legends.....	48
Tables.....	49
Figures.....	50
Supplementary material.....	52
4. Conclusão.....	55
5. Referências bibliográficas.....	56
Anexos.....	68

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. História da hanseníase

Acredita-se que a origem da hanseníase se deu na África Oriental ou na Índia cerca de 600 anos antes de Cristo (A. C.) devido à existência de registros que descrevem as características clínicas da doença. Documentos chineses que datam de 500 A.C. citam sinais característicos da hanseníase como numerosas lesões de pele, dormência e madarose, bem como, a expansão da doença para o Japão (BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008; MONOT et al., 2007). No século IV depois de Cristo (D. C.), a doença foi introduzida na Grécia com a chegada dos soldados vindos da Pérsia e as tropas do Alexandre, O Grande, podem ter sido responsáveis pela disseminação da doença da Índia para o Egito, um século mais tarde. Com as cruzadas, a hanseníase se expandiu amplamente pelo território Europeu, e os navegantes de Colombo, escravos africanos e imigrantes europeus levaram a doença para as Américas e ilhas do pacífico (MONOT et al., 2007; TRAUTMAN, 1984). Naquela época, os indivíduos com hanseníase eram obrigados a usar vestimentas e adereços como sinos e chocalhos, que os diferiam do restante da população, uma vez que a doença era associada com pecado e punições religiosas e, com isso, posteriormente, foi imposto o isolamento social dos pacientes. Esse contexto de isolamento contribuiu para o estigma que é encontrado até os tempos atuais (BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008).

Por volta dos anos 1800, houve um surto de casos de hanseníase na Noruega, o que ocasionou o aumento dos estudos relacionados à doença e favoreceu a descoberta do seu agente causador: o *Mycobacterium leprae*. Em 1873, o médico norueguês Dr. Gerhard Hansen observou a presença do bacilo em biópsias de pacientes com hanseníase e, pela primeira vez, houve a associação entre a presença de uma bactéria e a patogênese de uma doença em seres humanos (BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008; DEGANG; NAKAMURA; AKAMA, 2014; TRUMAN; FINE, 2010).

## **1.2. *Mycobacterium leprae***

O *M. leprae* pertence à família Mycobacteriaceae e ao gênero *Mycobacterium*, e apresenta-se como bacilo microaerófilo álcool-ácido resistente (BAAR) que requer cerca de 14 dias para sua duplicação. Como consequência, o *M. leprae* é considerado um bacilo de multiplicação lenta em relação a outras bactérias, como por exemplo o *Mycobacterium tuberculosis* (24 horas) e *Escherichia coli* (20 minutos) (revisto por Reibel, Cambau e Aubry 2015). Seu hábito de vida é de parasita intracelular obrigatório, tendo como principal alvo de infecção as células de Schwann e macrófagos dermais. Como consequência, a hanseníase afeta diretamente a pele e os nervos periféricos (DEGANG; NAKAMURA; AKAMA, 2014; MONTOYA; MODLIN, 2010; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).

O genoma do *M. leprae* sofreu redução evolutiva em comparação com outras micobactérias e há um acúmulo de pseudogenes com funções ainda discutidas e que podem influenciar o metabolismo da bactéria. Acredita-se que a redução no número de genes está vinculada com a perda das funções metabólicas e ao desenvolvimento intracelular do parasita (MONOT et al., 2007; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015). Uma vez que o bacilo não é cultivável *in vitro*, foi desenvolvida uma técnica para multiplicação bacilar no coxim plantar de camundongos suíços (SHEPARD, 1960), permitindo o progresso nos estudos envolvendo a biologia do *M. leprae* (SCOLLARD et al., 2006).

## **1.3. Transmissão do *M. leprae***

A exposição ao *M. leprae* e sua transmissão são aspectos que ainda não estão totalmente elucidados. Acredita-se que existe um risco aumentado para aqueles indivíduos que mantém contato com pacientes hansenianos com elevadas cargas bacilares (BRATSCHI et al., 2015; DU et al., 2011), entretanto, a maioria dos indivíduos que entram em contato com o *M. leprae* não adoecem, enquanto que uma menor parte pode apresentar os sinais clínicos da infecção (LÁZARO et al., 2010). Durante o contato, a disseminação da micobactéria

ocorreria por meio da liberação de gotículas contendo bacilos, através da boca e da mucosa nasal de pacientes hansenianos, para indivíduos susceptíveis que convivem com esses doentes (LAVANIA et al., 2008; TANG; PETERSON, 2014). Uma evidência que fortalece a ideia de transmissão via aerossóis é o fato de o bacilo ter a capacidade de sobrevivência até 24 horas em gotículas de secreção nasal fora do organismo (BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008). Porém, embora a transmissão por aerossóis (homem-homem) seja amplamente aceita, outras vias de transmissão são discutidas.

Em situações experimentais, a via de transmissão por pele lesada foi vista em camundongos nude e sugere a probabilidade de ocorrência em humanos (JOB, CHEHL E HASTINGS, 1985). A presença de BAAR foi observada na camada de queratinócitos da pele de pacientes multibacilares, bem como o DNA desta micobactéria estava presente em lavados de pele desses indivíduos (JOB et al., 2008).

Existem ainda estudos que consideram a possibilidade de fontes de transmissão não humanas (TRUMAN; FINE, 2010). Uma das possibilidades seria a transmissão zoonótica por tatus de nove bandas residentes na América do Norte infectados pelo *M. leprae* (BUSSO et al., 2011). Ademais, existem questionamentos sobre o papel que o ambiente exerce na dinâmica de transmissão do bacilo e surge a ideia de que o agente etiológico da hanseníase pode estar presente na água, no solo, nas plantas, em animais como amebas, insetos, peixes e primatas, além de tatus (LAVANIA et al., 2008). Entretanto, o papel dessas fontes ambientais de bacilo na transmissão da doença não foi comprovado.

#### **1.4. Epidemiologia e tratamento**

Desde a década de 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem implementado esforços para eliminar a hanseníase como problema de saúde pública. Com isso, foi instituído pela OMS o uso da poliquimioterapia no tratamento dos pacientes diagnosticados com hanseníase, que consiste na combinação de rifampicina, clofazemina e dapsona e persiste até os dias atuais

(BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008). A poliquimioterapia é considerada uma medida efetiva para a cura da hanseníase, porém, a doença não tratada ou o atraso no diagnóstico e, conseqüentemente, no tratamento, acarretam destruição dos nervos periféricos que pode resultar em deformidades físicas e incapacidades permanentes (MARTINS; TORRES; OLIVEIRA, 2006).

Nesse sentido, as principais estratégias para combate a hanseníase na atualidade têm como principal objetivo o diagnóstico precoce e tratamento completo da doença, visando à interrupção da cadeia de transmissão, além de evitar a ocorrência de deformidades físicas incapacitantes (WHO 2015).

Após a implementação do tratamento com a poliquimioterapia, na década de 80, a incidência mundial da hanseníase diminuiu significativamente; entretanto, 210.758 mil casos foram ainda detectados no ano de 2015 (JOB et al., 2008; MOET et al., 2008; TANG; PETERSON, 2014; WHO, 2015). Atualmente, a doença se encontra restrita a regiões endêmicas onde a cadeia de transmissão do bacilo é mantida. Nesse cenário, Índia, Brasil e Indonésia, em conjunto, registraram 81% das ocorrências de hanseníase e o Brasil, isoladamente, reportou, em 2015, 26.395 casos novos, atestando que doença persiste como um relevante problema de saúde pública (WHO, 2015). A elucidação dos mecanismos de transmissão e adoecimento podem contribuir para que a disseminação do *M. leprae* seja interrompida (TANG; PETERSON, 2014).

### **1.5. Manifestações clínicas**

Após o contato com o *M. leprae*, a maioria dos indivíduos desenvolve imunidade eficiente contra o patógeno e não demonstra sinais da doença. Em contrapartida, uma parte daqueles que são expostos desenvolve as manifestações clínicas, que se apresentam de forma espectral e podem variar da forma localizada à disseminada (LÁZARO et al., 2010). Levando em consideração critérios histopatológicos, baciloscópicos e imunológicos, Ridley e Jopling em 1966 propuseram um modelo de classificação para a doença que consiste em 5 grupos constituídos por duas formas polares, imunologicamente

estáveis, e três formas instáveis da doença, que representam características intermediárias em relação as formas polares. Além disso, existe a forma indeterminada, que inclui lesões recentes não classificáveis, contendo poucos bacilos e que pode evoluir para a cura espontânea ou desenvolver as características clínicas da hanseníase (SOUZA, 1997).

O polo tuberculoide-tuberculoide ou *tuberculoid-tuberculoid* (TT) apresenta poucas lesões com margens bem definidas e centro hipossensível e hipopigmentado. A análise histopatológica demonstra inflamação granulomatosa bem desenvolvida, onde raramente são encontrados bacilos. Devido à intensa imunidade celular, são observados danos teciduais e neurais, os quais estão fortemente associados com a perda sensorial e motora local (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015; SCOLLARD et al., 2006).

Por outro lado, os pacientes do polo virchowiano-virchowiano (VV) ou *lepromatous-lepromatous* (LL) possuem múltiplas lesões distribuídas pelo corpo, como pequenas máculas com bordas mal delimitadas, e que podem se desenvolver em pápulas e nódulos conhecidos como hansenomas, que se apresentam de maneira assimétrica ao longo da pele (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015). A histopatologia dos virchowianos revela a presença de macrófagos dermais repletos de bacilos e micro colônias chamadas globias (SCOLLARD et al., 2006).

As formas intermediárias da hanseníase, conhecidas como dimorfas (D) ou *borderlines* (B), apresentam diversos sinais clínicos que correspondem às características de transição entre as formas polares da hanseníase (BOUREE; BOURÉE; CARSALADE, 2012). Os pacientes dimorfo tuberculoides (DT) ou *borderline tuberculoids* (BT) possuem características semelhantes ao polo tuberculoide e apresentam assimetria na distribuição das lesões, que podem ser grandes ou pequenas, e são hipoanestésicas, com máculas periféricas ou infiltrados linfocitários na pele. A hanseníase dimorfo dimorfa (DD) ou *borderline borderline* (BB) apresenta diversas lesões anulares com bordas indistintas, uma mistura de máculas e placas com lesões que podem possuir margens ou podem aparecer difusas, e, frequentemente, apresentam sensibilidade reduzida (SCOLLARD; DACSO; ABAD-VENIDA, 2015). A forma que mais se aproxima do polo virchowiano, a dimorfo virchowiana (DV) ou *borderline lepromatous* (BL)

é caracterizada pela presença de lesões bilaterais numerosas; os pacientes tendem a exibir máculas, placas, pápulas e nódulos, sem distribuição simétrica nas regiões afetadas, mas não demonstram características típicas de pacientes virchowianos como ulcerações nasais (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Para fins terapêuticos, em 1982 a OMS propôs uma classificação da hanseníase baseada no índice baciloscópico, que considera os pacientes com menos de 2+ de bacilos como paucibacilares e aqueles com 2+ ou mais como multibacilares (WHO, 1982). A partir de 1988, a OMS passou a considerar qualquer paciente com baciloscopia positiva como multibacilar (WHO, 1988). Em seguida, em 1995, foi proposta uma classificação baseada exclusivamente em critérios clínicos segundo a qual, os pacientes que apresentam, de 1 a 5 lesões são considerados paucibacilares e aqueles que apresentam mais de 5 são classificados como multibacilares (WHO, 1995).

## **1.6. Imunologia da hanseníase**

Durante a fase de atuação da imunidade inata, células fagocíticas como os macrófagos e as células dendríticas podem reconhecer e internalizar micobactérias a partir dos receptores de lectina do tipo C, como o DC-SIGN (BARREIRO et al., 2006a), que desempenha um papel importante no reconhecimento do agente causador da hanseníase (KRUTZIK et al., 2005; SOILLEUX et al., 2006). Após fagocitar o bacilo, os macrófagos apresentam diminuição na expressão dos receptores para a porção Fc dos anticorpos (CD16) na interação com os linfócitos T (BIRDI et al., 1980). Posteriormente a internalização, os fagossomos se fundem com lisossomos no interior das células permitindo a lise dos patógenos (MONTROYA; MODLIN, 2010). Porém, o bacilo pode impedir tal fusão (FREHEL; RASTOGI, 1987) e escapar do fagossomo (VAN DER WEL et al., 2007), sobrevivendo no meio intracelular protegido da ação dos componentes microbicidas da célula. Dentre os mecanismos microbicidas, o burst oxidativo é o processo conhecido por produzir intermediários reativos de oxigênio que são eficientes no combate aos patógenos, entretanto, a fagocitose do *M. leprae* não estimula a intensa



produção desses componentes (HOLZER; NELSON; SCHAUF, 1986).

A enzima iNOS é responsável pela produção de radicais reativos de nitrogênio, como o óxido nítrico, com papel microbicida contra patógenos intracelulares, e portanto (FLESCH; HESS; KAUFMANN, 1994), a sua expressão encontra-se relacionada com a eliminação desses microrganismos pelas células da imunidade inata. Na hanseníase foi visto que os pacientes tuberculoides expressaram maiores níveis de iNOS do que os virchowianos (LOCKWOOD et al., 2011).

Outros receptores presentes nas células da imunidade inata funcionam como sensores que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos como os receptores do tipo Toll, receptores intracelulares do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo RIG (RLRs) (KAWAI; AKIRA, 2009). Na hanseníase, os receptores TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem o *M. leprae* e induzem a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 12 (IL-12), sendo que TLR1 e TLR2 encontram-se mais expressos nos indivíduos tuberculoides quando comparados com os virchowianos (KRUTZIK et al., 2003) o que mostra a importância desses componentes na fase de combate inicial ao *M. leprae*. O NOD2 atua frente ao agente causador da hanseníase reconhecendo estruturas específicas da parede do bacilo (SCHENK et al., 2016) e junto com o NOD1 ativa a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$  (interleucina-1 $\beta$ ) via NF $\kappa$ B pelos macrófagos (KANG; CHAE, 2011). Em um estudo que avaliou a expressão dos receptores NOD em camundongos infectados com o *M. leprae*, foi visto que tanto o NOD1 quanto o NOD2 foram mais expressos nos infectados quando comparados com os não-infectados. Em pacientes hansenianos, a expressão do NOD2 está elevada no grupo TT e este receptor participa da ativação da diferenciação dos monócitos em DCs, o que não é visto nos LL (SCHENK et al., 2013).

As diferentes apresentações da doença se relacionam com o nível de resposta imune celular antígeno-específica contra o *M. leprae*. Pacientes tuberculoides são considerados o polo restritivo à infecção, devido à natureza da resposta imune que desenvolvem. Nesses indivíduos ocorre predomínio do perfil Th1 de linfócitos, o que leva a produção das citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e TNF que levam a ativação de macrófagos pela via clássica,

com elevado poder microbicida. Desta forma, a resposta imune exibida pelos pacientes TT contribui para a contenção da multiplicação do bacilo e resulta na forma localizada da doença. Esses pacientes possuem pequeno número de lesões onde raramente são encontrados bacilos e o envolvimento do tecido e dano neural são características frequentes deste grupo (ARNOLDI; GERDES; FLAD, 1990; MENDONÇA et al., 2008; MONTOYA; MODLIN, 2010; MOURA et al., 2007; SIELING; MODLIN, 1994; YAMAMURA et al., 1991).

Por outro lado, os pacientes LL apresentam a secreção predominante de citocinas com perfil Th2 como interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13) resultando em intensa resposta imune humoral, a qual não contribui na defesa do hospedeiro contra micobactérias, pois não é efetiva contra patógenos intracelulares. Além disso, a IL-4 e IL-13 levam a uma ativação alternativa dos macrófagos (GORDON; TAYLOR, 2005), voltada para o reparo tecidual através da secreção de fatores de crescimento como o fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) que atua nos mecanismos de regulação da matrix extracelular pelos fibroblastos, proliferação das células endoteliais e indução de angiogênese nos tecidos lesionados (FULCO et al., 2014). Os pacientes LL mostram maior expressão do CD163 (DE SOUSA et al., 2016) receptor que participa de respostas anti-inflamatórias e contribui para a estocagem de ferro dentro dos vacúolos fagossomais, favorecendo a sobrevivência do *M. leprae* dentro dessas células (MOURA et al., 2012). Em conjunto, o perfil de resposta desenvolvido pelos LL colabora para o desenvolvimento da forma disseminada da doença, considerada o polo permissivo à infecção e caracterizada pela presença de numerosas lesões cutâneas com elevada carga bacilar (ARNOLDI; GERDES; FLAD, 1990; MENDONÇA et al., 2008; MONTOYA; MODLIN, 2010; MOURA et al., 2007; SIELING; MODLIN, 1994; YAMAMURA et al., 1991).

Apesar da dicotomia Th1/Th2 na hanseníase estar bem descrita (MODLIN, 1994), outros perfis de resposta imune podem contribuir para a patogênese da doença. Os linfócitos Th17 parecem exercer um papel na resposta imune protetora contra o *M. leprae* uma vez que a principal citocina secretada por estas células (IL-17) é mais expressa pelas pessoas saudáveis que mantem um longo período de convivência com indivíduos hansenianos, bem

como pelos pacientes com a forma localizada da doença (SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

A subpopulação dos linfócitos T regulatórios (Tregs) é conhecida por controlar a ativação da resposta inflamatória por meio da secreção de citocinas inibitórias como a IL-10 e TGF- $\beta$  (SHU et al., 2016). Na hanseníase as Tregs foram associadas com a anergia antígeno-específica ao *M. leprae* nos pacientes virchowianos (SAINI; RAMESH; NATH, 2014). Por outro lado, essa subpopulação se mostrou aumentada nos pacientes que exibem alto grau de imunidade celular na tentativa de regular a ativação crônica da resposta imune antimicrobiana (ATTIA et al., 2014).

Os pacientes dimorfos apresentam instabilidade na resposta imunológica oscilando entre os polos tuberculoide e virchowiano. Os pacientes BT possuem lesões com perfil histopatológico semelhante aos pacientes TT porém essas são mais numerosas e podem possuir baciloscopia positiva (RIDLEY; JOPLING, 1966); o perfil de citocinas é predominantemente Th1 (MISRA et al., 1995a; VENTURINI et al., 2011). As secções histopatológicas das lesões revelam granulomas formados por células epitelioides no centro e linfócitos na periferia com uma menor quantidade de histiócitos e plasmócitos. A expressão de iNOS e a produção de IFN- $\gamma$  são maiores em comparação com os BL e o índice baciloscópico destes indivíduos pode variar entre 0 a 1+ (VENTURINI et al., 2011). Os BB são bastante instáveis com lesões de pele distribuídas de modo simétrico com dimensões variadas. A histopatologia desse grupo revela a ausência de células gigantes e a presença de células epitelioides e linfócitos espalhados de modo difuso e um índice baciloscópico de 3 ou 4+ (RIDLEY; JOPLING, 1966). A histopatologia dos BL mostra a presença de linfócitos reunidos em clusters ao redor do infiltrado inflamatório, com maior índice baciloscópico e produção de IL-10, TGF- $\beta$ 1 em comparação com os pacientes BT. O perfil de citocinas, assim como observado nos pacientes LL, tende ao padrão Th2 (MISRA et al., 1995a; VENTURINI et al., 2011).

Durante o curso da hanseníase podem surgir complicações resultantes de reações inflamatórias agudas aos antígenos do *M. leprae*, chamadas de reações hansênicas (NAAFS; VAN HEES, 2016; SCOLLARD et al., 2006; WALKER; LOCKWOOD, 2006), as quais se caracterizam por diferentes mecanismos

imunológicos (SCOLLARD et al., 2006). A reação do tipo 1 ou RR tem como característica o aumento da resposta imune celular contra o *M. leprae* e seus componentes, deslocando a resposta imunológica em direção ao polo tuberculoide do espectro (DEGANG; NAKAMURA; AKAMA, 2014). Atinge principalmente os pacientes BT, BB e BL (SCOLLARD et al., 2006) que demonstram aumento de infiltrado de linfócitos com perfil Th1 específicos contra o *M. leprae* e consequente decréscimo na quantidade de bacilos (revisto por Degang et al., 2014). A infiltração leva à compressão neural na região acometida podendo evoluir para fibrose (RANQUE et al., 2007). Portanto, a RR é considerada a principal causa da perda da função neural, levando a incapacidades e contribuindo para a morbidade nas regiões endêmicas (RANQUE et al., 2007).

A reação do tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) atinge principalmente os pacientes da faixa virchowiana (BL e LL) e é mediada pela formação e deposição de imuno-complexos na circulação e múltiplos tecidos, bem como pela ativação do sistema complemento frente aos antígenos do *M. leprae* (WEMAMBU et al., 1969). O ENH ocorre em pacientes que apresentam elevada carga bacilar e predomínio da resposta imune humoral (RIDLEY e RIDLEY, 1983) uma vez que este tipo de resposta não é a mais adequada contra os organismos intracelulares (MISRA, et al., 1995b). Clinicamente a reação de ENH é caracterizada pela presença de pápulas ou nódulos eritematosos e dolorosos e sinais sistêmicos como febre, dores nas articulações, edema das mãos, pés e face, proteinúria e indisposição, além disso a ocorrência de vasculite com edema intersticial é o principal evento patológico observado (DEGANG; NAKAMURA; AKAMA, 2014). A resposta Th17 parece também estar envolvida na patogênese do ENH uma vez que a isoforma IL-17A encontra-se aumentada nesses pacientes reacionais e sugere o aumento da resposta mediada por essas células durante essa reação (MARTINIUK et al., 2012). Além disso, os pacientes com ENH exibiram menores níveis de Tregs circulantes no sangue em comparação com pacientes com Reação Reversa (RR) e pessoas saudáveis, associado com o decréscimo do TGF- $\beta$  e aumento da expressão da IL-17. Sendo assim, sugere-se que a diminuição dessa população de células imunossupressoras pode favorecer o desenvolvimento da resposta mediada

pelas Th17 durante o ENH (VIEIRA et al., 2016).

### **1.7 Células Dendríticas e o papel do receptor DC-SIGN na hanseníase.**

As células dendríticas (DCs) atuam na primeira linha de defesa reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de receptores específicos como o DC-SIGN. O reconhecimento e internalização de antígenos pelas DCs imaturas (iDCs) induz sua migração para os órgãos linfoides secundários regionais, enquanto sofrem maturação que envolve grandes mudanças morfológicas, como o desenvolvimento de prolongamentos celulares, que aumentam a sua superfície de contato e propiciam melhor interação com os linfócitos, e aumento na produção de citocinas e expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos. Tais mudanças tornam as DCs maduras (mDCs) e aptas a ativar os linfócitos T CD4+ virgens, característica exclusiva dessa população celular (HUBO et al., 2013).

A ativação dos linfócitos T CD4+ virgens envolve três sinais principais mediados pelas DCs. O peptídeo derivado do patógeno apresentado pelas DCs via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é reconhecido pelos linfócitos e tomado como primeiro sinal; o segundo sinal é dado pela ligação de receptores da superfície dos linfócitos T com moléculas coestimulatórias expressas pelas mDCs; além disso, a presença de fatores solúveis como as citocinas IL-12, IL-15, IL-16 ou TNF- $\alpha$  é considerada como terceiro sinal. Assim, as DCs se configuram como fortes indutoras de diferenciação e proliferação dos linfócitos T, e por este motivo as DCs são consideradas a ponte entre a imunidade inata e adquirida (BANCHEREAU et al., 2000; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; FORUM, 2006; GEGINAT et al., 2015; HUBO et al., 2013; MEDZHITOV, 2001; STEINMAN; YOUNG, 1991).

A partir da interação entre os linfócitos T virgens e DCs há o desencadeamento da resposta imune específica onde os linfócitos ativados produzem citocinas, que levam à expansão de clones antígeno-específicos e promovem a diferenciação de linfócitos T efetores e de memória. De acordo com o perfil de maturação das DCs que se reflete na expressão de moléculas

coestimulatórias e produção de citocinas por estas células, diferentes perfis de resposta imune podem ser ativados (KALIŃSKI et al., 1999).

Na hanseníase, iDCs derivadas de monócitos do sangue periférico não demonstraram o aumento da expressão dos marcadores de maturação em sua superfície quando estimuladas com *M. leprae* (MURRAY et al., 2007). Os níveis de expressão das moléculas apresentadoras de antígenos (MHC I e II) nas DCs infectadas pelo bacilo se mostram diminuídos, o que sugere uma baixa competência para estimular o desenvolvimento de resposta imune efetiva contra o bacilo (HASHIMOTO et al., 2002).

Em biópsias de pacientes TT foi observada elevada expressão de proteínas relacionadas com a apresentação de antígenos (CD1) pelas DCs ao contrário do que foi visto nos pacientes LL, onde as mesmas raramente estavam presentes (SIELING et al., 1999).

Em um estudo realizado por Krutzik et al. (2003) foi visto que o *M. leprae* ativa as células da imunidade inata, como as DCs, pelos receptores do tipo Toll TLR1-TLR2 e as citocinas presentes no ambiente das lesões TT ou LL podem influenciar a ativação destes receptores. As DCs estimuladas com os antígenos do bacilo, na presença de IFN- $\gamma$ , tiveram aumento na produção da IL-12p40 ao passo que quando o estímulo foi dado na presença da IL-4 e IL-10 a secreção da IL-12p40 foi inibida.

Em um trabalho realizado pelo nosso grupo observamos que as DCs estimuladas com antígenos do *M. leprae* produziram baixos níveis da forma bioativa desta citocina, a IL-12p70 (BRAGA et al., 2015). Já que a produção dessa citocina é essencial para a geração da resposta imune celular (HSIEH et al., 1993), a sua baixa produção frente ao bacilo sugere que este não é um forte indutor da resposta eficiente para a eliminação do patógeno intracelular.

Em geral, estudos que empregam as DCs na hanseníase situam a importância do papel que estas células desempenham na ativação da resposta imune específica contra o *M. leprae*, e indicam uma dificuldade, quando infectadas, em ativar a diferenciação de linfócitos com perfil efetivo para contenção da multiplicação bacilar.

O receptor DC-SIGN (*DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*) é o principal envolvido no reconhecimento do *Mycobacterium tuberculosis* em DCs

e macrófagos alveolares (GEIJTENBEEK et al., 2002; TAILLEUX et al., 2005) e pode ser considerado um elemento fundamental no desenvolvimento da resposta imune contra micobactérias, tais como *M. leprae*. Ensaios in vitro confirmaram a preferência de ligação do *M. leprae* pelo receptor DC-SIGN em comparação com *Mycobacterium smegmatis* (BARREIRO et al., 2006a).

Codificado pelo gene *CD209*, o DC-SIGN é membro da família de receptores de lectina do tipo C e encontra-se presente na superfície de DCs imaturas de origem mieloide e algumas populações de macrófagos (SOILLEUX et al., 2006). É capaz de reconhecer estruturas ricas em manose presentes na superfície dos microrganismos promovendo a internalização e apresentação antigênica dos patógenos. Além disso, se liga as moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais (ICAM-2) e linfócitos T (ICAM-3) contribuindo para migração transendotelial das DCs e sinapse imunológica entre DCs e linfócitos T, respectivamente (GEIJTENBEEK; ENGERING; VAN KOOYK, 2002; ŠVAJGER et al., 2010).

Além de mediar o reconhecimento do patógeno, a interação entre DC-SIGN e a lipoarabinomanana (ManLAM) presente na superfície das micobacterias influencia o desenvolvimento da resposta imune específica. Essa ligação induz desativação celular e/ou produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  (FIGDOR; VAN KOOYK; ADEMA, 2002), e pode contribuir com os mecanismos de escape do patógeno (MAEDA et al., 2003).

Células DC-SIGN positivas contendo o *M. leprae* estão presentes nas lesões de pacientes do polo virchowiano da hanseníase (BARREIRO et al., 2006a; KRUTZIK et al., 2005). Além disso, a expressão do DC-SIGN foi predominante nas lesões virchowianos enquanto o receptor CD1b, com a função de apresentação antigênica, estava aumentado nos pacientes tuberculoides (SOILLEUX et al., 2006). Diante deste contexto funcional, variações no gene do receptor DC-SIGN são candidatas à associação com a hanseníase, uma vez que este está diretamente envolvido no reconhecimento do *M. leprae* e pode influenciar o curso da resposta imune.

## 1.8 Genética na hanseníase

É curioso observar que a complexidade de manifestações clínicas da hanseníase está intimamente relacionada com as variações da resposta imune que os indivíduos desenvolvem frente a um mesmo microrganismo, (CASANOVA; ABEL, 2007; DE SOUZA et al., 2016), uma vez que o bacilo apresenta baixa variabilidade (MONOT et al., 2007). O *background* genético do hospedeiro, condições nutricionais, vacinação com BCG, co-infecções e taxa de exposição ao *M. leprae* influenciam o desenvolvimento clínico da hanseníase (MORAES et al., 2006).

Diante deste contexto, a hanseníase é considerada uma doença de caráter complexo, não apresentando padrão de herança mendeliana clássica nem correlação genótipo/fenótipo perfeita. O desenvolvimento da doença é controlado pela ação conjunta de vários genes, associada a fatores do ambiente, socioeconômicos, culturais, entre outros.

A presença do componente genético na susceptibilidade à hanseníase foi observada por trabalhos de genética clássica. Estudos realizados com gêmeos demonstraram que os pares monozigóticos apresentavam maior concordância de ocorrência dos fenótipos na hanseníase *per se* e subtipos clínicos (ALI; RAMANUJAM, 1966). Análises de segregação complexa mostraram que a susceptibilidade à doença é controlada pela ação de poucos genes, que influenciam tanto a ocorrência quanto a progressão da hanseníase (ABEL; DEMENAI, 1988; LÁZARO et al., 2010; SHIELDS; RUSSELL; PERCAK-VANCE, 1987).

Estudos que fornecem informações sobre a natureza exata do componente genético envolvido necessitam do emprego de marcadores genéticos moleculares em estratégias de ligação e/ou associação (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Os estudos de ligação identificam nos pacientes intervalos cromossômicos relacionados à patologia estudada através do uso de marcadores conhecidos e resultam na identificação de regiões candidatas a abrigar o(s) gene(s) associado(s) com a doença (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Por outro lado, as análises de associação, quando baseadas no modelo de estudo caso-controle, comparam as frequências de determinado marcador em



indivíduos afetados (casos) e indivíduos não afetados (controles). Estudos de associação podem ser utilizados como sequência aos estudos de ligação uma vez que, a partir da pesquisa em regiões candidatas, é possível detectar genes e marcadores responsáveis pelo desfecho alvo do estudo. No caso do marcador apresentar-se em maior frequência no grupo de pacientes, o mesmo está associado com susceptibilidade à doença, e quando se apresenta em maior frequência no grupo controle, está associado com a resistência (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

As estratégias adotadas para estudar ou validar a influência genética envolvem a descrição de novos genes que podem ter impacto na doença, e para isso pode ser feito um *screening* total do genoma como nos estudos do tipo *genome-wide*. Outra estratégia pode ser o uso de genes candidatos que são escolhidos com base no conhecimento prévio da imunopatogenia da doença. Nesse caso é realizado um mapeamento a partir do emprego de poucos marcadores dentro de um *locus* gênico e a associação pode ser testada na população em estudos do tipo caso-controle ou em estudos baseados em família (TDT) (CARDOSO et al., 2011a).

Os seguintes critérios são considerados para eleger genes candidatos: (i) se desempenham papel crítico na patogenia da doença são os candidatos funcionais; (ii) se estão localizados em região genômica previamente envolvida com a doença são os candidatos posicionais; (iii) se são candidatos funcionais e posicionais (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

Estudos têm confirmado a participação de vários genes na susceptibilidade à hanseníase. A maioria são estudos caso-controle que envolvem genes candidatos (CARDOSO et al., 2011a). Os marcadores genéticos mais utilizados nestes estudos são os polimorfismos de base única (SNPs), que são substituições bialélicas pontuais que podem estar em qualquer região do genoma e podem ou não ter efeito funcional sobre proteínas (MORAES et al., 2006).

## 1.9 Genes candidatos e polimorfismos na hanseníase

Variações nos genes relacionados com a resposta imune inata e adquirida regulam a interação patógeno-hospedeiro na hanseníase (CARDOSO et al., 2011a; MORAES et al., 2006) e os estudos de epidemiologia genética têm confirmado esta hipótese (BOCHUD et al., 2008, 2009; DE SALES MARQUES et al., 2013; MEDEIROS et al., 2016; MIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2009; PREVEDELLO; MIRA, 2007; ROY et al., 1997; SAPKOTA et al., 2011; WONG et al., 2010; ZHANG et al., 2009). Diante desse contexto, nosso grupo tem explorado SNPs que ocorrem em regiões gênicas que participam da resposta imunológica do hospedeiro frente ao *M. leprae*.

A interleucina 10 (IL-10), por exemplo, exerce papel imunorregulatório sobre o perfil de resposta Th1, o que pode contribuir para a permanência de patógenos intracelulares (PEÑALOZA et al., 2016; VOLK et al., 2001). É considerada uma citocina anti-inflamatória e a sua concentração está diretamente associada com a progressão da hanseníase (LIMA et al., 2000). SNPs isolados ou em haplótipos na região promotora do gene *IL10* têm sido alvo de estudos de associação em hanseníase (FRANCESCHI et al., 2009; MALHOTRA et al., 2005; MORAES et al., 2004; PEREIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2002). Nosso grupo relatou que o alelo -819T do SNP rs1800871 no gene *IL10* foi associado com a susceptibilidade à doença na população brasileira (PEREIRA et al., 2009). Além disso, o haplótipo associado à susceptibilidade -3575T/-2849A/-2763C/-1082G/-819T confirma a participação deste alelo na predisposição a hanseníase (MORAES et al., 2004). De modo semelhante, nos indianos, a frequência do alelo -819T e do genótipo TT foi significativamente maior nos pacientes quando comparados com controles saudáveis, e o haplótipo -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C foi associado com resistência para a hanseníase *per se* e para o desenvolvimento das formas mais graves da doença (MALHOTRA et al., 2005).

Diante da importância do Fator de Necrose Tumoral (TNF) na resposta inflamatória frente a infecções, diversos estudos envolvendo *SNPs* na região do gene *TNF* foram realizados. O polimorfismo -308G/A (rs1800629) localizado na região promotora do *TNF* é alvo comum de estudos de associação em doenças

infecciosas, e nosso grupo encontrou associação do alelo -308A deste SNP com proteção contra a hanseníase em populações brasileiras. Somado a isso, observamos que células do sangue total dos carreadores do alelo -308A produziram altos níveis da citocina TNF quando estimuladas com *M. leprae* ou lipopolissacarídeo (LPS) (CARDOSO et al., 2011b).

O IFN- $\gamma$  desempenha papel na defesa do hospedeiro induzindo o desenvolvimento do perfil Th1 e inibindo a resposta Th2 (SCHRODER et al., 2004). O IFN- $\gamma$  aumenta o poder microbicida dos macrófagos (FILICE; BEAMAN; REMINGTON, 1980) e é a principal citocina envolvida na resposta imune protetora frente às infecções micobacterianas (COOPER; KHADER, 2008). Nas populações dos estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, os indivíduos carreadores do alelo +874T (rs2430561) no gene *IFNG* produziram níveis elevados de IFN- $\gamma$ , e este alelo foi associado com a proteção contra hanseníase nos brasileiros (CARDOSO et al., 2010). O mesmo SNP não foi associado com a doença na população de Malawi, o que não exclui a possibilidade de associação do gene com a doença nesta população (FITNESS et al., 2004).

O gene *GATA3* localizado na região cromossômica 10p15 também é um candidato na susceptibilidade à hanseníase, pois codifica o fator de transcrição GATA-3 essencial para a geração da resposta imune Th2 (TINDEMANS et al., 2014) a qual favorece a multiplicação do bacilo. Polimorfismos no gene *GATA3* encontram-se associados com diversas doenças inflamatórias (ANDREW et al., 2012; ARSHAD et al., 2008; CHANG et al., 2010; COOK et al., 2014; GLUBB et al., 2015; GUTHIKONDA et al., 2014; PEREZ-ANDREU et al., 2015; PYKÄLÄINEN et al., 2005). Nosso grupo observou que o alelo A do polimorfismo rs10905284 neste gene está associado com resistência a hanseníase *per se* em duas amostras da população brasileira. Além disso, os linfócitos T CD4+ de indivíduos com genótipo AA deste polimorfismo expressam maior quantidade do fator de transcrição, indicando um papel funcional deste SNP (MEDEIROS et al., 2016).

Variações em genes que estão envolvidos com os passos iniciais do reconhecimento de patógenos também parecem exercer grande influência na patogênese da hanseníase (BARREIRO et al., 2006a). Os receptores do tipo Toll (*toll like receptors*, TLRs) reconhecem os PAMPs dos patógenos e dão início à

resposta imune inflamatória (WANG et al., 2016). Os TLRs 1 e 2 são expressos em várias células da pele (derme e epiderme) e foram detectados nas lesões de pacientes com hanseníase (KRUTZIK et al., 2003). Polimorfismos em genes *TLR* foram relacionados com as reações hansênicas e a hanseníase *per se* em vários estudos (BOCHUD et al., 2008, 2009; JOHNSON et al., 2007; MISCH et al., 2008; WONG et al., 2010). Nosso grupo encontrou associação do haplótipo 248S/I602 (rs4833095/rs5743618) do gene *TLR1* com o risco aumentado para o desenvolvimento da hanseníase na população brasileira (DE SALES MARQUES et al., 2013). Na população de origem caucasiana (turcos), o alelo *TLR1* 602S foi relacionado com a diminuição da expressão do receptor na superfície das células e com um papel protetor para desenvolvimento da hanseníase (JOHNSON et al., 2007). Neste mesmo gene, o alelo 248S foi associado com a hanseníase *per se* e estados reacionais da doença em uma população de Bangladesh (SCHURING et al., 2009).

O receptor NOD2 reconhece estruturas da parede celular das micobacterias e pode induzir a diferenciação de monócitos em células dendríticas via interleucina-32 (IL-32) (SCHENK et al., 2013), além de colaborar para o *clearance* dos patógenos através da ativação do processo da autofagia (COONEY et al., 2010). Um estudo do tipo *genome-wide* identificou a associação do gene *NOD2* com a hanseníase e sugere que este receptor desempenha um papel na resposta contra essa doença (ZHANG et al., 2009). Sendo assim, foi identificada a predisposição à hanseníase para os portadores do alelo G do SNP rs8057341 na população chinesa. Em um estudo conduzido pelo nosso grupo observamos que o alelo A do mesmo polimorfismo foi associado com a proteção à doença na população brasileira, o que complementa o achado dos chineses (SALES-MARQUES et al., 2014).

### **1.10 A relação do gene do receptor DC-SIGN com a hanseníase**

O gene *CD209* codifica o receptor DC-SIGN, localizado no cromossomo 19p13.2-3 e polimorfismos na região promotora deste gene foram associados com predisposição a algumas doenças (BARREIRO et al., 2006b;

CHAAITHANYA et al., 2015; CHUANSUMRIT et al., 2005; MARTIN et al., 2004; YI et al., 2015; ZHOU et al., 2006; ZUPIN et al., 2016). O polimorfismo -336A/G (rs4804803) interfere na expressão do receptor (WANG et al., 2011) e estudos apontam a sua associação com o risco aumentado para o desenvolvimento de doenças infecciosas como a tuberculose e a dengue (BARREIRO et al., 2006b; CHUANSUMRIT et al., 2005; MARTIN et al., 2004). Em um estudo de coorte realizado no sul da África, os genótipos GG e GA foram mais frequentes nos pacientes com tuberculose do que nos controles, sugerindo um papel do alelo -336G na predisposição ao desenvolvimento da doença (BARREIRO et al., 2006b). Este polimorfismo também foi associado com a dengue, e o alelo -336G mostrou correlação com a gravidade da doença (CHUANSUMRIT et al., 2005), o que corrobora o fato dos genótipos GG e AG terem sido associados com susceptibilidade a dengue hemorrágica (WANG et al., 2011).

Em amostras de origem paquistanesa, foi realizado sequenciamento da região genômica *CD209*, e os polimorfismos detectados foram genotipados em estudo de associação com a hanseníase. Dentre os 7 SNPs avaliados, incluindo o -336A/G, nenhum mostrou associação com a doença *per se* ou com as formas clínicas (BARREIRO et al., 2006a). Porém, vale ressaltar que este estudo testou um número pequeno de pacientes e controles saudáveis. Já na população japonesa, o alelo -336G foi associado com a susceptibilidade para a hanseníase (KANAZAWA et al., 2009). No Brasil, não foram encontrados estudos avaliando a associação do gene DC-SIGN com a hanseníase.

Visto que o reconhecimento do *M. leprae* pelas células da imunidade inata envolve a participação do DC-SIGN (BARREIRO et al., 2006a), este estudo teve como objetivo testar pela primeira vez na população brasileira a associação do polimorfismo -336A/G no gene *CD209* com a hanseníase.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a associação do polimorfismo -336A/G (rs4804803) no gene *CD209* com a hanseníase e seus efeitos funcionais na resposta de DCs ao *M. leprae*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Conduzir estudo de associação do polimorfismo -336A/G com a hanseníase *per se* e suas formas clínicas em amostra populacional caso-controle oriunda de área com alta endemicidade para a doença (município de Rondonópolis-MT).

- Realizar estudo funcional sobre os efeitos do SNP na resposta imune de DCs derivadas de monócitos frente a antígenos do *M. leprae* através da avaliação de marcadores de superfície (DC-SIGN, CD80, CD86, CD83, CD40, HLA-DR e ICAM-1) e produção de citocinas (TNF, TGF- $\beta$ 1, IL-12p70, IL-12-23p40 e IL-10).

### 3. MANUSCRITO

#### **-336A/G (rs4804803) SNP IN *CD209* (DC-SIGN) GENE IS ASSOCIATED WITH MULTIBACILLARY LEPROSY AND AFFECTS THE RESPONSE AGAINST *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

**Running title: Effects of rs4804803 SNP in leprosy**

Giovanna V. Germano, Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, CEP 18618687, Brasil.

André F. Braga, Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, CEP 18618687, Brasil.

Rodrigo M. de Camargo, Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, CEP 18618687, Brasil.

Priscila B. B. Mangilli, Departamento de Biologia Molecular, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, CEP 17034-971, Brasil.

Ana Carla P. Latini, Departamento de Biologia Molecular, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, CEP 17034-971, Brasil.

Vânia N. Brito de Souza Departamento de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, CEP 17034-971, Brasil.

## Footnote page

The authors declare no conflicts of interest.

This work was supported by: São Paulo Resercher Foundation (FAPESP) [Grant #2009/01436-1]. GG, AFB and RMC were supported by scholarships from CAPES

These data were not presented in any scientific meeting.

Correspondence: Vania Niéto Brito de Souza

Instituto Lauro de Souza Lima

Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, Km 225/226, Aimorés, CEP: 17034-97, Bauru, São Paulo State, Brazil.

Phone number: +55 14 3103-5943

e-mail: vbrito@ilsl.br



## ABSTRACT

**Introduction.** Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, is a relevant problem of public health in Brazil, affecting the peripheral nervous system causing physical disabilities. During pathogen-host interaction the host genetic background determine the course of the disease that presents a spectral range of clinical manifestations from localized lesions to disseminated disease with high bacillary load. *CD209* gene encodes DC-SIGN receptor that is present on dendritic cells and participates in the recognition of *M. leprae* and immune activation. **Methods.** We evaluated the association of the -336A/G SNP (rs4804803) in *CD209* gene with leprosy. The population included 835 individuals from endemic area in Brazil (424 controls and 411 cases). Besides, we performed a functional study using dendritic cells stimulated with *M. leprae* antigens. **Results.** The GG genotype was associated with susceptibility to the multibacillary leprosy (OR 4.52, CI 1.01-20.09, p=0.0472) and the A allele protected against this clinical form of leprosy (OR 0.22, IC 0.05-0.98, p=0.0478). The carriers of the G allele expressed low levels of DC-SIGN and CD80 and secreted less TNF and more TGF- $\beta$  after *M. leprae* stimulus. **Conclusion.** Together, these data suggest a lower efficiency of G carriers in activating the effective immune response against leprosy bacillus.

**Key-words:** DC-SIGN, *Mycobacterium leprae*, leprosy, single nucleotide polymorphism

### 3.1. BACKGROUND

Leprosy is still considered a public health problem. Around 210,000 new cases were detected in 2015 around the world and more than 26,000 were registered in Brazil [1] which indicates active transmission of *Mycobacterium leprae*. Following the initial host-pathogen interaction it may occur the elimination of the bacillus or clinical manifestation of the disease in its different forms [2], which reflect the immune response of the host [3]. In the tuberculoid pole of leprosy, considered restrictive, there are few localized lesions and rare bacilli due to the intense cellular immune response with predominance of Th1 cytokines that are effective for the containment of the bacillus besides some Th17 cytokines [4]. On the other hand, the lepromatous pole is considered permissive to the infection and presents disseminated disease. These patients are unable to restrict the multiplication of bacilli due to inhibition of the antimicrobial activity of the macrophages and the predominance of the humoral response allied to an increase in the number of T regulatory cells [4]. There are also the intermediate forms, immunologically unstable (borderlines) where the cellular immune response gradually decreases from the tuberculoid to the lepromatous pole [5].

Given the low genetic diversity of *M. leprae* [6], the complexity of clinical and biological phenotypes in leprosy points to the role of the host genetic background as determining the course of leprosy [7]. This is evidenced in a study with twins where the development of the disease and its clinical forms had higher concordance among monozygotic pairs [8]. Complex segregation analysis also demonstrates that susceptibility to disease is controlled by the action of few genes, which influence the development and progression of leprosy [9].

Since variations in genes related to the innate and acquired immune response regulate host-pathogen interaction, these genes are frequently candidates for association studies. Our group have demonstrated the association of genes *GATA3* [10], *NOD2*, *CCDC122-LACC1* [11], *NLRP1* [12], *TNF* [13], *TLR1* [13], *IFNG* [14] e *IL10* [15] with leprosy in the Brazilian population.

The *CD209* gene encodes the DC-SIGN receptor that is present on the surface of dendritic cells (DCs). This receptor participates in the recognition of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) [16] e *M. leprae* [17] and promotes the internalization and antigen presentation [18]. Polymorphisms in the *CD209*

promoter region were associated with predisposition to tuberculosis [19], Chikungunya [20], dengue fever [21] e hepatitis C [22]. The polymorphism rs4804803 (-336A/G) may interfere with receptor expression [21] while -336G allele was associated with susceptibility to tuberculosis in Africans [19] and dengue fever and its severity in the chinese population [21]. In leprosy, this allele was associated with susceptibility to disease in the Japanese population, but no association with leprosy or its clinical forms was seen in Pakistan [23]. There are no previous studies evaluating the association of *CD209* gene with leprosy in the Brazilian population.

Since the recognition of *M. leprae* involves DC-SIGN and polymorphisms in this gene are associated with the development of infectious diseases, we analyzed for the first time in the Brazilian population the association of SNP rs4804803 in the *CD209* gene with leprosy as well as its functional effects in the response against *M. leprae*.

## **3.2. METHODS**

### **3.2.1. Participants and study design**

The association of -336A/G SNP (rs4804803) in *CD209* gene with leprosy was tested in an endemic area for leprosy in Brazil. The study involved 835 individuals living in Rondonópolis, Mato Grosso state. Located in the center-west of Brazil, it is considered to be highly endemic for leprosy, with a prevalence of 10.19 cases per 10,000 inhabitants [24]. Among the participants, 411 are cases, with confirmation of leprosy through clinical-laboratory tests performed at the outpatient service in Rondonópolis. The control group involved 424 healthy individuals, who did not present clinical signs of leprosy in a campaign to detect leprosy in public places in this municipality. The characteristics of the participants are shown in Supplementary Table 1. Leprosy was classified according to Ridley and Jopling criteria [3]. In order to evaluate the association of the rs4804803 polymorphism with the clinical manifestation of leprosy, the patients were classified according to the bacillary index: patients who presented 0 and 1+ of bacilli in the histopathological analysis of the skin lesions were considered

paucibacillary (PB), and those containing 2+ or more were considered as multibacillary (MB) [25].

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Lauro de Souza Lima Institute (CAAE 68433217.0.0000.5475) and all required protocols were followed. Informed consent was given by all participants.

### **3.2.2. SNP selection**

The SNP rs4804803 was chosen because of previous association with leprosy in the Japanese population [23] and other infectious diseases [19–22,26–28].

### **3.2.3. DNA extraction and SNP genotyping**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the *salting-out* method [29]. Genotyping was done by allelic discrimination using fluorogenic probes in TaqMan SNP genotyping assay on ViiA 7 equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **3.2.4. Functional study**

The functional effect of the SNP rs4804803 was evaluated on monocytes-derived dendritic cells (DCs) stimulated with sonicated antigen of *M. leprae*. For this analysis, we selected 19 leprosy patients characterized in Supplementary Table 2. DNA of these patients was obtained from skin lesions biopsies embedded in paraffin from the archive of the Pathology Department of the Lauro de Souza Lima Institute. Extraction of these samples was performed with the QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) and genotyping was done as previously described. Due to the low frequency of the G allele, patients were grouped into carriers of the G allele and not carriers of this allele, regardless of clinical form (GG + AG *versus* AA).

For DC differentiation, monocytes were isolated from peripheral blood using density gradients from Histopaque 1077 (Sigma - Aldrich - Saint Louis - USA) and Percoll (GE Healthcare, Upsalla, Sweden) and differentiated into DCs by addition of GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) and

IL-4 (Peprotech, New Jersey, USA) [30]. After 6 days, DCs were stimulated with (i) maturation cocktail (MC) composed by IL-1 $\beta$  (25 ng/mL), IL-6 (1,000 U/mL), TNF (50 ng/mL) and prostaglandin E2 (PGE2) ( $10^{-6}$ M); (ii) lipopolissadaride (LPS, 250 ng/ml); (iii) sonicated antigen of *M. leprae* (ML, 10  $\mu$ g/ml) (kindly provided by Dr. Patrick Brennan of the University of State of Colorado – USA); or (iv) remained unstimulated (US). After 48 hours, the cells were harvested and the supernatant was stored for cytokine dosing.

DCs were evaluated by flow cytometry for expression of DC-SIGN and other activation and maturation markers (CD80, CD86, CD83, CD40, ICAM-1 and HLA-DR) using specific monoclonal antibodies according to the instructions of the manufacturer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (Supplementary Table 3). Isotype-matched controls of irrelevant specificity (isotype controls, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were used in all reactions. Data collection was performed in a FACSCalibur flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), including a minimum of 10,000 events. Analyses were done using the FlowJo software version 7.6.5 (2011).

The levels of TNF, Transforming Growth Factor –  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), IL-12p70, IL-12-23p40 and IL-10 were measured in the culture supernatant 48 hours after the addition of the stimuli using commercial DuoSet ELISA kits (R&D Systems, USA).

### **3.2.5. Data analysis**

Frequencies of genotypes, alleles, and carriers in cases and controls were compared using the univariate logistic regression model for the calculation of Odds Ratio (OR) values, with and without adjustment for sex and ethnicity covariates. The statistical software R version 2.5.1 for Windows was used. The p value <0.05 was adopted for statistical significance. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were tested by the chi-square test.

Statistical analysis of functional data according to genotype was done using the non-parametric Mann Whitney test. Statistical significance was set at p <0.05. All of these analyzes were performed in GraphPad Prism software version 5.01 (La Jolla, CA, USA, 2007).

### 3.3. RESULTS

#### 3.3.1 rs4804803 (-336A/G) SNP is associated with clinical form of leprosy

The genotype GG of the rs4804803 SNP in the *CD209* gene was associated with a higher risk of developing multibacillary form of leprosy with statistical significance after adjustment for the covariates sex and ethnicity (OR 4.52, CI 1.01-20.09,  $p = 0.0472$ ) (Table 1). Complementarily, carriers of the A allele showed protection against the multibacillary form of the disease (OR 0.22; CI 0.05-0.98;  $p = 0.0478$ ) (Table 1). There was no association of polymorphism with leprosy *per se* in the population.

Genotyping was successful for 96.5% of the samples and the frequency of genotypes was within the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE).

#### 3.3.2 DCs from -336G carriers have lower expression of DC-SIGN and CD80 in response to *M. leprae* antigen.

By using FACS we evaluated the expression of the DC-SIGN receptor and other costimulatory and adhesion molecules by the DCs in order to verify the influence of the rs4804803 SNP genotype on the immune response against *M. leprae* antigens. DCs from G carriers showed slightly lower percentage of positive cells for DC-SIGN receptor compared to DCs from individuals with AA genotype after stimulation with *M. leprae* antigens ( $p = 0.0346$ ) (Figure 1).

The expression of CD80, represented by mean fluorescence intensity (MFI), was lower in -336G carriers when DCs were stimulated with *M. leprae* sonicated antigen ( $p = 0.0286$ ) and standard maturation cocktail ( $p = 0.0497$ ) or were kept unstimulated ( $p = 0.0497$ ) (Figure 2).

The percentage of DCs expressing CD86 was significantly lower for G carriers only when stimulated with LPS ( $p = 0.0339$ ) (Figure 2).

The expression of the other molecules evaluated (CD83, CD40, ICAM-1 and HLA-DR) showed no differences according to -336A/G SNP genotypes (Data not shown).

### 3.3.3 DCs from -336G carriers produce lower levels of the TNF and higher levels of TGF- $\beta$ 1

The production of pro and anti-inflammatory cytokines by DCs was also evaluated according to the genotype for rs4804803 SNP. TNF production in *M. leprae*-stimulated cultures was lower in G carriers in comparison with AA individuals ( $p = 0.0486$ ) (Figure 3). On the other hand, TGF- $\beta$ 1 production was higher in G carriers after *M. leprae* stimulus, standard maturation cocktail and unstimulated cultures ( $p = 0.0053$ ,  $p = 0.0123$  and  $p = 0.0455$ , respectively) (Figure 3). This group also showed higher IL-12p70 production than the AA genotype group, and this difference was significant for LPS-stimulated cultures ( $p = 0.0363$ ) (Figure 3). The production of IL-12-23p40 and IL-10 did not show significant differences according to the genotype for this SNP (data not shown).

## 3.4 DISCUSSION

When we investigated the association of the rs4804803 polymorphism in the *CD209* gene with leprosy, we found that the GG genotype increased the risk of developing the multibacillary leprosy by Brazilian patients from a highly endemic area. The genotypes AG and GG were previously associated with dengue fever [31] and are strongly associated with the dengue hemorrhagic fever, increasing the risk of developing the most severe form of this disease by Thai and Chinese populations [21,31]. In tuberculosis, GG genotype and G allele increased the risk of developing pulmonary disease [32]. The frequency of G allele was higher among male patients with tuberculosis, infected with the virulent strain Beijing, and who had death as outcome [33]. GG genotype was also associated with a predisposition for tuberculosis coinfection in HIV-positive individuals [34]. Therefore, the presence of G allele seems to be associated with a higher risk of developing the more severe forms of these infectious diseases.

Our results showed no association of rs4804803 SNP with leprosy *per se*. In Pakistan, this polymorphism was also not associated with disease *per se* or clinical form [17] while in Japanese population G allele was associated with susceptibility to leprosy. This SNP was not associated with the occurrence of tuberculosis or its clinical forms in Colombians [35]. Similarly, there was no

association with susceptibility to tuberculosis in North Africans in Tunisia [36]. In contrast, in the South African population there was an increased risk for the development of the disease related to G allele, while A allele showed a protective effect [19]. Together, these data reveal that the association of rs4804803 SNP with mycobacteriosis varies according to the population what should be explained by the distinct gene organization in these populations and does not exclude the association of the gene with these diseases.

We observed that DCs from G carriers had lower DC-SIGN expression under stimulation with *M. leprae* antigen. On the other hand, no variation in expression of this receptor related to the genotype was seen in dengue fever [31]. Such difference can be attributed to particular characteristics of the interaction between pathogens and DCs, since after contact with the *M. leprae*, this receptor is internalized [37]. A study tested the effect of the two variants of rs4804803 SNP on gene transcription, using a model of gene reporter with luciferase in HeLa cells, and reported lower transcriptional activity of the G variant [21]. This could be reflected in lower receptor expression in cells from the carriers of this allele, but this was not verified. Another study that analyzed the expression of both gene and protein *CD209*, showed higher expression in monocyte-derived DCs from AG individuals in comparison with AA ones, contrarily what was predicted in the previously mentioned study [31]. This contradiction suggests that factors other than -336A/G SNP influence the levels of expression of DC-SIGN.

We also observed that DCs stimulated with *M. leprae* antigen had lower CD80 expression among G carriers. This molecule is found in activated DCs and exerts an important costimulatory function by binding to the CD28 receptor present on the surface of lymphocytes, stimulating lymphocyte proliferation and inhibiting the differentiation of induced T regulatory cells [38]. Therefore, the lower expression of CD80 by G carriers could contribute to the low ability of DCs to stimulate the development of specific cellular immune responses for *M. leprae*. M1-activated monocytes exposed to *M. leprae* showed a significant reduction in CD80 expression [39], as seen in DCs stimulated with irradiated *M. leprae* [40]. Since the bacillus it is not a potent inducer of DC maturation [41], the lower expression of CD80 could contribute to the low activation of the specific cellular immune response, a process that directly involves the CD80/CD28 costimulation



pathway [38]. The preferential recognition of the bacillus by DC-SIGN [17] and the consequent activation of an anti-inflammatory route [42] may induce a decrease in the expression of costimulatory molecules such as CD80.

Besides, DCs stimulated with *M. leprae* antigens from G carriers produced lower levels of TNF, an important cytokine in response to the bacillus [43]. This data is consistent with the results of the genetic study, where GG genotype showed increased risk of developing the multibacillary form of leprosy. DCs from AG heterozygous individuals stimulated with DEN-2 dengue virus antigens presented high production of TNF- $\alpha$  and IL-12p40 compared to AA homozygotes [31], which may be related to the characteristics of the viral infection and contribute to the development of dengue hemorrhagic fever, associated with the presence of the G allele. During Th1 response, IFN- $\gamma$  induces TNF production by macrophages which results in increased microbicidal activity of these cells [43] contributing to the containment of bacillary multiplication and consequently to the development of the localized form of the disease. The low production of TNF by DCs stimulated with *M. leprae* has been shown [40], and may contribute to defective development of Th1 response, favoring the spread of the bacillus. This idea is corroborated by the observation that TNF is present in the serum of patients with the tuberculoid form of leprosy unlike the lepromatous where this cytokine is absent [44].

Another functional effect of rs4804803 was higher TGF- $\beta$ 1 production by G carriers. TGF- $\beta$ 1 is related to the development and maintenance of suppressor and regulatory cells in the immune response [45]. Abundant secretion of this cytokine by DCs from G carriers may favor bacillary persistence and multiplication, resulting in the disseminated form of the disease. The expression of TGF- $\beta$ 1 is greater in skin lesions from LL leprosy patients [46] and BL patients with high bacilloscopic index [5], as well as in PBMCs of these individuals stimulated with *M. leprae* antigen [47]. In addition, leprosy patients showed greater expression of TGF- $\beta$ 1 compared with healthy controls [46]. This cytokine is associated with M2 type macrophages which participate in the cicatrization, migration, cell division and induction of angiogenesis [48]. High levels of TGF- $\beta$  are related to the macrophages with elevated expression of the receptor CD163 in LL lesions, associated with *M. leprae* antigen uptake, which can contribute to

the suppression of the cellular immune response in these individuals and may favor the bacilli persistence [49].

Taken together, our data showed that G allele of the -336A/G SNP is related to the lower efficiency in the activation of the first steps for effective immune response against *M. leprae* which may favour the occurrence of the multibacillary form of leprosy. Variants in genes of pattern recognition receptors, such as NOD2, TLR1, MBL2 and VDR, are previously associated with the risk of development of leprosy *per se*. Our data suggest the importance of this stage of pathogen recognition also for the outcome of leprosy.

## REFERENCES

1. WHO. Leprosy: weekly epidemiological record, Septembre 2016. World Heal Organ Wkly Epidemiol Rec [Internet]. **2016**; 91(35):405–420.
2. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* **2006**; 77(3):189–202.
3. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* **1966**; 34(3):255–273.
4. Saini C, Tarique M, Rai R, Siddiqui A, Khanna N, Sharma A. T helper cells in leprosy: An update. *Immunol Lett* [Internet]. Elsevier B.V.; **2017**; 184:61–66.
5. Venturini J, Soares AC, Belone A de FF, et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. **2011**; 82(1):25-35.
6. Monot M et al. On the Origin of Leprosy. **2007**; 1040(2005):1–448.
7. Prevedello FC, Mira MT. Leprosy : a genetic disease ? 2007; 82(5).
8. Ali PM, Ramanujam K. Leprosy in Twins 1. *Int J Lepr.* **1966**; 34(4):405–407.
9. Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CCO, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis.* **2010**; 201:1598–1605.
10. Medeiros P, Silva WL da, Oliveira Gimenez BB de, et al. The GATA3 gene is involved in leprosy susceptibility in Brazilian patients. *Infect Genet Evol.* Elsevier B.V.; **2016**; 39:194–200.
11. Sales-Marques C, Salomão H, Fava VM, et al. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum Genet.* **2014**;

133(12):1525–1532.

12. Pontillo A, Laurentino W, Crovella S, Pereira AC. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol.* **2013**; 19:274–279.

13. Sales Marques C De, Brito-De-Souza VN, Guerreiro LTA, et al. Toll-like receptor 1 N248s single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* **2013**; 208(1):120–129.

14. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-De-Souza VN, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet.* **2010**; 128(5):481–490.

15. Pereira a C, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* **2009**; 10(2):174–180.

16. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann J-L, et al. DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells. *J Exp Med*; **2003**; 197(1):121–127.

17. Barreiro LB, Quach H, Krahenbuhl J, et al. DC-SIGN Interacts with *Mycobacterium leprae* but Sequence Variation in This Lectin Is Not Associated with Leprosy in the Pakistani Population. *Hum Immunol.* **2006**; 67(1–2):102–107.

18. Geijtenbeek TBH, Engering A, Kooyk Y Van. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol.* **2002**; 71:921–931.

19. Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL, et al. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene *CD209* is associated with tuberculosis. *PLoS Med.* **2006**; 3(2):0230–0235.

20. Chaaithanya IK, Muruganandam N, Surya P, Anwesh M, Alagarasu K, Vijayachari P. Association of Oligoadenylate Synthetase Gene Cluster and DC-SIGN (*CD209*) Gene Polymorphisms with Clinical Symptoms in Chikungunya Virus Infection. *DNA Cell Biol.* **2015**; 35(1):44–50.

21. Chuansumrit A, Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, et al. A variant in the *CD209* promoter is associated with severity of dengue disease. **2005**; 37(5):507–513.

22. Zupin L, Polesello V, Alberi G, et al. MBL2 genetic variants in HCV infection susceptibility, spontaneous viral clearance and pegylated-interferon plus ribavirin treatment response. *Scand J Immunol.* **2016**; 76:49–54.
23. Kanazawa N, Mikita N, Li HJ, et al. [Genetic involvement of bacterial sensor molecules in Japanese leprosy]. *Nihon Hansen Zasshi.* **2009**; 78(1342–3681):255–261.
24. Mobilização reforça combate à hanseníase em Mato Grosso [Internet]. [cited 2017 Apr 17]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/19350-mobilizacao-reforca-combate-a-hanseniase-em-mato-grosso>
25. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ Tech Rep Ser.* **1982**; 675:1–33.
26. Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB, et al. Association of DC-SIGN Promoter Polymorphism with Increased Risk for Parenteral , but Not Mucosal , Acquisition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **2004**; 78(24):14053–14056.
27. Zhou T, Chen Y, Hao L, Zhang Y. DC-SIGN and immunoregulation. *Cell Mol Immunol.* **2006**; 3(4):279–283.
28. Yi L, Zhang K, Mo Y, Zhen G, Zhao J. The association between *CD209* gene polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol.* **2015**; 8(10):12437–12445.
29. John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* **1991**; 19(2):408.
30. Sallusto F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* **1994**; 179(4):1109–1118.
31. Wang L, Chen RF, Liu JW, et al. DC-SIGN (*CD209*) promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis.* **2011**; 5(1).
32. Naderi M, Hashemi M. *CD209* promoter e 336 A / G ( rs4804803 ) polymorphism is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in

- Zahedan , southeast Iran. *J Microbiol Immunol Infect.* **2014**; 47(3):171–175.
33. Ogarkov O, Mokrousov I, Sinkov V, Zhdanova S, Antipina S. “ Lethal ” combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human *CD209* À 336G allele in Russian male population. *Infect Genet Evol.* **2012**; 12(4):732–736.
34. Selvaraj P, Alagarasu K, Swaminathan S, Harishankar M, Narendran G. *CD209* gene polymorphisms in South Indian HIV and HIV-TB patients. *Infect Genet Evol.* **2009**; 9:256–262.
35. Gómez LM, Anaya J, Sierra-filardi E, Cadena J, Corbí Á, Martín J. Analysis of DC-SIGN (*CD209*) Functional Variants in Patients with Tuberculosis. **2006**; :4–7.
36. Ben-ali M, Barreiro LB, Chabbou A, et al. Promoter and neck region length variation of DC-SIGN is not associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. **2007**; :908–912.
37. Geijtenbeek TBH, Vliet SJ Van, Koppel EA, et al. *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* **2003**; 197(1):7–17.
38. Lenschow DJ, Walunas TL, Jeffrey A. CD28 / B7 SYSTEM OF T CELL. **1996**;
- .
39. Fallows D, Peixoto B, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* alters classical activation of human monocytes in vitro. *J Inflamm. Journal of Inflammation*; **2016**; 13:8.
40. Murray RA, Siddiqui MR, Krahenbuhl J, et al. *Mycobacterium leprae* Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation. **2007**.
41. Braga AF, Moretto DF, Gigliotti P, et al. Activation and cytokine profile of monocyte derived dendritic cells in leprosy: in vitro stimulation by sonicated *Mycobacterium leprae* induces decreased level of IL-12p70 in lepromatous leprosy. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz.* **2015**; 110(5):655–61.
42. Krutzik SR, Tan B, Li H, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **2005**; 11(6):653–660.
43. Ottenhoff THM. New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. *Trends Microbiol. Elsevier Ltd*; **2012**; 20(9):419–428.
44. Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev [Internet]*. **2011**;

82(4):371–82.

45. Ruegamer JJ, Ho SN, Augustine JA, et al. Regulatory effects of transforming growth factor-beta on IL-2- and IL-4-dependent T cell-cycle progression. *J Immunol*. **1990**; 144(0022–1767):1767–1776.

46. Trombone AP, Belone A, Guidella C, et al. T helper cytokines expression in leprosy forms and reactional states: serum and in situ analysis (59.9). *J Immunol* [Internet]. **2016**; 188.

47. Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- $\beta$  Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS Negl Trop Dis*. **2014**; 8(1):23.

48. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* [Internet]. **2003**; 3(1):23–35.

49. Moura DF, Mattos KA de, Amadeu TP, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. **2012**; 42(11):2925–2936.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Expression of DC-SIGN by DCs according to the genotypes for rs4804803 SNP.** DCs from leprosy patients (n=19; 12 AA and 7 AG+GG) were stimulated for 48 h with maturation cocktail (MC, composed of IL-1 $\beta$  25 ng/mL, IL-6 1,000 U/mL, TNF 50 ng/mL and prostaglandin E<sub>2</sub> - PGE<sub>2</sub> - 10<sup>-6</sup>M), lipopolysaccharide (LPS, 250 ng/ml) and *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10  $\mu$ g/mL) or kept unstimulated (US). The graphics represents mean plus SEM. \*p<0.05 (Mann-Whitney non parametric test). MFI: mean fluorescence intensity.

**Figure 2. Expression of CD80/CD86 by DCs according to the rs4804803 SNP genotypes.** DCs from leprosy patients (n=19; 12 AA and 7 AG+GG) were stimulated for 48 h with maturation cocktail (MC, composed of IL-1 $\beta$  25 ng/mL, IL-6 1,000 U/mL, TNF 50 ng/mL and prostaglandin E<sub>2</sub> - PGE<sub>2</sub> - 10<sup>-6</sup>M), lipopolysaccharide (LPS, 250 ng/ml) and *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10  $\mu$ g/mL) or kept unstimulated (US). The graphics represents plus SEM. \*p<0.05 (Mann-Whitney non parametric test). MFI: mean fluorescence intensity.

**Figure 3. Cytokine levels in culture supernatants of dendritic cells (DCs) according to the genotypes for rs4804803 SNP.** DCs from leprosy patients (n=19; 12 AA and 7 AG+GG) were stimulated for 48 h with maturation cocktail (MC composed of IL-1 $\beta$  25 ng/mL, IL-6 1,000 U/mL, TNF 50 ng/mL and prostaglandin E<sub>2</sub> - PGE<sub>2</sub> - 10<sup>-6</sup>M), lipopolysaccharide (LPS, 250 ng/ml) and *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10  $\mu$ g/ml) or kept unstimulated (US). The graphics represents mean plus SEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01 (Mann-Whitney non parametric test).

## TABLES

Table 1. Allele, genotype and carrier frequencies of the rs4804803 in *CD209* gene of case-control groups and clinical forms of leprosy from Rondonópolis. Odds ratio, confidence interval and *p-value* regression logistic data for association with leprosy *per se* and clinical forms.

SNP	Alleles or genotypes	Controls	Cases	Non adjusted <sup>a</sup>		Adjusted <sup>ab</sup>	
		N(%frequency)	N(%frequency)	OR (95% CI)	<i>p-value</i> <sup>a</sup>	OR (95% CI)	<i>p-value</i> <sup>a</sup>
rs4804803	A	0,73	0,74	*		*	
	G	0,27	0,26	0,95 (0,87-1,20)	0,7763	0,95 (0,69-1,30)	0,7757
	AA	216 (0,54)	222 (0,55)	*		*	
	AG	154 (0,38)	155 (0,38)	0,97 (0,73-1,31)	0,8880	0,98 (0,73-1,31)	0,9039
	GG	31 (0,08)	28 (0,07)	0,87 (0,51-1,51)	0,6418	0,87 (0,50-1,50)	0,6279
	Carrier A			1,12 (0,66-1,91)	0,6563	1,13 (0,66-1,93)	0,6386
	Carrier G			0,96 (0,72-1,26)	0,7867	0,96 (0,72-1,27)	0,7950
		n= 401	n= 405				
SNP	Alleles or genotypes	PB	MB	Non adjusted <sup>a</sup>		Adjusted <sup>ab</sup>	
		N(%frequency)	N(%frequency)	OR (95% CI)	<i>p-value</i> <sup>a</sup>	OR (95% CI)	<i>p-value</i> <sup>a</sup>
rs4804803	A	0,77	0,73	*		*	
	G	0,23	0,27	1,23 (0,71-2,11)	0,4514	1,34 (0,77-2,33)	0,2940
	AA	53 (0,56)	165 (0,54)	*		*	
	AG	40 (0,42)	115 (0,38)	0,92 (0,57-1,48)	0,7423	1,04 (0,64-1,70)	0,8527
	<b>GG</b>	<b>2 (0,02)</b>	<b>25 (0,08)</b>	<b>4,01 (0,92-17,51)</b>	<b>0,0644</b>	<b>4,52 (1,01-20,09)</b>	<b>0,0472</b>
	<b>Carrier A</b>			<b>0,24 (0,56-1,03)</b>	<b>0,0559</b>	<b>0,22 (0,05-0,98)</b>	<b>0,0478</b>
	Carrier G			0,93 (0,58-1,48)	0,7726	0,82 (0,51-1,32)	0,4286
		n= 95	n= 305				

OR - odds ratio; CI - confidence interval of 95%; PB - Paucibacillary; MB - Multibacillary

<sup>a</sup> Univariate regression logistic.

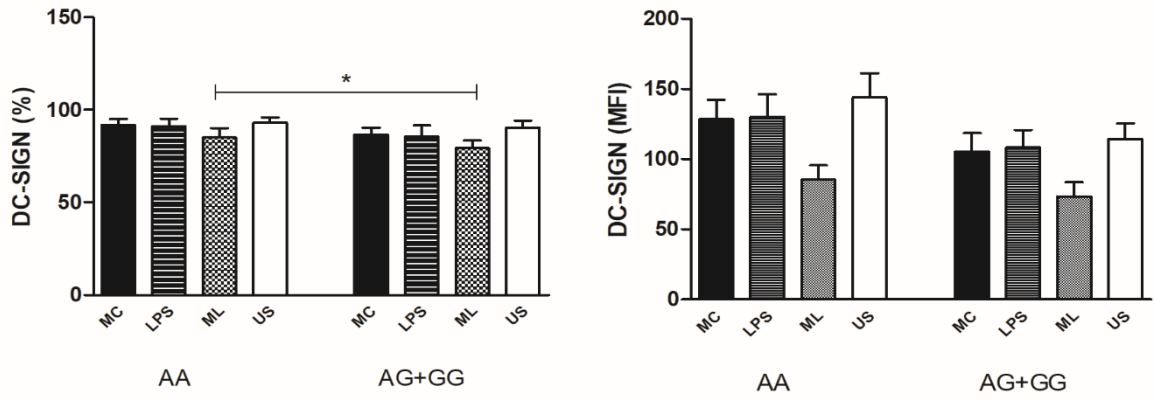
<sup>b</sup> Adjustment for gender and ethnicity covariables.

\* *baseline* comparison.



# FIGURES

## Figure 1



## Figure 2

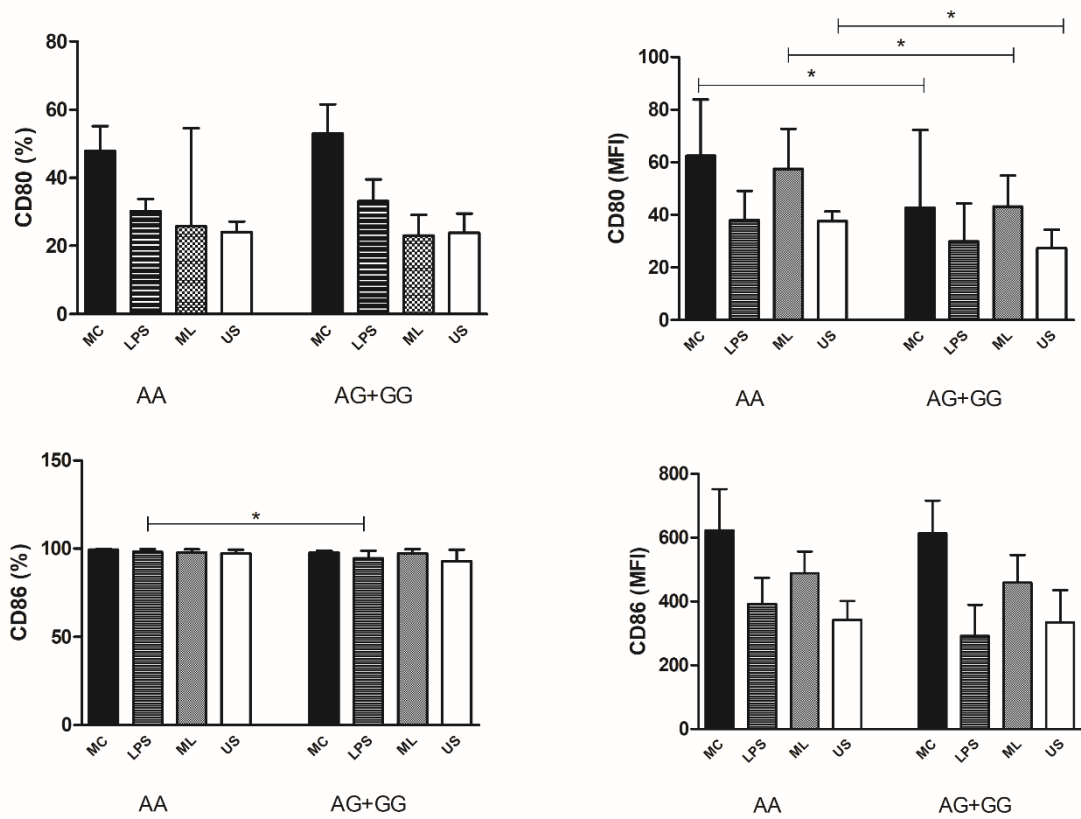
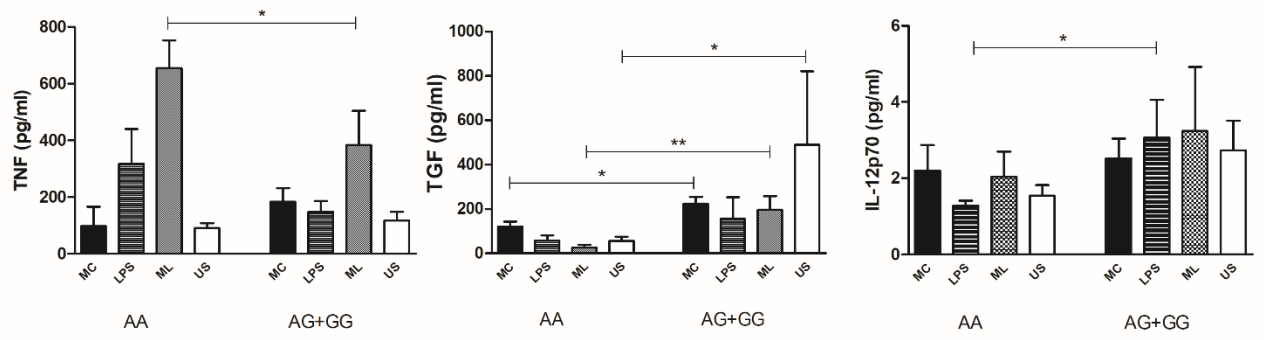


Figure 3



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary Table 1.** Characteristics of cases and controls groups.

<b>Characteristics</b>	<b>Categories</b>	<b>Cases (n=411)</b>	<b>Controls (n=424)</b>
<b>Age (years average±SD)</b>		42,02±16,14	42,03±24,5
<b>Ethnicity*</b>	Caucasians	147 (35,8%)	141 (33,3%)
<b>N (%)</b>	Brown	247 (60,1%)	265 (62,5%)
	Black	17 (4,1%)	18 (4,2%)
<b>Sex</b>	Male	250 (60,8%)	256 (60,4%)
<b>N (%)</b>	Female	161 (39,2%)	168 (39,6%)
<b>WHO classification</b>	Paucibacillary	96 (23,4%)	
<b>N (%)</b>	Multibacillary	310 (75,4%)	
	No classification	5 (1,2%)	
<b>Ridley and Jopling classification</b>	LL	21 (5,1%)	
<b>N (%)</b>	BL	63 (15,3%)	
	BB	79 (19,2%)	
	BT	159 (38,7%)	
	TT	60 (14,6%)	
	IL	27 (6,6%)	
	No classification	2 (0,5%)	

SD – standard deviation; LL – lepromatous leprosy; BL – borderline-leprosy; BB – borderline-borderline leprosy; BT – borderline-tuberculoid leprosy; TT – tuberculoid-tuberculoid leprosy; IL - Indeterminated leprosy. \*Ethnicity was self-declared by subjects.

**Supplementary Table 2.** Characterization of patient groups involved in the functional study of -336A/G (rs4804803) polymorphism.

Characteristics	Categories	Genotypes (rs4804803)	
		(GG+AG)	AA
<b>N (%)</b>		7 (36,8%)	12 (63,1%)
<b>Age (years average±SD)</b>		50±17,28	53±14,03
<b>Clinical forms</b>	PB	4 (57%)	6 (50%)
<b>N (%)</b>	MB	3 (43%)	6 (50%)
<b>Sex</b>	Male	5 (71,4%)	8 (66,7%)
<b>N (%)</b>	Female	2 (28,6%)	4 (33,3%)

SD – standard deviation; LL – lepromatous leprosy; BL – borderline-leprosy; BB – borderline-borderline leprosy; BT – borderline-tuberculoid leprosy; TT – tuberculoid-tuberculoid leprosy; Indeterminated leprosy.

**Supplementary Table 3.** Monoclonal antibodies used in the functional study.

<b>Antibody</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>
<b>CD83</b>	APC	HB15e	BD Biosciences
<b>CD80</b>	FITC	L307.4	BD Biosciences
<b>CD86</b>	PE	IT2.2	BD Biosciences
<b>DC-SIGN (CD209)</b>	PE	DCN46	BD Biosciences
<b>ICAM (CD54)</b>	APC	HA58	BD Biosciences
<b>CD40</b>	FITC	5C3	BD Biosciences
<b>HLA-DR</b>	PE	TU36	BD Biosciences

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que o genótipo GG do polimorfismo rs4804803 (-336A/G) no gene *CD209* está associado com hanseníase multibacilar, e de modo complementar o alelo A foi associado com a proteção a forma multibacilar da doença. Como efeito funcional, observamos que os pacientes hansenianos portadores do alelo G tiveram menor expressão do receptor DC-SIGN e da molécula coestimulatória CD80 aliada a níveis menores de TNF e maior produção do TGF- $\beta$  em DCs, em especial, sob o estímulo com antígeno sonicado do *M. leprae*.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o alelo G do SNP -336A/G está relacionado com a menor eficiência na ativação da resposta imune específica eficaz contra o bacilo o que pode favorecer o desenvolvimento da forma multibacilar da doença.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABEL, L.; DEMENASIS, F. Detection of Major Genes for Susceptibility to Leprosy and Its Subtypes in a Caribbean Island : Desirade Island. **American Journal of Human Genetics**, v.42, 256-266, 1988.
- ALI, P. M.; RAMANUJAM, K. Leprosy in Twins 1. **Internacional Journal of Leprosy**, v. 34, n. 4, p. 405–407, 1966.
- ANDREW, A. S. et al. HSD3B and Gene-Gene Interactions in a Pathway-Based Analysis of Genetic Susceptibility to Bladder Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, e51301, 2012.
- ARNOLDI, J.; GERDES, J.; FLAD, H. D. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. **American Journal of Pathology**, v. 137, n. 4, p. 749–753, 1990.
- ARSHAD, S. H. et al. Polymorphisms in the interleukin 13 and GATA binding protein 3 genes and the development of eczema during childhood. **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 6, p. 1315–1322, 2008.
- ATTIA, E. A. S. et al. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T-reg cells, as well as down regulatory cytokines. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 9, p. 793–801, 2014.
- BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.18, p. 767–811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245–252, 1998.
- BARREIRO, L. B. et al. DC-SIGN Interacts with Mycobacterium leprae but Sequence Variation in This Lectin Is Not Associated with Leprosy in the Pakistani Population. **Human Immunology**, v. 67, n. 1–2, p. 102–107, 2006a.
- BARREIRO, L. B. et al. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene *CD209* is associated with tuberculosis. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 2, p. 0230–0235, 2006b.
- BENNETT, B. H.; PARKER, D. L.; ROBSON, M. Leprosy: Steps Along the Journey of Eradication. **Public health reports**, v. 123, n. 2, p. 198–205, 2008.
- BIRDI, T. J.; SALGAME, P. R.; MAHADEVAN, P. R.; ANTIA, N. H. Role of macrophages in defective cell mediated immunity in lepromatous leprosy. II. Macrophage and lymphocyte interaction. **International Journal of Leprosy and**

**Other Mycobacterial Diseases**, v.48, n.2, p.178–821, 1980.

BOCHUD, P. et al. Toll-Like Receptor 2 (*TLR2*) Polymorphisms Are Associated with Reversal Reaction in Leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 253–261, 2008.

BOCHUD, P. Y. et al. Polymorphisms in toll-like receptor 4 (*TLR4*) are associated with protection against leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 9, p. 1055–1065, 2009.

BOUREE, P.; CARSALADE, G. DE. Current status of leprosy. **La Revue du praticien**, vol.62, 2012.

BRAGA, A. F. et al. Activation and cytokine profile of monocyte derived dendritic cells in leprosy: in vitro stimulation by sonicated *Mycobacterium leprae* induces decreased level of IL-12p70 in lepromatous leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 655–61, 2015.

BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. **Leprosy Review**, v.86, p. 142–155, 2015.

BUSSO, P. et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 1626-1633, 2011.

CARDOSO, C. C. et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. **Human Genetics**, v. 128, n. 5, p. 481–490, 2010.

CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Medicine**, v.6, p. 533–549, 2011a.

CARDOSO, C. C. et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 8, p. 1256–1263, 2011b.

CASANOVA, J.; ABEL, L. Review Human genetics of infectious diseases: a unified theory, **The Embo Journal**, v. 26, n. 4, p. 915–922, 2007.

CHAAITHANYA, I. K. et al. Association of Oligoadenylate Synthetase Gene Cluster and DC-SIGN (*CD209*) Gene Polymorphisms with Clinical Symptoms in Chikungunya Virus Infection. **DNA and cell biology**, v. 35, n. 1, p. 44–50, 2015.



CHANG, J. S. et al. Genetic Polymorphisms in Adaptive Immunity Genes and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 9, p. 2152–2163, 2010.

CHUANSUMRIT, A. et al. A variant in the *CD209* promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature genetics**, v. 37, n. 5, p. 507–513, 2005.

COOK, M. B. et al. A genome-wide association study of prostate cancer in West African men. **Human Genetics**, v. 133, n. 5, p. 509–521, 2014.

COONEY, R. et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. **Nature Medicine**, v. 16, n. 1, p. 90–97, 2010.

COOPER, A. M.; KHADER, S. A. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 191–204, 2008.

CUENCA, J. et al. Genetic polymorphism at position -308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): Implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. **Biological Research**, v. 34, n. 3–4, p. 237–241, 2001.

DE SALES MARQUES, C. et al. Toll-like receptor 1 N248s single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 120–129, 2013.

DE SOUSA, J. R. et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. **Acta Tropica**, v. 157, p. 108–114, 2016.

DE SOUZA, V. N. B. et al. Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 1, p. 82–95, 2016.

DEGANG, Y.; NAKAMURA, K.; AKAMA, T. Leprosy as a model of immunity. **Future Medicine**, v. 9, n. 1, p. 43–54, 2014.

DU, C. et al. Leprosy among Patient Contacts : A Multilevel Study of Risk Factors. **PLoS Neglected** , v. 5, n. 3, p. 1–6, 2011.

DU, T. et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. **Journal of viral hepatitis**, v. 13, n. 9, p. 618–624, 2006.

FIGDOR, C. G.; VAN KOOYK, Y.; ADEMA, G. J. Lectin receptors on DC cells

and related sugars. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 77–84, 2002.

FILICE, G. A.; BEAMAN, B. L.; REMINGTON, J. S. Effects of activated macrophages on *Nocardia asteroides*. **Infection and immunity**, v. 27, n. 2, p. 643–649, 1980.

FITNESS, J. et al. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 341–349, 2004.

FLESCH, I. E. A.; HESS, J. H.; KAUFMANN, S. H. E. NADPH diaphorase staining suggests a transient and localized contribution of nitric oxide to host defence against an intracellular pathogen in situ. **International Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1751–1757, 1994.

FORUM, D. A Three-cell Model for Activation of Naïve T Helper Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, p. 93–96, 2006.

FRANCESCHI, D. S. A. et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 493–498, 2009.

FREHEL, C.; RASTOGI, N. Mycobacterium leprae surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 12, p. 2916–2921, 1987.

FULCO, T. DE O. et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3968–3978, 2014.

EGINAT, J. et al. Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–13, 2015.

GEIJTENBEEK, T. B. H.; ENGERING, A.; VAN KOOYK, Y. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, p. 921–931, 2002.

GLUBB, D. M. et al. Fine-scale mapping of the 5q11.2 breast cancer locus reveals at least three independent risk variants regulating MAP3K1. **American Journal of Human Genetics**, v. 96, n. 1, p. 5–20, 2015.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–964, 2005.

GUTHIKONDA, K. et al. Oral contraceptives modify the effect of GATA3

polymorphisms on the risk of asthma at the age of 18 years via DNA methylation. **Clinical epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 17, 2014.

HASHIMOTO, K. et al. Mycobacterium leprae Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function Mycobacterium leprae Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5167–5176, 2002.

HE, J. et al. The relationship between tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis. **Ren Fail**, v. 33, n. 9, p. 915–922, 2011.

HOLZER, T. J.; NELSON, K. E.; SCHAUF, V. Mycobacterium leprae fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 2, p. 514–520, 1986.

HSIEH, C. S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547–9, 1993.

HUBO, M. et al. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1–14, 2013.

CHEHL, S.; JOB, C. K.; HASTINGS, R. C. 1985. Transmission of leprosy in nude mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol.34, p.1161–1166, 1985.

JOB, C. K. et al. Transmission of Leprosy: A Study of Skin and Nasal Secretions of Household Contacts of Leprosy Patients Using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518–521, 2008.

JOHNSON, C. M. et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 7520–7524, 2007.

KALIŃSKI, P. et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunology Today**, v. 20, n. 12, p. 561–567, dez. 1999.

KANAZAWA, N. et al. [Genetic involvement of bacterial sensor molecules in Japanese leprosy]. **Nihon Hansenbyo.Gakkai Zasshi**, v. 78, n. 1342–3681 (Print), p. 255–261, 2009.

KANG, T. J.; CHAE, G.-T. The Role of Intracellular Receptor NODs for Cytokine Production by Macrophages Infected with Mycobacterium leprae. **Immune**

**network**, v. 11, n. 6, p. 424–7, 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317–337, 2009.

KIM, T. H.; CHAE, G.; KANG, T. J. Expression of Nucleotide-oligomerization Domain (NOD) and Related Genes in Mouse Tissues Infected with *Mycobacterium leprae*. **Immune Network**, v. 15, n. 6, p. 319–324, 2015.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 525–532, 2003.

KRUTZIK, S. R. et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nature Medicine** v. 11, n. 6, p. 653–660, 2005.

LAVANIA, M. et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples : Insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 627–631, 2008.

LÁZARO, F. P. et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. **The journal of infectious diseases**, v. 201, p. 1598–1605, 2010.

LI, Z. et al. **Association between genetic polymorphism of tumor necrosis factor and chronic severe hepatitis B in patients** **National Medical Journal of China**, 2007.

LIMA, M. C. B. S. et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 51, n. 4, p. 419–428, 2000.

LOCKWOOD, D. N. J. et al. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: Baseline results for the north indian infir cohort. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, 2011.

MAEDA, N. et al. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 8, p. 5513–5516, 2003.

MALHOTRA, D. et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Human Genetics**, v. 118, n. 2, p. 295–300, 2005.

MARTIN, M. P. et al. Association of DC-SIGN Promoter Polymorphism with Increased Risk for Parenteral, but Not Mucosal, Acquisition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p. 14053–14056, 2004.

MARTINIUK, F. et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 5, p. 626–630, 2012.

MARTINS, B. D. L.; TORRES, F. N.; OLIVEIRA, M. L. W. DE. Impacto na qualidade de vida em pacientes com hanseníase : correlação do Dermatology Life Quality Index com diversas variáveis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 1, p. 39–43, 2006.

MEDEIROS, P. et al. The GATA3 gene is involved in leprosy susceptibility in Brazilian patients. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 194–200, 2016.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001.

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase \*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343–350, 2008.

MIRA, M. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 636–640, 2004.

MISCH, E. A. et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 5, 2008.

MISRA, N. et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of Mycobacterium leprae. **Immunology**, v. 86, n. 1, p. 97–103, 1995a.

MISRA N. et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. **Immunology Letters**. n.48, vol.2, p.123–128, 1995b.

MODLIN, R. L. Th1-TH2 Paradigm\_Insights from Leprosy, **The Society of Investigative Dermatology**,v.102, p.828-832, 1994.

MOET, F. J. et al. The Prevalence of Previously Undiagnosed Leprosy in the General Population of Northwest Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical**

**Diseases**, v. 2, n. 2, p. 1–4, 2008.

MONOT, M. et al. On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 1040, n. 2005, p. 1–448, 2007.

MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. **Learning from Leprosy. Insight into the human innate immune response**. vol.105, 2010.

MORAES, M. O. et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes and immunity**, v. 5, n. 7, p. 592–5, 2004.

MORAES, M. O. et al. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy review**, v. 77, n. 3, p. 189–202, 2006.

MOURA, D. F. et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study Mycobacterium leprae-human cell interaction. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 2, p. 273–283, 2007.

MOURA, D. F. et al. CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 11, p. 2925–2936, 2012.

MURRAY, R. A. et al. Mycobacterium leprae Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation. **Journal of Immunology**, v.178, p.338-344, 2007.

NAAFS, B.; VAN HEES, C. L. M. Leprosy type 1 reaction (formerly reversal reaction). **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 1, p. 37–50, 2016.

PEÑALOZA, H. F. et al. Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 32, p. 17–30, 2016.

PEREIRA, A C. et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. **Genes and immunity**, v. 10, n. 2, p. 174–180, 2009.

PEREZ-ANDREU, V. et al. Lymphoid neoplasia A genome-wide association study of susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Blood**,v. 125, n. 4, p. 680–687, 2015.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Leprosy: a genetic disease?. **Mammalian Genome**, v. 82, 2007.

PYKÄLÄINEN, M. et al. Association analysis of common variants of STAT6,

GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 1, p. 80–87, 2005.

RANQUE, B. et al. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. **Clinical infectious diseases**, v. 44, n. 1, p. 33–40, 2007.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 9, p. 383–393, 2015.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255–273, 1966.

ROY, S. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 530–532, 1997.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, 2013.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF- $\beta$  Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 23, 2014.

SALES-MARQUES, C. et al. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. **Human Genetics**, v. 133, n. 12, p. 1525–1532, 2014.

SANTOS, A. R. et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 11, p. 1687–1691, 2002.

SAPKOTA, B. R. et al. Association of TNF, MBL, and VDR Polymorphisms with Leprosy Phenotypes. **Human Immunology**, v. 71, n. 10, p. 992–998, 2011.

SCHENK, M. et al. NOD2 triggers an interleukin-32–dependent human dendritic cell program in leprosy. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 555–563, 2013.

SCHENK, M. et al. Human NOD2 Recognizes Structurally Unique Muramyl Dipeptides from *Mycobacterium leprae*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 9, p. 2429–2438, 2016.

SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 7, p. 2920–2930, 1993.

SCHRODER, K. et al. Interferon-  $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of leukocyte Biology**, v. 75, p. 163–189, 2004.

SCHURING, R. P. et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 12, p. 1816–1819, 2009.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.

SCOLLARD, D. M.; DACSO, M. M.; ABAD-VENIDA, M. L. Tuberculosis and Leprosy: Classical Granulomatous Diseases in the Twenty-First Century. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 541–62, jul. 2015.

SHEPARD, C. C. the Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli Into Foot-Pads of Mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 112, n. 3, p. 445–54, 1960.

SHIELDS, E. D.; RUSSELL, D. A.; PERCAK-VANCE, M. A. Genetic Epidemiology of the Susceptibility to Leprosy, **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 1139–1143, 1987.

SHU, Y. et al. Epigenetic Variability of CD4+CD25+ Tregs Contributes to the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.52, p.260-272, 2016.

SIELING, P. A. et al. CD1 Expression by Dendritic Cells in Human Leprosy Lesions: Correlation with Effective Host Immunity. **The journal of immunology**, v. 162, p. 1851–1858, 1999.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, v. 191, n. 4–5, p. 378–387, 1994.

SOILLEUX, E. J. et al. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: Cause or effect? **Journal of Pathology**, v. 209, n. 2, p. 182–189, 2006.

SOUZA, C. S. Hanseníase: Formas Clínicas E Diagnóstico. **Revista de Medicina, Ribeirão Preto**, cidade, v.30,p. 325–334, 1997.



STEINMAN, R. M.; YOUNG, J. W. Signals arising from antigen-presenting cells. **Current opinion in immunology**, v. 3, n. 3, p. 361–72, jun. 1991.

ŠVAJGER, U. et al. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 10, p. 1397–1405, 2010.

TAILLEUX, L.; SCHWARTZ, O.; HERRMANN J. L.; et al. DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells. **Journal of Experimental Medicine**; 197(1):121–127, 2003.

TANG, Y.; PETERSON, L. R. A strategy to halt leprosy transmission. **The Lancet**, v. 14, p. 96–98, 2014.

TINDEMANS, I. et al. GATA-3 function in innate and adaptive immunity. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 191–206, 2014.

TRAUTMAN, J. R. A brief history of Hansen's disease. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 60, n. 7, p. 689–95, 1984.

TRUMAN, R.; FINE, P. E. M. Environmental sources of *Mycobacterium leprae* issues and evidence. **Leprosy Review**, v.81,p.89-92 , 2010.

VAN DER WEL, N. et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1287–1298, 2007.

VENTURINI, J. et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. **Leprosy review**, v. 82, n. 1, p. 25–35, mar. 2011.

VIEIRA, A. P. et al. Development of type 2, but not type 1, leprosy reactions is associated with a severe reduction of circulating and in situ regulatory T-cells. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 721–727, 2016.

VOLK, H. D. et al. IL-10 and its homologs: Important immune mediators and emerging immunotherapeutic agents. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 8, p. 414–417, 2001.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v. 77–78, n. 1, p. 103–121, 2006.

WANG, L. et al. DC-SIGN (*CD209*) promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN

expression and immune augmentation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e934, 2011.

WANG, Y. et al. MiR-200a-3p regulates TLR1 expression in bacterial challenged miiuy croaker. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 63, p. 181–186, 2016.

WEMAMBU, S. N.; TURK, J. L.; WATERS, M. F.; REES, R. J. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. **The Lancet**, v.2, n.7627, p.933–935, 1969.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. **Weekly Epidemiological Record**, v. 90, p.461–476, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to eliminate leprosy as a public health problem**. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **World Health Organization** [Internet]. 1982 [cited 2017 Aug 3]; 675:1–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6806990> (WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organ Tech Rep Ser 768 (1988) 1-51.

WONG, S. H. et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1–9, 2010.

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277–279, 1991.

YI, L. et al. The association between *CD209* gene polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. **International Journal of Clinical Experimental Pathology.**, v. 8, n. 10, p. 12437–12445, 2015.

ZHANG, F.-R. R. et al. Genomewide association study of leprosy. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609–2618, 2009.

ZHOU, T. et al. DC-SIGN and immunoregulation. **Cellular & molecular immunology**, v. 3, n. 4, p. 279–283, 2006.

ZUPIN, L. et al. MBL2 genetic variants in HCV infection susceptibility, spontaneous viral clearance and pegylated-interferon plus ribavirin treatment response. **Scandinavian journal of immunology**, v. 76, p. 49–54, 2016.

## Anexos

INSTITUTO LAURO DE SOUZA  
LIMA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de associação do polimorfismo de base única -336A/G no gene CD209 com a hanseníase em população de área endêmica brasileira

**Pesquisador:** VANIA NIETO BRITO DE SOUZA

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 68433217.0.0000.5475

**Instituição Proponente:** Instituto Lauro de Souza Lima

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.109.983

#### Apresentação do Projeto:

Projeto apresenta introdução clara, informativa com justificativa pertinente para sua execução.

#### Objetivo da Pesquisa:

Proceder estudo de associação do polimorfismo -336A/G com a hanseníase per se e as formas clínicas em amostra populacional caso-controle e caso-caso

de área endêmica: município de Rondonópolis-MT e o estudo também propõe reproduzir os dados observados da população primária em outra população independente, de área não endêmica no estado de São Paulo.

Serão também avaliados os efeitos funcionais deste polimorfismo sobre a resposta de células dendríticas em monócitos do sangue periférico frente à antígenos do M. leprae, utilizando os seguintes marcadores de superfície (DC-SIGN, CD86,

CD80, CD83, CD40, HLA-DR, CD11c e ICAM-1) e produção de citocinas (TNF, TGF-B, IL-12p70, IL-12- 23p40 e IL-10).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por se tratar de amostras de DNA oriundas de Biorepositório (CEP/ILSL: processo 172/09) e de amostras de DNA extraídas de bloco de parafina (CEP/ILSL: processo 171/09), o projeto na

**Endereço:** Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226

**Bairro:** Caixa Postal 3021

**CEP:** 17.034-971

**UF:** SP

**Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3103-5855

**Fax:** (14)3103-5963

**E-mail:** etica@ils.br

apresenta riscos, mas seus resultados podem auxiliar no melhor entendimento da patogênese da doença e na identificação do risco para adoecimento.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Por se tratar de estudo retrospectivo foi solicitada a dispensa do TCLE, mas o pesquisador responsável encaminhou um termo de compromisso em atendimento a resolução 466/12.

**Recomendações:**

Solicitamos justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados e também mediante a finalização do projeto proceder o encaminhamento de um relatório final via Plataforma Brasil, conforme solicitação resolução 466/12.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem comentários

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_881483.pdf	15/05/2017 08:28:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_dcsign_comissao_cientifica.docx	10/05/2017 17:10:57	Giovanna Valle Germano	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	HP0002.pdf	10/05/2017 09:55:26	Giovanna Valle Germano	Aceito
Folha de Rosto	HP0001.pdf	10/05/2017 09:54:41	Giovanna Valle Germano	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BAURU, 09 de Junho de 2017

---

**Assinado por:**  
**Ida Maria Foschiani Dias Baptista**  
**(Coordenador)**