



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**CARLA YAEL RIBEIRO MENDONÇA**

**Associação de SNVs nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2* e a hanseníase, em indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)**

**MANAUS**  
**2019**

**CARLA YAEL RIBEIRO MENDONÇA**

**Associação de SNVs nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2* e a hanseníase, em indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fabíola da Costa Rodrigues**

**MANAUS  
2019**

**CARLA YAEL RIBEIRO MENDONÇA**

**Associação de SNVs nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2* e a hanseníase, em indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Dra. Maria da Conceição Freitas  
Universidade do Estado do Amazonas

---

Dr. Edson do Carmo Júnior  
Universidade Federal do Amazonas

---

Dra. Fabíola da Costa Rodrigues  
Fundação Alfredo da Matta

**MANAUS  
2019**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UEA)

Mendonça, Carla Yael Ribeiro

R484a Associação de SNVs nos genes TYK2, IL23R e LRRK2 e a hanseníase, em indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)/ Carla Yael Ribeiro Mendonça. - Manaus: UEA, 2019

71 f.: color.; 29 cm.

Dissertação – PGSS – Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>Dr<sup>ª</sup> Fabíola da Costa Rodrigues

1. Hanseníase 2. Variantes Genéticas 3. Amazonas. I. Rodrigues, Fabíola da Costa (Orient). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Associação de SNVs nos genes TYK2, IL23R e LRRK2 e a hanseníase em indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)

*Dedico aos maiores incentivadores da minha vida, aos meus pais,  
Ieda Ribeiro e Jorge Mendonça*

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa, que a fez tão importante”.*

*Antoine De Saint - Expéry*

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me dando forças e me guiando nesta jornada.

Aos meus pais, pela educação, carinho e incentivo nos estudos e por terem feito eu chegar até aqui.

À minha amiga Ariani Batista, pela amizade, pelas doses diárias de ânimo, apoio emocional e momentos de descontração.

Aos demais familiares e amigos, pela torcida, incentivo e compreensão dos meus estados de espírito.

À Dra. Fabíola da Costa Rodrigues, pela oportunidade de orientação e apoio ao longo dessa minha trajetória acadêmica e crescimento pessoal.

Ao MSc. André Leturiondo, pela ajuda na execução de parte dos experimentos laboratoriais e incentivo acadêmico.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular, da Fundação Alfredo da Matta, pelo apoio técnico e científico durante a realização deste trabalho.

À CAPES e à FAPEAM pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

## RESUMO

A hanseníase é uma doença crônica, infecciosa e negligenciada, causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória. A instalação da infecção ocorre pela capacidade da bactéria em desordenar o sistema imune, proliferando-se lentamente em células preferenciais, como os macrófagos de pele e células de Schwann, nos nervos periféricos. É de conhecimento que a maioria dos indivíduos expostos ao bacilo não desenvolve a hanseníase e estudos de associação genômica têm demonstrado que diferentes genes podem influenciar o desfecho da doença. Nesse sentido, os estudos têm buscado variações presentes em genes envolvidos na resposta imune ao *M. leprae*, que poderiam explicar a susceptibilidade de determinadas pessoas à hanseníase. Recentemente, foram encontradas variantes de nucleotídeo único (SNV), raras e polimórficas, que podem estar associadas em diferentes populações no desfecho da doença. O presente estudo teve o objetivo, analisar a possível associação de SNVs, nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2*, ao desenvolvimento da hanseníase. Para isso, foi realizado um estudo do tipo caso-controle, em 412 pacientes amazonenses, atendidos na Fundação Alfredo Matta (FUAM) e em 967 indivíduos saudáveis, através da técnica de discriminação alélica, por qPCR. Foram avaliados SNVs representativos, dos genes *TYK2* (rs55882956), *IL23R* (rs76418789), *LRRK2* (rs7298930) e *LRRK2* (rs3761863), os quais já foram associados com a hanseníase em diferentes populações. As variantes do gene *LRRK2* exibiram um fraco Desequilíbrio de Ligação (DL) ( $r^2 = 18\%$ ). Nossos resultados indicam que as variantes rs55882956\_ *TYK2*, rs76418789\_ *IL23R*, rs7298930\_ *LRRK2* e rs3761863\_ *LRRK2* não foram associadas à hanseníase em nossa população, exibindo *Odds Ratio* (OR) de: 4,06 (p=0,35); 0,86 (p=0,96); 1,42 (p= 0,58) e 0,92 (p=0,56) respectivamente. Embora o presente estudo não tenha encontrado relação de associação dos SNVs à hanseníase, os dados aqui apresentados são importantes para conhecer melhor a complexidade dessa doença e buscar novos alvos para tentar explicar como que a genética influencia no desfecho da hanseníase.

**Palavras-chave:** SNVs, *IL23R*, *TYK2* e *LRRK2*, *Mycobacterium leprae*, Polimorfismos.



## ABSTRACT

Leprosy is a chronic, infectious and neglected disease caused by the bacterium *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular bacterium. The onset of infection occurs because of the bacteria's ability to clutter the immune system, proliferating slowly in preferential cells such as skin macrophages and Schwann cells in the peripheral nerves. It is known that the majority of individuals exposed to bacillus do not develop leprosy and studies of genomic association have shown that different genes can influence the outcome of the disease. Therefore, the studies have search for variations present in genes involved in the immune response to *M. leprae*, which could explain the susceptibility of certain people to leprosy. Recently, single nucleotide variants (SNVs), rare and polymorphic, have been found that may be associated in different populations in the outcome of the disease. The present study goal to analyze the possible association of SNVs in the *TYK2*, *IL23R* and *LRRK2* genes, to the development of leprosy. For this, a case-control study was carried out in 412 Amazonia patients, treated at the Alfredo Matta Foundation (FUAM) and 967 healthy individuals, through the allelic discrimination technique, by qPCR. The representative SNVs of the *TYK2* (rs55882956), *IL23R* (rs76418789), *LRRK2* (rs7298930) and *LRRK2* (rs3761863) genes, which have been associated with leprosy in different populations, have been evaluated. Variants of the *LRRK2* gene show a weak binding imbalance (DL) ( $r^2 = 18\%$ ). Our results indicate that variants rs55882956\_*TYK2*, rs76418789\_*IL23R*, rs7298930\_*LRRK2* and rs3761863\_*LRRK2* were not associated with leprosy in our population, showing *Odds Ratio* (OR), 4.06 ( $p = 0.35$ ); 0.86 ( $p = 0.96$ ); 1.42 ( $p = 0.58$ ) and 0.92 ( $p = 0.56$ ) respectively. Although the present study hasn't found association between SNVs and leprosy, the data presented here are important in order to better understand the complexity of this disease and to search new targets to try explain how influence genetics the result of leprosy.

**Palavras-chave:** SNVs, *IL23R*, *TYK2* e *LRRK2*, *Mycobacterium leprae*, Polymorphisms.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Variantes investigadas em pacientes e controles.....	35
Tabela 2. Dados dos pacientes com hanseníase e indivíduos controles saudáveis selecionados para a análise.....	39
Tabela 3. Teste do Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy e Weinberg para as variantes dos genes <i>TYK2</i> , <i>IL23R</i> e <i>LRRK2</i> .....	40
Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística referentes às variantes analisadas em pacientes com hanseníase e controles saudáveis atendidos na FUAM.....	44
Tabela 5. Estudos realizados com as variantes <i>IL23R_rs76418789</i> , <i>TYK2_rs55882956</i> , <i>LRRK2_rs3761863</i> , <i>LRRK2_rs7298930</i> na Hanseníase.....	47
Tabela 6. Frequência da variante rs76418789, do gene <i>IL23R</i> , disponível no Projeto 1000 Genomas.....	48
Tabela 7. Frequência da variante rs55882956, do gene <i>TYK2</i> , disponível no Projeto 1000 Genomas. ....	49
Tabela 8. Frequência do SNP rs3761863, do gene <i>LRRK2</i> , disponível no Projeto 1000 Genomas.....	49
Tabela 9. Frequência do SNP rs7298930, do gene <i>LRRK2</i> , disponível no Projeto 1000 Genomas.....	50

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação da variação da resposta imunológica.....11

### REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 2. Genoma do *Mycobacterium leprae*.....16
- Figura 3. Representação da Variação da resposta imunológica de acordo com Ridley & Jopling e Organização Mundial de Saúde. **A.** virchowiano (VV), **B.** borderline-virchowiano (BV), **C.** borderline-boderline (BB), **D.** borderline-tuberculóide (BT), **E.** tuberculóide (TT).....18
- Figura 4. Mecanismo de interação entre humanos e micobactérias .....19
- Figura 5. Ilustração esquemática do complexo receptor das citocinas IL23, IL23R, consistindo em IL23p19 e p40, liga-se às duas cadeias receptoras IL23R E IL12Rb1 .....24
- Figura 6. Forma estrutural da proteína IL23R .....26
- Figura 7. Forma estrutural da proteína TYK2.....28
- Figura 8 Esquema dos domínios da proteína *LRRK2*.....29

### CAPÍTULO I

- Figura 1. Exemplo de curva de amplificação por qPCR mostrando o CT (cyclethreshold) e o Threshold. ....36
- Figura 2. Genótipo fornecido pela discriminação alélica por eio da intensidade das fluorescência VIC (verde) e FAM (azul), por qPCR, mostrando os três possíveis genótipos. **A.** homozigoto selvagem; **B.** heterozigoto; **C.** homozigoto polimórfico.....37
- Figura 3. Frequências alélicas e genótípicas do SNV rs76418789, do gene *IL23R*.....40
- Figura 4. Frequências alélicas e genótípicas do SNV rs55882956, do gene *TYK2*.....41
- Figura 5. Frequências alélicas e genótípicas do SNP rs3761863, do gene *LRRK2*.....41
- Figura 6. Frequências alélicas e genótípicas da variante rs7298930, do gene *LRRK2*.....42
- Figura 7. Desequilíbrio de ligação entre os marcadores selecionados para os SNPs do gene *LRRK2* na amostra total do grupo caso e controle. O número no interior do losango indica o valor de  $r^2$ .....42
- Figura 8. Meta- Análise do SNP *TNF-308G/A* e a hanseníase.....51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

A - Adenina

AFR - Africana

AMR - Ameríndia

ANK - Repetição de Anquilina

BB - Boderline- Boderline

BCG - Bacilo Calmette – Guérin

BT - Boderline- Tuberculose

BV - Boderline- Virchowiano

C - Citosina

*CARD9* - Domínio de recrutamento da caspase 9

DC - Doença de Crohn

DII - Doença inflamatória intestinal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EAS - Leste Asiático

EUR - Europa

G - Guanina

GWAS - Estudo de Associação Genômica

HIES - Síndrome de hiperimunoglobulina E

HLA - Complexo de histocompatibilidade

IB - Índice baciloscópico

IC - Imunidade Celular

*IFNG* - interferon gama

*IL23R* - Receptor de interleucina 23

LD - Desequilíbrio de Ligação

LRR - Repetição rica em leucina

*LRRK2* - Leucina – rica em repetição quinase 2

*LTA4H* - leucotrieno A4 hidrolase

MAF - Alelo de menor frequência

MB - Multibacilar

*NCKIPSD* - proteína de interação de nck com domínio sh3

*NOD2* - Proteína de domínio de oligomerização de nucleotídeos 2

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR - *Oddsratio*

PARK2 - Park

Pb - Pares de bases

PB - Paucibacilar

qPcr - Pcr em tempo real

*SLC29A3* - família de transportadores de solução 29

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

SNV - Variante de nucleotídeo simples

T - Timina

TT - Tuberculoide- Tuberculoide

TH1 - Células T helper 1

*TLR1* - Toll-like receptor 1

*TYK2* - Tirosina quinase 2

UC - Colite Ulcerativa

UTR - Região não traduzida

*VDR* - Receptor de vitamina D

VV - Virchowiano

## SUMÁRIO

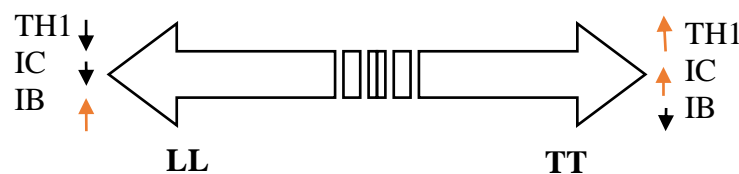
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
2.1 Considerações gerais .....	14
2.1.1 A Hanseníase .....	14
2.2 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	15
2.3 Características e formas clínicas .....	16
2.4 Imunidade Humana contra Micobactérias .....	18
2.5 Genética da hanseníase .....	20
2.6 Marcadores Moleculares .....	21
2.7 Genes .....	23
2.7.1 <i>IL23R</i> .....	23
2.7.2 <i>TYK2</i> .....	26
2.7.3 <i>LRRK2</i> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
3.1 Objetivo Geral .....	30
3.2 Objetivos Específicos .....	30
<b>CAPÍTULO I</b> .....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	39
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>8 ANEXOS</b> .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1873, o pesquisador Gerhard Henrik Armauer Hansen identificou o patógeno causador da hanseníase, uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). A bactéria pode afetar a pele e o nervo periférico, podendo causar dano nervoso e / ou incapacidades físicas, além da diminuição de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil (DE MESSIAS et al., 2007; MONOT et al., 2009; ZHANG et al, 2009; ALTER et al., 2011).

Entre as pessoas potencialmente expostas ao *M. leprae*, cerca de 5% desenvolvem a doença. Dessa forma, as condições nutricionais, ambientais e fatores genéticos do hospedeiro parecem influenciar o espectro clínico da doença, sugerindo que o ambiente e a carga genética têm papel fundamental na suscetibilidade à doença. A variabilidade interindividual no desenvolvimento da doença demonstra uma ampla gama de manifestações, que vão, desde a forma tuberculóide até a hanseníase lepromatosa (MORAES et al., 2006; MENDONÇA et al., 2008)

Dentre um subconjunto de pacientes, a doença pode apresentar-se localizada ou disseminada, dependendo da resposta imune de cada indivíduo. Entre as formas tuberculóide (paucibacilares) e lepromatosa (multibacilares) há diferenças nas respostas imunes (Figura 1). Nas formas lepromatosas (LL), a ausência de respostas Th1 (células *T helper 1*) aumenta a carga bacilar com forte imunidade humoral. Por outro lado, as formas tuberculóide (TT) revelam uma resposta Th1 aumentada com carga bacteriana baixa (RIDLEY & JOPLING, 1996; BRASIL, 2002; DE MESSIAS et al., 2007; TALHARI et al., 2014; ALTER et al., 2011; PINHEIRO et al, 2011).



**Figura 1.** Representação da variação da resposta imunológica. IC- imunidade celular, IB- índice baciloscópio.

**Fonte:** Adaptado de MENDONÇA, 2008.

O desenvolvimento da hanseníase após a infecção pelo *M. leprae* depende do histórico genético do hospedeiro, essa suscetibilidade à doença tem sido associada a fatores imunogenéticos. De acordo com alguns estudos realizados, de agregação familiar, estudos de

gêmeos, testes de associação e análises genômicas, genes implicados nas vias de resposta imunológica inata e adaptativa do hospedeiro, mostraram-se relevantes durante a interação com o patógeno no início da doença (ALCAIS et al., 2005; SOUZA & PERREIRA, 2007; CARDOSO et al., 2011).

Esses estudos já demonstraram hipóteses de que os contatos domiciliares consanguíneos, que possuem contato com o caso índice, apresentam risco maior de desenvolvimento da doença quando comparados aos contatos que não apresentam essa relação (FINE et al., 1997; FITNESS et al., 2002). Bem como, a concordância entre gêmeos monozigóticos, onde a presença da doença e sua intensidade são maiores em relação aos gêmeos dizigóticos (MORAES et al., 2006; ALTER et al., 2008; MENDONÇA et al., 2008).

Vários genes têm sido implicados por estudos de associação na alteração da predisposição à hanseníase, principalmente genes ligados à produção de citocinas da via imunológica (MORAES et al., 2006; ZHANG et al., 2009; LIU et al., 2017) É provável que a predisposição genética desempenhe um papel importante mais substancial na susceptibilidade à doença. Há numerosos genes candidatos para à hanseníase, mas evidências de casualidade para variantes específicas, são pouco estudadas. Além disso, os estudos de associação genômica são, em sua maioria, limitados ao estudos de variantes comuns e ignoram a variação funcionalmente prejudicial imposta pela mutação rara (LIU et al., 2017).

Foram realizados estudos de associação genômica (GWAS) envolvendo um grande número de indivíduos com hanseníase e pessoas não afetadas (controles) (MORAES et al., 2006; LIU et al., 2017, WANG et al., 2018). A maioria das variantes comuns já descritas, como nos genes *NOD2*, *TLR1*, *VDR*, *TNF $\alpha$* , *PARK2* e *HLA*, estão localizadas em regiões não codificadoras ou em regiões gênicas reguladoras (região promotora, regiões 5' ou 3' não traduzida - UTR).

A análise do exoma é totalmente informativa para entender a variação dentro da sequência codificadora de proteína dos genes. Este tipo de estudo tem sido usado para identificar variantes raras ou de baixa frequência, associadas a doenças complexas, como a hanseníase. Variantes comuns parecem exercer um impacto menor no risco de adoecimento, mas elas são importantes, pois podem estar em desequilíbrio de ligação (DL) com outras variantes raras, que possuem um forte impacto no risco de doença e o conjunto desse efeito é relevante (LIU et al., 2017).

De acordo com alguns pesquisadores, as variantes de baixa e rara frequência localizadas em regiões codificadoras não foram investigadas de forma mais ampla, apesar destas estarem, provavelmente, envolvidas na maioria dos casos de doenças infecciosas e



inflamatórias (BODMER & BONILLA, 2008; FEARNHEAD et al., 2005; FRAZER et al., 2009, LIU et al., 2017).

Dessa forma, estudos recentes de associação genômica (GWAS) têm mostrado dados relevantes de genes localizados em regiões exônicas, que possivelmente podem estar associados ao risco de adoecimento (WANG et al., 2015; FAVA et al., 2016, LIU et al., 2017, WANG et al., 2018).

As variantes localizadas no TYK2 [gene responsável por promungar sinais de citocina por fosforilação das subunidades do receptor], LRRK2, [gene que codifica proteínas associadas à doença de Parkinson e possui atividade reguladora de autofagia] e IL23R [ gene que codifica a proteína necessária para sinalização da subunidade do receptor IL23 (IL23A)] foram relatados como associados à suscetibilidade à hanseníase ou ao desenvolvimento de uma forma clínica particular da doença, mas poucas dessas associações foram replicadas ( GILKS et al., 2005; FLOSS et al., 2015; LIU et al., 2017)

Estes dados são bastante promissores e precisam ser replicados e investigados em diferentes populações. Além disso, ainda há necessidade da criação de um painel de marcadores genéticos, do hospedeiro, que auxilie no diagnóstico precoce e prognóstico da gravidade da doença.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Considerações gerais

#### 2.1.1 A Hanseníase

A hanseníase é uma doença dermatoneurológica humana crônica, de evolução lenta resultante da infecção pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), manifestando-se através de sinais e sintomas que afetam a pele, os olhos, a mucosa do trato respiratório superior e acomete o sistema nervoso periférico (BRASIL, 2002; EIDT, 2004; PREVEDELLO & MIRA, 2007) em alguns casos, podendo surgir perda de sensibilidade, atrofia dos músculos com deformidades características e incapacidade físicas irreversíveis ao paciente (BRASIL, 2002; BRASIL, 2010, TALHARI et al., 2014).

A transmissão do patógeno ocorre através do contato íntimo e prolongado com o doente, por meio das vias aéreas superiores através de secreções orais e nasais, de indivíduos infectados não tratados (NOORDEEN, 1994; BRASIL, 2008; TALHARI et al., 2014). O indivíduo infectado pode apresentar a doença de forma localizada ou disseminada (ALTER et al., 2011) dependendo da sua resposta imune. (WHO, 1982; TALHARI & NEVES, 1997, BRASIL, 2010; TALHARI et al., 2014). A hanseníase pode ser caracterizada de diferentes maneiras, de acordo com os parâmetros imunopatológicos e baciloscópico (BRASIL, 2010). Com o passar dos anos, as classificações para caracterizar o grau da doença foram aprimorados para um melhor tratamento. Dessa forma, têm-se as classificações de Madri, de 1953, a de Ridley e Jopling (RIDLEY E JOPLING, 1996) e a classificação operacional adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2016).

O *M. leprae* possui uma baixa patogenicidade, fato que pode observado quando mais de 90% dos indivíduos expostos ao bacilo não desenvolvem a doença, por apresentarem uma imunidade protetora contra a infecção (MORAES et al., 2006). Muitos indivíduos portadores do *M.leprae* não apresentam qualquer sintoma, já outros, manifestam as diferentes formas clínicas (SANTANA et al., 2009). Ainda que a sobrevivência do parasita no hospedeiro esteja relacionada principalmente a fatores genéticos do próprio hospedeiro, não é possível diagnosticar precocemente a hanseníase e não existem marcadores preditivos que distinguem os estágios de exposição, infecção e doença ativa, devido ao longo tempo de evolução (SANTANA et al., 2009).

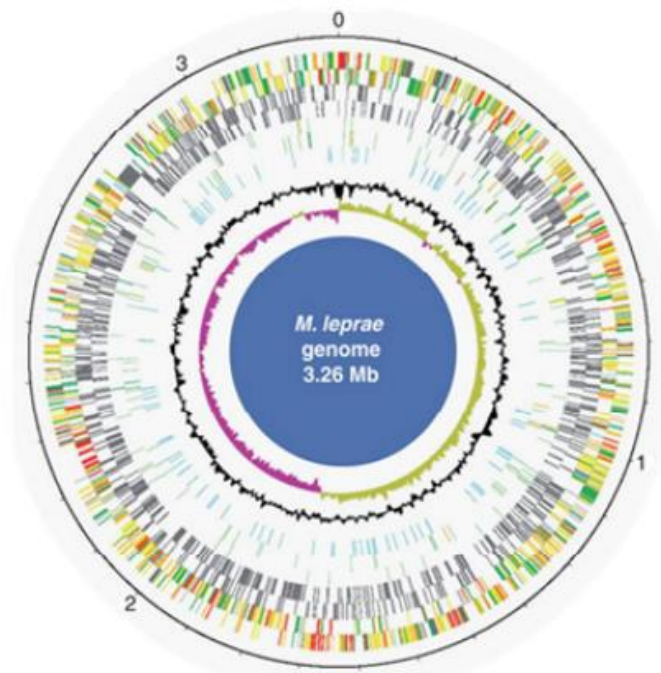
O perfil clínico e patológico da doença e a heterogeneidade epidemiológica, geográfica e étnica podem ser explicados pelas diferenças genéticas na resistência do

hospedeiro (SCHURR et al., 2006). Estudos com os polimorfismos de base única, os SNPs, foram realizados na busca de associação com diferentes doenças e mostraram que eles podem provocar diferenças na expressão de proteínas, causando mudanças estruturais e funcionais (SUH & VIJG, 2005). Além disso, os estudos de associação apontam o envolvimento de variantes genéticas no controle da resposta imune (MIRA et al., 2003; GOULART, 2009) e análises de segregação, em diferentes populações, mostram modelos consistentes de genes controlando a susceptibilidade à doença. Desta forma, os dados de estudos genéticos são bastante promissores e precisam ser replicados e investigados em diferentes populações para que possam ser confirmados (MIRA et al., 2018; FONSECA et al., 2017).

## 2.2 *Mycobacterium leprae*

Além de ser a primeira bactéria patogênica humana a ser identificada, o genoma do *M. leprae* foi um dos primeiros a ser sequenciado de forma completa. A sequência completa do genoma do *M. leprae* revelou evidências de redução e rearranjos genômicos extensos, tornando o *M. leprae* um parasita intracelular obrigatório altamente especializado. Apesar de seu genoma ter sofrido redução evolutiva, quando comparado ao *Mycobacterium tuberculosis*, ele apresenta 3.268.203 pares de bases (pb), com 1.614 genes codificadores de proteínas e 1.116 pseudogenes (Figura 2) (COLI et al., 2001; MONOT et al., 2010; SINGH & COLI, 2011). Análises moleculares do DNA recuperado, de corpos preservados, nos séculos 12 e 13, de países endêmicos da Europa, demonstraram que a variabilidade genética e a arquitetura genômica do *M. leprae* não sofreram mudanças significativas nos últimos 1000 anos (MONOT et al., 2010; SINGH & COLI, 2011; SCHUENEMANN et al., 2013).

Pertencente a ordem Actinomycetales e família Mycobacteriaceae o gênero *Mycobacterium* afigura-se como bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. Ele é um patógeno intracelular obrigatório que tem preferência por células de Schwann e macrófagos (RIDLEY & JOPLING, 1966; MACIEIRA, 2000; TALHARI et al., 2014). O bacilo se reproduz por divisão binária simples, em média a cada 11 a 16 dias. As características imunológicas dos doentes estão associadas ao tempo de incubação, em média de 2-5 anos para os paucibacilares e de 5 a 10 anos para os multibacilares.



**Figura 2.** Genoma do *Mycobacterium leprae*. **Fonte:** Adaptado de SINGH; COLE, 2011.

Sendo um parasita intracelular obrigatório, possui afinidade pelas células cutâneas e células dos nervos periféricos, pois sua temperatura ótima de crescimento é abaixo de 37° C, por esse motivo o bacilo apresenta preferência por essas regiões periféricas do corpo. O *Mycobacterium leprae* tem uma baixa patogenicidade e alta infectividade, ou seja, nem todos os indivíduos que são expostos desenvolvem a doença, por apresentarem uma imunidade protetora contra a infecção (BRASIL, 2002; MORAES et al., 2006; ROSA et al, 2013; TALHARI et al., 2014; COLE et al, 2001)

A transmissão da doença ocorre principalmente, pelo convívio com doentes de formas multibacilares sem tratamento. O contato com doentes paucibacilares pode aumentar em até 2-3 vezes e com multibacilares em até 5-10 vezes o risco de adoecer. O bacilo já foi encontrado em tatus, chimpanzés e macacos e há casos que evidenciam a relação entre esses animais e infecção em humanos (BRASIL, 2002; OMS, 2012; TALHARI, 2015).

### 2.3 Características e formas clínicas

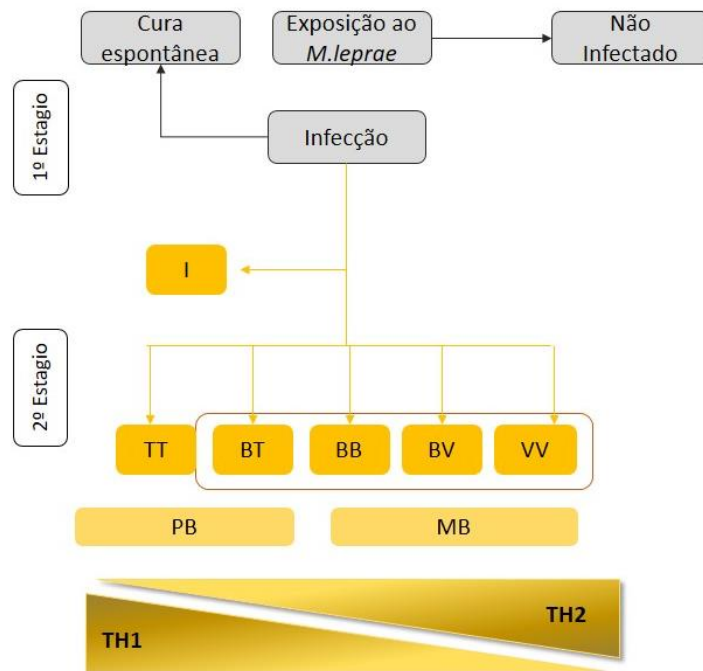
Os indivíduos expostos ao *Mycobacterium leprae* podem desenvolver formas distintas da doença que estão intimamente relacionados ao tipo de resposta imune apresentada por cada paciente, sendo as formas localizadas, associadas a uma resposta imune mais forte, mediada

por células do tipo *Th1* e as formas sistêmicas, associadas com a resposta, predominantemente, humoral, do tipo *Th2*.

A classificação sugerida por Ridley e Jopling (1966) é a mais utilizada em pesquisas e leva em consideração a imunidade dentro da visão de resistência do hospedeiro. Cinco grupos abrangendo todo o espectro da doença foram estreitamente definidos: tuberculóide (TT), tuberculóide *boderline* (BT), *boderline-boderline* (BB) e *boderline-virchowiana* (BV) e a forma virchowiana (VV) (SOUZA, 1997; ARAÚJO, 2005) (Figura 3). No pólo tuberculóide da doença, os pacientes possuem um alto grau de imunidade celular, com um índice baciloscópico baixo. No pólo virchowiano, a imunidade celular é praticamente ausente e apresenta um elevado número de bacilos (RIDLEY & JOPLING, 1996; SCOLLARD et al, 2006; PINHEIRO et al, 2011).

Mais recentemente, um sistema criado pela OMS para definição de tratamento, classificou os pacientes em dois grupos, de acordo com a amplitude da infecção e a carga bacilar. Assim, do ponto de vista operacional, para fins de tratamento, os pacientes são classificados em multibacilares (MB), quando a baciloscopia é positiva e apresentam mais de cinco lesões e paucibacilares (PB), quando a baciloscopia é negativa e com até cinco lesões. Ao comparar os dois sistemas, os pacientes classificados como PB são geralmente equivalentes ao TT/BT, enquanto que os pacientes classificados com MB se aproximam do espectro BB/BV/VV, do sistema de Ridley & Jopling (BRASIL, 2002; MIRA, 2006; TALHARI et al., 2014). Pacientes PB seguem o tratamento com rifampicina e dapsona, por 6 meses, enquanto que os pacientes MB seguem o tratamento com rifampicina, dapsona e clofazimina, de 12 a 24 meses (OMS, 2017).

A característica da hanseníase é a presença de uma ou mais lesões cutâneas, hipopigmentadas ou eritomasos, com bordas bem definidas. Os pacientes com TT e BT apresentam o desenvolvimento de poucas lesões de pele, sem bacilos detectáveis e com alteração neural perto da lesão. Pacientes BB apresentam lesões intermediárias em número e tamanho, entre as formas TT e VV. As formas BV e VV são caracterizadas por numerosas pequenas lesões de pele e danos nervosos generalizados (MIRA, 2006; TALHARI et al 2014).

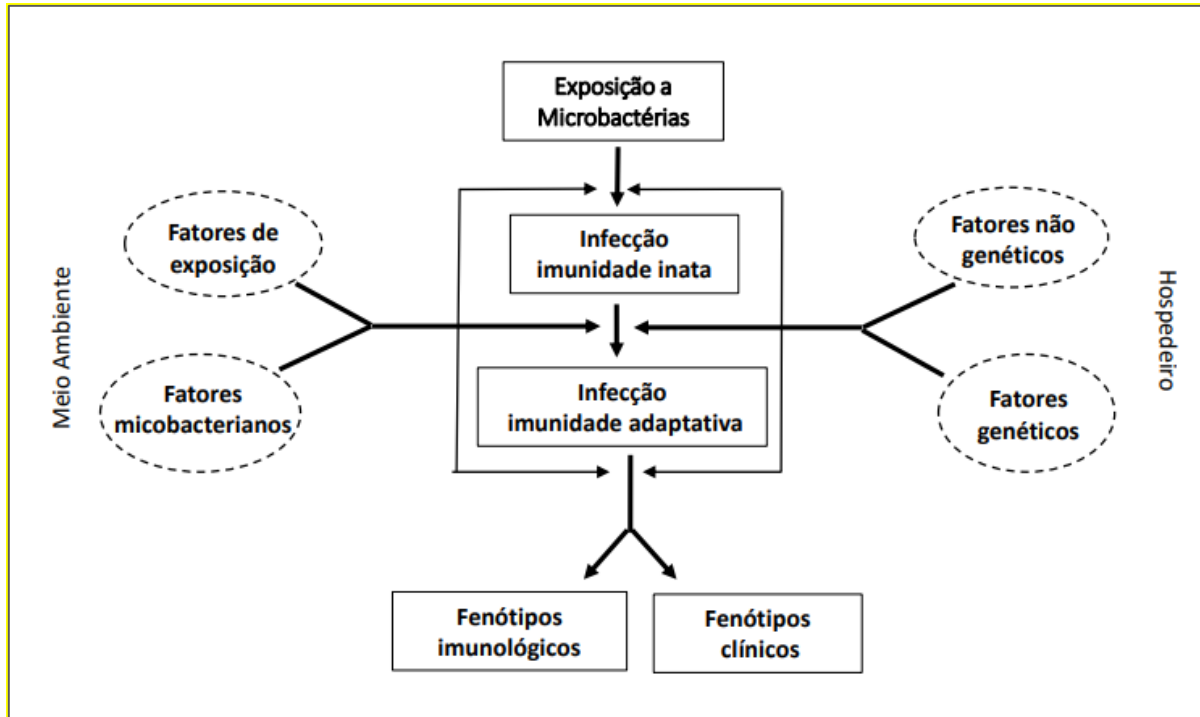


**Figura 3.** Representação da variação da resposta imunológica de acordo com Ridley & Jopling e a Organização Mundial de Saúde. *Th1* - células T helper 1; *Th2* - células T helper 2; VV - virchowiano; BV - borderline-virchowiano; BB - borderline-boderline; BT - borderline-tuberculóide; TT – tuberculóide. **Fonte:** Adaptado Talhari et al, 2014.

## 2.4 Imunidade Humana contra Micobactérias

É difícil distinguir entre exposição e infecção por micobactérias diferentes do Bacilo Calmette – Guerin (BCG - que é inoculado), porque a exposição individual do hospedeiro não pode ainda ser determinada. Geralmente, a exposição à maioria das micobactérias resulta apenas na infecção, podendo a imunidade inata ser suficiente para controlar a infecção e respostas de memória. Conseqüentemente, a essa resposta imunológica, apenas uma pequena porcentagem dos indivíduos infectados desenvolve doença clínica. Isso pode ser observado quando o *M. leprae* causa doença clínica em menos de 10% dos indivíduos infectados (JACOBSON et al., 1999; CASADEVALL et al., 2000).

Portanto, a vulnerabilidade do hospedeiro à micobactérias é a exceção e não a regra em humanos. Uma combinação de fatores ambientais, microbianos e fatores genéticos e não genéticos do hospedeiro determinam o resultado da exposição e infecção. Quaisquer que sejam as contribuições relativas desses fatores, a ocorrência de doenças clínicas implica que a defesa do hospedeiro às micobactérias falhou.



**Figura 4.** Mecanismos de interação entre humanos e micobactérias. **Fonte:** Adaptado CASANOVA et al., 2002.

Interações complexas entre bactérias patogênicas e o hospedeiro são eventos centrais para uma infecção. Dessa forma, a existência ou não de uma infecção estabelecida depende da imunidade inata, isoladamente ou em conjunto com a imunidade adaptativa fornecendo os fenótipos imunológicos e clínicos. O processo de interação do patógeno com o hospedeiro está intimamente sendo controlado por fatores do hospedeiro e do meio ambiente (CASANOVA et al., 2002).

Os fatores conhecidos por contribuir para o desenvolvimento de infecção pelo *M. leprae* são fatores não genéticos, tais como imunidade (por exemplo, vacinação com BCG) e fatores ambientais, como virulência microbiana (por exemplo, resistência a antibióticos) e condições sociais (por pobreza) (Figura 4). Na hanseníase, a suscetibilidade à doença está, provavelmente, ligada aos mecanismos precoces de interação entre o *M. leprae* e seus alvos celulares, por preferência, macrófagos e células de *Schwann*, do sistema nervoso periférico. Muitos estudos epidemiológicos indicaram que a composição genética do hospedeiro desempenha um papel importante na variabilidade da resposta clínica à infecção pelo *M. leprae* (CASANOVA et al., 2002; CARDOSO et al., 2011).

Devido ao importante papel da imunidade do hospedeiro nas diversas características clínicas da doença, os principais genes relacionados a essa susceptibilidade são aqueles envolvidos na produção de citocinas e outras moléculas importantes na via imunológica. No

entanto, diferentes estudos em populações distintas, apresentam resultados discrepantes, isso pode ser explicado pela existência de especificidades no perfil genético de cada população, relacionada à susceptibilidade ao *M. leprae* (ALCAIS et al., 2005; PREVEDELLO & MIRA, 2007; SOUZA & PERREIRA, 2007; MENDONÇA et al., 2008; MISH et al., 2010; SARDINHA et al., 2011).

## 2.5 Genética da hanseníase

Em muitas doenças infecciosas, incluindo a hanseníase, a susceptibilidade é mediada por efeito aditivo de múltiplos genes, que podem modificar a resposta do indivíduo frente a uma infecção, onde cada gene influencia um efeito aditivo sobre o fenótipo infeccioso. (ALCAIS et al., 2009; MISH et al., 2010; SAUER et al., 2015). Evidências clínicas e epidemiológicas sugerem que a susceptibilidade ou a resistência à hanseníase é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro. Dessa forma, estudos observacionais indicam a presença de um componente genético na susceptibilidade à doença. Esta relação foi observada em estudos realizados em gêmeos monozigóticos e entre os contatos domiciliares consanguíneos, os quais tiveram um maior risco de desenvolver a doença do que os dizigóticos e os contatos não consanguíneos, respectivamente, além de análises de segregação genética familiar, bem como, nas diferentes taxas de imunização conferidas pela vacina BCG entre diferentes populações (ALTER et al., 2008; PACHECO & MORAES, 2009; ALTER et al., 2011).

Dessa maneira, esses resultados em conjunto indicam a existência de um forte componente genético que controla a susceptibilidade à hanseníase. Além disso, estudos fitogeográficos mostraram que a variabilidade genética do *M. leprae* é pequena, o que não permite explicar o amplo espectro clínico desenvolvido na doença (MONOT et al., 2005; MONOT et al., 2009). No entanto, esses modelos de pesquisas observacionais, não fornecem informação exata sobre os fatores genéticos envolvidos, ou seja, a identidade e o número de genes, assim como as variantes genéticas existentes que influenciam os fenótipos da hanseníase (SAUER et al., 2015). Destes estudos, os de ligação e os de associação genômica total (GWAS) têm sido conduzidos em busca de genes candidatos. Como resultado várias regiões de genes cromossômicos foram descritas, como a *HLA*, *TNF*, *IFNG*, *IL10*, *IL23R*, *LRK2*, *NOD2*, *TLR*. Estudos de ligação procuram evidências de segregação de um marcador e um traço de doenças dentro das famílias. Em contraste, estudos de associação avaliam se a frequência de uma determinada variante genética difere entre indivíduos com a doença em comparação com controles não doentes (MISH et al., 2010; SAUER et al., 2015)



Os polimorfismos estão relacionados à resposta imunológica a infecções, sendo implicados à hanseníase. Esses genes podem exercer um papel fundamental na influência sobre a susceptibilidade à doença, no desenvolvimento da doença independente da forma clínica e na determinação de suas diferentes manifestações fenotípicas (MENDONÇA et al., 2008; CARDOSO et al., 2011).

## 2.6 Marcadores Moleculares

Estudos de associação pan-genômicos ou estudos de associação genômica (GWAS, *Genome-wide association studies*), do tipo caso-controle, têm identificado SNPs em diversos genes os quais estão associados ao risco ou à proteção à hanseníase, em diferentes populações (MIRA et al., 2003; MIRA et al., 2004; ZHANG et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; CHOPRA et al., 2013; MARQUES et al., 2013). Esses estudos são importantes e sugerem diferentes alvos (*locus* gênicos) relevantes que podem explicar a susceptibilidade de determinados indivíduos à doença (PREVEDELLO & MIRA, 2007; PACHECO & MORAES, 2009; ALTER et al., 2011; CARDOSO et al., 2011; LASTÓRIA et al., 2014; SALES-MARQUES et al., 2017).

As investigações genéticas para mapeamento de *loci* associados com doenças geralmente são realizadas por meio de estudos de ligação ou de associação. Os estudos de ligação são realizados com o intuito de rastrear regiões cromossômicas ligadas a doenças, ampliando para um mapeamento de possíveis marcadores genéticos (SOUZA & PEREIRA, 2007). Um GWAS é considerado como um estudo de caso-controle e visa identificar a influência genética sobre as doenças, examinando amostras completas do genoma, de um vasto número de indivíduos de determinada região geográfica, por meio de SNPs (PEARSON & MANOLIO, 2008; ELBERS et al., 2009; VISSCHER et al., 2012).

Os SNPs ou polimorfismo de nucleotídeo único são variações pontuais, apresentam uma frequência superior a 1% na população e estão ao longo do genoma, tanto em regiões não codificantes, como em regiões codificantes e em regiões reguladoras. A presença dessas variantes pode modificar sítios de *splicing*, resultar na alteração da afinidade de ligação entre as regiões promotoras e fatores de transcrição e provocar a troca de aminoácido, levando a variações na estrutura e função de uma importante proteína.

Os SNPs localizados em genes envolvidos nas vias de resposta imune inata e na resposta imune adaptativa mostraram-se fortemente associados à hanseníase *per se*

(independente da forma clínica) (ZHANG et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; CHOPRA et al., 2013; MARQUES et al., 2013). Análises de associação nos genes *NOD2*, *TLRI*, *VDR* e *HLA*, já identificaram 21 variantes de risco comuns (SNPs) e mostraram o envolvimento das respostas imune inata e adaptativa à susceptibilidade à hanseníase ( ZHANG et al., 2009; CHU et al., 2009; MISCH et al., 2010; ZHANG et al., 2011; LIU et al., 2012; LIU et al., 2013; LIU et al., 2015; WANG et al., 2016).

A maioria destas variantes comuns, descritas nos genes acima, estão localizadas em regiões não codificadoras ou em regiões reguladoras gênicas (região promotora, regiões 3' ou 5' não traduzida - UTR). Dessa forma, as variantes de baixa e rara frequência, inclusive as localizadas em regiões exônicas, não foram investigadas de forma mais ampla, apesar destas estarem provavelmente, envolvidas na maioria dos casos de doenças infecciosas e inflamatórias (BODMER & BONILLA, 2008; FEARNHEAD et al., 2005; FRAZER et al., 2009).

Recentemente, por meio do sequenciamento de última geração, variantes raras e de baixa frequência, em regiões codificadoras, mostraram-se associadas à hanseníase, em sete genes (*NCKIPSD*, *CARD9*, *IL23R*, *FLG*, *TYK2*, *SLC29A3* e *EIL27*), na população chinesa (LIU et al., 2017). Neste estudo, constituído por 7.048 pacientes com hanseníase e 14.398 indivíduos saudáveis, mostrou que os genes *TYK2* e *IL23R*, tiveram uma razão de chance (OR – *oddsratio*) significativa, de: OR= 1.30, p-valor=  $1.04 \times 10^{-6}$  e OR= 1.36, p-valor=  $1.03 \times 10^{-10}$ , respectivamente (LIU et al., 2017), indicando aumento de risco ao desenvolvimento da hanseníase.

Em um estudo de GWAS, realizado por Wang e colaboradores (2014), foram identificadas variantes do gene *LRRK2* associadas com a hanseníase, na população chinesa. Este estudo foi constituído por 527 pacientes e 1.078 controles saudáveis. Foram genotipados 13 SNPs, onde apenas cinco mostraram-se associados à doença (*rs1427267*, *rs3761863*, *rs1873613*, *rs732374* e *rs7298930*) (ZHANG et al., 2009; WANG et al., 2014). Em outro estudo, a variante *missense LRRK2\_rs3761863* foi associada ao risco de desenvolvimento da hanseníase e também foi associada com a doença de Crohn, sugerindo um mecanismo inflamatório comum a essas duas enfermidades (FAVA et al., 2016).

Estes dados são bastante promissores e precisam ser replicados e investigados em diferentes populações. Além disso, ainda há necessidade da criação de um painel de marcadores genéticos, do hospedeiro, que auxilie no diagnóstico precoce e prognóstico da gravidade da doença. É importante ressaltar, que os estudos de associação genética geralmente usam variantes comuns, de alta frequência e que estão localizadas em íntrons ou

em regiões reguladoras e portanto, não codificadoras. A descoberta de variantes raras e de baixa frequência, em regiões codificadoras precisa ser melhor estudado e replicado em diferentes populações, para melhor entender o papel genético da hanseníase.

Desta forma, temos como fatores genéticos de risco à doença, variantes de nucleotídeo simples (SNVs), as quais podem ser classificadas como, raras (mutações), de baixa frequência (menor que 1%), ou, comum (os SNPs), com frequência maior que 1% e comum na população geral. Sabe-se que as variantes comuns estão em desequilíbrio de ligação (LD) com as variantes raras e o efeito delas juntas, influenciam no desfecho da doença.

## 2.7 Genes

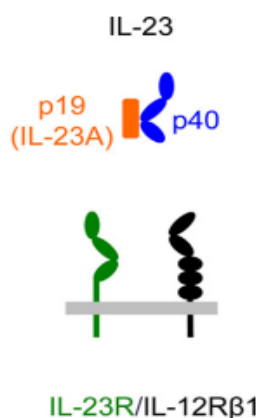
Os estudos relacionados à genética da hanseníase mostram genes que aumentam o risco de desenvolvimento à doença e que estão associados a outras patologias, como doença de Crohn, Lúpus eritematoso e Parkinson (CARDOSO et al., 2011). Dentre estes, merecem destaques os genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2*, os quais tiveram variantes em regiões codificadoras, associadas ao risco aumentado de desenvolvimento da hanseníase, na população Chinesa.

### 2.7.1 *IL23R*

O gene *IL23R* (OMIM 607562, *interleukin 23 receptor*, receptor de interleucina 23) está localizado no cromossomo 1p31.3, possui 11 éxon e a proteína codificada por 629 aminoácidos é uma subunidade do receptor para proteína IL23. Esta proteína encontra-se incorporada na membrana externa de várias células do sistema imune, como células T, células natural *killer* (NK), monócitos e células dendríticas, responsáveis pela identificação e defesa do organismo contra infecções (DUERR et al., 2006; VERMEIRE et al., 2010). Está envolvido no controle do desenvolvimento da diferenciação e proliferação do *Th17* (T *helper* 17), que media a resposta imunológica contra fungos e bactérias e estimulam a expansão de células T auxiliares (CD4 + 17), fazendo a indução de produção de citocinas do tipo *Th17* por células inatas (SARRA et al., 2010; FLOSS et al., 2015).

A *IL23R* faz parte do complexo da IL23, sendo um receptor de citocina que desencadeia sinais dentro da célula promovendo a inflamação e auxiliando na coordenação da resposta do sistema imunológico aos patógenos invasores. A proteína IL23 é semelhante à

citocina IL-12 estruturalmente, onde compartilham a subunidade p40 e se diferenciam pelas subunidades de citocinas IL23p19 e IL12p35 respectivamente. O complexo receptor da IL23 é composto por IL12Rb1 e IL23R. Essa cadeia (IL23R) é a principal cadeia de sinalização do seu receptor como mostrado na Figura 5 (DUERR et al., 2006; SARRA et al., 2010; FLOSS et al., 2015).



**Figura 5.** Ilustração esquemática do complexo receptor da citocinas IL23. **Fonte:** Floss et al., 2015.

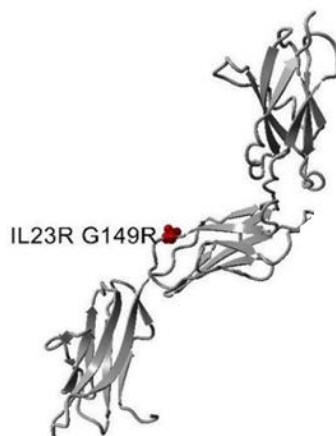
Após a identificação da associação de marcadores genéticos no gene *IL23R* com o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal (DII) (DUER et al., 2006; BROWN et al., 2007), outros estudos mostraram relação deste gene com a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (UC), que são os dois tipos mais comuns de doença inflamatória intestinal, além da psoríase e hanseníase (CAPON et al., 2007; FISHER et al., 2008; SMITH et al., 2008; LIU et al., 2017). Em estudos de associação com colite ulcerativa, foi demonstrado que a IL23 é a principal responsável pela inflamação intestinal (MORRISON et al., 2011; KIM et al., 2011). Além disso, estudos de ampla associação genômica com pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) e controles saudáveis, identificaram vários SNPs no gene *IL23R* associados à suscetibilidade ou resistência à doença inflamatória intestinal (DUBINSKI et al., 2007; DUERR et al., 2011).

Estudos de ampla associação genômica (GWAS) são ferramentas importantes para descobrir variantes genéticas relacionadas a doenças. Recentemente, os GWAS sugeriram um papel no controle da suscetibilidade à hanseníase do receptor pró-inflamatório IL23R, que regula a resposta imune adaptativa. Dessa forma, estudos de associação genômica de variantes de nucleotídeo simples (SNVs), realizados nas populações chinesa e japonesa, associaram SNVs do *IL23R* (rs76418789, rs11209026, rs7530511, rs11805303) como fatores genéticos que podem contribuir para o desfecho de doenças inflamatórias e auto imune (YU et al, 2012;

YU et al; 2014, ONODERA et al; 2015). Esses estudos de associação genômica, mostraram que a via da proteína IL23R desempenha um papel crucial em doenças inflamatórias crônicas, como doença de Crohn (DC), colite ulcerativa, psoríase e diabetes tipo I, e que, diversas variantes (G149R, V362I e R381Q) foram encontradas no gene *IL23R* com uma potencial associação à proteção contra o desenvolvimento de doença de Crohn e colite ulcerativa (SIVANESAN et al., 2016).

Dessa forma, variantes no gene *IL23R* têm sido associadas a patologias distintas, como a doença de Crohn (DC), Espondilite anquilosante, Colite ulcerativa (UC) e a Hanseníase. Uma dessas variantes (rs11209026) parece reduzir a chance de desenvolver Espondilite anquilosante. Essa variante genética altera um bloco de uma única proteína no receptor da *IL23*, fazendo uma substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido glutamina (R381Q). É interessante ressaltar que a mesma variante associada à proteção para esse distúrbio, também foi associada à proteção para a doença de Crohn e Psoríase (YU et al, 2012; YU et al., 2014; ONODERA et al; 2015; ABDOLLAHI et al., 2016). Zhang e colaboradores realizaram um estudo na população chinesa onde encontraram que a variante rs3762318 está associada à proteção à hanseníase, com uma razão de chance (OR – *odds ratio*) de 0.69 e p-valor =  $3.37 \times 10^{-11}$  (ZHANG et al., 2011).

Em um estudo realizado em indivíduos japoneses, foi encontrada uma variante exônicas (G149R), de baixa frequência (rs76418789), no gene *IL23R*, com uma significativa associação à proteção (OR= 0.21 e p-valor =  $7.3E^{-5}$ ) à doença de Crohn (ONODERA et al; 2015). Entretanto, em estudo recente de GWAs identificou três variantes codificadoras de proteína, de rara e baixa frequência, relacionada à hanseníase, como a rs76418789 (G149R), no gene *IL23R*, associada ao risco à hanseníase (OR=1.36, p-valor  $1.03 \times 10^{-10}$ ) (LIU et al., 2017). Essa variante *missense* troca o aminoácido glicina por uma arginina, na posição 149 do gene *IL23R*, gerando um forte efeito desestabilizador na estrutura da proteína. (Figura 6). Apesar da grande variedade de estudos envolvendo doenças inflamatórias e infecciosas relacionadas às variantes neste gene, existem poucos estudos que buscam associação à hanseníase e que precisam ser replicados em grupos étnicos diferentes.



**Figura 6.** Forma estrutural da proteína IL23R. **Fonte:** LIU et al., 2017.

### 2.7.2 *TYK2*

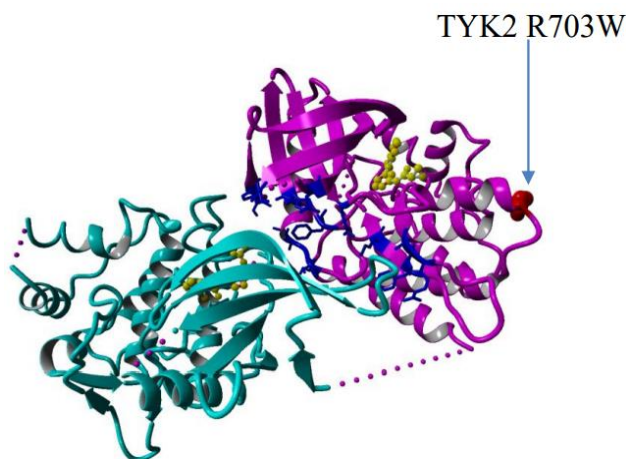
O gene da tirosina quinase 2, *TYK2* (OMIM 176941, *tyrosine kinase 2*), o primeiro da via janus quinase (JAK) a ser identificado, foi relacionado à susceptibilidade ao desenvolvimento da hanseníase (LIU et al., 2017). Este gene localiza-se na região cromossômica 19p13.2, possui 4.262 pares de base, 29 éxons e a proteína codificada possui 1.187 aminoácidos. A proteína *TYK2* contém um domínio catalítico de proteína-tirosina quinase C-terminal, com um local de ligação de ATP consensual (FIRMBACH KRAFT et al., 1990; LIU et al., 2017). A *TYK2* é uma tirosina não receptora da família janus quinase envolvida na sinalização de múltiplas citocinas, como a IL-6, IL-10, IL-12 e IL23. Essa proteína associa-se ao domínio citoplasmático dos receptores de citocina e transmite sinais de citocinas por fosforilação das subunidades do receptor (KREINS et al., 2015; LIU et al., 2017; AL-SHAIKHLI et al., 2018).

Estudos bioquímicos e experimentos em camundongos verificaram o papel crucial desse gene na imunidade, onde, os camundongos com deficiência de tirosina quinase 2, apresentavam múltiplos defeitos imunológicos e alta sensibilidade a infecções. No entanto, a ausência ou o truncamento desta proteína, resultou em um aumento da resistência a doenças alérgicas, autoimunes e inflamatórias, como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatóide. Nesse sentido, um estudo de GWAS publicado em 2015, demonstrou que três variantes exônicas no gene *TYK2* foram associadas à proteção à artrite reumatóide: rs34536443 (OR = 0.66, p-valor =  $2,3 \times 10^{-21}$ ), rs35018800 (A928V, OR = 0.53, p-valor =  $1,2 \times 10^{-9}$ ) e rs12720356 (I684S, OR = 0.86, p-valor =  $4,6 \times 10^{-7}$ ) (STROBL, et al., 2011; DIOGO et al., 2015).

Outros estudos de meta-análise demonstraram que variantes, como a rs2304256 e a rs12720356, estão associados à susceptibilidade a doenças reumáticas e outros associados ao lúpus eritematoso sistêmico (LES), em caucasianos e asiáticos (LEE & BAE, 2016; YIN et al, 2018). De acordo com um estudo realizado por Yin e colaboradores (2018) há uma forte associação entre o polimorfismo, rs2304256 do gene *TYK2* ao desenvolvimento de LES, em europeus (OR=1,43 e p-valor=  $5,82 \times 10^{-5}$ ). No entanto, essa variante não teve uma associação significativa para risco de desenvolvimento do LES na população asiática (LEE & BAE, 2016; YIN et al, 2018).

Mutações nesse gene estão sendo associadas a imunodeficiência primária por imunoglobulina sérica elevada E, a síndrome de hiper imunoglobulina E (HIES) (MINEGISHI et al., 2006). Uma pesquisa realizada no Japão por Minegishi e colaboradores (2006), identificou um homem com imunodeficiência-35, com uma deleção homozigota GCTT, no nucleotídeo 550, no gene *TYK2*, resultando em um *frameshift* (erro na matriz de leitura do DNA) e término prematuro da proteína (mutação *nonsense*), no aminoácido 90. Eles concluíram que esta mutação leva à imunodeficiência primária, acompanhada de susceptibilidade aumentada à infecção bacteriana (MINEGISHI et al., 2006). Além disso, estudos mostram que pacientes com deficiência da proteína *TYK2* desenvolveram infecções micobacterianas e virais. Variantes genéticas neste gene podem estar associadas ao desfecho de várias doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo, psoríase, esclerose múltipla, diabetes tipo I, doença de Crohn, colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico e a alguns tipos de câncer (WALLACE et al., 2009; CUNNINGHAME et al., 2011; STROBL, et al., 2011; LIU et al., 2017).

Recentemente, um estudo do tipo GWAs (pan-genômico) com variantes em regiões codificadoras, em sete genes distintos, identificou uma variante *missense* de baixa frequência, (rs55882956) no gene *TYK2*, com troca de aminoácido (Arg703Trp), que mostrou estar associada à susceptibilidade ao risco à hanseníase, na população Chinesa (OR= 1.30, p valor= $1.04 \times 10^{-6}$ ) (LIU et al., 2017). Na Figura 7 é demonstrado o domínio quinase (destacado em ciano, “verde água”) e pseudoquinase (destacado em magenta, “roxo”). A variante estudada (Arg703Trp) é mostrada em vermelho.



**Figura 7.** Forma estrutural da proteína TYK2. **Fonte:** LIU et al., 2017.

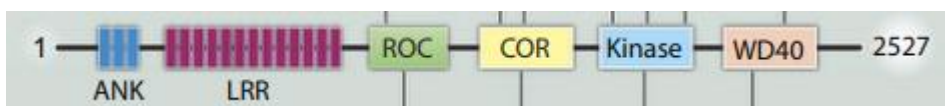
Devido à importância gene *TYK2* na via da cascata de sinalização intracelular, na fosforilação, na regulação e na transdução de sinais celulares e da sua associação com doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo a hanseníase, se faz necessário verificar a se esta associação se mantém em outras amostras populacionais.

### 2.7.3 *LRRK2*

O gene *LRRK2*, repetição quinase rica em leucina 2, (OMIM 609007, *leucine – rich repeat kinase 2*), localizado na região cromossômica 12q12, é um membro da família das quinases ricas em leucina, possui 51 éxons que fornecem informações para a síntese de uma grande proteína com 2.527 aminoácidos, a dardarina, que está envolvida na resposta do hospedeiro a patógenos (GARDET et al., 2010). Essa proteína encontra-se presente, em grande parte, no citoplasma e na membrana externa da mitocôndria de domínio múltiplo e o seu RNAm é expresso no cérebro, no coração, na placenta, no pulmão, no fígado, no músculo esquelético e no pâncreas (MATA, et al., 2006; TRABZUNI et al., 2013).

A dardarina (*LRRK2*) é uma proteína que exerce um conjunto diversificado de funções, mediando processos catalíticos através de seu domínio enzimático, facilitando a transdução de sinal e interagindo com outras proteínas através de seus três domínios (repetição de anquilina (ANK), repetição rica em leucina (LRR) e domínio de repetição WD40) (Figura 9). Esse gene é expresso em células imunes específicas e tem sido bioquimicamente ligado às vias interligadas que regulam a inflamação e a função de autofagia e lisossomal. (GILKS et al, 2005; SANCHEZ et al., 2006).





**Figura 8.** Esquema dos domínios da proteína LRRK2. **Fonte:** LEWIS, 2012.

Variantes neste gene já foram associados à doença de Parkinson familiar, aumento do risco de doença de Parkinson esporádica, aumento do risco de doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, câncer e ao aumento da susceptibilidade à hanseníase em populações chinesas (WEST et al., 2005; GREENMAN et al., 2007; ZHANG et al., 2009; FAVA et al., 2015). Estudos de associação genômica realizados recentemente, em sua maioria, na população chinesa, forneceram dados relevantes de variantes no gene *LRRK2* associados à hanseníase (rs1427267, rs3761863, rs1873613, rs732374 e rs7298930) (TRABZUNI et al., 2013; WANG et al., 2014; FAVA et al., 2015).

Considerando que a composição étnica e as frequências alélicas da população amazonense diferem das demais regiões geográficas do país e à escassez de dados em relação à variabilidade genética dos genes envolvidos na resposta imune, neste modelo de doença, este estudo teve como principal meta investigar uma relação entre as variantes genéticas dos genes *IL23R*, *TYK2* e *LRRK2* e a hanseníase. Além disso, ainda há necessidade de se fazer um painel de marcadores genéticos, do hospedeiro, para que possa auxiliar no diagnóstico precoce e prognóstico da gravidade da doença. É importante ressaltar, que os estudos de associação genética geralmente usam variantes comuns, de alta frequência e que estão localizadas em íntrons ou em regiões reguladoras. As variantes raras e de baixa frequência localizadas nas regiões codificadoras precisam ser melhores estudadas, em estudos de replicação, em diferentes populações, para melhor entender o papel genético da hanseníase.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar variantes nos genes *IL23R* (rs76418789), *TYK2* (rs55882956), *LRRK2* (rs7298930 e rs3761863), associadas ao desenvolvimento da hanseníase, em uma ampla amostra de pacientes e controles saudáveis, atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas das variantes selecionadas, na população da FUAM;
- Analisar se estas variantes estão associadas ao desfecho da hanseníase na população da FUAM.

## CAPÍTULO I

**Associação de SNVs nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2* e a hanseníase, em indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)**

Associação de SNVs nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2* e a hanseníase, em indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)

Mendonça<sup>1</sup>, C.Y.R; Rodrigues, F.C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Brasil

### Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta a pele e o sistema nervoso periférico, transmitidas por meio das vias aéreas superiores, através de secreções nasais e orais, pelo contato íntimo e prolongado, de indivíduos infectados não tratados. Apesar de ser uma doença infecciosa, a influência genética, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, podem exercer um importante papel no desfecho clínico da doença. Em nosso estudo investigamos variantes de nucleotídeo único (SNV), nos genes *TYK2* e *IL23R* e *LRRK2* que foram associados ao desfecho da hanseníase, em outras populações. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar se estas variantes estão associadas ao desenvolvimento da hanseníase em uma ampla amostra procedente da Fundação Alfredo da Matta (FUAM), por meio de qPCR. As variantes do gene *LRRK2* exibiram um fraco Desequilíbrio de Ligação (DL) ( $r^2= 18\%$ ). Nossos resultados indicam que as variantes *rs55882956\_TYK2*, *rs76418789\_IL23R*, *rs7298930\_LRRK2* e *rs3761863\_LRRK2* não foram associadas à hanseníase em nossa população, exibindo *Odds Ratio* (OR) de: 4,06 (p=0,35); 0,86 (p=0,96); 1,42 (p= 0,58) e 0,92 (p=0,56), respectivamente.

**Palavras chave: Hanseníase, variantes genéticas, Amazonas.**

## INTRODUÇÃO

O *Micobacterium leprae* é o patógeno causador da hanseníase, uma doença infecciosa crônica que afeta pele e sistema nervoso periférico podendo causar deformidades irreversíveis ao indivíduo. O diagnóstico é efetivamente clínico, baseado no exame de pele e em exames laboratoriais (SCOLLARD et al., 2006). Atualmente, a doença permanece concentrada em países pobres, com o maior número de casos registrados da Índia. Embora o número de casos registrados em todo o mundo tenha diminuído nas últimas duas décadas, o número de novos casos registrados a cada ano permaneceu quase igual (WHO, 2016).

A exposição ao *M. leprae* não é suficiente para desencadear e resultar em doença ativa, devido a isso, acredita-se que há um conjunto de genes diferentes que modificam a susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase, em diferentes estágios. Variações em genes implicados na resposta imune inata e adaptativa (*TLR1/2*, *MRC1*, *VDR*, *PARK2*, *LRRK2*, *LTA4H*, *NOD2*, *ADPT*, *IL10*, *TNF*, *HLA*, *IFNG*), principalmente polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), alteram a chance de risco de desenvolver a doença ou a gravidade da mesma. Dessa forma, a resposta imunológica do hospedeiro e os fatores genéticos mostraram influenciar na susceptibilidade e nas formas clínicas da doença (DE MESSIAS et al., 2007; MONOT et al., 2009; ZHANG et al., 2009; ALTER et al., 2011; CARDOSO et al., 2011; SAUER et al., 2015). Alguns destes genes estão envolvidos não só com a hanseníase, mas com doenças autoimunes, como Crohn, artrite reumatoide, psoríase ou doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer. (ZHANG et al., 2009; ALTER et al., 2011; CARDOSO et al., 2011; HONG et al., 2012; MANRY et al., 2013; LASTÓRIA & MORGADO, 2014; LIU et al., 2017).

Variantes em diferentes genes, como no *TYK2*, *LRRK2* e *IL23R* foram relatadas como associadas à susceptibilidade à hanseníase na população asiática, entretanto, precisam ser replicadas em outros grupos étnicos para confirmar tal associação (SHILDS et al., 1987; TOOD et al., 1990; PRIYA et al., 2013, MIRA et al., 2018, LIU et al., 2017). Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de estimar variantes nos genes *IL23R* (rs76418789), *TYK2* (rs55882956), *LRRK2* (rs7298930 e rs3761863), associadas ao desenvolvimento da hanseníase, na população amazonense, atendida na Fundação Alfredo da Matta (FUAM).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este foi um estudo transversal, de associação do tipo caso-controle, no qual foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas, bem como a OR (*odds ratio*) das variantes genéticas dos genes *IL23R* (rs76418789), *TYK2* (rs55882956) e *LRRK2* (rs72989303761863).

### *Aspectos Éticos*

Este projeto foi aprovado em 13/03/2014 pelo CEP/FUAM com o Parecer 555.620.

### *Coleta das amostras*

Foram coletadas 1.379 amostras de indivíduos atendidos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM), que foram separados em dois grupos: caso e controle. O grupo caso foi formado por 412 pacientes confirmados com hanseníase e o grupo controle foi composto por 967 indivíduos saudáveis, sem hanseníase ou outra doença dermatológica, constituído de voluntários que buscavam apenas o atestado de saúde para atividades em empresa ou a liberação para prática esportiva na piscina, no período de 2016 a 2018. Ambos os grupos, passaram por um rigoroso exame clínico de pele, por especialistas na área dermatológica, tinham acima de 18 anos de idade e eram naturais do Amazonas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado aos participantes do estudo e após a explicação acerca dos objetivos da pesquisa e da assinatura do mesmo, uma amostra do material biológico foi coletada.

### *Extração de DNA genômico*

A coleta sangue consistiu na retirada de 5 mL de sangue periférico, armazenados em tubos apropriados *vacutainer*, contendo anticoagulante EDTA. O DNA foi extraído do sangue utilizando o *DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen)* seguindo o protocolo do fabricante. Este kit permite que as amostras sofram lise celular, com o auxílio da proteinase k. Os contaminantes remanescentes e os inibidores enzimáticos são removidos em duas etapas de lavagem e centrifugação e o DNA é então purificado e eluído em tampão específico. Após a extração do DNA, as alíquotas foram armazenadas em microtubos de 1,5 ml, sendo uma amostra mantida a 4°C e a outra, a -20°C.

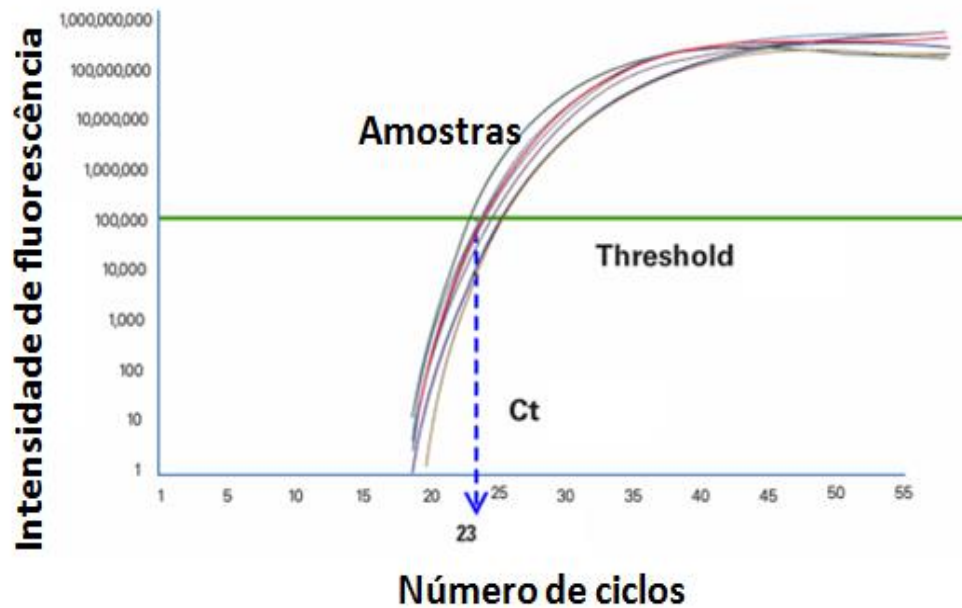
### Genotipagem dos SNVs por qPCR

Os SNVs selecionados foram genotipados através da técnica de discriminação alélica, por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real), via sistema de ensaios *AssayBy Design TaqMan MGB (Life Technologies)*, descritos na Tabela 1. Essa técnica quantifica os fragmentos de DNA em tempo real, durante a fase exponencial da reação, fazendo simultaneamente, a amplificação e a detecção do fragmento de interesse.

**Tabela 1.** Variantes investigadas em pacientes e controles.

SNV	Chr	Gene	Alelos	Função	TaqMan® SNP Genotyping Assays
<b>rs55882956</b>	19	<i>TYK2</i>	A/G	<i>Missense</i> (R703W)	C_89470466_10
<b>rs76418789</b>	1	<i>IL23R</i>	A/G	<i>Missense</i> (G149R)	C_104780482_10
<b>rs3761863</b>	12	<i>LRRK2</i>	C/T	<i>Missense</i> (T2397M)	C_3215842_10
<b>rs7298930</b>	12	<i>LRRK2</i>	A/C	Íntron	C_2069047_10

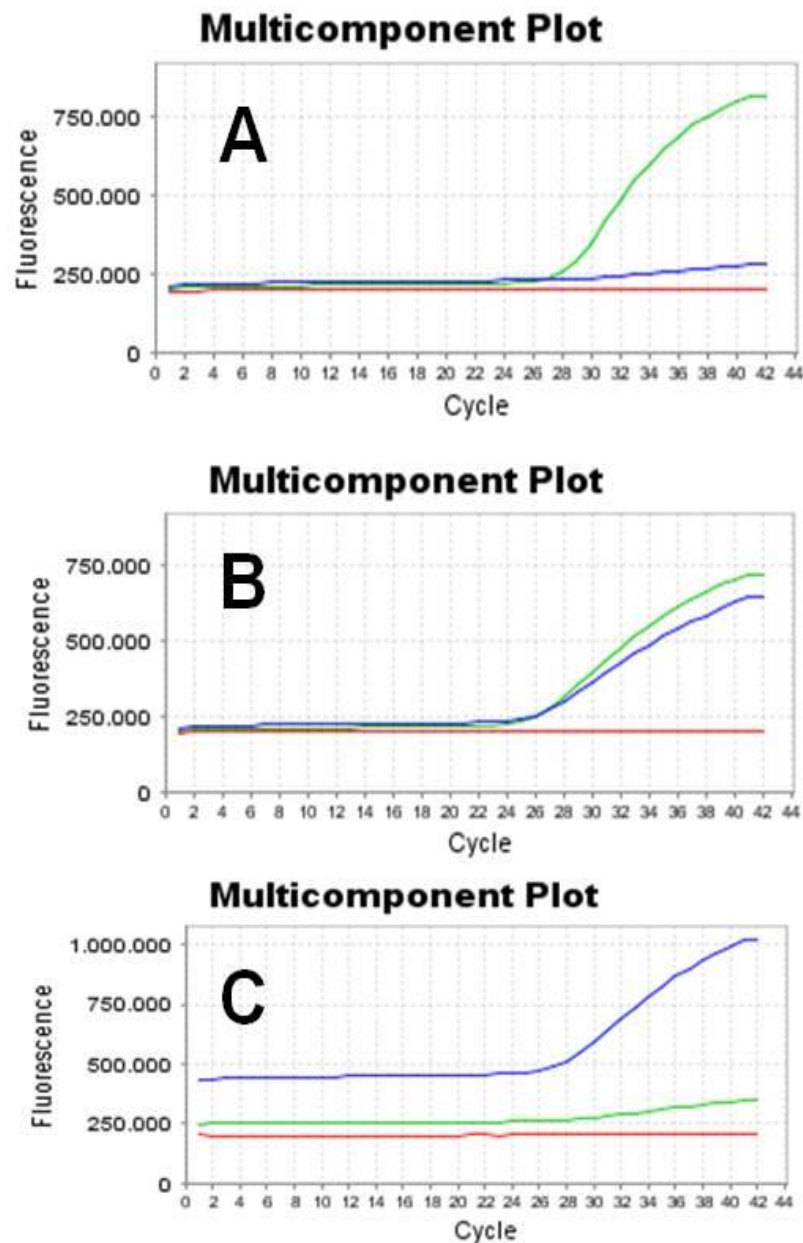
A amplificação por qPCR é realizada em três etapas: linha basal, fase log e fase platô. A linha basal é quando não é possível verificar a detecção da fluorescência, devido à deficiência de produtos amplificados, ocorre no início da reação de qPCR. A fase log é quando se dá à amplificação máxima dos produtos, de forma exponencial, dobrando a cada novo ciclo. Nesta fase da amplificação é possível determinar um valor de intensidade da fluorescência, no qual todas as amostras podem ser comparadas. Esse valor é denominado *threshold* e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal. Finalizando, a fase platô é quando cessa à amplificação da região de interesse. Para a validação da amplificação, é necessário comparar os valores emitidos pelo Ct (*cycle threshold*), que representa o número de ciclos que a amostra leva para atingir a emissão de fluorescência ideal (*threshold*), sendo esta, posicionada na fase exponencial da reação (Figura 1).



**Figura 1:** Exemplo da curva de amplificação por qPCR mostrando o Ct (*cyclethreshold*) e o *Threshold*. Neste exemplo, a fluorescência atingiu o Ct 23.

Na técnica de discriminação alélica, a obtenção dos genótipos é fornecida através da intensidade de fluorescência, gerada por sondas marcadas com fluoróforos específicos para cada alelo (Figura 2), por meio do sistema de ensaios (*assays*, sondas *TaqMan MGB*) (*Life Technologies*). Cada ensaio contém um par de *primers* e um par de sondas *TaqMan MGB* (*Life Technologies*) marcadas com fluorescência, VIC (verde) e FAM (azul), para a região que se quer amplificar e cada alelo é marcado com uma fluorescência específica. A sonda é marcada duplamente, em uma extremidade com um fluoróforo repórter (*reporter*) e em outra extremidade com o fluoróforo *quencher* (silenciador).





**Figura 2:** Genótipo fornecido pela discriminação alélica por meio da intensidade das fluorescências VIC (verde) e FAM (azul), por qPCR, mostrando os três possíveis genótipos. **A:** homocigoto selvagem; **B:** heterocigoto; **C:** homocigoto polimórfico.

As reações de amplificação tiveram um volume final de 5 $\mu$ L, contendo: 2,5 $\mu$ L de *Master Mix TaqMan Genotyping* (Life Technologies), 0,125 $\mu$ L de *Assay TaqMan MGB* (Life Technologies), 1,375 $\mu$ L de água e 1 $\mu$ L de DNA (~ 50 ng). As reações foram processadas no equipamento *StepOne Plus* (Life Technologies), utilizando as condições de ciclagem padrão, fornecidas pelo *software SDS v2.0.6* (Life Technologies). Os dados gerados foram conferidos nas ferramentas de análises *Multicomponent Plot* e *Amplification*

*Plot*, no próprio *software SDS* e os resultados foram exportados para uma planilha de Excel (*Microsoft*) para serem analisados.

Entretanto, somente para a amplificação do SNV *LRRK2\_rs3761863*, foi realizado para um volume final de 10 $\mu$ L, pois a discriminação alélica foi mais eficiente. Neste caso, cada reação foi feita contendo: 5,0 $\mu$ L de *Master Mix TaqMan Genotyping* (*Life Technologies*), 0,25 $\mu$ L de *Assay TaqMan MGB* (*Life Technologies*), 2,75 $\mu$ L de água e 2 $\mu$ L de DNA (~ 50 ng).

### *Análises estatísticas*

As análises das frequências alélicas e genótípicas foram realizadas em casos e controles e comparadas entre esses dois grupos. Através do modelo de regressão logística, foi calculada a OR (*odds ratio*) que foi usada como estimativa de associação, com intervalo de confiança (IC) de 95% e p-valor significativo ( $\leq 0,05$ ). Levando-se em conta o valor do IC, de p valor e de OR, os modelos indicaram susceptibilidade ao risco ou à proteção. Sendo: OR>1, risco; OR=1 não há associação com a doença e OR<1 proteção.

O parâmetro  $r^2$  foi utilizado para verificar se os SNPs selecionados do gene *LRRK2* estavam em desequilíbrio de ligação. O programa *HaploView* 4.2 foi utilizado para verificar possíveis desequilíbrio de ligação (LD) fornecidos pelos SNVs entre o grupo controle e pacientes.

Este trabalho faz parte de um projeto maior, de Doutorado, que está sendo realizado pelo MSc. André Leturiondo, do Laboratório de Biologia Molecular, da Fundação Alfredo da Matta (Fuam), no qual os resultados obtidos neste estudo estão sendo compilados em um único artigo, que incluem outras variantes genéticas e marcadores informativos de ancestralidade, e que se encontra em fase de revisão pelos autores.

## 4 RESULTADOS

Em um total, foram analisadas 1.379 amostras de indivíduos, divididos em 412 pacientes com hanseníase e 967 controles saudáveis, entre 18 a 97 anos. Do total de pacientes, 314 (76%) apresentaram a forma multibacilar (MB), destes, 74% eram do gênero masculino e 26% do gênero feminino e 98 (24%) indivíduos apresentaram a forma paucibacilar (PB). Destes, 51 indivíduos eram do gênero masculino e 47 do gênero feminino. Neste estudo também, foram analisadas 967 amostras de indivíduos saudáveis de ambos os sexos, que ingressaram no estudo como grupo controle. Dentre eles, 526 (54%) pessoas eram do gênero masculino e 441 (46%) do gênero feminino.

**Tabela 2:** Dados dos pacientes com hanseníase e indivíduos controles saudáveis selecionados para a análise.

<i>Forma clínica</i>	<i>Total</i>	<i>Sexo</i>
Multibacilar	314	♂ 232 ♀ 82
Paucibacilar	98	♂ 51 ♀ 47
Controles	967	♂ 526 ♀ 441

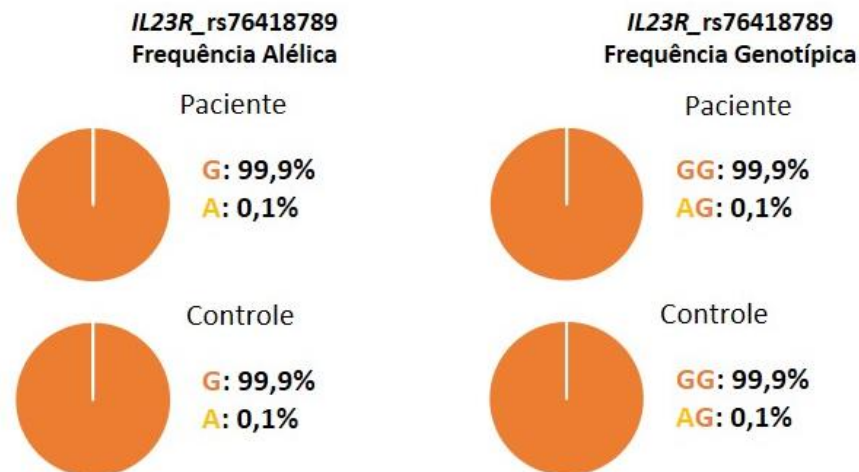
A investigação das variantes localizadas nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2*, foi realizada em todos os 412 pacientes com hanseníase, naturais do estado do Amazonas e para fins comparativos, foram analisadas amostras do grupo controle constituída por 967 indivíduos saudáveis, procedentes da mesma região. Por meio do teste do Qui-quadrado foi possível verificar que para as quatro variantes analisadas, as frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy e Weinberg (EHW) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Teste do Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy e Weinberg para as variantes dos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2*.

Gene	SNP	X <sup>2</sup> controle	X <sup>2</sup> paciente
<i>IL23R</i>	rs76418789	2,73 (p= 1)	3,19 (p=1)
<i>TYK2</i>	rs55882956	2,20 (p=1)	5,20(p=1)
<i>LRRK2</i>	rs7298930	0,51 (p= 0,47)	0,18 (p= 0,66)
<i>LRRK2</i>	rs3761863	0,93 (p= 0,33)	0,004 (p= 0,94)

*Frequências alélicas e genotípicas para as variantes dos genes IL23R, TYK2 e LRRK2*

As frequências alélicas e genotípicas, referentes à variante rs7641789, do gene *IL23R*, estão mostradas na Figura 3.

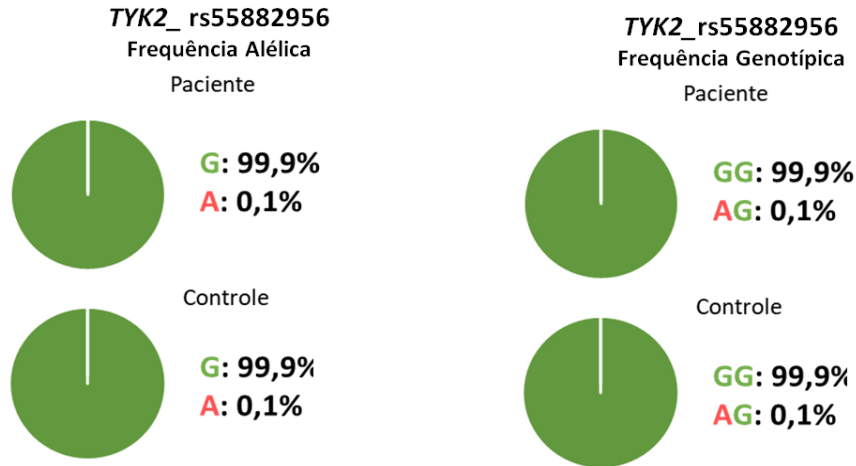


**Figura 3:** Frequências alélicas e genotípicas do SNV rs76418789, do gene *IL23R*.

Como é possível verificar, na Figura 3, as frequências alélicas (à esquerda) e genotípicas (à direita) do SNV *IL23R*\_rs76418789, nos dois grupos (caso e controle), mostraram-se similares, com maior frequência do alelo G e do genótipo GG, em ambos os grupos. Não foi encontrado nenhum indivíduo com o genótipo AA. Apenas três indivíduos apresentaram o genótipo heterozigoto AG, dois controles e um paciente (Tabela 4).

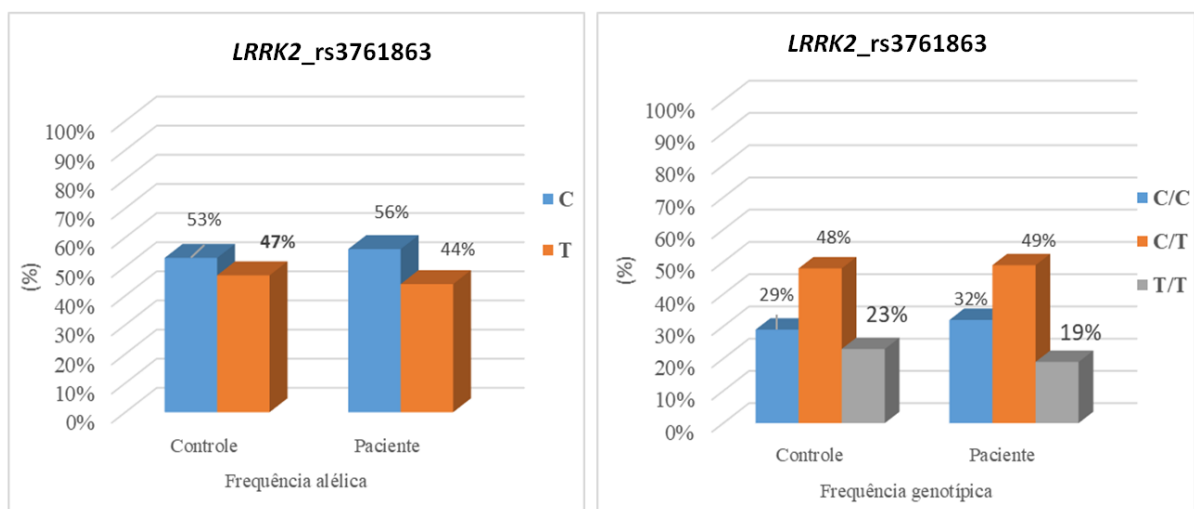
Com relação às frequências alélicas e genotípicas da variante rs55882956, do gene *TYK2*, o alelo G foi encontrado em maior frequência em ambos os grupos, assim como o genótipo GG (Figura 4). Não foi encontrado nenhum indivíduo portador do genótipo AA. O

genótipo heterozigoto AG foi encontrado somente em quatro indivíduos, dois controles e dois pacientes (Tabela 4).



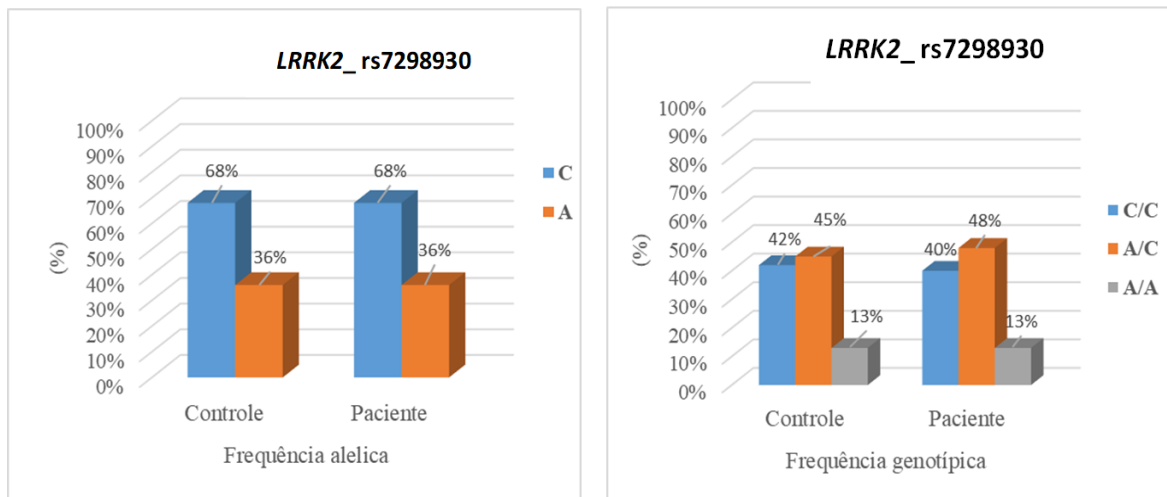
**Figura 4:** Frequências alélicas e genotípicas da variante rs55882956, do gene *TYK2*.

As frequências alélicas e genotípicas do SNV rs3761863, do gene *LRRK2*, estão mostradas na Figura 5. Como é possível observar, o alelo mais frequente, tanto no grupo caso (56%) quanto no grupo controle (53%), foi o alelo C. O genótipo mais frequente nos dois grupos, foi o genótipo heterozigoto CT (grupo controle 48% ; grupo caso 49%), e o genótipo de menor frequência foi o TT (19% em pacientes e 23% em controles).



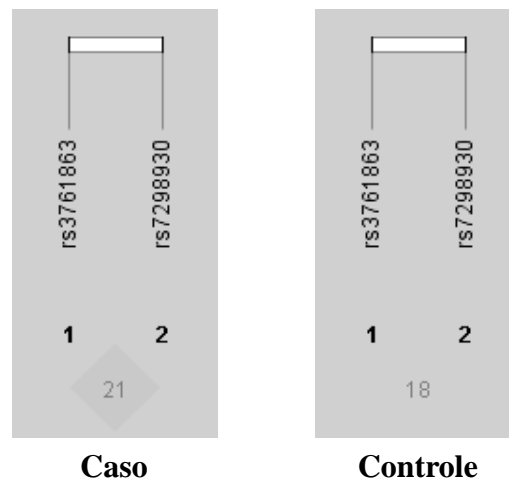
**Figura 5:** Frequências alélicas e genotípicas SNP rs3761863, do gene *LRRK2*.

Com relação às frequências alélicas e genotípicas da variante rs7298930, do gene *LRRK2*, é possível observar que o alelo mais frequente nos dois grupos, foi o alelo C (68% em ambos os grupos). O genótipo mais frequente nos dois grupos, foi o genótipo heterozigoto AC (grupo controle 45% ; grupo caso 48%), e o genótipo de menor frequência foi o AA (13% nos dois grupos) (Figura 6).



**Figura 6:** Frequências alélicas e genotípicas da variante rs7298930, do gene *LRRK2*.

A análise de desequilíbrio de ligação (DL) (Figura 7), para amostra do grupo controle, mostrou que as duas variantes (rs3761863 e rs7298930) do gene *LRRK2*, estão em fraco DL ( $r^2=18\%$ ). Os critérios estabelecidos pelo projeto *HapMap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), indicam que SNPs com valores de  $r^2 > 0,30$ , estão em fraco ou baixo DL, ou seja, não estão segregando juntos na forma de haplótipo, sendo portanto, marcadores independentes.



**Figura 7:** Desequilíbrio de ligação entre os marcadores selecionados para os SNPs do gene *LRRK2* na amostra total do grupo caso e controle. O número no interior do losango indica o valor de  $r^2$ .

Como mostrado na Figura 7, os dois grupos (caso e controle) possuem um grau de DL semelhantes, mostrando uma população homogênea. As análises de desequilíbrio de ligação são realizadas apenas em grupo controles, mas em nosso estudo as análises foram realizadas nos dois grupos para fins comparativos.

Para os SNPs do gene *LRRK2*, rs3761863/rs7298930, a análise de haplótipo mostrou a combinação C/C a mais frequente (45%), sendo este haplótipo usado como referência (haplobase) nas análises. O haplótipo de menor frequência foi o C/A, encontrado em somente 8% das amostras. A combinação haplotípica T/C (rs3761863/rs7298930) apresentou valor *borderline* (OR= 0,79; IC= 0,61 - 1,01; p= 0,06), com tendência para a proteção, mesmo após a correção para as co-variáveis de sexo e idade (OR= 0,79; IC= 0,61 - 1,02; p= 0,07).

Na Tabela 4 constam as análises comparativas realizadas através da regressão logística para as variantes *IL23R* (rs76418789), *TYK2* (rs55882956), *LRRK2* (rs3761863 e rs7298930), na amostra de pacientes e indivíduos saudáveis atendidos na FUAM, com valores de OR não ajustados (OR bruto) e ajustados para sexo e idade. É possível verificar que não foi encontrada associação, estatisticamente significativa, alélica, genotípica ou de carreador com a hanseníase, na população atendida na FUAM, para as quatro variantes analisadas neste estudo ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4:** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística referentes às variantes analisadas em pacientes com hanseníase e controles saudáveis atendidos na FUAM.

	N (Frequência)		OR (95% IC; p-valor)		
	Controles	Casos	Não ajustado	Ajustado*	
<b><i>IL23R_rs76418789</i></b>	GG	953	408	Referência	Referência
	AG	2	1	1,16 (95% IC: 0,10 – 12,91; p= 0,89)	0,86 (95% IC: 0,016 – 46,57; p= 0,94)
	AA	-	-	-	-
		955	409		
	Alelo G	1908	817	Referência	Referência
	Alelo A	2	1	1,16 (95% IC: 0,039 – 34,87; p= 0,92)	0,86 (95% IC: 0,003 – 241,75; p= 0,96)
	Carreador de A	2	1	1,16 (95% IC: 0,10 – 12,9; p= 0,89)	0,86 (95% IC: 0,01 – 46,57; p= 0,94)
<b><i>TYK2_rs5582956</i></b>	GG	960	407	Referência	Referência
	AG	2	2	2,35 (95% IC: 0,33 – 16,8;p= 0,39)	4,07 (95% IC: 0,52 – 31,48; p= 0,17)
	AA	-	-	-	-
		962	409		
	Alelo G	1922	816	Referência	Referência
	Alelo A	2	2	2,35 (95% IC: 0,14 – 37,74; p= 0,54)	4,06 (95% IC: 0,22 – 72,83; p= 0,34)
	Carreador de A	2	2	2,35 (95% IC: 0,33 – 16,80; p= 0,39)	4,07 (95% IC: 0,52 – 31,48; p= 0,17)



Continuação

		N (Frequência)		OR (95% IC; p-valor)	
		Controles	Casos	Não ajustado	Ajustado*
<b>LRRK2_rs3761863</b>	CC	274 (0,29)	123 (0,32)	Referência	Referência
	CT	457 (0,48)	190 (0,49)	0,92 (95% IC: 0,70 – 1,21; p= 0,58)	0,95 (95% IC: 0,69 – 1,30; p= 0,76)
	TT	218 (0,23)	76 (0,19)	0,77 (95% IC: 0,55– 1,08; p= 0,14)	0,85 (95% IC: 0,58– 1,24; p= 0,41)
		949	389		
	Alelo C	1005 (0,53)	436 (0,56)	Referência	Referência
	Alelo T	893 (0,47)	342 (0,44)	0,88 (95% IC: 0,69 – 1,11; p= 0,30)	0,92 (95% IC: 0,70 – 1,21; p= 0,56)
	Carreador de T	675 (0,71)	266 (0,68)	0,87 (95% IC: 0,67 – 1,13; p= 0,31)	0,92 (95% IC: 0,68 – 1,23; p= 0,58)
<b>LRRK2_rs7298930</b>	CC	391 (0,42)	163 (0,40)	Referência	Referência
	AC	418 (0,45)	195 (0,48)	1,11 (95% IC: 0,87 – 1,43; p= 0,37)	1,15 (95% IC: 0,86 – 1,52; p= 0,32)
	AA	125 (0,13)	52 (0,13)	0,99 (95% IC: 0,68 – 1,44; p= 0,99)	1,10 (95% IC: 0,72 – 1,68; p= 0,64)
		934	410		
	Alelo C	1200 (0,64)	521 (0,64)	Referência	Referência
	Alelo A	668 (0,36)	299 (0,36)	1,03 (95% IC: 0,80 – 1,31); p= 0,80)	1,07 (95% IC: 0,82 – 1,42); p= 0,58)
	Carreador de A	543 (0,58)	247 (0,61)	1,09 (95% IC: 0,86 – 1,38); p= 0,47)	1,14 (95% IC: 0,87 – 1,49); p= 0,32)

\*corrigido para sexo e idade

## 5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos diversos trabalhos têm sido publicados associando variantes genéticas com o desfecho da hanseníase (MORAES et al., 2006; CARDOSO et al., 2011; CHOPRA et al., 2013; MARQUES et al., 2013; LIU et al., 2017). Mais de 17 genes estão descritos como relacionados ao desenvolvimento desta patologia (CARDOSO et al., 2011), em diferentes populações. Genes candidatos têm sido propostos para várias doenças, incluindo a hanseníase e estudos de ampla associação genômica (GWAS), vem contribuindo para esclarecer variantes associadas a diferentes doenças complexas, com amostragens robustas e capazes de propor resultados que se mostram cada vez mais reprodutíveis em estudos independentes de replicação (MORAES et al., 2006; CARDOSO et al., 2011).

Os estudos têm indicado que a composição genética do hospedeiro desempenha um papel importante na variabilidade considerável da resposta (CASANOVA et al., 2002; BLEKHMANN et al., 2015). Entretanto, estes estudos (GWAs, metanálises ou de replicação de genes candidatos), em sua maioria, são realizados em populações geneticamente homogêneas, como a européia ou a asiática. Para populações mais heterogêneas, como é o caso da população brasileira, os estudos ainda são poucos e são realizados, geralmente, na região Sudeste do Brasil (CARDOSO et al., 2010; CARDOSO et al., 2011; MARQUES et al., 2013).

No presente estudo, analisamos a associação de quatro variantes presentes nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2* e a susceptibilidade à hanseníase. A associação desses genes com a hanseníase foi validada em amostras da população chinesa (Tabela 5), ou seja, população que possui traços étnicos menos variáveis, quando comparado com populações mais miscigenadas, como é o caso da amazonense. Estes autores encontraram alelos e genótipos associados à hanseníase, com ORs variando de 0,64 a 1,30 e  $p < 0,05$ . Estes estudos investigaram variantes raras, de baixa frequência e comuns, em mais de 20 mil indivíduos (entre os grupos controle e caso) e encontraram variantes exônicas associadas ao desfecho da hanseníase. As variantes rs76418789 (*IL23R*) e rs55882956 (*TYK2*) são raras ou de baixa frequência e esse mesmo padrão se manteve em nossa população, dessa forma, teríamos que ter um número amostral muito maior para conseguirmos encontrar algum tipo de associação com estas duas variantes e a hanseníase.

**Tabela 5:** Estudos realizados com as variantes *IL23R*\_rs76418789, *TYK2*\_rs55882956, *LRRK2*\_rs3761863, *LRRK2*\_rs7298930 na Hanseníase.

Gene	Autor	Etnia	Variante de risco	OR*	p-valor
<i>IL23R</i> rs76418789	LIU et al., 2017	Chinesa	A	1,36	1.03e <sup>-10</sup>
			<b>Presente estudo</b>	<b>Amazonense</b>	<b>AG</b>
			A	<b>0,86</b>	<b>0,96</b>
			<b>Carreador de A</b>	<b>0,86</b>	<b>0,94</b>
<i>TYK2</i> rs55882956	LIU et al., 2017	Chinesa	A	1,30	1.04e <sup>-04</sup>
			<b>Presente estudo</b>	<b>Amazonense</b>	<b>AG</b>
			A	<b>4,06</b>	<b>0,34</b>
			<b>Carreador de A</b>	<b>4,07</b>	<b>0,17</b>
<i>LRRK2</i> rs3761863	WHANG et al., 2014	Chinesa	C	0,775	0,013
			<b>Presente estudo</b>	<b>Amazonense</b>	<b>CT</b>
			TT	<b>0,85</b>	<b>0,41</b>
			T	<b>0,92</b>	<b>0,56</b>
		<b>Carreador de T</b>	<b>0,92</b>	<b>0,58</b>	
<i>LRRK2</i> rs7298930	WHANG et al., 2014	Chinesa	CC	0,647	0,005
			C	0,811	0,006
	<b>Presente estudo</b>	<b>Amazonense</b>	AC	<b>1,15</b>	<b>0,32</b>
			AA	<b>1,10</b>	<b>0,64</b>
			A	<b>1,07</b>	<b>0,58</b>
			<b>Carreador de A</b>	<b>1,14</b>	<b>0,32</b>

Em nosso estudo, realizamos análises de duas variantes de baixa frequência dos genes *TYK2* e *IL23R*, localizadas em regiões codificadoras de proteínas, que de acordo com o último GWAS publicado, podem estar fortemente associadas à Hanseníase (LIU et al., 2017). A análise das variantes genéticas localizadas nos genes *TYK2*, *IL23R* e *LRRK2* na amostra composta por 412 pacientes com Hanseníase e de 967 indivíduos saudáveis, nascidos no Amazonas, não mostraram associação para as três combinações: alélica, genotípica e de carreador, conforme mostrado anteriormente, na Tabela 5. Na análise da variante de baixa frequência, rs76418789, do gene *IL23R*, observamos ausência de associação para o alelo A e genótipo AG, com OR= 0,86 (IC: 0,00 – 241,7; p= 0,96) e com OR = 0,86 (IC: 0,01 – 46,5; p= 0,94), respectivamente, sugerindo que essa variante não está associada à Hanseníase na população atendida na FUAM. Não foi encontrado o genótipo homozigoto AA. Para a variante rs55882956, localizada no gene *TYK2*, observamos que o alelo A e o genótipo AG quatro indivíduos apresentaram o genótipo heterozigoto AG, sendo duas amostras de controle e duas amostras de pacientes e também não foi encontrada associação com a doença (p > 0,05). O genótipo AA foi ausente nas amostras analisadas de casos ou controles.

A ausência de associação genética em diferentes populações pode ocorrer e pode ser explicada pela diferença na frequência dos alelos e genótipos, que são particulares e específicas de cada região geográfica. A frequência e a distribuição dos alelos em uma população podem fazer com que uma variante esteja associada à determinada doença. Ao se comparar as frequências dos alelos e dos genótipos, obtidos neste trabalho, como o que está disponível no Projeto Internacional 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org/>), verificamos que as frequências para as variantes raras do gene *IL23R* (rs76418789) (Tabela 6) e *TYK2* (rs55882956) mantém um padrão similar (Tabela 7).

**Tabela 6:** Frequência da variante rs76418789, do gene *IL23R*, disponível no Projeto 1000 Genomas.

<i>IL23R</i> rs76418789	AFR	AMR	EAS	EUR	Presente estudo
G	0,999	1,000	0,947	0,998	<b>0,999</b>
A	0,001	-	0,053	0,002	<b>0,001</b>
GG	0,998	1,000	0,895	0,996	<b>0,998</b>
AG	0,002	-	0,105	0,004	<b>0,002</b>

AFR: africana; AMR: ameríndia; EAS: asiática; EUR: europeia

É interessante notar, de acordo com o que está disponível no Projeto 1000 Genomas, a variante rs76418789, do gene *IL23R*, a raiz ancestral ameríndia (AMR) teve 100% de frequência do alelo G e do genótipo GG (Tabela 6). Já a variante rs55882956, do gene *TYK2*, a frequência descrita para o alelo G e para o genótipo GG, é de 100%, para a ancestralidade africana (AFR) (Tabela 7).

**Tabela 7:** Frequência da variante rs55882956, do gene *TYK2*, disponível no Projeto 1000 Genomas.

<i>TYK2</i> rs55882956	AFR	AMR	EAS	EUR	Presente estudo
G	1,000	0,983	0,975	0,999	<b>0,999</b>
A	-	0,017	0,025	0,001	<b>0,001</b>
GG	1,000	0,965	0,950	0,998	<b>0,998</b>
AG	-	0,035	0,050	0,002	<b>0,002</b>

AFR: africana; AMR: ameríndia; EAS: asiática; EUR: europeia

Para os SNPsrs3761863(Tabela 8) e rs7298930(Tabela 9), do gene *LRRK2*, as frequências alélica e genotípica mostraram-se parecidas com o que tem disponível no Projeto 1000 Genomas, com uma maior uniformidade e distribuição dos alelos e genótipos. Diferente das outras duas variantes dos genes *IL23R* e *TYK2*, os três grupos genotípicos foram encontrados.

**Tabela 8:** Frequência do SNP rs3761863, do gene *LRRK2*, disponível no Projeto 1000 Genomas.

<i>LRRK2</i> rs3761863	AFR	AMR	EAS	EUR	Presente estudo
T	0,508	0,471	0,540	0,330	<b>0,462</b>
C	0,492	0,529	0,460	0,670	<b>0,538</b>
TT	0,247	0,233	0,288	0,109	<b>0,220</b>
CC	0,230	0,291	0,208	0,449	<b>0,297</b>
CT	0,523	0,476	0,504	0,441	<b>0,483</b>

AFR: africana; AMR: ameríndia; EAS: asiática; EUR: europeia

**Tabela 9:** Frequência do SNP rs7298930, do gene *LRRK2*, disponível no Projeto 1000 Genomas.

<i>LRRK2</i> rs7298930	AFR	AMR	EAS	EUR	Presente estudo
C	0,413	0,393	0,500	0,457	<b>0,640</b>
A	0,587	0,607	0,500	0,543	<b>0,360</b>
AA	0,168	0,138	0,240	0,213	<b>0,131</b>
AC	0,490	0,510	0,520	0,489	<b>0,457</b>
CC	0,342	0,352	0,240	0,298	<b>0,412</b>

AFR: africana; AMR: ameríndia; EAS: asiática; EUR: europeia

### 5.1 Análise molecular das variantes rs76418789\_IL23R, rs55882956\_TYK2, rs3761863\_LRRK2 e rs7298930\_LRRK2

A partir dos estudos de GWAS que começaram a identificar variantes do tipo SNP, geralmente em regiões intrônicas e em regiões reguladoras do DNA e que estavam associadas ao desfecho de doenças, em diferentes etnias (FAVA et al., 2017, QUI et al., 2017; SAEED, 2017), com o aprimoramento de técnicas moleculares, variantes exônicas foram descobertas e também associadas ao desenvolvimento de doenças, como a hanseníase (WHANG et al., 2014; LIU et al., 2017). Estas variantes têm uma frequência menor na população geral, mas podem ter um efeito aumentado, quando comparadas às variantes comuns, no desfecho e no quadro clínico da doença. A relação dessas variantes e sua relação com a hanseníase ainda precisam ser mais bem esclarecidas, assim como a replicação delas em outras amostras populacionais e de estudos funcionais.

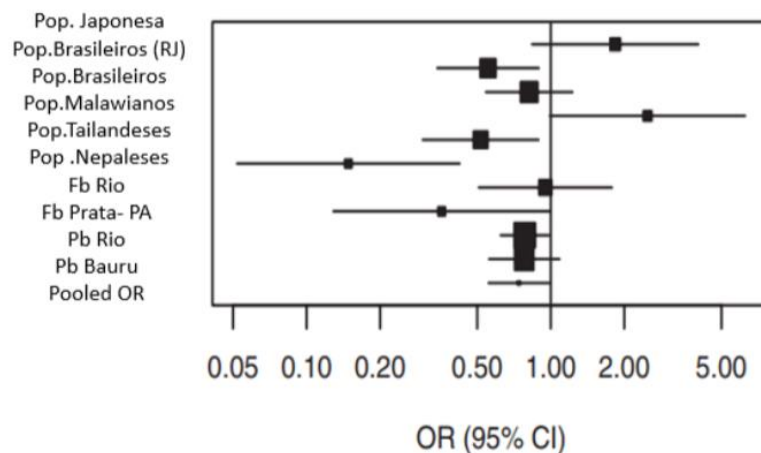
- *IL23R*

A variante exônica rs76418789, do gene *IL23R*, foi recentemente associada ao risco (OR= 1,36; p= 1.03e<sup>-10</sup>) de desenvolvimento da hanseníase, na população chinesa (LIU et al., 2017). O gene *IL23R* é um gene que faz parte do complexo protéico IL23, sendo um receptor de citocina, que desencadeia sinais dentro da célula promovendo a inflamação e auxiliando na coordenação da resposta do sistema imunológico aos microorganismos invasores (O'SHEA et al., 2012; KREIS et al., 2015). Desempenha papel importante junto com outros genes na

regulação da ativação de células T, na resposta imune adaptativa e na produção de interferon gama (IFNG) (DIOGO et al., 2015; LIU et al., 2017).

No presente estudo, não foram observadas associações alélicas, genótípicas ou de carreador em nossa amostragem ( $p > 0,05$ ), o que pode ser explicado pelas frequências alélicas: o alelo A tem uma frequência de 5,3% na população asiática, enquanto que no nosso estudo, a frequência deste alelo foi de 0,1% (Tabela 6), ou seja, precisaríamos de um número amostral muito maior para conseguirmos verificar alguma tendência de associação. Até o momento, só existe o trabalho de Liu e colaboradores (2017) que identificou a associação desta variante com a hanseníase, dessa forma, para verificar se esta associação se mantém, é necessário que outras amostras populacionais repliquem a variante rs76418789\_IL23R em seus estudos.

O alelo A que está associado ao risco na população chinesa ( $OR = 1,36$ ;  $p = 1.03e^{-10}$ ) (LIU et al., 2017), na população amazonense, atendida na FUAM, mesmo não tendo um valor estatisticamente significativo, está apontando para o sentido contrário, o de proteção ( $OR = 0,86$ ;  $p = 0,96$ ). Esse tipo de resultado antagônico é observado em outros estudos, principalmente nos de meta-análise, como o de Cardoso e colaboradores (2011) (Figura 8), que analisaram o SNP *TNF*-308G>A e sua associação com a hanseníase, na população proveniente do Rio de Janeiro, São Paulo e Pará. Como é possível verificar, na Figura 8, dois estudos mostram este SNP associado ou apontando para o risco ( $OR > 1$ ), outros associados ou apontando à proteção ( $OR < 1$ ), enquanto outros não estão associados ( $OR = 1$ ) (CARDOSO et al., 2011).



**Figura 8:** Meta-análise do SNP *TNF*-308G>A e a hanseníase. **Fonte:** CARDOSO et al., 2011.

Onodera e colaboradores (2015) analisaram a mesma variante utilizada em nosso estudo, a rs76418789, e encontraram uma associação à proteção à doença de Crohn, na população japonesa. Esta mesma variante (rs76418789) foi associada à espondilite anquilosante, em asiáticos (OR = 1,5;  $p = 8,2 \times 10^{-4}$ ) (SANTONI et al., 2013).

Por ser um gene que está implicado na via metabólica das citocinas, consequentemente, nas respostas inflamatórias e do sistema imunológico, outras variantes do gene *IL23R* tem sido estudadas para verificar a relação com diferentes patologias, como, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e colite ulcerativa, psoríase e esclerose múltipla, por exemplo (EINARSDOTTIR et al., 2009; LI et al., 2016; SIVANESAN et al., 2016). Li e colaboradores (2016) analisaram o efeito das variantes rs1884444, rs7530511, rs10889677 e rs76418789, do gene *IL23R*, na população chinesa e a associação delas com o desenvolvimento de doenças desmielinizantes inflamatórias graves, como a esclerose múltipla. Entretanto, apenas a variante rs1884444 foi associada ao risco de desenvolvimento da doença desmielinizantes ( $p = 0,02291$ ) (LI et al., 2016). Variantes do gene *IL23R* (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026, rs1343151, rs10889677, rs11209032 e rs1495965) foram analisadas na sua relação com as respostas ao medicamento Influximabe, utilizado no tratamento da doença inflamatória intestinal (DII), na população alemã (JURGENS et al., 2010). Eles verificaram que os portadores do genótipo homozigoto têm um risco aumentado de desenvolver a DII, porém, têm mais possibilidade de responder melhor ao tratamento com o Influximabe ( $p = 0,001$ ) (JURGENS et al., 2010). Cravo e colaboradores (2014), também investigaram variantes no gene *IL23R* para verificar aspectos clínicos e genéticos relacionados à resposta de terapia em pacientes com colite ulcerativa. Eles concluíram que os portadores do alelo mutante C2370A tiveram uma chance maior de desenvolver manifestações extra-intestinais ( $p < 0,05$ ) e uma maior probabilidade de resistência ao medicamento Mesalazina ( $p < 0,03$ ), utilizado para tratamento de doenças inflamatórias intestinais (CRAVO et al., 2014).

Einarsdottir e colaboradores (2009) realizaram um estudo no qual testaram variantes do *IL23R* em doenças inflamatórias intestinais (DII), psoríase e na doença celíaca, em amostras de pacientes suecos, finlandeses, italianos e húngaros, sendo o primeiro estudo a relatar associação do *IL23R* com a doença de Crohn, a psoríase e a colite ulcerativa. O haplótipo TTCTGCAA foi associado ao risco de DII (OR = 1,38;  $p = 0,009$ ), enquanto o haplótipo CCTGATCG foi associado à proteção à DII (OR = 0,41;  $p = 0,001$ ) (EINARSDOTTIR et al., 2009). Um estudo recente, em pacientes israelenses e turcos, com uveíte de Behçet, uma vasculite inflamatória sistêmica, analisaram variantes nos genes *IL-10*



e *IL23R* e verificaram que variante rs1495965 mutante do gene *IL23R*, pode levar a um risco maior de desenvolvimento desta doença e que a presença do genótipo selvagem parece exercer um papel protetor (KRAMER et al., 2018)

- *TYK2*

A variante rs55882956 do gene *TYK2* foi uma das sete variantes encontradas no trabalho de GWAS, de Liu e colaboradores (2017), sendo classificada como variante de baixa frequência e associada ao risco (OR= 1,30;  $p= 1.04e^{-04}$ ) de desenvolvimento da hanseníase (LIU et al., 2017). O gene *TYK2* é um membro da família janus kinase (JAK), onde as proteínas da família JAK (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2) se associam a vários receptores de citocinas (KREIS et al., 2015; DIOGO et al., 2015). A proteína TYK2 se associa a cadeias de citocinas, participando na regulação da resposta imune inata e da atividade do fator de transcrição NF-kappaB. (O'SHEA et al., 2012; LIU et al., 2017).

Seguindo o trabalho de Liu e colaboradores (2017), até o momento, este é o primeiro estudo do tipo caso-controle que examinou a associação da variante genética rs88552956\_*TYK2*, e sua associação com a hanseníase, em indivíduos amazonenses. Entretanto, nossos resultados não foram significativos, sugerindo que esta variante não desempenha um papel na predisposição desta doença (OR= 2,35;  $p =0,54$ ). Outras variantes genéticas no *TYK2* já foram investigadas para doenças infecciosas (tuberculose e doença de Chagas), autoimunes (lúpus e psoríase) e reumáticas (artrite reumatoide) (DIOGO et al., 2015; MEYER et al., 2015; DENDROU et al., 2016; BOISSON-DUPUIS et al., 2018; RODRIGEZ et al., 2018).

Boisson-Dupuis e colaboradores (2018) analisaram a variante P1104A, no gene *TYK2*, relacionada ao desenvolvimento de tuberculose primária, que assim como a hanseníase, também é causada por uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis*). Os autores verificaram que portadores homocigotos da variante P1104A são mais propensos à tuberculose devido à produção insuficiente de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), um fator crucial no sistema autoimune aos patógenos (BOISSON-DUPUIS et al., 2018).

Rodriguez e colaboradores (2018) investigaram três variantes (rs2304256, rs34536443 e rs12720356) do gene *TYK2*, na população colombiana, para verificar se elas poderiam reduzir a função gênica em mediar a sinalização de citocinas e a susceptibilidade a infecções pelo *Trypanosoma cruzi* e o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica. Entretanto, essas variantes não tiveram associação significativa com a doença de chagas ou à progressão da

cardiomiopatia chagásica, em indivíduos infectados (RODRIGUEZ et al., 2018). Em um estudo conduzido por Dendrou e colaboradores (2016), a variante rs34536443\_*TYK2* mutante leva à perda significativa da função do gene, fazendo com que a sinalização de citocinas, como a IL12 e IL23, seja prejudicada (DENDROU et al., 2016).

Um estudo realizado no Japão identificou um indivíduo com deficiência da proteína *TYK2* que foi diagnosticado, clinicamente, com síndrome de hiper-IgE (HIES) e que tinha uma susceptibilidade aumentada a inúmeras infecções (MINEGISHI et al., 2006). O paciente com deficiência proteica *TYK2*, descrito por Minegishi e colaboradores (2006), apresentava infecção moderada por Bacille Calmette Guerin (BCG) e concentrações elevadas de IgE, provavelmente devido à resposta da interleucina 12 (*IL12*). Anos depois, Killic e colaboradores (2012) descreveram um paciente turco, com deficiência da proteína *TYK2* e que também sofria de infecção disseminada por BCG, herpes zoster e neurobrucelose. Causando sequelas neurológicas graves e comprometimento cognitivo do paciente. A deficiência desse gene no paciente turco, provavelmente, contribuiu para a ocorrência dessa doença causada pela bactéria *Brucella* (MINEGISHI et al., 2006; KILLIC et al., 2012).

Em um GWAS de análise de associação do *TYK2*, realizado por Enerback e colaboradores (2018), foi encontrado uma forte associação genética de três variantes exônicas (rs34536443, rs12720356 e rs2304256) associados à psoríase (ENERBACK et al., 2018).

Lesgidou et al, utilizaram simulações de dinâmica molecular para explorar as consequências estruturais da substituição de Pro1104Ala, encontrada na variante rs34536443, do gene *TYK2* (LESGIDOU et al., 2018). A mudança de prolina para alanina, na posição 1104, do gene *TYK2*, produz a expansão do espaço conformacional da proteína do domínio quinase. Essa alteração de aminoácidos pode desregular o processo de ativação proteica, bloqueando a regulação de sua atividade enzimática e, portanto, a transdução de sinal. Esses achados estão em concordância com estudos anteriores, nos quais abordam a fosforilação reduzida e atividade enzimática da *TYK2* e a transdução de sinal atenuado pelo polimorfismo rs34536443 (COUTURIER et al., 2011; DENDROU et al., 2016; LESGIDOU et al., 2018).

- *LRRK2*

Estudos de GWAS têm associados variantes no gene *LRRK2* à susceptibilidade ao risco de desenvolvimento da hanseníase (ZHANG et al., 2009; WHANG et al., 2015; FAVA et al., 2016). A *LRRK2* ou dardarina é uma proteína que exerce um conjunto diversificado de funções, na qual medeia processos catalíticos através do seu domínio enzimático ROC / COR

facilitando a transdução de sinal através de um domínio MAPK e interage com outras proteínas através de três domínios de suporte, uma repetição de anquilina (ANK), uma repetição rica em leucina (LRR) e um domínio de repetição WD40 (LEWIS et al., 2012). O gene *LRRK2* está relacionado à imunidade, destacando-se em um possível papel na regulação de vias de sinalização que estão ligadas à patogênese de doenças, como doença de Crohn, de Parkinson e a hanseníase. A *LRRK2* pertence à família de proteína de repetição quinase rica em leucina 2, responsáveis por regularem vias celulares e em processos de autofagia e fagocitose (ZHANG et al., 2011).

Zhang e colaboradores (2009) realizaram um estudo de GWAS para buscar variantes relacionadas à hanseníase, na população Chinesa, e encontraram polimorfismos associados à hanseníase, no gene *LRRK2*. O SNP rs1873613 mostrou-se fortemente associado ao risco ( $p = 5,10 \times 10^{-5}$ ) (ZHANG et al., 2009). Em outro estudo de GWAS, Whang e colaboradores (2015), investigaram variantes (rs1427267, rs3761863 (M2397T), rs1873613, rs732374 e rs7298930) e sua associação com a hanseníase, na população chinesa. As variantes rs3761863 (M2397T) e rs7298930 parecem ter um efeito protetor na hanseníase, mediado pelo aumento da resposta imune e pela diminuição da neurotoxicidade, após a infecção pelo *M. leprae* e foram associadas à proteção (OR = 0,713;  $p = 0,038$  e OR = 0,647;  $p = 0,005$ , respectivamente) (WHANG et al., 2015).

Nós não encontramos associações alélicas, genotípicas ou de carreador ( $p > 0,05$ ) no presente estudo. Uma leve e sugestiva tendência *borderline* à proteção foi sugerida na análise haplotípica rs3761863/rs7298930, para o haplótipo T/C (OR= 0,79; IC= 0,61 - 1,02;  $p = 0,07$ ), após as correções de sexo e idade. O baixo desequilíbrio de ligação ( $r^2=18\%$ ) para os SNPs do gene *LRRK2*, mostra que essas duas variantes se comportam como marcadores independentes.

A ausência de associação relatada neste estudo confirma que a população brasileira possui um padrão genético muito heterogêneo e particular e isso se deve às variações nas frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas, que são únicas de cada região geográfica. Isso reflete nos resultados discordantes dentre os estudos analisados, ou seja, cada população exibe um *background* genético diferenciado, devido à estrutura populacional, a interações ambientais, ao grau de DL entre os marcadores, à estratificação populacional ou à influência de outros genes, entre outros fatores (MATA et al., 2010).

Fava e colaboradores avaliaram variantes no gene *LRRK2* e verificaram se pacientes com hanseníase desenvolveriam reações do tipo 1 (T1R), um dos efeitos colaterais inflamatórios da doença. Das 18 variantes analisadas, a variante rs3761863 (M2397T),

mostrou-se relacionada à reação do tipo 1, tendo o mesmo alelo associado também à doença de Crohn, sugerindo o mecanismo inflamatório comum nessas duas doenças distintas (FAVA et al., 2016).

O gene *LRRK2* foi associado ao defeito de células de Paneth, células do intestino delgado com função antibacteriana, antifúngica e antiviral, em pacientes japoneses com doença de Crohn. Nesse estudo, foram selecionados 56 SNPs, onde, apenas a variante rs3761863 (M2397T), do gene *LRRK2*, mostrou associação significativa com defeito de células de Paneth ( $p = 3,62 \times 10^{-4}$ ) (LIU et al., 2017). Heckman e colaboradores (2014) avaliaram a associação entre variantes comuns, no gene *LRRK2* e o risco de atrofia de múltiplos sistemas, com amostras americana e inglesa. A variante rs3761863 (M2397T) mostrou-se como um fator de proteção à atrofia de múltiplos sistemas (OR= 0,60;  $p = 0,002$ ). Este efeito protetor foi observado mais fortemente nas amostras dos EUA (OR =0,46;  $p = 0,0008$ ) do que nas amostras do Reino Unido (OR = 0,63;  $p = 0,006$ ) (HECKMAN et al., 2014).

Estudos associação com variantes genéticas no gene *LRRK2* são associados com a doença de Parkinson (ZABETIAN et al., 2006; HEALY et al., 2008; PIRKEV et al., 2009; WU et al., 2013; KESSLER et al., 2018). Em um estudo realizado na população Taiwanesa foram analisadas seis variantes *missense* (N551K, R1398H, R1628P, S1647T, G2385R e M2397T) e a doença de Parkinson. O alelo A da variante G2385R foi associado à doença (OR = 2,27;  $p = 0,0017$ ) (WU et al., 2013). A variante rara G2019S do gene *LRRK2* é a causa genética mais comum da doença de Parkinson. A substituição G2019S está presente em várias populações, com uma frequência altamente variável, de acordo com a origem geográfica e étnica (ZABETIAN et al., 2006; HEALY et al., 2008).

Ao analisar os estudos do tipo caso-controle para os genes *IL23*, *TYK2* e *LRRK2* pode-se observar que, a maioria deles, são realizados em populações mais geneticamente homogêneas, como a asiática ou européia caucasiana. A população brasileira é a mais miscigenada e exibe características diferenciadas. Neste trabalho, mostramos que nenhuma das variantes genéticas está associada à susceptibilidade da hanseníase, na população amazonense, atendida na FUAM. Replicações em diferentes grupos populacionais precisam ser feitas para verificar se estas variantes estão associadas ao desfecho da hanseníase.

## 6 CONCLUSÃO

- Não foram encontradas associações alélicas, genotípicas de carreador ou haplotípicas para as variantes do gene *TYK2*, rs55882956 (Arg703Trp), *IL23R*, rs76418789 (G149R), *LRRK2*, rs7298930 e *LRRK2*, rs3761863 (M2397T), à hanseníase, em indivíduos amazonenses.

- As variantes (rs3761863 e rs7298930) do gene *LRRK2*, estão em fraco DL ( $r^2=18\%$ ) nas amostras de indivíduos atendidos na FUAM.

- A ausência de associação pode ser explicada pelo padrão de frequência alélica e genotípica e da contribuição ancestral

- É necessário replicar estas variantes em outras populações e verificar seu potencial efeito no desfecho da hanseníase.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, E; TAVASOLIAN, F; MOMTAZI-BOROJENI, A. A; SAMADI, M; RAFATPANAH, H. Protective role of R381Q (rs11209026) polymorphism in IL-23R gene in immune-mediated diseases: A comprehensive review. *Journal of Immunotoxicology*, 13(3), 286–300, 2016. Doi:10.3109/1547691x.2015.1115448
- AFONSO, L. Panorama da cidade de Manaus: crise, progresso e cultura na década de 1960. *SOMANLU*. 10(2), 2010.
- ALCAIS, A; MIRA, M; CASANOVA, J.-L; SCHURR, E; ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Current Opinion in Immunology*, 17(1), 44–48, 2005. Doi:10.1016/j.coi.2004.11.006
- ALTER, A; ALCAIS, A; ABEL, L; SCHURR, E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Human Genetics*, 123(3), 227–235, 2008. Doi:10.1007/s00439-008-0474-z
- ALTER, A; GRANT, A; ALCAIS, L; ABEL, A; SCHURR, E. Leprosy as a genetic disease. *Mammalian Genome*, 22(1-2), 19–31, 2011. Doi:10.1007/s00335-010-9287-1
- AL-SHAIKHLY, T; OCHS, H. D. HyperIgE Syndromes, Clinical & Molecular Characteristics. *Immunology and Cell Biology*, 2018. Doi:10.1111/imcb.12209
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia para o controle da hanseníase. n.111, 2002.
- BLEKHMAN, R; GOODRICH, J. K; HUANG, K; SUN, Q; BUKNOWSKI, R; BELL, J. T; CLARK, A. G. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*, 16(1), 2015. Doi:10.1186/s13059-015-0759-1
- BOISSON-DUPOUIS, S; RAMIREZ-ALEJO, N; LI, Z; PATIN, E; RAO, G; KERNER, G; MA, C. S. Tuberculosis and impaired IL-23–dependent IFN- $\gamma$  immunity in humans homozygous for a common TYK2 missense variant. *Science Immunology*, 3(30), 2018. Doi:10.1126/sciimmunol.aau8714
- BODMER, W; BONILLA, C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature Genetics*, 40(6), 695–701, 2008. Doi:10.1038/ng.f.136
- CARDOSO, C. C; PEREIRA, A. C; DE SALES MARQUES, C; MORAES, M. O. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiology*, 6(5), 533–549, 2011. Doi:10.2217/fmb.11.39
- CARDOSO, C. C; PEREIRA, A. C; BRITO-DE-SOUZA, V. N; DURAES, S. M. B; RIBEIRO-ALVES, M; AUGUSTO C. Nery, J; MORAES, M. O. TNF -308G>A Single Nucleotide Polymorphism Is Associated With

Leprosy Among Brazilians: A Genetic Epidemiology Assessment, Meta-Analysis, and Functional Study. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(8), 1256–1263, 2011. Doi:10.1093/infdis/jir521

CARDOSO, C. C; PEREIRA, A. C; BRITO-DE-SOUZA, V. N; DIAS-BAPTISTA, I. M; MANIERO, V. C; VENTURI, J; MORAES, M. O. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism associated with leprosy among Brazilians. *Human Genetics*, 128(5), 481–490, 2010. Doi:10.1007/s00439-010-0872-x

CASANOVA, J.-L & Abel, L. GENETIC DISSECTION OF IMMUNITY TO MYCOBACTERIA: The Human Model. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 581–620, 2002. Doi:10.1146/annurev.immunol.20.081501

CHOI, M; SCHOLL, U. I; JI, W; LIU, T; TIKHONOVA, I. R; ZUMBO, P; LIFTON, R. P. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19096–19101, 2009. Doi:10.1073/pnas.0910672106

CORTES, A; HADLER, J; POINTON, J. P; ROBINSON, P. C; KARADERI, T; ... HARRIS, J. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature Genetics*, 45(7), 730–738, 2013. Doi:10.1038/ng.2667

COUTURIER, N; BUCCIARELLI, F; NURTDINOV, R. N; DEBOUVERIE, M; LEBRUN-FRENAY, C; DEFER, G; BRASSAT, D. Tyrosine kinase 2 variant influences T lymphocyte polarization and multiple sclerosis susceptibility. *Brain*, 134(3), 693–703, 2011. Doi:10.1093/brain/awr010

CRAVO, M. L; FERREIRA, P. A; SOUSA, P; MOURA-SANTOS, P; VELHO, S; TAVARES, L; BRITO, M. IL23R polymorphisms influence phenotype and response to therapy in patients with ulcerative colitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 26(1), 26–32, 2014. Doi:10.1097/meg.0000000000000004

CUNNINGHAME GRAHAM, D. S; MORRIS, D. L; BHANGALE, T. R; CRISWELL, L. A; SYVANEN, A. C; RONNBLOM, L; VYSE, T. J. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS Genetics*, 7(10), e1002341, 2011. Doi:10.1371/journal.pgen.1002341

DIOGO, D; BASTARACHE, L; LIAO, K. P; GRAHAM, R. R; FULTON, R. S; GREENBERG, J. D; LEE, A. TYK2 Protein-Coding Variants Protect against Rheumatoid Arthritis and Autoimmunity, with No Evidence of Major Pleiotropic Effects on Non-Autoimmune Complex Traits. *PLOS ONE*, 10(4), e0122271, 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0122271

DENDROU, C. A; CORTES, A; SHIPMAN, L; EVANS, H. G; ATTFIELD, K. E; JOSTINS, L; FUGGER, L. Resolving TYK2 locus genotype-to-phenotype differences in autoimmunity. *Science Translational Medicine*, 8(363), 363ra149–363ra149, 2016. Doi:10.1126/scitranslmed.aag1974

DUERR, R. H; TAYLOR, K. D; BRANT, S. R; RIOUX, J. D; SILVERBERG, M. S; DALY, M. J; CHO, J. H. A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science*, 314(5804), 1461–1463, 2006. Doi:10.1126/science.1135245

EINARSDOTTIR, E; KOSKINEN, L. L; DUKES, E; KAINU, K; SUOMELA, S; LAPPALAINEN, M; SAAVALAINEN, P. IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Medical Genetics*, 10(1), 2009. Doi:10.1186/1471-2350-10-8

ENERBACK, C; SANDIN, C; LAMBERT, S; ZAWISTOWSKI, M; STUART, P. E; VERMA, D; ELDER, J. T. The psoriasis-protective TYK2 I684S variant impairs IL-12 stimulated pSTAT4 response in skin-homing CD4+ and CD8+ memory T-cells. *Scientific Reports*, 8(1), 2018. Doi:10.1038/s41598-018-25282-2

FAVA, V. M; MANRY, J; COBAT, A; ORLAVA, M; VAN THUC, N; Ba, N. N. A Missense LRRK2 Variant Is a Risk Factor for Excessive Inflammatory Responses in Leprosy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004412, 2016. Doi:10.1371/journal.pntd.0004412

FAVA, V. M; MANRY, J; COBAT, A; ORLOVA, M; VAN THUC, N; MORAES, M. O; SALES-MARQUES, C; STEFANI, M.M; LATINI, A. C; BELONE, A. F; THAI, V, H; ABEL, L; ALCAIS, A; SCHURR, E. A genome wide association study identifies a lncRNA as risk factor for pathological inflammatory responses in leprosy. *PLOS Genetics*, 13(2), e1006637, 2017. Doi:10.1371/journal.pgen.1006637

FINE, P. E. M; STEME, J. A. C; PONNIGHAUS, J. M; BLISS, L; SAUL, J; CHIHANA, A; WAMDORFF, D. K. Household and Dwelling Contact as Risk Factors for Leprosy in Northern Malawi. *American Journal of Epidemiology*, 146(1), 91–102, 1997. Doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009195

FITNESS, J; TOSH, K, HILL, A. V. Genetic susceptibility to leprosy. *Genes and Immunity* 3, 441–453, 2002.

FIRMBACH-KRAFT, I; BVERS, M; SHOWS, T; DALLA-FAVERA, R; KROLEWSKI, J, J. tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene*, Sep;5(9):1329-36, 1990.

FLOSS, D. M; SCHRODER, J; FRANKE, M; SCHELLER, J. Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26(5), 569–578, 2015. Doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.005

GILKS, W. P; ABOU-SLEIMAN, P. M; GANDHI, S; JAIN, S; SINGLETON, A; LEES, A. J; WOOD, N. W. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *The Lancet*, 365(9457), 415–416, 2005. Doi:10.1016/s0140-6736(05)17830-1

HECKMAN, M. G; SCHOTTLAENDER, L; SOTO-ORTOLAZA, A. I; DIEHL, N. N; RAYAPROLU, S; OGAKI, K; ROSS, O. A. LRRK2 exonic variants and risk of multiple system atrophy. *Neurology*, 83(24), 2256–2261, 2014. Doi:10.1212/wnl.0000000000001078



HEALY, D. G; FALCHI, M; O'SULLIVAN, S. S; BONIFATI, V; DURR, A; BRESSMAN, S; WOOD, N. W. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet Neurology*, 7(7), 583–590, 2008. Doi:10.1016/s1474-4422(08)70117-0

ISHIZAKI, M; MUROMOTO, R; AKIMOTO, T; SEKINE, Y; KON, S; DIWAN, M; MATSUDA, T. Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation. *International Immunology*, 26(5), 257–26, 2013. Doi:10.1093/intimm/dxt062

JURGENS, M; LAUBENDER, R. P; HARTL, F; WEIDINGER, M; SEIDERER, J; WAGNER, J; BRAND, S. Disease Activity, ANCA and IL23R Genotype Status Determine Early Response to Infliximab in Patients With Ulcerative Colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 105(8), 1811–1819, 2010. Doi:10.1038/ajg.2010.95

KESSLER, C; ATASU, B; HANAGASI, H; SIMON-SANCHEZ, J; HAUSER, A.-K; PAK, M; LOHMANN, E. Role of LRRK2 and SNCA in autosomal dominant Parkinson's disease in Turkey. *Parkinsonism & Related Disorders*, 48, 34–39, 2018. Doi:10.1016/j.parkreldis.2017.12.007

KILIC, S. S; HACIMUSTAFAOGLU, M; BOISSON-DUPUIS, S; KREINS, A. Y; GRANT, A. V; ABEL, L; CASANOVA, J.-L. A Patient with Tyrosine Kinase 2 Deficiency without Hyper-IgE Syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 160(6), 1055–1057, 2012. Doi:10.1016/j.jpeds.2012.01.056

KRAMER, M; HASANREISOGLU, M; WEISS, S; KUMOVA, D; SCHAAP-FOGLER, M; GUNTEKIN-ERGUN, S; COHEN, Y. Single-Nucleotide Polymorphisms in IL23R-IL12RB2 (rs1495965) Are Highly Prevalent in Patients with Behcet's Uveitis, and Vary between Populations. *Ocular Immunology and Inflammation*, 1–8, 2018. Doi:10.1080/09273948.2018.1467463

KREINS, A. Y; CIANCANELLI, M. J; OKADA, S; KONG, X. F; RAMÍREZ-ALEJO, N; KILIC, S. S; AILAL, F. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(10), 1641–1662, 2015. Doi:10.1084/jem.20140280

LEE, Y. H.; BAE, S. Association between TYK2 polymorphisms and susceptibility to autoimmune rheumatic diseases : a meta-analysis. p. 1–8, 2016.

LEWIS, P. A; MANZONI, C. LRRK2 and Human Disease: A Complicated Question or a Question of Complexes? *Science Signaling*, 5(207), 2012. Doi:10.1126/scisignal.2002680

LEON RODRIGUEZ, D. A; ACOSTA-HERRERA, M; CARMONA, F. D; DOLADE, N; VARGAS, S; ECHEVERRÍA, L. E; MARTTIN, J. Comprehensive analysis of three TYK2 gene variants in the susceptibility to Chagas disease infection and cardiomyopathy. *PLOS ONE*, 13(1), 2018. Doi:10.1371/journal.pone.0190591

LESGIDOU, N; ELIOPOULOS, E; GOULIELMOS, G. N; VLASSI, M. Insights on the alteration of functionality of a tyrosine kinase 2 variant: a molecular dynamics study. *Bioinformatics*, 34(17), i781–i786, 2018. Doi:10.1093/bioinformatics/bty556

LI, F-F; ZHU, X-D; YAN, P; JIN, M-H; YUE, H; ZHANG, Q; FU, J; LIU, S-L. Characterization of variations in IL23A and IL23R genes: possible roles in multiple sclerosis and other neuroinflammatory demyelinating diseases. *Journal Aging*, v. 8, n. 11, 2734-2746, 2016. Doi: 10.18632/aging.101058.

LIU, H; WANG, Z; LI, Y; YU, G; FU, X; WANG, C; LIU, W; YU, Y; BAO, F; IRWANTO, A; LIU, J; CHU, T; KUMAR, A; MAURER-STROH, S; LIMVIPHUVADH, V; WANG, H; MI, Z; SUN, Y; SUN, L; WANG, L; WANG, C; YOU, J; LI, J; FOO, J; LIANY, H; MEAH, W; NIU, G; YUE, Z; ZHAO, Q; WANG, N; YU, M; YU, W; CHENG, X; KHOR, C; SIM, K; AUNG, T; WANG, N; WANG, D; SHI, L; NING, Y; ZHENG, Z; YANG, R; LI, J; YANG, J; YAN, L; SHEN, J; ZHANG, G; CHEN, S; LIU, L; ZHANG, F. Genome-Wide Analysis of Protein-Coding Variants in Leprosy. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 137, n. 12, p. 2544–2551, 2017.

LIU, T.C; NAITO, T; LIU, Z; VANDUSSEN, K. L; HARITUNIAN, T; LI, D; ENDO, K; KAWAI, Y; NAGASAKI, M; KINOUCHE, Y; MCGOVERN, D. P. B; SHIMOSEGAWA, T; KAKUTA, Y; STAPPENBECK, T. S. LRRK2 but not ATG16L1 is association with Paneth cell defect in Japanese Crohn's disease patients. *JCI Insight*, v. 2, n. 6, 2(6):e9117, 2017. Doi: 10.1172/jci.insight.91917.

MAMOLIO, T. A; COLLINS, F. S; COX, N. J; GOLDSTEIN, D. B; HINDORFF, L. A; HUNTER, D. J; VISSCHER, P. M. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461(7265), 747–753, 2009. Doi:10.1038/nature08494

MATA, I. F; WEDEMEYER, W. J; FARRER, M. J; TAYLOR, J. P; GALLO, K. A. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends in Neurosciences*, 29(5), 286–293, 2006. Doi:10.1016/j.tins.2006.03.006

MATA IF, SHI M, AGARWAL P, *et al.* SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol* 2010, 67: 1350-1356.

MANTA, F; PEREIRA, R; VIANNA, R; ARAÚJO, A. R. B; GITAI, D; SILVA, D; GUSMÃO, L. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS ONE*, 8(9), e75145, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0075145

MINEGISHI, Y; SAITO, M; MORIO, T; WATANABE, K; AGEMATSU, K; TSUCHIYA, S; KARASUYAMA, H. Human Tyrosine Kinase 2 Deficiency Reveals Its Requisite Roles in Multiple Cytokine Signals Involved in Innate and Acquired Immunity. *Immunity*, 25(5), 745–755, 2006. Doi:10.1016/j.immuni.2006.09.009

MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes and Infection*, 8(4), 1124–1131, 2006. Doi:10.1016/j.micinf.2005.10.024

MEYER, C. G; INTEMANN, C. D; FORSTER, B; OWUSU-DABO, E; FRANKE, A; HORSTMANN, R. D; THYE, T. No significant impact of IFN- $\gamma$  pathway gene variants on tuberculosis susceptibility in a West African population. *European Journal of Human Genetics*, 24(5), 748–755, 2015. Doi:10.1038/ejhg.2015.172

MONOT, M; HONORÉ, N; GARNIER, T; ZIDANE, N; SHERAFI, D; PANIZ-MONDOLFI, A; COLE, S. T. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature Genetics*, 41(12), 1282–1289, 2009. Doi:10.1038/ng.477

NG, S. B; TURNER, E. H; ROBERTSON, P. D; FLYGARE, S. D; BIGHAM, A. W; LEE, C; SHENDURE, J. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461(7261), 272–276, 2009. Doi:10.1038/nature08250

ONODERA, K; ARIMURA, Y; ISSHIKI, H; KAWAKAMI, K; NAGAISHI, K; YAMASHITA, K; SHINOMURA, Y. Low-Frequency IL23R Coding Variant Associated with Crohn's Disease Susceptibility in Japanese Subjects Identified by Personal Genomics Analysis. *PLOS ONE*, 10(9), e0137801, 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0137801

ORLOVA, M; DI PIETRANTONIO, T; SCHURR, E. Genetics of infectious diseases: hidden etiologies and common pathways. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(9), 2011. Doi:10.1515/cclm.2011.620

O'SHEA, J. J; PLENGE, R. JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease. *Immunity*, 36(4), 542–550, 2012. Doi:10.1016/j.immuni.2012.03.014

PIRKEVI, C; LESAGE, S; CONDROYER, C; TOMIYAMA, H; HATTORI, N; ERTAN, S; BASAK, A. N. A LRRK2 G2019S mutation carrier from Turkey shares the Japanese haplotype. *Neurogenetics*, 10(3), 271–273, 2009. Doi:10.1007/s10048-009-0173-5

QI, H; ZHANG, Y.-B; SUN, L; CHEN, C; XU, B; XU, F; SHEN, A.-D.. Discovery of susceptibility loci associated with tuberculosis in Han Chinese. *Human Molecular Genetics*, 26(23), 4752–4763, 2017. Doi:10.1093/hmg/ddx365

SAEED, M. Locus and gene-based GWAS meta-analysis identifies new diabetic nephropathy genes. *Immunogenetics*, 70(6), 347–353, 2017. Doi:10.1007/s00251-017-1044-0

SAUER, M. E. D; SALOMÃO, H; RAMOS, G. B; D'ESPINDULA, H. R. S; RODRIGUES, R. S. A; MACEDO, W. C; MIRA, M. T. Genetics of leprosy: Expected—and unexpected—developments and perspectives. *Clinics in Dermatology*, 34(1), 96–104, 2016. Doi:10.1016/j.clindermatol.2015.10.005

SADHU, S; MITRA, D. K. Emerging Concepts of Adaptive Immunity in Leprosy. *Frontiers in Immunology*, 9, 2018. Doi:10.3389/fimmu.2018.00604

- SCOLLARD, D. M; ADAMS, L. B; GILLIS, T. P; KRAHENBUHL, J. L; TRUMAN, R. W; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. *ClinMicrobiol Rev* (2006) 19:338–81, 2006. Doi:10.1128/CMR.19.2.338-381.
- SIMON-SANCHEZ, J; HERRANZ-PÉREZ, V; OLUCHA-BORDONAOU, F; PEREZ-TUR, J. LRRK2 is expressed in areas affected by Parkinson's disease in the adult mouse brain. *European Journal of Neuroscience*, 23(3), 659–666, 2006. Doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04616.x
- SIVANESAN, D; BEAUCHAMP, C; QUINOU, C; LEE, J; LESAGE, S; CHEMTOB, S; MICHNICK, S. W. IL23R (Interleukin 23 Receptor) Variants Protective against Inflammatory Bowel Diseases (IBD) Display Loss of Function due to Impaired Protein Stability and Intracellular Trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 291(16), 8673–8685, 2016. Doi:10.1074/jbc.m116.715870
- TRABZUNI, D; RYTEN, M; EMMETT, W; RAMASAMY, A; LACKNER, K. J; ZELLER, T. Fine-Mapping, Gene Expression and Splicing Analysis of the Disease Associated LRRK2 Locus. *PLoS ONE*, 8(8), e70724, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0070724
- TOMIYAMA, H; LI, Y; FUNAYAMA, M; HASEGAWA, K; YOSHINO, H; KUBO, S.-I; HATTORI, N. *Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. Movement Disorders*, 21(8), 1102–1108, 2006. Doi:10.1002/mds.20886
- WALLACE, C; SMYTH, D. J; MAISURIA-ARMER, M; WALKER, N. M; TODD, J. A; CLAYTON, D. G. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 42(1), 68–71, 2009. Doi:10.1038/ng.493
- WANG, D; XU, L; LV, L; SU, L.-Y; FAN, Y; ZHANG, D. F; YAO, Y. G. ' . *Genes & Immunity*, 16(2), 112–119, 2014. Doi:10.1038/gene.2014.72
- WANG, Z; MI, Z; WANG, H; SUN, L; YU, G; FU, X;ZHANG, F. Discovery of 4 exonic and 1 intergenic novel susceptibility loci for leprosy. *Clinical Genetics*, 94(2), 259–263,2018. Doi:10.1111/cge.13376
- WEST A B; MOORE D J; BISKUP S; BUGAYENKO A; SMITH W W; ROSS C A; DAWSON V L; DAWSON T M. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity, 102(46), 16842–16847, 2005. Doi:10.1073/pnas.0507360102
- WHO. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. *WklyEpidemiol Rec* (2016) 91:405–20.

WU, Y.-R; CHANG, K.-H; CHANG, W.-T; HSIAO, Y.-C; HSU, H.-C; JIANG, P.-R; CHEN, C.-M. *Genetic Variants of LRRK2 in Taiwanese Parkinson's Disease. PLoS ONE, 8(12), e82001, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0082001*

YIN, Q; WU, L. C; ZHENG, L; HAN, M. Y; HU, L. Y; ZHAO, P. P; ZHENG, H. F. Comprehensive assessment of the association between genes on JAK-STAT pathway (IFIH1, TYK2, IL-10) and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Archives of Dermatological Research, 2018. Doi:10.1007/s00403-018-1858-0*

YU, P; SHEN, F; ZHANG, X; CAO, R; ZHAO, X; LIU, P; ZHANG, H. Association of Single Nucleotide Polymorphisms of IL23R and IL17 with Ulcerative Colitis Risk in a Chinese Han Population. *PLoS ONE, 7(9), e44380, 2012. Doi:10.1371/journal.pone.0044380*

YU, R. Y; BRAZAITIS, J; GALLAGHER, G. The Human IL-23 Receptor rs11209026 A Allele Promotes the Expression of a Soluble IL-23R-Encoding mRNA Species. *The Journal of Immunology, 194(3), 1062–1068, 2014. Doi:10.4049/jimmunol.1401850*

ZABETIAN, C. P; HUTTER, C. M; YEAROUT, D; LOPEZ, A. N; FACTOR, S. A; GRIFFITH, A; PAYAMI, H. *LRRK2 G2019S in Families with Parkinson Disease Who Originated from Europe and the Middle East: Evidence of Two Distinct Founding Events Beginning Two Millennia Ago. The American Journal of Human Genetics, 79(4), 752–758, 2006. Doi:10.1086/508025*

ZAKRZEWSKI, M; SIMMS, L. A; BROWN, A; APPELYARD, M; IRWIN, J; WADDELL, N; RADFORD-SMITH, G. L. IL23R-protective coding variant promotes beneficial bacteria and diversity in the ileal microbiome in healthy individuals without inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis, 2018. Doi:10.1093/ecco-jcc/jjy188*

ZHANG, F; LIU, H; CHEN, S; LOW, H; SUN, L; CUI, Y; ZHANG, X. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nature Genetics, 43(12), 1247–1251, 2011. Doi:10.1038/ng.973*

## 8 ANEXOS

### ANEXO I

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa **“MARCADORES MOLECULARES, GENÉTICOS E SOROLÓGICOS NA HANSENÍASE: SUPORTE AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE PACIENTES E VIGILÂNCIA DOS CONTATOS**. Este estudo tem como objetivo avaliar testes laboratoriais capazes de identificar o contato domiciliar (pessoa que vive na mesma casa do doente) com maior risco de desenvolver a hanseníase ou o paciente com hanseníase com maior risco em desenvolver as reações inflamatórias. Os resultados servirão para possível implantação do teste no Serviço Único de Saúde (SUS), contribuindo para uma vigilância mais eficaz da doença ou do risco de reações inflamatórias. Com isso pode-se traçar alternativas de prevenção da hanseníase, tratamento medicamentoso e diagnóstico precoce, com grande impacto na diminuição de novos casos de hanseníase e diminuição de sequelas causadas pelo bacilo.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: haverá um questionário a ser respondido por você, com o fornecimento de informações mínimas as quais serão importantes para análises deste estudo. Após esta fase, você será examinado por um profissional treinado que colherá da sua orelha (lóbulo auricular) uma pequena quantidade de linfa (líquido transparente), uma gota de sangue por punção digital (ponta do dedo) e 5 mL de sangue. Com este material serão realizados testes laboratoriais que não são feitos na rotina de atendimento e que servem para identificar uma doença que pode afetar a sua saúde: a Hanseníase. Todo material coletado será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação “Alfredo da Matta”, com identificação para a confirmação de algum resultado duvidoso. Nós prestaremos todas as orientações necessárias caso queira conhecer o resultado. Se você não quiser conhecer o resultado nós o manteremos em sigilo. Todas as informações fornecidas serão confidenciais.

**Riscos e Desconfortos:** É mínimo o risco associado à sua participação neste estudo. O único desconforto será uma leve dor durante o raspado dérmico no lóbulo auricular, discreta dor na punção digital ou durante a coleta de sangue.

**Benefícios:** A participação neste estudo trará benefícios indiretos ao indivíduo, pois caso os resultados forem satisfatórios, será implantado na rotina da Fundação os testes diagnósticos em estudo, beneficiando todos os clientes atendidos pelo SUS com suspeita de estarem com hanseníase e seus respectivos contatos.

Para participar desta pesquisa, você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se do estudo. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que será atendido (a).

O Senhor (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação e terá assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. O nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos

utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Solicito a sua autorização para que o material colhido seja armazenado e utilizado futuramente em outros estudos, respeitando sempre a resolução vigente e com a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Declaro ter entendido as explicações referentes ao estudo:

Manaus, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do (a) Voluntário

\_\_\_\_\_

Assinatura do (a) Pesquisador (a)

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/FUAM

AV CODAJÁS 24 - BAIRRO CACHOEIRINHA MANAUS-AM

CEP: 69065-130

FONE: (92) 3632- 5853 / E-MAIL: cep@fuam.am.gov.br

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ANDRÉ LUIZ LETURIONDO

ENDEREÇO: AV CODAJÁS 24 - BAIRRO CACHOEIRINHA MANAUS-AM

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

CEP: 69065-130 FONE: (92) 3632-5843 /E-MAIL:  
ANDRE\_LETURIONDO@YAHOO.COM.BR