

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Marcelo Castro Freitas

Estudo da associação dos polimorfismos de base única (*G308A*) *TNF-alfa* e (*G801A*) *CXCL12* com a suscetibilidade à hanseníase e seus aspectos clínicos

Montes Claros
2013

Marcelo Castro Freitas

**Estudo da associação dos polimorfismos de base única (*G308A*) *TNF-alfa* e (*G801A*) *CXCL12*
com a suscetibilidade à hanseníase e seus aspectos clínicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Cuidados Primários em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Cuidados Primários em Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula

Coorientador: Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães Carvalho

Montes Claros
2013

F866e	<p>Freitas, Marcelo Castro. Estudo da associação dos polimorfismos de base única (<i>G308A</i>) <i>TNF-alfa</i> e (<i>G801A</i>) <i>CXCL12</i> com a suscetibilidade à hanseníase e seus aspectos clínicos [manuscrito] / Marcelo Castro Freitas. – 2013. 67 f. : il.</p> <p>Inclui bibliografia. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2013.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula. Coorientador: Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães Carvalho.</p> <p>1. Hanseníase. 2. Polimorfismo. 3. <i>TNF-a</i>, <i>CXCL12</i> – Associação dos genes – casos-controle. 5. Citocinas. 6. Quimiocinas. 7. Suscetibilidade. I. Paula, Alfredo Maurício Batista de. II. Carvalho, Sílvio Fernando Guimarães. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.</p>
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Catalogação: Biblioteca Central Professor Antônio Jorge.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Maria Ivete Soares de Almeida

Pró-reitor de Pesquisa: Vicente Ribeiro Rocha Júnior

Coordenadoria de Iniciação Científica: Leonardo Monteiro Ribeiro

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Maria Cristina Freire Barbosa

**PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM CUIDADOS PRIMÁRIOS EM
SAÚDE**

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Prates Caldeira

Coordenador Adjunto: Profa. Dra. Maísa Tavares de Souza Leite



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



CANDIDATO (A): MARCELO CASTRO FREITAS

TÍTULO DO TRABALHO: "Estudo da associação dos polimorfismos de base única (G308A) TNF-alfa e (G801A) CXCL12 com a suscetibilidade à hanseníase e seus aspectos clínicos".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

LINHA DE PESQUISA: Diagnóstico clínico e terapêutico em doenças infecciosas e parasitárias.

BANCA (TITULARES)

PROF. DR. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA /ORIENTADOR

PROF. DR. SÍLVIO FERNANDO GUIMARÃES CARVALHO

PROF. DR. LUIZ ANTÔNIO NOGUEIRA DOS SANTOS

PROF. DR. SÉRGIO AVELINO MOTA NOBRE

ASSINATURAS

BANCA (SUPLENTES)

PROF. DR. LÍVIA MÁRIS RIBEIRO PARANAÍBA

PROF. DR. LUCYANA CONCEIÇÃO FARIA

ASSINATURA



APROVADO(A)

[] REPROVADO(A)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir essa vitória em minha vida e por sempre guiar os meus passos durante toda a caminhada.

Agradeço à minha esposa, Mabell, pela paciência e compreensão e, também, aos meus filhos, Mateus e Artur, que aguentaram firme a minha ausência. Dedico a eles essa vitória em nossas vidas.

Agradeço à minha sogra, D. Alzira, que cuidou da minha família nas minhas ausências. Minha eterna gratidão.

Agradeço à minha mãe, Maria Inês, e aos meus irmãos, Marcos Antônio, Mário Vitor e Renato que, embora distantes, sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

Agradeço ao meu grande amigo de caminhada, Ednardo, pelo apoio sempre incondicional.

Agradeço aos amigos que fiz no Laboratório de Saúde Bucal Danilo, Camila, Marcos, Lucas, Carlos, João Marcus e Alana pelo aprendizado e pela cooperação.

Agradecimento especial a Danilo, Deborah, Lucas e Camila por terem me ajudado na realização desse trabalho.

Agradeço aos professores Silvio, por sempre responder prontamente quando as duvidas surgiam.

Agradeço em especial ao Prof. Alfredo, por acreditar que eu seria capaz e pela motivação.

Agradeço ao professor André, por estar à disposição para esclarecimento das dúvidas.

Agradeço aos professores da pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos e pela dedicação ao programa.

E, finalmente,

Agradeço ao meu pai, Antônio Tarcizo de Freitas, que embora não esteja mais entre nós, sempre foi meu espelho de vida e acredito me acompanhar em todo momento.

RESUMO

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa relatada desde o século VI a.C. Ainda hoje, representa um grave problema de saúde pública com elevadas taxas de detecção de novos casos, principalmente nos países em desenvolvimento. Tem como agente etiológico *Mycobacterium leprae*, parasito intracelular obrigatório de células epiteliais e de Schwann. Estudos recentes têm demonstrado a influência de fatores genéticos na suscetibilidade à doença *per si*, bem como no desenvolvimento das formas clínicas. Alguns polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do complexo de histocompatibilidade principal (*HLA-D_RI*), *PARK2/PACRG*, interleucina-10 (*IL-10*), receptor da vitamina D (*VDR*), *NRAMP1* foram consistentemente associados à hanseníase em estudos independentes envolvendo populações etnicamente distintas. Entretanto, estudos de associação dos SNPs dos genes *TNF_α* e *CXCL12* ainda se mostram inconclusivos para determinar a existência de associação com a suscetibilidade a *M. leprae*, assim como na gravidade das formas clínicas da doença. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação da expressão dos genes *TNF_α* e *CXCL12*, através de um estudo do tipo casos-controles, desenvolvido no município de Almenara, Minas Gerais, Brasil, onde foram avaliados 47 indivíduos hansenianos, diagnosticados entre os anos de 2007 e 2012. Os resultados obtidos pela análise dos polimorfismos (*G308A*) *TNF_α* e (*G801A*) *CXCL12*, através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), não demonstraram associação significativa com o desenvolvimento da hanseníase e nem com suas apresentações clínicas ($p < 0.05$). Entretanto, foi observada uma tendência de significância ($OR= 0.46, p= 0.083$) entre a presença do alelo G do gene (*G308A*) *TNF_α* e a ocorrência de bacilos nas lesões cutâneas. Os dados sugerem uma deficiente resposta imune celular nos indivíduos portadores do alelo G, tornando-se necessários estudos mais aprofundados para maiores conclusões.

Palavras-chave: Hanseníase, polimorfismo, *TNF-α*, *CXCL12*, citocinas, quimiocinas, suscetibilidade.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease, ancient, to reports by its presence among the population since the sixth century BC. Still today, is a major public health issue, with high rate of detection of new cases, especially in the developing countries. Its causative agent *Mycobacterium leprae* an obligate intracellular parasite of epithelial and Schwann cells. Recent studies have shown the influence of genetic factors in susceptibility to the disease *per si* as well as the development of clinical forms. A few single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of the major histocompatibility complex (HLADR1) PARK2/PACRG, Interleukin-10 (IL-10), vitamin D receptor (VDR), NRAMP1 were consistently associated with leprosy in independent studies ethnically distinct populations. However, association studies of SNPs of genes TNF and CXCL12 still inconclusive to establish the presence of association with susceptibility to *M. leprae*, as well as of the disease of the clinical forms severity. The objective of this study was to assess the genetic predisposition of these genes, through a study of the case-control type, conducted in the city of Almenara, Minas Gerais, Brazil, in which we assessed 47 leprosy individuals, diagnosed between the years 2007 and 2012. The findings obtained by the analysis of polymorphisms (G308A) and TNFa (G801A) CXCL12 by PCR (Polymerase Chain Reaction) was not significantly associated with the development of leprosy nor with their clinical presentations. However, we observed a trend toward significance ($OR = 0.46$, $p = 0.083$) between the presence of the G allele of the gene (G308A) TNFa and the occurrence of bacilli in skin lesions. Our data suggest a deficient cellular immune response in individuals with the G allele, making it necessary further studies to achieve better conclusions.

Keywords: Leprosy, polymorphism, TNF- α , CXCL21, cytokines, chemokines, susceptibility.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BB	<i>Boderline-Boderline</i>
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BL	<i>Boderline-Lepromatoso</i>
BT	<i>Boderline-Tuberculóide</i>
<i>CXCL12</i>	Gene CXCL12
CXCL12/SDF-1	Fator Derivado de Células Estromais
ENH	Eritema Nodoso Hansônico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Histocompatibilidade Principal
ICRC	<i>Indian Cancer Research Council</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
LL	Lepromatoso
MHC	Complexo Histocompatibilidade Principal
NRAMP1	Proteína 1 do macrófago associado à resistência natural
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACRG	Co-regulador da Parquina
PARK	Parquina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGL-1	Glicolipídeo Fenólico 1
PQT	Poliquimioterapia
PQT	Poliquimioterapia
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RR	Reação Reversa
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
<i>TNF</i>	Gene TNF
TT	Tuberculóide
VDR	Receptor da Vitamina D
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Aspectos gerais da hanseníase	11
1.2 Aspectos clínicos, terapêuticos e de diagnóstico da hanseníase.....	13
1.3 Hanseníase e estudos moleculares	15
1.4 Fator de necrose tumoral alfa – TNF α	18
1.5 Fator derivado de células estromais – CXCL12/SDF-1	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 PRODUTO	22
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIA	50
APÊNDICE	59
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	59
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para Menores de 18 Anos.....	61
APÊNDICE C – Questionário Sociodemográfico.....	63
ANEXOS	66
ANEXO A – Parecer Favorável do Comitê de Ética em Pesquisa.....	66
ANEXO B – Ficha de Notificação de Hanseníase.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da hanseníase

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa, granulomatosa, de caráter crônico-sistêmica, tendo como agente etiológico um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), denominado *Mycobacterium leprae*. Sua história está relacionada com a evolução da sociedade, acompanhando os processos migratórios e de miscigenação dos povos, carregando consigo um grande estigma social devido às lesões e deformidades que causa (1). Os primeiros relatos da doença remontam a 600 a.C., em antigas civilizações da China, Egito e Índia (2).

A correlação entre *M. leprae*, ou bacilo de Hansen, e a Hanseníase foi feita em 1873, quando Gerhard Armauer Hansen (Noruega) isolou a bactéria das lesões de indivíduos infectados, tornando-se a primeira doença atribuída a um agente infeccioso (1). Trata-se de um bastonete linear ou levemente encurvado, de comprimento entre 1,5 a 8 µm, largura em torno de 0,2 a 0,4 µm, de crescimento lento, tempo de geração entre 5-12 dias e temperatura ótima de crescimento entre 27-30°C. O período de incubação pode ser superior a cinco anos. É um parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário, com predileção por células da pele e, também, por células de Schwann, que compõem a bainha de mielina dos axônios dos nervos periféricos. Seu cultivo em meios de cultura artificiais ainda não é possível, o que dificulta seu estudo e o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais eficientes (1-3).

A Hanseníase apresenta um grande espectro de manifestações clínicas e fisiopatológicas, sendo a principal causa de incapacidades físicas, deformidades e sérias consequências econômicas, psicológicas e de exclusão social. O desenvolvimento das manifestações clínicas depende principalmente da resposta imune celular desenvolvida pelo hospedeiro (4, 5).

A classificação de Ridley e Jopling, proposta em 1964, classifica os indivíduos em dois polos distintos de acordo com seus espectros imunológicos e aspectos histopatológicos, onde aqueles indivíduos que apresentam resposta imune celular efetiva contra o *M. leprae* são denominados Tuberculóides (TT), enquanto aqueles que apresentam resposta imune celular fraca ou inexistente são classificados como lepromatosos (LL). Entre os polos tuberculóide e lepromatoso estão as formas intermediárias denominadas *Boderline-Tuberculóide* (BT), *Boderline-Boderline* (BB) e *Boderline-Lepromatoso* (BL), de acordo com grau de resposta imune desenvolvida (5, 6).

Os mecanismos de transmissão não estão bem esclarecidos. Acredita-se que os indivíduos classificados como multibacilares eliminam formas viáveis do bacilo pelas vias aéreas e através de secreções cutâneas. A infecção ocorre pelas vias aéreas ou, ainda, através de lesões presentes na pele do novo hospedeiro, porém a grande maioria dos indivíduos é naturalmente imune ao *M. leprae* (2, 3).

A prevalência da Hanseníase está intimamente relacionada às condições socioeconômicas da população, principalmente às condições precárias de moradia que facilitam o contato dos indivíduos susceptíveis com os doentes. Um importante fator de prevalência da doença é a susceptibilidade genética dos indivíduos que, segundo diversos estudos de agregação familiar, comparação entre gêmeos e de segregação populacional realizados, tem demonstrado importante papel na infecção por *M. leprae* (1, 7).

Devido à sua magnitude e alto poder incapacitante, a Hanseníase, ainda hoje, é considerada um grande problema de saúde pública, atingindo, principalmente, a faixa etária economicamente ativa da população. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 foram registrados 181.941 novos casos de hanseníase no mundo, contra 219.075 registrados no ano de 2011 e notificados por 105 países. Do total de novos casos registrados no ano de 2011, 18 países, concentrados na África, América do Sul e suldeste da Ásia, foram responsáveis por 94% das notificações. Do ano de 2004 a 2012, houve uma redução de mais de 50% de novos casos da doença, provavelmente devido às melhorias nas estratégias de controle e combate à doença em países onde a hanseníase é endêmica. Embora o número de casos tenha diminuído, ainda assim é considerado alto, devido à gravidade da doença (8).

Atualmente, o Brasil ocupa o segundo lugar mundial em número de novos casos de Hanseníase, registrando 33.935 novos casos em 2012 (8).

Desde 1985, o país vem reestruturando suas ações voltada para este problema e, em 1999, por recomendação da OMS, assumiu o compromisso de eliminar a doença até 2005, devendo reduzir a prevalência para menos de 1 caso/10.000 habitantes. Entretanto, a meta não foi alcançada, tendo o prazo prorrogado para 2010 (9, 10). Apesar da redução drástica no número de casos, de 190 para 46,8 doentes em cada 100.000 habitantes no período compreendido entre 1985 a 2000, a Hanseníase ainda precisa de uma vigilância resolutiva (9).

O objetivo proposto pela OMS, para o ano de 2015, é diminuir a taxa de detecção de novos casos com grau de incapacidade tipo II em 35% em relação ao ano de 2010 e, em 2020, para menos de 1 novo caso com grau 2 de incapacidade em 1 milhão (11).

1.2 Aspectos clínicos, terapêuticos e de diagnóstico da hanseníase.

A Hanseníase na antiguidade e na idade média era confundida com várias outras doenças de pele que acometiam aquelas populações como, por exemplo, elefantíase, queimaduras, escamações, escabiose, câncer de pele, lúpus, escarlatina, eczemas, sífilis, dentre outras (12). A preferência da bactéria *M. leprae* por temperaturas inferiores a 37°C determina sua localização em áreas mais frias do corpo como pele, nervos periféricos, testículos e trato respiratório superior. O diagnóstico tardio da doença pode determinar um grau de incapacidade e deformidades elevado, devido à invasão neural pela bactéria (2).

Geralmente, as manifestações clínicas observadas dependem de diversos fatores relacionados às características do hospedeiro, bem como da resposta imunológica desencadeada pela bactéria. As lesões apresentadas estão relacionadas à preferência pelas células da pele e pelas células de Schwann, causando processos inflamatórios agudos nestes locais, caracterizados por edema e destruição da bainha de mielina (7, 13).

Uma vez que o bacilo se instala nos nervos periféricos e na pele, desenvolve-se uma resposta inflamatória levando ao aparecimento de lesões que se caracterizam por manchas despigmentadas ou discrômicas, infiltrados celulares na pele, com ou sem edema e vasodilatação, além de nódulos e tubérculos de diferentes tamanhos. As lesões podem localizar-se em qualquer região do corpo, inclusive na mucosa nasal e cavidade oral, acompanhadas de perda de sensibilidade e perda de pelos, inclusive sobrancelhas e cílios (9).

A lesão neural é atribuída à proliferação do bacilo ou à resposta imune do hospedeiro, onde a maior ou menor intensidade bacilar está relacionada à forma clínica da doença. Por conseguinte, uma polineuropatia simétrica desenvolve-se nos pacientes lepromatosos (ou virchowianos), caracterizada pela perda sensitiva à temperatura e dor. Pode ocorrer presença de infiltrados de histiócitos, com pouca quantidade de linfócitos e, também, muitos bacilos no citoplasma das células de Schwann - especialmente nas adjacentes aos axônios amielínicos - em macrófagos, células perineurais e endoteliais. Pacientes tuberculóides apresentam mononeuropatia, formação de granulomas com células epitelioides e células gigantes, células inflamatórias mononucleadas e, ocasionalmente, necrose caseosa. Os nervos estão parcial ou totalmente destruídos e substituídos por tecido fibroso (14, 15).

No Brasil, a classificação mais utilizada é a de Madri, proposta em 1953, que considera os critérios clínicos (aspecto, número, extensão, definição de margens e simetria das lesões),

bacteriológico (presença ou ausência do bacilo), imunológicos (grau de resposta imune celular) e histológicos (presença desde granulomas bem definidos até infiltrado difuso linfocitário) para dispor os indivíduos em quatro grupos: dois polos considerados estáveis e opostos (virchowiano e tuberculóide) e outros dois grupos instáveis (indeterminado e dimorfo) (16).

As formas virchowiana e tuberculóide seguem um padrão de manifestações clínicas diferentes. Já nas formas dimorfa e indeterminada não são encontrados padrões fisiopatológicos semelhantes (13). A forma tuberculóide caracteriza-se pela pouca quantidade de bacilos, lesões anestésicas na pele e predomínio de resposta imune celular. A forma virchowiana caracteriza-se por apresentar lesões de forma disseminada, intensa multiplicação bacilar e predomínio da resposta humoral (17).

O tratamento da Hanseníase é feito através de poliquimioterapia (PQT), com a utilização de drogas de primeira linha como dapsona, rifampicina e clofazimina, sendo o esquema mais indicado, inclusive pelas baixas taxas de recidivas apresentadas (18).

Várias vacinas vêm sendo testadas como, por exemplo, o BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) associado ao *M. leprae* morto pelo calor ou a outras micobactérias, tais como o *Mycobacterium w.* e o bacilo ICRC (*Indian Cancer Research Council*), sendo os efeitos ainda incipientes para uma conclusão. Recentemente, novos estudos neste sentido avançam apontando para o uso da BCG, na perspectiva da proteção a alguns tipos de Hanseníase (19-24), podendo evoluir para ganhos significativos no combate a esta doença (18).

Durante o curso natural da doença, ou mesmo após a finalização do tratamento, no espectro imunológico da Hanseníase, situam-se os estados reacionais classificados, de acordo com Ridley & Joplin (1966), como reação tipo 1 ou Reação Reversa (RR), e reação tipo 2, ou Eritema Nodoso Hansônico (ENH) (25).

A reação tipo 1 (RR) ocorre frequentemente em pacientes paucibacilares, sendo caracterizada por uma resposta imune abrupta, mediada por célula, com formação de edema, aumento da população de linfócitos CD4+, da quantidade de receptores de IL-2 (Interleucina-2) e da expressão de RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) de IL-1 β (Interleucina-1 β), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), IL-2 e IFN- γ (Interferon- γ) (26). Já a reação tipo 2 (ENH) é caracterizada por uma reação inflamatória sistêmica e uma imunopatologia complexa, não totalmente esclarecida (27, 28).

O tratamento para os estados reacionais representa uma seção à parte na terapêutica da Hanseníase, cuja duração e escolha da droga dependem de fatores como presença e severidade de neurites, além da condição clínica do paciente. A utilização de terapia com corticóides

sistêmicos, como a prednisona e a talidomida, e antinflamatórios não-esteróides varia de acordo com a presença ou não das neurites, respectivamente (17, 29).

O diagnóstico da Hanseníase é essencialmente clínico, onde são observados sinais e sintomas característicos da doença provocados pela localização do bacilo na pele, vias aéreas superiores, olhos, testículos e principalmente nos nervos periféricos (17). Além disso, a baciloscopy de raspados dérmicos em sítios específicos, como lóbulos auriculares e cotovelos, ou diretamente das lesões na pele é utilizada para determinar o esquema terapêutico (9).

Embora a baciloscopy seja um método muito utilizado, tem maior importância como mecanismo de diagnóstico auxiliar. Assim, outras ferramentas laboratoriais como exames histopatológicos, imunológicos, bioquímicos e, também, de cunho genético vêm sendo desenvolvidos e testados na identificação, no diagnóstico e no monitoramento da Hanseníase como, por exemplo, dosagem de quimiocinas, citocinas, anticorpos e reação em cadeia da polimerase (PCR) (21, 28, 30-36).

1.3 Hanseníase e estudos moleculares

A detecção precoce da infecção pelo *M. leprae* é de grande importância para o monitoramento epidemiológico efetivo da Hanseníase na sociedade, sendo fundamental o desenvolvimento de métodos diagnósticos específicos e sensíveis que a diferenciem da infecção por outras micobactérias (24).

Com o sequenciamento do genoma de *M. leprae*, ficou evidenciado que este bacilo não apresentou notável evolução no decorrer dos tempos, mas sim uma diminuição genômica tornando-o mais adaptado às condições intracelulares. Grande parte de seu genoma é composto por pseudogenes (37). Neste sentido, acredita-se que o seu desenvolvimento está intimamente ligado a fatores relacionados à predisposição genética do hospedeiro, tanto no desenvolvimento da Hanseníase *per se*, como das formas clínicas (1, 37).

A interação entre *M. leprae* e as células do hospedeiro, com destaque para macrófagos e células de Schwann, representa o evento fundamental para o desenvolvimento da infecção. Importantes抗ígenos micobacterianos estão envolvidos no processo de ativação da resposta imune como, por exemplo, o抗ígeno específico glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1), que tem importante função na ativação do complemento e no processo de fagocitose de *M. leprae* pelos macrófagos (5, 17).

O espectro de manifestações clínicas é caracterizado, em parte, pela resposta imunológica mediada pelas células secretoras de citocinas. Assim, pacientes com a forma tuberculóide apresentam resposta positiva para antígenos do *M. leprae*, enquanto pacientes com a forma lepromatosa apresentam resposta negativa, reação de Mitsuda. Isso ocorre, provavelmente, devido a maior atividade de células T *helper* 1 (Th1) em pacientes com a forma tuberculóide, e a maior atividade de células T *helper* 2 (Th2) naqueles que apresentam a forma lepromatosa (27).

Dentre os mecanismos efetores da resposta imune, a atividade das citocinas e quimiocinas representam um dos mais importantes, devido a sua capacidade de ativação, recrutamento e, também, inibição das células envolvidas com a resposta imunológica, bem como de moléculas de suas próprias classes (38, 39). São pequenas moléculas polipeptídicas, com atividade pleiotrópica, secretadas constitutivamente por diferentes tipos celulares, como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células B e, principalmente, células T. Além destas, células de nervos periféricos podem sintetizar citocinas durante processos patológicos, através das células de Schwann, recrutando macrófagos (39).

Dentre as citocinas já identificadas e envolvidas na resposta imune, as principais são as interleucinas (IL) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, Interferons (INF) α , β e γ , Fatores de Necrose Tumoral (TNF) α e β (39). Já entre as quimiocinas, foram identificadas várias moléculas que foram divididas em 4 subfamílias, conforme a localização e disposição dos resíduos de cisteína (C) e de outros aminoácidos em suas estruturas moleculares: CXC, CC, C e CX₃C, onde X representa os resíduos de aminoácidos (40).

Estudos têm demonstrado a atividade de diversas citocinas e quimiocinas no desenvolvimento do espectro imunológico da hanseníase. Os níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pacientes hansenianos estão relacionados ao tipo e intensidade de resposta imune, bem como à predominância da resposta celular das células T CD4⁺ e TCD8⁺, das células Th1 e Th2 (38, 41). Citocinas como IL2, IL4, IL6, IL10, L12, IL18, INF γ e TNF apresentam altos níveis séricos em paciente hansenianos, bem como nas diferentes formas clínicas da doença (38, 41, 42).

Do mesmo modo as citocinas participam dos mecanismos de comunicação entre as células envolvidas na resposta imune, as quimiocinas também apresentam um papel chave de ativação e regulação deste processo. Além de estarem envolvidas na migração celular, também pode ser observada sua participação como neurotransmissores (43).

O aumento da expressão de quimiocinas, bem como de seus receptores, relacionada a doenças infecciosas tem sido observado em vários estudos, demonstrando a participação destes marcadores nos mecanismos de suscetibilidade e resistência às infecções microbianas (44-46). A influência de componentes genéticos no desenvolvimento da hanseníase vem sendo sugerida desde a idade média, quando se acreditava que era uma doença hereditária. Entretanto, somente no século IXX, através de estudos de comparação da hanseníase entre gêmeos, pode ser indicada a influência de componentes genéticos no desenvolvimento da doença (1).

Alguns estudos indicaram a existência de diversos genes do hospedeiro (genes candidatos) e regiões cromossômicas candidatas ligadas a moléculas efetoras no sistema imune, que codificam a expressão de diversas proteínas relacionadas com a susceptibilidade genética e gravidade da Hanseníase (1, 24, 47). Dentre eles, os genes do complexo de histocompatibilidade principal (*MHC*) (*HLA-DRB1*) (47, 48), Interleucina-10 (*IL-10*) (31), parquina (*PARK2*)/co-regulador da parquina (*PACRG*) (49), receptor da vitamina D (*VDR*) (50), *NRAMP1* ou *SCL11A1* (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*) (51), e as regiões 2p14 (52), 10p13, 20p12, 6q25 e, 17q11 (47).

Os genes do *MHC* estão localizados no braço curto do cromossomo 6 humano, na região conhecida como 6p21 e, de acordo com seu sequenciamento, é composto por 224 *loci*. Possuem como principal função o reconhecimento e a apresentação de抗ígenos às células T, sendo os principais responsáveis pela resposta imunológica às infecções. Seus *loci* são classificados em regiões altamente complexas e polimórficas, assim chamadas: *HLA* de classe I, *HLA* de classe II e *HLA* de classe III. Alguns estudos vêm tentando demonstrar a susceptibilidade de indivíduos com alelos *HLA-DR2* e *HLA-DR3* específicos, em desenvolver com maior frequência a Hanseníase tuberculóide, e naqueles com alelos *HLA-DQ1* específicos em desenvolver a Hanseníase lepromatosa. As moléculas de *HLA* apresentam diferentes peptídeos de diferentes proteínas para células T, podendo, assim, induzir diferentes respostas de células T (1, 13, 47, 48).

No entanto, estes efeitos do MHC parecem insuficientes para explicar completamente os mecanismos genéticos do hospedeiro envolvidos na susceptibilidade. Recentemente, novas evidências sugerem o envolvimento de outros genes não relacionados ao MHC, tais como o *NRAMP1* (gene da proteína 1 do macrófago associado à resistência natural) localizado no cromossomo 2q35 e o gene do receptor de vitamina D (*VDR*) no cromossomo 12. O *NRAMP1* vem sendo apontado como principal gene envolvido com a resistência a parasitas intracelulares, por possuir atividade diretamente ligada ao processamento de抗ígeno pelas

células fagocitárias, contudo, ainda não foi encontrada associação significativa entre este gene e a suscetibilidade à Hanseníase (50).

1.4 Fator de necrose tumoral alfa – TNF α

O Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- α , TNF-alfa ou TNF-a) é sintetizada inicialmente como uma glicoproteína de membrana que, após clivagem, dá origem a uma proteína solúvel composta por 157 amoniácidos, formando um homotímero composto por três subunidades de 17 kDa (53, 54). É uma citocina pró-inflamatória e pró-apoptótica, envolvida na inflamação, imunidade e organização celular, que tem como função regular a atividade de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e B e modular as propriedades do endotélio vascular, atuando em conjunto com outras citocinas como interleucina-1 (IL1) e interferon- γ (INF γ) (55), apresentando níveis elevados em determinadas condições patológicas como artrite reumatóide e sepses. A regulação dos níveis de TNF pode ocorrer em diferentes etapas da sua síntese como, por exemplo, na transcrição gênica, na estabilização do RNAm, na clivagem da forma transmembana para forma solúvel e, também, na expressão de seus receptores (56).

Na década de 1980, foi identificada como uma caquetina e como um fator de diferenciação de linfócitos T (57). O gene que codifica a proteína TNF- α foi克隆ado em 1984, está localizado no cromossomo 6p21.3, ao redor de um centrômero de 200Kbp, região onde também está localizado *MHC* (55, 58). A localização do gene *TNF- α* sugere uma grande correlação entre os seus alelos com a etiologia de doença inflamatórias e autoimunes, bem como de doenças infecciosas (59).

A atividade do TNF é essencial para a regulação da resposta imunológica e defesa do hospedeiro. É uma potente citocina com ação pleitrópica, ligando-se a dois tipos receptores, p55TNFR (TNFR1, CD120a) e p75TNFR (TNFR2, CD120b), localizados nas superfícies celulares (60, 61).

O TNF é produzido principalmente por macrófagos, porém outros tipos celulares também o sintetizam como mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células do tecido nervoso. Moléculas como lipopolissacarídeos e outros produtos bacterianos estimulam uma maior produção de TNF. Sua notável atividade pró-inflamatória é capaz de estimular a produção de outras citocinas, bem como induzir apoptose. Em situações patológicas, pode apresentar função dupla, participando tanto da regeneração quanto da destruição de tecidos (61).

A existência de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs*) ao longo do *locus TNF- α* tem sido identificada, sugerindo uma importante relação com

a produção da proteína TNF- α e, consequentemente, na mediação da resposta imunológica. Entre os SNPs existentes, vários estudos de associação têm sido realizados com várias posições, com destaque para as seguintes: -238G/A e +489G/A (62), -1031T/C (63, 64), -863C/A, -857C/T, -308G/A (65), -244G/A (66), 376G/A (67). Em estudos de suscetibilidade de doenças, os SPNs localizados nas posições -238G/A e -308G/A demonstram maior importância, principalmente pela substituição de guanina (G) por adenina (A), mostrando associação com o aumento do nível de transcrição da proteína TNF- α (31, 67).

1.5 Fator derivado de células estromais – CXCL12/SDF-1

As quimiocinas, também chamadas de citocinas quimiotáticas, tem a função de estimular e regular o movimento e a migração de leucócitos do sangue para os órgãos e tecidos (40, 68).

Essas pequenas moléculas compõem uma grande família de polipeptídeos caracterizada bioquimicamente pela presença de 4 resíduos de cisteína, formando pontes dissulfeto imprescindíveis para as atividades destas moléculas. São divididas em subfamílias de acordo com o número e a localização dos resíduos de cisteína na porção amino-terminal de suas moléculas em: CXC (ou α), CC (ou β), C (γ) e CX3C (ou δ). Atualmente, são conhecidas aproximadamente 50 quimiocinas e 20 receptores que se acoplam a elas (68, 69).

As duas principais subfamílias são CXC e CC, onde o X representa um resíduo de aminoácido separando os resíduos de cisteína. Estas duas subfamílias são produzidas por leucócitos e, também, por células teciduais como as endoteliais, epiteliais e fibroblastos (69).

Alguns estudos têm demonstrado que a ativação e regulação de quimiocinas produzidas pelas células epiteliais, mastócitos, monócitos e neutrófilos, como, por exemplo, as quimiocinas CC, (CCL2, CCL3 e CCL4) e CXC (CXCL8, CXCL9, CXCL10 e CXCL10), favorecem as interações celulares nos tecidos lesados (71, 72).

Na subfamília CXC, existem aproximadamente 17 subtipos de quimiocinas, dentre eles, o subtipo CXCL12 ou Fator derivado de células estromais (*SDF-1 – stromal cell-derived factor-1*) que foi inicialmente isolado a partir de células estromais da medula óssea e identificado como um importante fator pré-estimulatório de linfócitos B. O gene que codifica a expressão de CXCL12 está localizado no cromossomo 10 (10q11.1) sendo expresso constitutivamente por células da medula óssea e de outros tecidos (69).

O sequenciamento do gene CXCL12, revelou um polimorfismo no segmento evolucionário conservado da região 3' não traduzida (3'UTR), na posição -G801A, designado SDF1-3'A ou

CXCL12 rs1801157-alelo A. Este alelo pode ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de CXCL12 (73).

A associação entre o polimorfismo (-G801A) CXCL12 e doenças infecciosas tem sido amplamente investigadas e apresentando correlações de suscetibilidade e resistência a agentes infecciosos como HIV (74-76).

Estudos relacionados à expressão de CXCL12 com doenças infecciosas são escassos, embora em pacientes hansenianos, foi observado o aumento de níveis séricos de CXCL8 e CCL2 em pacientes virchowianos e o aumento da expressão de quimiocinas CCL2 e CCL5 em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Neste sentido, os achados sugerem a participação desses fatores nos complexos mecanismos imunopatológicos da hanseníase, bem como na suscetibilidade dos indivíduos a *Mycobacterium leprae* (45, 72).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a existência de padrões genotípicos para os genes *TNF-α* (-308G/A) e *CXCL12* (-801G/A) em indivíduos hansenianos e seus contatos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a associação dos polimorfismos *TNF-α* -308G/A e *CXCL12* -801G/A e a suscetibilidade à hanseníase.
- Avaliar associação dos polimorfismos *TNF-α* -308G/A e *CXCL12* -801G/A e as características clínicas de indivíduos hansenianos.

3 PRODUTO

Analysis of promoter region single nucleotide polymorphisms of (*G308A*) *TNF-α* and (*G801A*) *CXCL12* and Leprosy susceptibility and clinical outcomes.

Running-title: *TNF-α* and *CXCL12* polymorphisms and Leprosy.

Marcelo Castro Freitas¹; Danilo Cangussu Mendes¹; Deborah de Farias Lelis¹; Lucas Henrique Lopes Mendes de Figueiredo¹; Marcos Vinícius Macedo de Oliveira¹; Sérgio Avelino Mota Nobre²; Sérgio Henrique Sousa Santos^{1,3}; Sílvio Fernando Guimarães Carvalho^{1,4}; André Luiz Sena Guimarães^{1,5}; Alfredo Maurício Batista De-Paula^{1,5}

¹ Nucleus of Epidemiological and Molecular Research Catrumano. Health Research Laboratory. Health Science Post-graduate Programme. Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil.

²Department of Physiopathology. Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil.

³ Department of Pharmacology and Biochemistry. Universidade Federal de Minas Gerais, 31270901 Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴ Department of Medicine. Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil.

⁵ Department of Dentistry. Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil.

Address correspondence to:

Dr. Alfredo Maurício Batista De-Paula.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Hospital Universitário Clemente de Faria - Universidade Estadual de Montes Claros.

Avenida Cula Mangabeira, 562. Bairro Santo Expedito, Montes Claros.

Minas Gerais, Brazil.

CEP: 39401-001.

Phone: 55-21-38 32248327

e-mail: ambpatologi@gmail.com

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Fundings

This work was supported by the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SESMG); Sistema Único de Saúde (SUS) MS-DECIT/Fapemig; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação (CAPES-MEC). Oliveira, MVM and Mendes, DC were recipients of a doctoral fellowship from CAPES-MEC. AMB De-Paula and ALS Guimarães are research fellowship of CNPq.

Acknowledgments

We thank all individuals that participated of this study sincerely.

Address correspondence to:

Dr. Alfredo Maurício Batista De-Paula.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Hospital Universitário Clemente de Faria - Universidade Estadual de Montes Claros. Avenida Cula Mangabeira, 562. Bairro Santo Expedito, Montes Claros. Minas Gerais, Brazil. CEP: 39401-001.

Phone: 55-21-38 32248327

e-mail: ambpatologi@gmail.com

ABSTRACT

Background Leprosy is a neglected infectious human disease caused by *Mycobacterium leprae*. The disease occurs in a small proportion of intrinsically susceptible and exposed individuals that do not self-heal or do not receive adequate multi-drug treatment. Single nucleotide polymorphisms in cytokines and other genes associated to immune response against infectious pathogens is likely to play a crucial role for susceptibility of individuals and the clinical outcome of infectious disease.

Aims We investigated the distribution of the (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* single nucleotide polymorphisms (SNP) in samples of healthy controls, household contacts, and Leprosy subjects. Additionally, we investigated the association of these polymorphisms with clinical factors-related to Leprosy.

Material and Methods Samples of healthy controls (n= 52), household contacts (n= 42), and Leprosy subjects (n= 47) were evaluated. Socio-demographical and clinical data were gathered. The (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* SNP were analysed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Data analyses were performed by using univariate and multivariate statistical tests. Significance was set at $p < 0.05$.

Results Our findings showed any significant association between the distribution of genotypes, carriers of A alleles, and alleles of both (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* and the controls, contacts, and Leprosy groups ($p < 0.05$). However, it was noted a tendency between the presence of G allele for (*G308A*) *TNF- α* and the positivity of bacterial load (OR= 0.46; $p = 0.083$).

Conclusion Our data suggest that the (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* SNP seem not to contribute to the susceptibility of Leprosy. The presence of G allele for (*G308A*) *TNF- α* seems to contribute the clinical behaviour of Leprosy, whereas SNP (*G801A*) *CXCL12* does interfere neither to susceptibility nor to clinical presentation of Leprosy.

Key-words: Leprosy, gene promoter polymorphism, cytokine, chemokines, *TNF- α* , chemotaxis, *CXCL12*, susceptibility, clinical outcomes.

Introduction

Leprosy is a neglected infectious human disease caused by the obligate intracellular parasite *Mycobacterium leprae* that still continues to account a great challenge to public health in many resource-poor regions and countries around the world which the disease remains endemic [1-4]. When progression of Leprosy is not interrupted by using a multi-drug therapeutical [5, 6] it can promote aesthetical and physical permanent impairments [7-11] that have been associated to high psychological morbidity and social stigma [12-14].

The Leprosy occurs in a small proportion of intrinsically susceptible and exposed individuals (<1%-3%) that do not self-heal or do not receive adequate multi-drug treatment [15-17]. Leprosy exhibits a complex spectrum of immunopathological phenotypes and clinical presentations that ranges from localized (associated with a stronger cell-mediated immune response) to systemic (associated with a predominantly humoral immune response) chronic infectious disease. The lesions of Leprosy typically exhibit a chronic granulomatous inflammatory reaction stimulated by the release of a series of inflammatory chemical mediators released from the interaction between the mycobacterium and infiltrating immune cells (notably, T cells, plasma cells, and monocytes/macrophages), activated resident cells (most importantly, Schwann cells of peripheral nerves), and components of extracellular matrix in the stroma of skin (face, hands, and feet) and mucosa (nasal tract) typically [4, 18-22].

The human tumour necrosis factor-alpha (*TNF- α*) gene is located in the chromosome 6q23-12, in close linkage with the class III region of the major histocompatibility complex (HLA-DR) [23, 24]. *TNF- α* has multiple well-recognised biological activities in many physiological processes such as cell differentiation, proliferation, apoptosis, energy metabolism, and in the context of the immune status in infectious diseases, the modulation of both innate and adaptative immune responses [25]. The *TNF- α* exhibits an important functional single nucleotide polymorphism (G/A) located at position -308 in its gene promoter region. Single nucleotide polymorphisms (SNP) of *TNF- α* are found in regions that regulate transcription or post-transcriptional events and seem to be functionally significant [26, 27]. Analysis of (G308A) *TNF- α* polymorphism have shown that polymorphic variants of this cytokine might influence the susceptibility and prognosis factor in some types of human infectious diseases.

The gene *CXCL12*, also known as stromal cell-derived factor-1 (*SDF-1*) which located on chromosome 10q11.1, express a protein that belongs to the CXC subfamily of chemokines

and is produced by bone marrow stromal cells. This chemokine is responsible for attraction and development of B and T cells precursors and monocytes in effectors immune responses which they have important roles in localize various immune cell types to specific tissues microenvironments. CXCL12 and its receptor, CXCR4, are also involved in organogenesis, lymphopoiesis, and myelopoiesis [28-33]. The SNP of *CXCL12* at position 801 relative to the start codon in the 3-untranslated region involving a G to A transition in *CXCL12*, whose A allele is regarded as a target of cis-acting factors, has been shown to have the ability of up-regulating the expression of the *CXCL12* [34, 35].

Currently, it has been reported that Leprosy control has improved significantly, with considerable reduction of the disease burden worldwide. However, the decrease of new cases of this infectious disease has faced important challenges due to the complexity of its pathogenesis that involves both environmental factors and a **genetic-epigenetic background** that modulate the resistance or susceptibility of Leprosy [36, 37]. It has been reported that common molecular variants in immune response genes and other genes associated with immune response play pivotal roles in explaining the participation of inter-individual genetic variants to susceptibility and clinical outcomes in Leprosy [38-45]. In this study, we investigated the association between (G308A) *TNF- α* and (G801A) *CXCL12* genes promoter polymorphisms in healthy control, household contacts, and Leprosy subjects. In addition, we also analysed the participation of these allelic and genotype polymorphisms on the clinical outcomes of the individuals with Leprosy.

Material and Methods

Ethical approval for this study was obtained from the relevant local ethics committees (Unimontes/CEP-2185/2010). All subjects gave written informed consent to participate in this study.

Subjects

In this case-control study, we conducted an investigation in a hyperendemic population for Leprosy (coefficient of prevalence is greater than or equal to 4.0) or very high (coefficient of prevalence from 2.0 to 3.99) from municipalities of the Almenara, Minas Gerais, Brazil, whose coefficient of prevalence of Leprosy is considered very high. Samples of Leprosy (n= 47; case group; male:female ratio: 5/3; mean age ± SD: 55.51 ± 19.218), household contacts (n= 42; contact group; male:female ratio: 10:7 mean age ± SD: 41.1 ± 16.668), and healthy controls (n= 52; control group; male:female ratio: 5:18 mean age ± SD: 48.45 ± 19.705) subjects. Newly-diagnosed leprosy patients was based on clinical examination made by the health professionals of the Brazilian public unified healthcare system (SUS) when an individual exhibited the following clinical and with standard bacilloscopic examination of the affected skin lesions: skin lesions typical for leprosy and/or thickened peripheral nerves; and/or acid fast bacilli on slit skin smears. After confirmation of diagnosis, patients were given health information about Leprosy. A trained health professional visited the household contacts (household contact group) to confirm a Leprosy diagnosis. Informed consent was obtained in all cases and every effort was made to include all members of a Leprosy patient family. All contacts studied were carefully examined clinically for signs and symptoms of Leprosy and to verify the existence of a BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) scar since the Brazilian Ministry of Health recommends that all Leprosy contacts receive the BCG vaccine [46]. The following contacts were excluded: those who refused to provide informed consent, pregnant women, any person currently receiving treatment for Tuberculosis or Leprosy, children <5 years old, any person residing temporarily in the dwelling of Leprosy patient. Clinically healthy control individuals matched for gender and age were chosen from the source population where the Leprosy individuals came from and who had lived in the same dwelling during the five-year period prior to the household case diagnosis. Control individuals that present signs or symptoms that were suggestive of Leprosy were assessed through bacteriological and clinical examinations and, in case of confirmation of the infectious disease, these individuals were assigned to the case group.

Clinical and laboratorial factors related to Leprosy sample

The presence and quantity of acid-fast bacilli in skin smears or biopsies and the number of skin lesions seem to represent the Leprosy activity. Paucibacillary (PB) patients present during diagnosis up to five hypopigmented, hypoanaesthetic or erythematous skin lesions, and/or absence of peripheral nerves compromised, and absence of the *M. leprae* in slit-skin smears (low bacterial load). Multibacillary (MB) patients have five or more skin lesions, and/or presence of peripheral nerves compromised, and presence of the *M. leprae* in slit-skin smears (high bacterial load) [47]. The chemotherapeutical treatment prescribed according to WHO recommendations [48, 49]. The term *disability* is defined as “any restriction or lack (resulting from an impairment) of ability to perform an activity in the manner or within the range considered normal for a human being” [50]. At the time of Leprosy diagnosis, each subject had eye, hand, and feet given its own grade, and the highest grade becomes the overall disability grade found in each individual. In this clinical grade system, the grade 0 (eyes: no evidence of visual loss and hand/feet: no anesthesia, no visible deformity or damage), grade 1 (eyes: problem but vision not severely affected and anesthesia present, but no visible deformity or damage and hand/feet: anesthesia present, but no visible deformity or damage), and grade 2 (eyes: severe visual impairment and hand/feet: visible deformity or damage present).

Genotyping for (G308A) TNF- α and (G801) CXCL12 SNP

A collection of lining epithelial cells from tongue of all control, contacts and Leprosy subjects was obtained by using a sterilized wet cotton swab. Immediately after mucosa swabbed, the cotton swab with epithelial cells was frozen in buffered saline containing 0.05% Tween80. An aliquot was subsequently centrifuged at 10,000X g in order to extract the DNA samples. The DNA obtained for genotyping exhibited high quality by measure spectrophotometer in separate samples and the genotype analysis for both (G308A) TNF- α and (G801) CXCL12 SNP in the cases and controls samples were blinded in respect to their status [51]. The allelic and genotypic polymorphisms of the (G308A) TNF- α (rs1800629) and (G801A) CXCL12 (rs1801157) were evaluated according to previously described methods [52, 53]. Briefly, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) used for TNF- α : forward primer (5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3') and a reverse primer (5'-AGGCAATAGGTTTGAGGGCCAT-3') and for CXCL12: forward primer (5'-CTGGCAAAGCTAGTGAAG-3') and reverse primer (5'-AGAACGTGGAG

GATGTGGAG-3'), respectively. The PCR mixture consisted of about 0.2 µg of genomic DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.3 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1×·Taq polymerase buffer, and 0.5 U of Taq DNA polymerase (PhoneutraBiotecnologia®, BH, Brazil); the final volume was 50 µL. The PCR-RFLP products were separated from the unincorporated primers and dNTPs by using a commercial kit (PCRclean) and were then subjected to *NcoI* enzyme digestion (37°C/12 h - New England Biolabs) for *TNF-α* and MspI (37°C/12 h - New England Biolabs) for *CXCL12*. The amplification conditions were as follows: 95°C for 5 min; 35 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 45 s, and the final extension step at 72°C for 10 min. After the complete digestion, the resulting DNA fragments were separated by using 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on a 1% agarose gel, stained with silver, and photographed. For *TNF-α*, the allele G was cleaved by the enzyme into 2 fragments, one of 87 bp and another of 20 bp (GG - wild). The haplotype GA (heterozygote) is composed of 3 fragments: 107 bp, 87 bp, and 20 bp. The A allele was not cleaved by the enzyme and therefore, generated 1 fragment of 107 bp (AA - variant). For *CXCL12*, the allele G was cleaved by the enzyme into 2 fragments, one of 92 bp and another of 117 bp (GG - wild). The haplotype GA (heterozygote) is composed of 3 fragments: 209 bp, 117 bp, and 92 bp. The A allele was not cleaved by the enzyme and therefore, generated 1 fragment of 209 bp (AA - variant) (Figure 1).

Statistical analysis

The Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by using a goodness-of-fit chi-square (χ^2)-test for the biallelic biomarker in order to compare the alleles, minor allele carriers, and genotype frequencies of (*G308A*) *TNF-α* and (*G801A*) *CXCL12* between case, contacts, and healthy controls groups. All groups were compared using unconditional logistic regression models controlling for gender and age. In the Leprosy sample, the following sociodemographical and clinical covariates (independent variables) were categorized as follow: gender (female vs. male), skin color (white vs. non-white), WHO clinical classification (paucibacillary vs. multibacillary), WHO disabilities classifications (0, absence of any type of disability vs. 1-2, presence of any type of disability), bacterial load (presence vs. absence), and cutaneous lesions (<5 vs. > 5 cutaneous lesions). The odds ratio (OR) values with the corresponding 95% confidence interval (CI95%) were obtained by unconditional logistic regression analysis and adjusted for sex as a continuous variable. Statistical significance was set at *p*<0.05. All statistical analyses were performed by using the SPSS 18.0 package (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results

Hardy-Weinberg equilibrium.

The genotypes frequencies of the (*G308A*) *TNF- α* polymorphisms in total samples (n= 141), Leprosy patients (n= 47), household contacts (n= 42), and healthy controls (n= 52) were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium distribution ($\chi^2= 0.468, p= 0.493; \chi^2= 0.129, p= 0.719; \chi^2= 0.009, p= 0.924; \chi^2= 0.307, p= 0.579$, respectively). For (*G801A*) *CXCL12* polymorphisms in total samples, Leprosy patients, household contacts, and healthy controls were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium distribution ($\chi^2= 0.868, p= 0.351; \chi^2= 0.03, p= 0.861; \chi^2= 0.517, p= 0.471; \chi^2= 0.822, p= 0.364$, respectively). In this way, both SNPs not showed no significant deviation from the expected Hardy-Weinberg equilibrium in either the case or controls groups.

(*G308A*) *TNF-alpha* and (*G801A*) *CXCL12* allelic and genotypes SNP in Leprosy, household contacts, and healthy controls

Our findings showed any significant association between the distribution of genotypes, carriers of A alleles, and alleles of both (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* and the healthy controls, household contacts, and Leprosy groups ($p>0.05$) (Table 1). The frequency of the A allele in both genes (*G308A*) *TNF α* and (*G801A*) *CXCL12* did not differ between the leprosy patients, household contacts and healthy controls groups ($OR= 1.548, 95\% CI= 0.837-2.866, p= 0.164$ and $OR= 1.067, 95\% CI= 0.610-1.868, p= 0.820$). Even when contacts and healthy individuals were jointed as control group, it was not detected any statistical difference in the genotypes of both (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* polymorphisms between cases and controls ($p>0.05$) (Table 2).

Association between (*G308A*) *TNF-alpha* and (*G801A*) *CXCL12* allelic and genotypes SNP and sociodemographical ad clinicopathological factors of Leprosy patients

Our results of univariate comparisons showed any significant association between the clinical variables-related Leprosy and allelic and genotypic (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* allelic and genotypes polymorphisms (Figure 2). However, it was noted a tendency between the presence of G allele for (*G308A*) *TNF- α* and the positivity of bacterial load ($OR= 0.460, p= 0.083$) (Table 3). As for (*G801A*) *CXCL12*, no significant tendency of association was observed (Table 4).

Discussion

The pathogenesis of Leprosy involves the participation of a series of environmental factors frequently related to poor socioeconomic, cultural conditions, a non-efficient assistance for health public care, the exposition of *M. leprae*, and background of genetic-epigenetic inheritances in individuals susceptible. Among genetic factors, some low-penetrance SNPs have been appointed as the pivotal modulators of susceptibility and the clinical outcomes of Leprosy [38-45].

Overall, the role of biological mechanism of the (*G308A*) *TNF-α* allelic and genotype variants remains uncertain [54, 55]. Notably, some studies reported the presence of associations between (*G308A*) *TNF-α* promoter region SNP and *M. leprae* susceptibility in different populations [56-63]. Nevertheless, results of these studies are quite controversial [15, 54]. In this way, the (*G308A*) *TNF-α* A allele variant exhibits a broad range of immune actions evidencing both protective [56, 57, 59, 61-63], non-protective [58, 61], and indifferent [64] roles into concerns the acquisition of Leprosy. In concerns to protective functions of the (*G308A*) *TNF-α* SNP, it has been noted a protective effect of A allele variant for Leprosy susceptibility in the Brazilian population notably [61]. In this current study, however, it was found any significant association between the distribution of variants alleles, minor allele carriers, and genotypes of (*G308A*) *TNF-α* and susceptibility to Leprosy *per se*. These discrepancies seem be due to differences in ethnicity of populations, the natural history of the infectious disease according to geographic area and its socioeconomical and cultural contexts, and limitation related to scarce use of extended haplotypes in Leprosy studies in order to better understand linkage disequilibrium, the non-random association of alleles at adjacent genetic loci, with extent of haplotypes of *TNF-α* across the major histocompatibility complex (MHC) locus [54, 62, 64]. It must also be considered that the resistance or susceptibility to Leprosy depends on the molecular integrity and function of genetic-epigenetic mechanisms that could control the transcription activity of *TNF-α* and/or the activity or inactivation of its mRNA and protein. Further large cohort studies are needed to better understand the participation of these molecular mechanisms as well as its disturbances for susceptibility of Leprosy.

Association analysis of genetic studies have consistently indicated that *TNF-α* SNPs can influence Leprosy phenotypes, and therefore, its diverse and complex clinical manifestations [57-59]. According to our findings, it was noted a tendency between the presence of G allele for (*G308A*) *TNF-α* and the presence of the mycobacterium in the smear

skin lesions (OR= 0.460, $p= 0.083$). Frequently, the (*G308A*) *TNF- α* A allele variant (recessive) has been associated with phenotypic manifestation of Leprosy. In these studies, the A allele variant has been associated with both the more aggressive [61] and the less aggressive [56, 57, 65] clinical manifestations of Leprosy. In parallel, a few functional in vitro, in vivo, and ex vivo studies also showed that individuals carrying the -308A allele and minor carriers produces higher *TNF- α* local and systemic levels [26, 27, 66, 67]. How *TNF- α* actively participates of tissue degradation molecular mechanisms-related to acute inflammatory lesions of Leprosy, which are responsible for many of the sequelae that characterize the infectious disease clinically [55], we hypothesize that individuals carrying the G allele variant of the 308 *TNF- α* , a low producer of *TNF- α* theoretically, are more susceptible to *M. leprae* due to a lower macrophage activation with disruption of granulomas and lower restriction of the mycobacterium growth promoted by *TNF- α* . These disturbances might result in higher mycobacterium load diagnosed in the smear skin lesions of the Leprosy patients. Therefore, our findings suggest that carriers of G allelic variant seem to present a weaken immune response to *M. leprae* due to a lower *TNF- α* expression.

Our findings did not show any significant difference between the distribution of alleles, minor allele carriers, and genotypes (*G801A*) *CXCL12* variants in healthy controls, contacts, and Leprosy samples. It has been reported that (*G801A*) *CXCL12* SNP predisposed the individuals to a higher risk for HIV-1 infection [53, 68-70]. However, there are inconsistent findings for this SNP among various populations attributed to different haplotype structures, including or excluding functional variants, for specific ethnic groups [68, 71]. In the other hand, a few studies have showed the participation of (*G801A*) *CXCL12* SNP in modulate the susceptibility to the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1) and clinical progression of the acquired immune deficiency syndrom (AIDS) [68, 72-76]. The (*G801A*) *CXCL12* G/G homozygote variant seem to contribute for the occurrence of nephritis and skin tissue damages developed in systemic lupus eritematosus patients might be due to its effects upon the production of auto-antibodies and higher expression of CXCL12 protein [77]. In Leprosy, the cutaneous lesions typically exhibit a chronic granulomatous inflammatory reaction stimulated by the release of a series of inflammatory chemical mediators released from the molecular interaction between the mycobacterium and resident and infiltrating immune cells [4, 21]. The chemotaxis of mononuclear phagocytes is tightly regulated by the interplay between stromal and endothelial cells and leukocytes, a process in which the CXCL12 chemokine play a pivotal role in localize macrophages and other immune cells to specific tissues microenvironments during infection [28, 30-33, 78-80]. An effective innate

immunity against *M. Leprae*, therefore, requires an adequate migration of monocytes and activation of macrophage [81-83]. Hypothetically, Leprosy individuals carrying the AA genotype variant of the (*G801A*) *CXCL12*, considered the low protein expresser, will be more susceptible to exhibit the more aggressive tissue injuries during *M. leprae* infection due to disturbances on molecular chemotactic signaling pathways responsible for attraction of mononuclear phagocytes and other immune cells to the affected skin. However, in this current study, our findings suggest that the different allelic and genotype (*G801A*) *CXCL12* variants seem no to contribute neither to susceptibility *M. leprae* nor to clinical manifestations of Leprosy individuals. However, this finding need of confirmation in future large molecular studies.

In this current study, we must consider some important limitations. Firstly, our study focused only on the phenotype for Leprosy *per se*, because of the smaller number of cases in each investigated group and clinical form decreases the power of the analysis to detect a clinically or biologically significant differences between the distribution of allelic and genotype of (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* SNPs in cases and controls groups. In the other hand, all controls (healthy individuals and households contacts) were chosen from the source population where the Leprosy cases came from and all Leprosy subjects diagnosed by using bacilloscopic exams. The participation of household contacts suggest the occurrence of exposure experience to pathogen in both cases and control groups and, therefore, it carries much less chance of bias and loss of power than the completely random approach for the samples [38]. In the public health point of view, contacts living under high exposure of Leprosy subjects who are at high risk of disease (multibacillary form, with high bacilloscopic load) is of utmost importance for any Leprosy control [46, 84-86]. The appropriate health education, public health care surveillance, and chemoprophylaxis of contacts closest to Leprosy patients might be strongly encouraged [5, 46, 85, 86].

In conclusion, our data suggest that the participation of (*G208A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* polymorphism suggests that both SNPs do not play a direct role in the susceptibility of Leprosy *per se*. Although neither allelic nor genotypic polymorphisms here investigated showed any influence on the clinical factors of Leprosy patients, the presence of G allele for (*G308A*) *TNF- α* seems to promoted a permissive innate immunity state against *M. Leprae*, promoting a higher bacterial load in the cutaneous lesions of Leprosy individuals.

FIGURES

Figure 1: A) Polyacrylamide gel electrophoresis for detection of (*G801A*) *CXCL12* polymorphism. 1- Base pair ladder (100 bp); 2- Genotype GA= 293 + 193 + 100 bp; 3- Genotype AA= 293 bp; 4- Genotype GG= 193 + 100 bp; 5- Blank. B) Polyacrylamide gel electrophoresis for detection of (*G308A*) *TNF- α* polymorphism. 1- Base pair ladder (100 bp); 2- Genotype GA= 107 + 87 bp; 3- Genotype AA= 107 bp; 4- Genotype GG= 87 bp; 5- Blank.

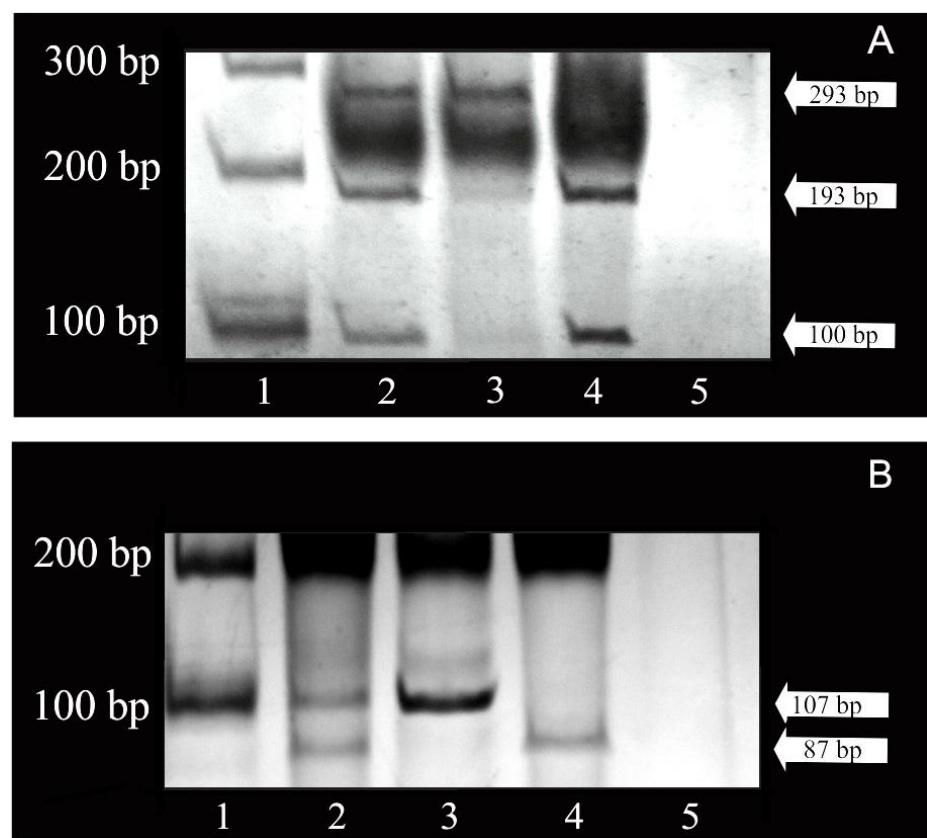


Figure 2. Analysis of the allelic, carriers, and genotype variants of the (*G308A*) *TNF α* (A) and *CXCL12* (B) SNP in healthy controls (n=52), household contacts (n=42), and Leprosy individuals (n=47).

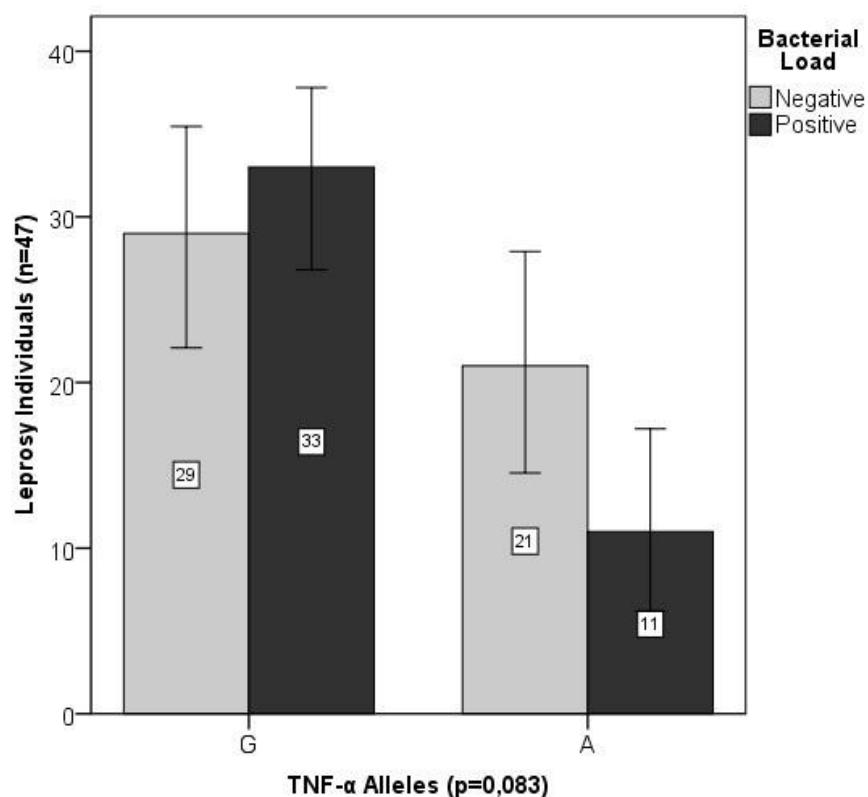


Table 1. Univariate logistic regression analyses between (*G308A*) *TNF-α* and (*G801A*) *CXCL12* allelic and genotypic polymorphisms and healthy control, household contacts, and Leprosy groups.

Variables	Groups			OR	95% CI	p
	Leprosy (n=47)	Contacts (n= 42)	Controls (n=52)			
(G308A) TNF-α polymorphism						
<u>Genotypes</u>						
GG	21	23	30	Reference		
GA	20	16	18	1.416	0.743-2.696	0.290
AA	6	3	4	1.866	0.573-6.081	0.300
<u>Carrier Allele A</u>						
GG	21	23	30	Reference		
AA/AG	26	19	22	1.490	0.808-2.749	0.202
<u>Alleles</u>						
G	62	62	78	Reference		
A	32	22	26	1.407	0.864-2.291	0.170
<u>Hardy-Weimberg Equilibrium</u>	Yes (p= 0.719)	Yes (p= 0.924)	Yes (p= 0.579)	-	-	-
(G801A) CXCL12 polymorphism						
<u>Genotypes</u>						
GG	13	7	14	Reference		
GA	24	23	29	0.928	0.409-2.105	0.858
AA	10	12	9	1.146	0.462-2.838	0.769
<u>Carrier Allele A</u>						
GG	13	7	14	Reference		
AA/AG	34	35	38	0.989	0.452-2.164	0.978
<u>Alleles</u>						
G	50	37	57	Reference		
A	44	47	47	1.066	0.694-1.639	0.770
<u>Hardy-Weimberg Equilibrium</u>	Yes (p= 0.861)	Yes (p= 0.471)	Yes (p= 0.364)	-	-	-

* Variables analyzed using the generalized linear model analyses. OR= odds ratio. IC95% = interval confidence.

Supplementary Material

Table 1 – Distribution of allelic, carriers, and genotype variants of the (*G308A*) *TNF α* and (*G801A*) *CXCL12* SNP in healthy controls (n=52), household contacts (n=42), Leprosy individuals (n=47), and total samples (n = 141).

<u>Groups</u>	(G308A) TNF- α SNP								(G801A) CXCL12 SNP								<u>Allele</u>			
	<u>Genotypes</u>				<u>Carrier Allele A</u>			<u>Allele</u>			<u>Genotypes</u>				<u>Carrier Allele A</u>			<u>Allele</u>		
	<u>GG</u>	<u>GA</u>	<u>AA</u>	<u>p</u>	<u>GG</u>	<u>GA/AA</u>	<u>p</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>p</u>	<u>GG</u>	<u>GA</u>	<u>AA</u>	<u>p</u>	<u>GG</u>	<u>GA/AA</u>	<u>p</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>p</u>
Leprosy (n= 47)	21	20	06	0.693	21	26	0.406	62	32	0.322	13	24	10	0.584	13	34	0.403	50	44	0.300
Household Contacts (n= 42)	23	16	03		23	19		62	22		07	23	12		07	35		37	47	
Healthy Control (n= 52)	30	18	04		30	22		78	26		14	29	09		14	38		57	47	
Total (n= 141)	74	54	13		74	67		202	80		34	76	31		34	107		144	138	

Table 2. Univariate logistic regression analyses between (*G308A*) *TNF- α* and (*G801A*) *CXCL12* allelic and genotypic polymorphisms and control group and Leprosy groups.

<u>Variables</u>	<u>Groups</u>					
	<u>Leprosy (n=47)</u>	<u>Controls (n=94)**</u>	<u>OR</u>	<u>95% CI</u>	<u>p</u>	
<u>(G308A) TNF-α polymorphism</u>						
<u>Genotypes</u>						
GG	21	53	Reference			
GA	20	34	0.674	0.319-1.424	0.300	
AA	6	7	0.462	0.139-1.538	0.201	
<u>Carrier Allele A</u>						
GG	21	53	Reference			
AA/AG	26	41	0.625	0.309-1.264	0.189	
<u>Alleles</u>						
G	62	140	Reference			
A	32	48	0.664	0.388-1.138	0.135	
<u>Hardy-Weinberg Equilibrium</u>	Yes (p= 0.719)	Yes (p= 0.636)	-	-	-	
<u>(G801A) CXCL12 polymorphism</u>						
<u>Genotypes</u>						
GG	13	21	Reference			
GA	24	52	1.341	0.577-3.119	0.495	
AA	10	21	1.300	0.468-3.614	0.615	
<u>Carrier Allele A</u>						
GG	13	21	Reference			
AA/AG	34	73	1.329	0.596-2.965	0.486	
<u>Alleles</u>						
G	50	94	Reference			
A	44	94	1.136	0.692-1.866	0.613	
<u>Hardy-Weinberg Equilibrium</u>	Yes (p= 0.861)	Yes (p= 0.302)	-	-	-	

* Variables analyzed using the generalized linear model analyses. OR= odds ratio. IC95%= interval confidence.

** Control group joining household contacts and healthy controls.

Table 3. Univariate logistic regression analyses between clinical factors related to Leprosy (n=47) allelic, carrier A allele, and genotype variants of and (*G308A*) *TNF- α* SNP.

Variables	(G308A) <i>TNF-α</i> SNP																			
	GG	GA	AA	Genotypes		OR	IC95%	p	GG	AA/AG	Carrier Allele A		OR	IC95%	p	G	A	Alleles	OR	IC95%
<u>WHO clinical classification</u>																				
Paucibacillary (n=15)	7	6	2	Referent					7	8	Referent					20	10	Referent		
Multibacillary (n=32)	14	14	4	1.079	0.330-3.529	0.900	14	18	1.125	0.328-3.855	0.549	42	22	1.048	0.418-2.623	0.921				
<u>WHO disability classification</u>																				
Absent (n=18)	9	8	1	Referent					9	9	Referent					26	10	Referent		
Present (n=29)	12	12	05	1.653	0.559-4.887	0.364	12	17	1.417	0.434-4.625	0.391	36	22	1.589	0.645-3.915	0.313				
<u>Bacterial Load</u>																				
Negative (n=25)	9	11	5	Referent					9	16	Referent					29	21	Referent		
Positive (n=32)	12	9	1	0.402	0.134-1.203	0.103	12	10	0.469	0.145-1.512	0.163	33	11	0.460	0.190-1.114	0.083*				
<u>Cutaneous Lesions</u>																				
None (n=5)	3	2	0	Referent					3	2	Referent					8	2	Referent		
≤ 5 lesions (n=28)	13	10	5	2.187	0.389-12.307	0.375	13	15	1.731	0.249-12.011	0.617	36	20	2.222	0.430-11.491	0.341				
> 5 lesions (n=14)	5	8	1	2.434	0.423-14.013	0.319	5	9	2.700	0.332-21.977	0.353	18	10	2.222	0.393-12.555	0.366				

*Values bearing asterisks exhibits a tendency of association using the unconditional logistic regression analysis.

Table 4. Univariate logistic regression analyses between clinical factors related to Leprosy (n=47) allelic, carrier A allele, and genotype variants of and (*G801A*) *CXCL12* SNP.

Variables	(G8018A) CXCL12 SNP																		
	GG	GA	AA	Genotypes		OR	IC95%	p	GG	AA/AG	Carrier Allele A		OR	IC95%	p	G	A	OR	IC95%
<u>WHO clinical classification</u>																			
Paucibacillary (n=13)	4	7	4	Referent					4	11	Referent				15	15	Referent		
Multibacillary (n=32)	9	17	6	0.778	0.230-2.627	0.685	9	23	0.929	0.234-3.693	0.604	35	29	0.829	0.348-1.975	0.671			
<u>WHO disability classification</u>																			
Absent (n=18)	6	9	3	Referent					6	12	Referent				21	15	Referent		
Present (n=29)	7	15	7	1.579	0.514-4.851	0.425	7	22	1.571	0.429-5.752	0.360	29	29	1.400	0.605-3.240	0.431			
<u>Bacterial Load</u>																			
Negative (n=25)	6	12	7	Referent					6	19	Referent				24	26	Referent		
Positive (n=22)	7	12	3	0.549	0.184-1.638	0.282	7	15	0.677	0.187-2.442	0.392	26	18	0.639	0.282-1.448	0.282			
<u>Cutaneous Lesions</u>																			
None (n=5)	3	0	2	Referent					3	2	Referent				6	4	Referent		
≤5 lesions (n=28)	7	14	7	2.245	0.071-70.861	0.646	7	21	4.500	0.619-32.695	0.137	28	28	1.500	0.381-5.899	0.562			
>5 lesions (n=14)	3	10	1	1.591	0.052-48.372	0.790	3	11	5.500	0.611-49.535	0.128	16	12	1.125	0.259-4.893	0.875			

*Values bearing asterisks exhibits a tendency of association using the unconditional logistic regression analysis.

References

1. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol* **2011**; 6:57-71.
2. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* **2006**; 19:338-81.
3. World Health Organization. Global leprosy situation, beginning of 2008. In: *Wkly Epidemiol Rec*, ed. Vol. 83, **2008**:293-300.
4. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *The lancet* **1999**; 353:655-60.
5. Smith CM, Smith WCS. Chemoprophylaxis is Effective in the Prevention of Leprosy in Endemic Countries: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Infection* **2000**; 41:137-42.
6. Ladhami S. Leprosy disabilities: the impact of multidrug therapy (MDT). *International Journal of Dermatology* **1997**; 36:561-72.
7. Meima A, Saunderson PR, Gebre S, Desta K, van Oortmarsen GJ, Habbema JD. Factors associated with impairments in new leprosy patients: the AMFES cohort. *Lepr Rev* **1999**; 70:189-203.
8. United Nations. The Millennium Development Goals (MDGs) and Disability, **2009**.
9. Smith WC, Nicholls PG, Das L, et al. Predicting neuropathy and reactions in leprosy at diagnosis and before incident events-results from the INFIR cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**; 3:e500.
10. Schreuder PA. The occurrence of reactions and impairments in leprosy: experience in the leprosy control program of three provinces in northeastern Thailand, 1987-1995 [correction of 1978-1995]. I. Overview of the study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1998**; 66:149-58.
11. Reed NK, van Brakel WH, Reed DS. Progress of impairment scores following commencement of chemotherapy in multibacillary leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1997**; 65:328-36.
12. Bhatia MS, Chandra R, Bhattacharya SN, Imran M. Psychiatric morbidity and pattern of dysfunctions in patients with leprosy. *Indian Journal of Dermatology* **2006**; 51:23-5.
13. Senior K. Stigma, chemoprophylaxis and leprosy control. *Lancet Infect Dis* **2009**; 9.
14. Singh GP. Psychosocial aspects of Hansen's disease (leprosy). *Indian Dermatol Online J* **2012**; 3:166-70.
15. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect* **2006**; 8:1124-31.
16. Alter A, Grant A, Abel L, Alcais A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome* **2011**; 22:19-31.
17. Rodrigues LC, Lockwood D. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis* **2011**; 11:464-70.
18. Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. *Immunol Cell Biol* **2000**; 78:349-55.

19. Boddigius J. The occurrence of *Mycobacterium leprae* within axons of peripheral nerves. *Acta Neuropathol* **1974**; 27:257-70.
20. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1966**; 34:255-73.
21. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The lancet* **2004**; 363:1209-19.
22. Burki T. Old problems still mar fight against ancient disease. *Lancet* **2009**; 373:287-8.
23. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **2001**; 104:487-501.
24. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* **1996**; 334:1717-25.
25. Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl* **1999**; 57:16-21.
26. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* **1997**; 34:391-9.
27. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**; 94:3195-9.
28. Olson KE, Booth GC, Poulin F, Sonenberg N, Beretta L. Impaired myelopoiesis in mice lacking the repressors of translation initiation, 4E-BP1 and 4E-BP2. *Immunology* **2009**; 128:e376-84.
29. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**; 91:2305-9.
30. Klein RS, Rubin JB. Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol* **2004**; 25:306-14.
31. D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, et al. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol* **1997**; 27:1788-93.
32. Ara T, Itoi M, Kawabata K, et al. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* **2003**; 170:4649-55.
33. Onai N, Zhang Y, Yoneyama H, Kitamura T, Ishikawa S, Matsushima K. Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakine. *Blood* **2000**; 96:2074-80.
34. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **1995**; 28:495-500.
35. Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Panutisopoulos D, Spandidos DA. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease. *Thromb Res* **2007**; 119:63-71.
36. World Health Organization. Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities. Operational Guidelines., **2006**.

37. World Health Organization. Global leprosy situation. In: *Wkly Epidemiol Rec*, ed. Vol. 87, **2012**:317-28.
38. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* **2009**; 27:173-86.
39. van Eden W, Gonzalez NM, de Vries RR, Convit J, van Rood JJ. HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* **1985**; 151:9-14.
40. Prado EMdO. Human Polymorphisms as Clinical Predictors in Leprosy. *Journal of Tropical Medicine* **2011**; 2011.
41. de Vries RR, Mehra NK, Vaidya MC, Gupte MD, Meera Khan P, Van Rood JJ. HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. *Tissue Antigens* **1980**; 16:294-304.
42. Zhang DF, Huang XQ, Wang D, Li YY, Yao YG. Genetic variants of complement genes Ficolin-2, Mannose-binding lectin and Complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet* **2013**; 132:629-40.
43. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* **2010**; 201:1422-35.
44. Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet* **1988**; 42:256-66.
45. Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet* **1995**; 56:1179-85.
46. Sales AM, Ponce de Leon A, Duppre NC, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis* **2011**; 5:e1013.
47. World Health Organization. Expert Committee on Leprosy seventh report. Vol. 874. Geneva, Switzerland., **1998**.
48. Rao PN. Recent advances in the control programs and therapy of leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **2004**; 70:269-76.
49. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Geneva, **1982**.
50. World Health Organization. International Classification of Functioning, Disability and Health (ICF). In: *Tech Rep Ser*, ed. Geneva, **2001**.
51. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, et al. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the STROBE statement. *Eur J Epidemiol* **2009**; 24:37-55.
52. Guimaraes AL, Correia-Silva Jde F, Sa AR, et al. Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol* **2007**; 52:268-72.
53. Winkler C, Modi W, Smith MW, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* **1998**; 279:389-93.

54. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* **2004**; 5:315-29.
55. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Jr., Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **2010**; 74:589-620.
56. Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **2000**; 68:325-7.
57. Santos AR, Suffys PN, Vanderborgh PR, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* **2002**; 186:1687-91.
58. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* **1997**; 176:530-2.
59. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* **2001**; 2:196-204.
60. Vejbaesa S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thai* **2007**; 90:1188-92.
61. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis* **2011**; 204:1256-63.
62. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis* **2009**; 13:493-8.
63. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol* **2010**; 71:992-8.
64. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* **2004**; 71:330-40.
65. Vanderborgh PR, Pacheco AG, Moraes ME, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* **2007**; 8:320-4.
66. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nat Genet* **2003**; 33:469-75.
67. Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet* **2009**; 17:1454-62.
68. Petersen DC, Glashoff RH, Shrestha S, et al. Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF1) polymorphism and CXCR4 variation in an African population. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2005**; 40:521-6.
69. Soriano A, Martinez C, Garcia F, et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J Infect Dis* **2002**; 186:922-31.

70. Watanabe MA, de Oliveira Cavassin GG, Orellana MD, et al. SDF-1 gene polymorphisms and syncytia induction in Brazilian HIV-1 infected individuals. *Microb Pathog* **2003**; 35:31-4.
71. Kimura R, Nishioka T, Soemantri A, Ishida T. Allele-specific transcript quantification detects haplotypic variation in the levels of the SDF-1 transcripts. *Hum Mol Genet* **2005**; 14:1579-85.
72. Vieira VC, Barral MF, Mendoza-Sassi RA, Silveira JM, Soares MA, de Martinez AM. The effect of combined polymorphisms in chemokines and chemokine receptors on the clinical course of HIV-1 infection in a Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2011**; 106:408-15.
73. Gianesin K, Freguia R, Carmona F, et al. The Role of Genetic Variants of Stromal Cell-Derived Factor 1 in Pediatric HIV-1 Infection and Disease Progression. *Plos One* **2012**; 7.
74. Tiensiwakul P. Stromal cell-derived factor (SDF) 1-3'A polymorphism may play a role in resistance to HIV-1 infection in seronegative high-risk Thais. *Intervirology* **2004**; 47:87-92.
75. Reiche EM, Bonametti AM, Voltarelli JC, Morimoto HK, Watanabe MA. Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptors: impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). *Current medicinal chemistry* **2007**; 14:1325-34.
76. Kaslow RA, Dorak T, Tang JJ. Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J Infect Dis* **2005**; 191 Suppl 1:S68-77.
77. Wu FX, Luo XY, Wu LJ, et al. Association of chemokine CXCL12-3'G801A polymorphism with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Lupus* **2012**; 21:604-10.
78. Gouwy M, Struyf S, Berghmans N, Vanormelingen C, Schols D, Van Damme J. CXCR4 and CCR5 ligands cooperate in monocyte and lymphocyte migration and in inhibition of dual-tropic (R5/X4) HIV-1 infection. *Eur J Immunol* **2011**; 41:963-73.
79. Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Thayer TC, et al. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. *J Immunol* **2011**; 187:911-8.
80. Mselle TF, Howell AL, Ghosh M, Wira CR, Sentman CL. Human uterine natural killer cells but not blood natural killer cells inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection by secretion of CXCL12. *J Virol* **2009**; 83:11188-95.
81. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. *J Clin Invest* **1990**; 85:1304-14.
82. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol* **1991**; 147:1983-94.
83. Desai SD, Birdi TJ, Antia NH. Correlation between macrophage activation and bactericidal function and *Mycobacterium leprae* antigen presentation in macrophages of leprosy patients and normal individuals. *Infect Immun* **1989**; 57:1311-7.
84. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg* **2008**; 78:518-21.
85. Reveiz L, Buendia JA, Tellez D. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. *Rev Panam Salud Publica* **2009**; 26:341-9.

86. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis* **2006**; 193:346-53.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os mecanismos de suscetibilidade e resistência às infecções microbianas têm sido extensivamente estudados, assim como os fatores genéticos que podem influenciar no desenvolvimento das infecções. Vários genes têm sido relacionados à suscetibilidade e resistência a *M. leprae*, relacionando os padrões de expressão gênica com os mecanismos de defesa do hospedeiro e desenvolvimento bacilar (77).

O espectro imunológico apresentado na infecção por *M. leprae* é muito variado, o que torna a hanseníase um excelente modelo de estudo para as investigações dos mecanismos reguladores da resposta imunológica contra infecções bacterianas. A grande maioria da população é resistente ao bacilo, sendo que, menos de 1%, dos indivíduos que têm contato com o bacilo podem desenvolver a doença, caracterizando uma baixa patogenicidade e proporcionando uma excelente oportunidade para estudos relacionados com a resistência e suscetibilidade às infecções microbianas e os mecanismos patogênicos (78).

No presente estudo, procurou-se investigar a participação dos polimorfismos de nucleotídeo único nos genes (*G308A*) *TNF-α* e (*G801A*) *CXCL12*. Ambas as proteínas que são codificadas por estes genes são extremamente importantes para a organização do sistema imune, com participação efetiva nos mecanismos de comunicação celular (79).

A localização do *locus TNF* no complexo *MHC* sugere a participação do polimorfismo analisado, visto que a variedade de manifestações clínicas encontradas no espectro imunológico da hanseníase está diretamente relacionada à resposta imunológica desencadeada contra a bactéria *M. leprae* (80).

Vários estudos têm demonstrado elevados níveis de *TNF-α* no soro (81) e em lesões de pacientes que apresentam diferentes estágios clínicos (81-83), indicando que a presença da proteína *TNF-α* está associada à destruição do *M. leprae* e, também, à formação de granuloma (83). Também foi observada a participação de *TNF-α* na estimulação de resposta inflamatória aguda em indivíduos com estados reacionais do tipo I (Eritema Nodoso Hansônico – ENH), especialmente em virchowianos, com aumento da produção de *TNF-α* (84). Esse aumento na expressão da proteína *TNFα* tem sido associado a polimorfismos existentes na região promotora do gene *TNF-α* (56). Os mecanismos de produção de *TNFα* em resposta a *M. leprae* ainda não estão bem conhecidos (85).

Neste estudo, os dados sugerem que não há associação significativa entre a variante polimórfica G→A do gene (*G308A*) *TNF-α* e a suscetibilidade a hanseníase *per se* e nem com a ocorrência das manifestações clínicas. No entanto, foi observada uma tendência de

significância ($OR = 0,460$; $p = 0,083$) entre a ocorrência da variante gênica do alelo G (*G308A*) *TNF*- α e a presença de *M. leprae* nas lesões de pele, sugerindo a participação deste polimorfismo nos mecanismos de resposta imune celular dos indivíduos hansenianos.

A correlação entre os polimorfismos existentes no gene *TNF*, seus receptores (*TNFR*) e a suscetibilidade a hanseníase tem sido extensivamente estuda em populações de diferentes etnias (86-89). Porém, os resultados apresentados ainda são controversos.

A associação entre os polimorfismos do *TNF*- α foi relatada em alguns estudos (86, 87) e, em outros, nenhuma associação significativa foi encontrada (88, 89). Porém, os resultados alcançados ainda são inconclusivos para uma correlação válida. A participação da variante alélica A do gene (*G308A*) *TNF*- α nos mecanismos de suscetibilidade à hanseníase, tem sido relatada, tanto como uma condição de proteção (31, 80, 90-93), como de predisposição (89, 91) e indiferença (94). No entanto, os dados encontrados neste estudo não apontaram nenhum efeito protetor da variante alélica -308A *TNF*- α ($OR = 1,407$; $p = 0,170$).

A ocorrência de tais discrepâncias pode ser devido a diferenças étnicas das populações, a história natural da doença infecciosa de acordo com a área geográfica e os seus contextos socioeconômicos e culturais e limitações relacionadas com escasso uso de haplótipos em estudos associação com a hanseníase, a fim de compreender melhor o desequilíbrio de ligação, a associação não aleatória de alelos em *loci* genéticos adjacentes, com uma extensão de haplótipos de *TNF*- α em todo o locus *MHC* (95).

Os resultados encontrados neste estudo, não identificaram nenhuma associação significativa entre as variantes alélicas e genotípicas do gene (*G801A*) *CXCL12* e os grupos de hansenianos, contatos intradomiciliares e controles saudáveis e, também, com as diversas manifestações clínicas encontradas nos indivíduos doentes.

Estudos de associação entre o polimorfismo (*G801A*) *CXCL12* e a suscetibilidade a doenças infecciosas são escassos, principalmente relacionados à hanseníase. Correlações entre este polimorfismo e predisposição a agentes infecciosos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (96), HIV (74, 97) e HBV (98), foram descritas em populações etnicamente distintas.

Alguns estudos demonstram que o SNP (*G801A*) *CXCL12* participa dos mecanismos de infecção a HIV, bem como na progressão clínica dos indivíduos infectados (73, 75). Também foi constatado que os níveis séricos da proteína *CXCL12* interferem na quimiotaxia de células imunológicas de indivíduos HIV+ (99). O aumento na produção da proteína *CXCL12* parece interferir na ocorrência de nefrites e lesões de pele de indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico, afetando a produção de autoanticorpos (100).

Na hanseníase, as lesões cutâneas normalmente apresentam uma reação inflamatória crônica granulomatosa estimulada pela liberação de uma série de mediadores químicos inflamatórios, liberados a partir da interação molecular entre a micobactéria e as células imunes residentes nos infiltrados (101, 102). A quimiotaxia de fagócitos mononucleares é fortemente regulada pela interação entre as células do estroma e os leucócitos endoteliais, em um processo onde a quimiocina CXCL12 desempenham um papel crucial na migração de macrófagos e outras células do sistema imunológico para tecidos e microambientes específicos durante a infecção (103-107). Uma imunidade inata eficaz contra o *M. leprae*, portanto, requer uma migração adequada dos monócitos e ativação de macrófagos (108-110).

Embora alguns resultados sejam promissores, quanto à associação destes polimorfismos com a suscetibilidade e resistência a doenças infecciosas, ainda não permitem conclusões válidas.

A utilização de um grupo controle formado por contatos intradomiciliares, permitiu avaliar a ocorrência dos SNPs entre aquele que realmente foram expostos ao agente patogênico, o que aumentou a potência das comparações e a diminuição de abordagens aleatórias (77).

A participação de fatores genéticos nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doenças infecciosas está claramente estabelecida (95). Porém, a exposição continuada dos contatos intradomiciliares a *M. leprae* e aos fatores sociodemográficos e culturais contribuem fortemente para a prevalência da hanseníase. A participação dos polimorfismos (*G308A*) *TNF- α* e (*G801A*) *CXCL12* com a suscetibilidade à hanseníase ainda precisa ser estudada mais profundamente, permitindo uma avaliação da incidência desta doença na população, considerando todos os fatores etiopatogênicos que interferem nos mecanismos de desenvolvimento da hanseníase.

Em conclusão, os resultados obtidos não indicam a participação dos SNPs (*G308A*) *TNF- α* e (*G801A*) *CXCL12* na suscetibilidade a hanseníase *per si*, e nem no desenvolvimento das manifestações clínicas encontradas durante espectro imunológico da doença, embora, uma tendência de associação tenha sido observada entre a presença do alelo G no gene (*G308A*) *TNF- α* e a presença de *M. leprae* nas lesões de pele.

REFERÊNCIA

1. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect.* 2006;8(4):1124-31. Epub 2006/03/04.
2. Agrawal A, Pandit L, Dalal M, Shetty JP. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clinical neurology and neurosurgery.* 2005;107(6):445-54. Epub 2005/10/06.
3. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet.* 1999;353(9153):655-60. Epub 1999/02/25.
4. Moschioni C, Antunes CM, Grossi MA, Lambertucci JR. Risk factors for physical disability at diagnosis of 19,283 new cases of leprosy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010;43(1):19-22. Epub 2010/03/23.
5. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):338-81. Epub 2006/04/15.
6. Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu RR, Ishii N. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. *The Journal of dermatology.* 2012;39(2):121-9. Epub 2011/10/07.
7. Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet.* 1995;56(5):1179-85. Epub 1995/05/01.
8. Global leprosy situation, 2012. *Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations.* 2012;87(34):317-28. Epub 2012/08/28.
9. Brasil. Guia para controle da hanseníase. In: Básica. DdA, editor. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde.; 2002. p. 89.
10. Dias RC, Pedrazzani ES. Políticas públicas na Hanseníase: contribuição na redução da exclusão social. *Revista Brasileira de Enfermagem.* 2008;61:753-6.
11. WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organization technical report series. 2012(968):1-61, 1 p following Epub 2012/09/14.
12. Cunha AZSd. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2002;7:235-42.
13. Beiguelman B. Genética e hanseníase. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2002;7:117-28.
14. Chimelli L, Freitas M, Nascimento O. Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. *Journal of neurology.* 1997;244(5):318-23. Epub 1997/05/01.

15. Gondim FdAA, Thomas FP, Oliveira GRd, Pimentel LHC, Bastos BPR, Costa CMdC. On the spectrum of leprosy neuropathies: Multifocal inflammatory neuropathy heralding leprosy relapse. *Neuromuscular Disorders*. 2009;19(10):711-3.
16. Araujo MG. [Leprosy in Brazil]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(3):373-82. Epub 2003/08/09. Hansenise no Brasil.
17. Teo SK, Resztak KE, Scheffler MA, Kook KA, Zeldis JB, Stirling DI, et al. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2002;4(11):1193-202. Epub 2002/10/04.
18. H. S. Multidrug therapy against leprosy : development and implementation over the past 25 years. Geneva2006.
19. da Silva Rocha A, Cunha M, Diniz LM, Salgado C, Aires MA, Nery JA, et al. Drug and multidrug resistance among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(6):1912-7. Epub 2012/04/13.
20. Bottasso O, Merlin V, Cannon L, Cannon H, Ingledew N, Keni M, et al. Studies of vaccination of persons in close contact with leprosy patients in Argentina. *Vaccine*. 1998;16(11-12):1166-71. Epub 1998/07/31.
21. Duppre NC, Camacho LA, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JA, et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(7):631-8. Epub 2008/06/03.
22. Rodrigues LC, Kerr-Pontes LR, Frietas MV, Barreto ML. Long lasting BCG protection against leprosy. *Vaccine*. 2007;25(39-40):6842-4. Epub 2007/08/31.
23. Setia MS, Steinmaus C, Ho CS, Rutherford GW. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2006;6(3):162-70. Epub 2006/02/28.
24. Zodpey SP, Ambadekar NN, Thakur A. Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India. *Public health*. 2005;119(3):209-16. Epub 2005/01/22.
25. Jopling WH. Clinical aspects of leprosy. *Tubercle*. 1982;63(4):295-305. Epub 1982/12/01.
26. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(4):1213-7. Epub 1988/02/01.
27. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(4):365-75. Epub 2002/08/10. Imunopatologia da hansenise: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*.
28. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-

- 12 in reactions (RR and ENL). Scandinavian journal of immunology. 1999;50(5):541-9. Epub 1999/11/17.
29. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. Journal of the American Academy of Dermatology. 2004;51(3):417-26. Epub 2004/09/01.
30. Patil SA, Ramu G, Prasad R. Detection of disease related immune complexes in the serum of leprosy patients. A novel single step method. Journal of neuroimmunology. 2000;105(1):64-8. Epub 2000/03/14.
31. Santos AR, Suffys PN, Vanderborgh PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. J Infect Dis. 2002;186(11):1687-91. Epub 2002/11/26.
32. Hamerlinck FF, Klatser PR, Walsh DS, Bos JD, Walsh GP, Faber WR. Serum neopterin as a marker for reactional states in leprosy. FEMS immunology and medical microbiology. 1999;24(4):405-9. Epub 1999/08/06.
33. Iyer A, van Eijk M, Silva E, Hatta M, Faber W, Aerts JM, et al. Increased chitotriosidase activity in serum of leprosy patients: association with bacillary leprosy. Clin Immunol. 2009;131(3):501-9. Epub 2009/03/25.
34. Iyer AM, Mohanty KK, van Egmond D, Katoch K, Faber WR, Das PK, et al. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. Human pathology. 2007;38(7):1065-73. Epub 2007/04/20.
35. Mendonca VA, Costa RD, Lyon S, Penido RA, Borges VO, Bretas TL, et al. Plasma levels of chemokines during leprosy specific treatment. Acta tropica. 2010;113(2):151-4. Epub 2009/10/31.
36. Sharma N, Sharma VK, Gupta A, Kaur I, Ganguly NK. Immunological defect in leprosy patients: altered T-lymphocyte signals. FEMS immunology and medical microbiology. 1999;23(4):355-62. Epub 1999/05/04.
37. Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. British Medical Bulletin. 2006;77-78:103-21. Epub 2006/11/09.
38. Moubasher AE-DA, Kamel NA, Zedan H, Raheem DE-DA. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. International Journal of Dermatology. 1998;37(10):733-40.
39. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. International anesthesiology clinics. 2007;45(2):27-37. Epub 2007/04/12.
40. Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. Developmental and comparative immunology. 2004;28(5):443-60. Epub 2004/04/06.
41. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. The Journal of Investigative Dermatology. 1994;102(6):828-32. Epub 1994/06/01.
42. Lopez Roa RI, Guerrero Velásquez C, Alvarado Navarro A, Montoya Buelna M, Garcia Niebla C, Fafutis Morris M. Recovery of IFN- γ levels in PBMCs from lepromatous

- leprosy patients through the synergistic actions of the cytokines IL-12 and IL-18. International Immunopharmacology. 2008;8(13–14):1715-20.
43. Adler MW, Geller EB, Chen X, Rogers TJ. Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. The AAPS journal. 2005;7(4):E865-70. Epub 2006/04/06.
44. Yu Y, Zhang Y, Hu S, Jin D, Chen X, Jin Q, et al. Different patterns of cytokines and chemokines combined with IFN-gamma production reflect Mycobacterium tuberculosis infection and disease. PloS one. 2012;7(9):e44944. Epub 2012/10/03.
45. Kirkaldy AA, Musonda AC, Khanolkhar-Young S, Suneetha S, Lockwood DN. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. Clinical and experimental immunology. 2003;134(3):447-53. Epub 2003/11/25.
46. Mahajan SD, Agosto-Mojica A, Aalinkeel R, Reynolds JL, Nair BB, Sykes DE, et al. Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease. Biochemical and biophysical research communications. 2010;396(2):348-52. Epub 2010/04/27.
47. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborgh PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. Leprosy review. 2006;77(3):189-202. Epub 2006/12/19.
48. Zhang F, Liu H, Chen S, Wang C, Zhu C, Zhang L, et al. Evidence for an association of HLA-DRB1*15 and DRB1*09 with leprosy and the impact of DRB1*09 on disease onset in a Chinese Han population. BMC medical genetics. 2009;10:133. Epub 2009/12/17.
49. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. Nature. 2004;427(6975):636-40. Epub 2004/01/23.
50. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. The Journal of infectious diseases. 1999;179(1):187-91. Epub 1998/12/08.
51. Teixeira MA, Silva NL, Ramos Ade L, Hatagima A, Magalhaes V. [NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2010;43(3):281-6. Epub 2010/06/22. Polimorfismos do gene NRAMP1 em indivíduos com reações hansenicas, atendidos em dois Centros de Referencia no Recife, nordeste do Brasil.
52. Yang Q, Liu H, Low H-Q, Wang H, Yu Y, Fu Xa, et al. Chromosome 2p14 Is Linked to Susceptibility to Leprosy. PloS one. 2012;7(1):e29747.
53. Arakawa T, Yphantis DA. Molecular weight of recombinant human tumor necrosis factor-alpha. The Journal of Biological Chemistry. 1987;262(16):7484-5. Epub 1987/06/05.
54. Utsumi T, Hung MC, Klostergaard J. The role of amino functions in recombinant human tumor necrosis factor in expression of biological activity. Molecular immunology. 1992;29(1):77-81. Epub 1992/01/01.

55. Balkwill FR. Tumour necrosis factor and cancer. Progress in growth factor research. 1992;4(2):121-37. Epub 1992/01/01.
56. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. Microscopy research and technique. 2000;50(3):216-28. Epub 2000/07/13.
57. Takeda K, Iwamoto S, Sugimoto H, Takuma T, Kawatani N, Noda M, et al. Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. Nature. 1986;323(6086):338-40. Epub 1986/09/01.
58. Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. Infection and immunity. 1992;60(4):1441-6. Epub 1992/04/01.
59. Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, Sevin A, Nedospasov SA, Cambon-Thomsen A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(21):9717-21. Epub 1991/11/01.
60. Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, Brakebusch C, Wallach D, Bauer J, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. The Journal of Experimental Medicine. 2004;200(3):367-76. Epub 2004/08/04.
61. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell death and Differentiation. 2003;10(1):45-65. Epub 2003/03/26.
62. Tolusso B, Fabris M, Caporali R, Cuomo G, Isola M, Soldano F, et al. -238 and +489 TNF-alpha along with TNF-RII gene polymorphisms associate with the diffuse phenotype in patients with Systemic Sclerosis. Immunology Letters. 2005;96(1):103-8. Epub 2004/12/09.
63. Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. Tissue antigens. 1998;51(6):605-12. Epub 1998/08/07.
64. Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. Malaria Journal. 2008;7:13. Epub 2008/01/16.
65. Gonzalez-Quintela A, Dominguez-Santalla MJ, Loidi L, Quinteiro C, Perez LF. Relation of tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphisms with serum concentrations and in vitro production of TNF-alpha and interleukin-8 in heavy drinkers. Alcohol. 2004;34(2-3):273-7. Epub 2005/05/21.
66. Ferrante L, Opdal SH, Vege A, Rognum TO. TNF-alpha promoter polymorphisms in sudden infant death. Human immunology. 2008;69(6):368-73. Epub 2008/06/24.
67. Kothari N, Bogra J, Abbas H, Kohli M, Malik A, Kothari D, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. Cytokine. 2013;61(2):676-81. Epub 2013/01/16.

68. Murphy PM, Baggolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews*. 2000;52(1):145-76. Epub 2000/03/04.
69. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology*. 2007;25:787-820. Epub 2007/02/13.
70. Savarin-Vuillat C, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2007;4(4):590-601. Epub 2007/10/09.
71. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine*. 2006;354(6):610-21. Epub 2006/02/10.
72. Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 2004;72(1):35-44. Epub 2004/06/26.
73. Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science*. 1998;279(5349):389-93. Epub 1998/02/07.
74. Amara S, Domenech J, Jenhani F. Stromal cell-derived factor 1 polymorphism in patients infected with HIV and implications for AIDS progression in Tunisia. *HIV AIDS (Auckl)*. 2010;2:203-9. Epub 2010/01/01.
75. Petersen DC, Glashoff RH, Shrestha S, Bergeron J, Laten A, Gold B, et al. Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF1) polymorphism and CXCR4 variation in an African population. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40(5):521-6. Epub 2005/11/15.
76. Tiensiwakul P. Stromal cell-derived factor (SDF) 1-3'A polymorphism may play a role in resistance to HIV-1 infection in seronegative high-risk Thais. *Intervirology*. 2004;47(2):87-92. Epub 2004/06/12.
77. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers*. 2009;27(3):173-86. Epub 2009/11/07.
78. Simon M, Scherlock J, Duthie MS, Ribeiro de Jesus A. Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy. *Drug Development Research*. 2011;72(6):509-27.
79. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2012;46(5):566-72. Epub 2012/02/11.
80. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun*. 2001;2(4):196-204. Epub 2001/07/31.

81. Moraes MO, Sarno EN, Teles RM, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, et al. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. *The Journal of investigative dermatology.* 2000;115(6):935-41. Epub 2000/12/20.
82. Lockwood DN, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I, van Brakel W, et al. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS neglected tropical diseases.* 2011;5(12):e1327. Epub 2011/12/20.
83. Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *The Journal of infectious diseases.* 1989;159(4):787-90. Epub 1989/04/01.
84. Foss NT, de Oliveira EB, Silva CL. Correlation between TNF production, increase of plasma C-reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to concanavalin A during erythema nodosum leprosum. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association.* 1993;61(2):218-26. Epub 1993/06/01.
85. Sampaio EP, Oliveira RB, Warwick-Davies J, Neto RB, Griffin GE, Shattock RJ. T cell-monocyte contact enhances tumor necrosis factor-alpha production in response to *Mycobacterium leprae*. *The Journal of infectious diseases.* 2000;182(5):1463-72. Epub 2000/10/07.
86. Franceschi DSA, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases.* 2009;13(4):493-8.
87. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit C, Siddiqui MR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Human immunology.* 2010;71(10):992-8.
88. Montoya-Buelna M, Muñoz-Valle JF, Alvarado-Navarro A, López Roa RI, Figuera-Villanueva LE, Fafutis-Morris M. 364 Single nucleotide polymorphisms of TNF- α gene and its receptors 1 and 2 in Mexican lepromatous leprosy patients. *Cytokine.* 2008;43(3):329-30.
89. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1997;176(2):530-2. Epub 1997/08/01.
90. Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, Moraes MO, Filho VF, Mattos HJ, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000;68(3):325-7. Epub 2001/02/28.
91. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SM, Ribeiro-Alves M, Nery JA, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis.* 2011;204(8):1256-63. Epub 2011/09/16.

92. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis.* 2009;13(4):493-8. Epub 2008/12/09.
93. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit C, Siddiqui MR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol.* 2010;71(10):992-8. Epub 2010/07/24.
94. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(3):330-40. Epub 2004/09/24.
95. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun.* 2004;5(5):315-29. Epub 2004/02/20.
96. Selvaraj P, Alagarasu K, Singh B. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of south India. *International journal of immunogenetics.* 2012;39(1):26-31.
97. Liu S, Zhu H. Association between polymorphism of SDF1 (CXCL12) gene and HIV-1 susceptibility: a meta-analysis. *Current HIV research.* 2011;9(2):112-9. Epub 2011/03/03.
98. Hassanshahi G, Arababadi MK, Khoramdelazad H, Yaghini N, Zarandi ER. Assessment of CXCL12 (SDF-1 α) Polymorphisms and Its Serum Level in Posttransfusion Occult HBV-infected Patients in Southeastern Iran. *Archives of Medical Research.* 2010;41(5):338-42.
99. Martinez-Maza O, Breen EC. B-cell activation and lymphoma in patients with HIV. *Current opinion in oncology.* 2002;14(5):528-32. Epub 2002/08/23.
100. Mselle TF, Howell AL, Ghosh M, Wira CR, Sentman CL. Human uterine natural killer cells but not blood natural killer cells inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection by secretion of CXCL12. *J Virol.* 2009;83(21):11188-95. Epub 2009/08/21.
101. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *The Lancet.* 1999;353(9153):655-60.
102. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet.* 2004;363(9416):1209-19.
103. Olson KE, Booth GC, Poulin F, Sonenberg N, Beretta L. Impaired myelopoiesis in mice lacking the repressors of translation initiation, 4E-BP1 and 4E-BP2. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e376-84. Epub 2009/01/30.
104. Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, et al. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol.* 2003;170(9):4649-55. Epub 2003/04/23.
105. D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, Hoxie JA, Clark-Lewis I, Melchers F, et al. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol.* 1997;27(7):1788-93. Epub 1997/07/01.

106. Klein RS, Rubin JB. Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):306-14. Epub 2004/05/18.
107. Onai N, Zhang Y, Yoneyama H, Kitamura T, Ishikawa S, Matsushima K. Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakine. *Blood.* 2000;96(6):2074-80. Epub 2000/09/09.
108. Desai SD, Birdi TJ, Antia NH. Correlation between macrophage activation and bactericidal function and *Mycobacterium leprae* antigen presentation in macrophages of leprosy patients and normal individuals. *Infect Immun.* 1989;57(4):1311-7. Epub 1989/04/01.
109. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(3):518-21. Epub 2008/03/14.
110. Reveiz L, Buendia JA, Tellez D. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. *Rev Panam Salud Publica.* 2009;26(4):341-9. Epub 2010/01/29.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Título da pesquisa: Estudo das características epidemiológicas, qualidade de vida, dos fatores clínico-terapêuticos, da condição normativa da saúde bucal e dos achados moleculares em pacientes com Hanseníase e seus contatos.

Instituição promotora: Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes/MG

Mestrando: Amanda Pinheiro da Rocha, Ednardo de Souza Nascimento, Marcelo Castro Freitas, Márcia Elizabeth Alves Ottoni, Nelson Lopes Junior, Tatiana Maciel Ladeia Gonçalves.

Equipe de Orientadores e Colaboradores: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula, Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães, Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães, Profa. Dra. Raquel Conceição Ferreira, Profa. Ms. Desirée Sant'Ana Haikal.

Coordenador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula

Atenção: Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis a você e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

1 Objetivo: Esta pesquisa tem como objetivo a investigação dos fatores que interferem na ocorrência da Hanseníase, como, por exemplo, condições sociais, de saúde, de alimentação e genética dos indivíduos presentes na região de Almenara-MG e Teófilo Otoni-MG.

2 Metodologia/procedimentos: Os dados serão coletados através de questionários estruturado e semi-estruturados, onde constarão todas as informações pertinentes ao estudo. A amostra será composta de raspado da mucosa jugal (parte interna da bochecha), que será coletada e identificada através de uma numeração única, que corresponderá à numeração impressa no questionário de coleta de dados. O raspado bucal, que contém células do participante, será analizado pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), para avaliação do DNA, que é uma molécula onde se encontram os genes. Para avaliação da saúde bucal será utilizado um instrumento denominado Inquérito Epidemiológico das Condições de Saúde Bucal. Todos os participantes assinarão este termo de consentimento livre e esclarecido.

3 Justificativa: A determinação de fatores relacionados à prevalência da Hanseníase em nossa comunidade pode ajudar a identificar pontos de controle da doença, e também fornecer informações importantes sobre prevenção, tratamento, reabilitação, além de proporcionar a elaboração de políticas específicas para o sistema de saúde no combate à Hanseníase.

4 Benefícios: A pesquisa poderá ou não trazer benefícios a você, mas as informações obtidas por meio deste estudo poderão ser importantes para o melhor entendimento do que leva um paciente a desenvolver tantos episódios reacionais durante e após o tratamento da Hanseníase, facilitando ao médico a condução terapêutica destes casos.

5 Desconfortos e riscos: A participação do cliente não acarretará prejuízo ao mesmo ou a qualquer pessoa, pois não causará nenhum tipo de risco, dano físico ou mesmo constrangimento moral ou ético. Estes exames não causam dor e nem outros incômodos. Todo o material resultante será utilizado exclusivamente para fins científicos. O participante terá o direito de receber qualquer esclarecimento sobre esta pesquisa e a garantia de que esta é de total responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

6 Danos: É garantida a manutenção da integridade física, psíquica e social dos participantes, ficando estes isentos de quaisquer riscos, danos ou agravos consequentes deste estudo.

7 Confidencialidade das informações: Após a entrevista, as informações coletadas serão usadas no nosso trabalho apenas para fins de pesquisa, mas a identidade do entrevistado será preservada, garantindo sua total privacidade.

8 Compensação/indenização: O(a) entrevistador(a) e o entrevistado(a) não receberão nenhum benefício financeiro pela participação nessa pesquisa. Todos os seus direitos serão respeitados.

9 Consentimento: Li e entendi as informações acima. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento para contribuir nesta pesquisa. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Almenara, _____ de _____ 201__.

Nome do Participante	Assinatura	Documento
Nome da Testemunha	Assinatura	Documento
Coordenador da Pesquisa	Assinatura	Documento

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para Menores de 18 Anos.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO DE
MENORES DE 18 ANOS EM PESQUISA**

Título da pesquisa: Estudo das características epidemiológicas, qualidade de vida, dos fatores clínico-terapêuticos, da condição normativa da saúde bucal e dos achados moleculares em pacientes com Hanseníase e seus contatos.

Instituição promotora: Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes/MG

Mestrando: Amanda Pinheiro da Rocha, Ednardo de Souza Nascimento, Marcelo Castro Freitas, Márcia Elizabeth Alves Ottoni, Nelson Lopes Junior, Tatiana Maciel Ladeia Gonçalves.

Equipe de Orientadores e Colaboradores: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula, Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães, Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães, Profa. Dra. Raquel Conceição Ferreira, Profa. Ms. Desirée Sant'Ana Haikal.

Coordenador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula

Atenção: O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado a participar desta pesquisa. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a participação do menor é importante. O objetivo deste estudo é gerar dados epidemiológicos relevantes para a avaliação das condições de saúde de adolescentes, identificando fatores de risco e outros indicadores. Caso o menor participe, será necessário responder questionários, permitir a avaliação saúde e coleta de amostra da mucosa bucal. Não será feito nenhum procedimento que traga qualquer desconforto ou risco à vida do menor.

1 Objetivo: Esta pesquisa tem como objetivo a investigação dos fatores que interferem na ocorrência da Hanseníase, como, por exemplo, condições sociais, de saúde, de alimentação e genética dos indivíduos presentes na região de Almenara-MG e Teófilo Otoni-MG.

2 Metodologia/procedimentos: Os dados serão coletados através de questionários estruturado e semi-estruturados, onde constarão todas as informações pertinentes ao estudo. A amostra será composta de raspado da mucosa jugal (parte interna da bochecha), que será coletada e identificada através de uma numeração única, que corresponderá à numeração impressa no questionário de coleta de dados. O raspado bucal, que contém células do participante, será analizado pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), para avaliação do DNA, que é uma molécula onde se encontram os genes. Para avaliação da saúde bucal será utilizado um instrumento denominado Inquérito Epidemiológico das Condições de Saúde Bucal. Todos os participantes assinarão este termo de consentimento livre e esclarecido.

3 Justificativa: A determinação de fatores relacionados à prevalência da Hanseníase em nossa comunidade pode ajudar a identificar pontos de controle da doença, e também fornecer informações importantes sobre prevenção, tratamento, reabilitação, além de proporcionar a elaboração de políticas específicas para o sistema de saúde no combate à Hanseníase.

4 Benefícios: A pesquisa poderá ou não trazer benefícios a você, mas as informações obtidas por meio deste estudo poderão ser importantes para o melhor entendimento do que leva um paciente a desenvolver tantos episódios reacionais durante e após o tratamento da Hanseníase, facilitando ao médico a condução terapêutica destes casos.

5 Desconfortos e riscos: A participação do adolescente não acarretará prejuízo ao mesmo ou a qualquer pessoa, pois não causará nenhum tipo de risco, dano físico ou mesmo constrangimento moral ou ético. Estes exames, inclusive o raspado da mucosa bucal, não causam dor e nem outros incômodos. Todo o material resultante será utilizado exclusivamente para fins científicos. Os pais ou responsáveis e mesmo o adolescente terá o direito de receber qualquer esclarecimento sobre esta pesquisa e a garantia de que esta é de total responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

6 Danos: É garantida a manutenção da integridade física, psíquica e social dos participantes, ficando estes isentos de quaisquer riscos, danos ou agravos consequentes deste estudo.

7 Confidencialidade das informações: Após a entrevista, as informações coletadas serão usadas no nosso trabalho apenas para fins de pesquisa, mas a identidade do entrevistado será preservada, garantindo sua total privacidade.

8 Compensação/indenização: O(a) entrevistador(a) e o entrevistado(a) não receberão nenhum benefício financeiro pela participação nessa pesquisa. Todos os seus direitos serão respeitados.

9 Consentimento:

Eu, _____ li o esclarecimento acima e comprehendi para que servirá o estudo e qual procedimento ao qual o menor sob minha responsabilidade será submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que eu e o menor sob minha responsabilidade somos livres para interromper a participação dele na pesquisa a qualquer momento, sem justificar a decisão tomada. Sei que o nome do menor não será divulgado, que não teremos despesas e não receberemos dinheiro por participar do estudo. Eu concordo com a participação do menor no estudo, desde que ele também concorde. Por isso ele assina junto comigo este Termo de Consentimento. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Almenara, _____ de _____ 2010.

Nome do Participante	Assinatura	Documento
Nome do Responsável pelo menor	Assinatura	Documento
Nome da Testemunha	Assinatura	Documento
Coordenador da Pesquisa	Assinatura	Documento

APÊNDICE C – Questionário Sociodemográfico.

QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO

Projeto: Estudo das características epidemiológicas, qualidade de vida, dos fatores clínico-terapêuticos, da condição normativa da saúde bucal e dos achados moleculares em pacientes com Hanseníase e seus contatos. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UNIMONTES, parecer nº 2185/2010, em 15 de outubro de 2010.

1- Código Questionário: _____	2- Data da aplicação: _____/_____/_____
3- Grupo da amostra ao qual pertence o indivíduo: <input type="checkbox"/> 1- Caso <input type="checkbox"/> 2- Controle (contatos) <input type="checkbox"/> 3- Controle (saudáveis)	
4- Nome do Indivíduo: _____	
5- Data de nascimento: ____ / ____ / ____ 6- Idade: _____ anos	
7- Sexo: <input type="checkbox"/> 1- Masculino <input type="checkbox"/> 2- Feminino	
8- Qual a cor da sua pele? (Considerada pelo indivíduo) <input type="checkbox"/> 1- Branca <input type="checkbox"/> 3- Parda <input type="checkbox"/> 98- Não informado <input type="checkbox"/> 2- Negra <input type="checkbox"/> 4- Outro _____	
9- Qual seu endereço (Rua, Avenida, Praça, etc.) <hr/> <hr/>	
10- Número da casa: _____ 11- Bairro: _____	
12- CEP : _____ 13- Município: _____ 14- Telefone: () _____	
15- O(A) senhor(a) é alfabetizado(a) (ou seja, sabe ler e escrever)? <input type="checkbox"/> 1- Sim <input type="checkbox"/> 2- Não* <input type="checkbox"/> 98- Não informado*	
*Vá para o item nº 18 e assinalar a opção “99- não se aplica” nos itens nº 16 e nº 17.	
16- O(A) senhor(a) frequenta a escola ou curso regular? <input type="checkbox"/> 1- Sim <input type="checkbox"/> 2- Não <input type="checkbox"/> 98- Não informado <input type="checkbox"/> 99- Não se aplica	
17- Qual o seu grau de escolaridade? <input type="checkbox"/> 1- Sem escolaridade <input type="checkbox"/> 5- Médio completo <input type="checkbox"/> 98- Não informado <input type="checkbox"/> 2- Fundamental completo <input type="checkbox"/> 6- Superior incompleto <input type="checkbox"/> 99- Não se aplica <input type="checkbox"/> 3- Fundamental incompleto <input type="checkbox"/> 7- Superior completo <input type="checkbox"/> 4- Médio incompleto <input type="checkbox"/> 8- Pós-graduação	
18- O(A) senhor(a) frequenta algum culto religioso? <input type="checkbox"/> 1- Sim <input type="checkbox"/> 2- Não <input type="checkbox"/> 98- Não informado	
19- Qual a sua atual ocupação/profissão <hr/>	
20- Qual a renda de sua família? <input type="checkbox"/> 1- Programas Federais <input type="checkbox"/> 5- Acima de 3 - até 4 salários mínimos <input type="checkbox"/> 2- Até 1 salário mínimo <input type="checkbox"/> 6- Acima de 4 - até 5 salários mínimos <input type="checkbox"/> 3- Acima de 1 - até 2 salários mínimos <input type="checkbox"/> 7- Acima de 5 salários mínimos	

() 4- Acima de 2 - até 3 salários mínimos () 98- Não informado

21- De que tipo é sua de moradia?

() 1- Casa própria () 2- Aluguel () 3- Outros _____ () 98- Não informado

22- Qual o tipo de construção da sua moradia?

() 1- Adobe	() 5- Lona
() 2- Alvenaria sem laje	() 6- Taipa
() 3- Alvenaria com laje	() 7- Outros _____
() 4- Madeira	() 98- Não informado

23- Quantos cômodos têm sua casa?

() 1- Um	() 3- Três	() 5- Cinco	() 98- Não informado
() 2- Dois	() 4- Quatro	() 6- Mais de cinco	

24- Quantas pessoas moram com você?

() 1- Uma	() 3- Três	() 5- Cinco	() 98- Não informado
() 2- Duas	() 4- Quatro	() 6- Mais de cinco	

25- Há quanto tempo você mora nesta casa?

() 1- Menos que um ano	() 5- De quatro a cinco anos	() 7- De dez a vinte anos
() 2- De um a dois anos	() 6- De cinco a dez anos	() 8- Mais que vinte anos
() 3- De dois a três anos	() 4- De três a quatro anos	() 98- Não informado

26- Possui rede elétrica em casa?

() 1- Sim	() 2- Não	() 98- Não informado
------------	------------	-----------------------

27- Possui abastecimento de água?

() 1- Sim	() 2- Não	() 98- Não informado
------------	------------	-----------------------

28- O(A) senhor(a) realiza algum tipo de tratamento da água que consome?

() 1- Sim	() 2- Não*	() 98- Não informado*
------------	-------------	------------------------

*Caso a resposta seja NÃO, vá para o item nº 30 e assinalar a opção “99- não se aplica” no item nº 29.

29 – Qual o tipo de tratamento utilizado?

() 1- Filtração	() 3- Cloração	() 98- Não informado
() 2- Fervura	() 4- Sem tratamento	() 99- Não se Aplica

30- Possui rede de esgoto?

() 1- Sim	() 2- Não	() 98- Não informado
------------	------------	-----------------------

• Os itens 31 a 37 devem ser preenchidos se o indivíduo for do grupo de CASOS, através de consulta à ficha de notificação do SINAN. Para os indivíduos dos grupos CONTROLES, marque a opção “99- Não se aplica”, e passe para o item 38.

31- Número da ficha de notificação do SINAN. _____

32- Ano do diagnóstico da Hanseníase: _____ () 99- Não se aplica

33- Condição de tratamento:

() 1- Virgem de tratamento	() 3- Tratado – Alta por cura
() 2- Em tratamento	() 99- Não se aplica

34- Classificação sistêmica:

() 1- Paucibacilar	() 2- Multibacilar	() 99- Não se aplica
---------------------	---------------------	-----------------------

35- Forma clínica diagnosticada:

- | | | |
|----------------------|--------------------|-----------------------|
| () 1- Indeterminada | () 3- Dimórfica | () 99- Não se aplica |
| () 2- Tuberculóide | () 4- Virchowiana | |
-

36- Estado reacional:

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| () 1- Sem reação | () 3- Eritema Nodoso |
| () 2- Reação Reversa | () 99- Não se aplica |
-

37- Nível de incapacidade

- | | |
|-------------|-----------------------|
| () 1- zero | () 3- dois |
| () 2- um | () 99- Não se aplica |
-

38- O(A) senhor(a) gostaria de fazer alguma observação em relação ao questionário aplicado?

Entrevistador: POR FAVOR, LEIA E ASSINE SEU NOME

Eu reli o questionário após a entrevista e certifico que todas as respostas às perguntas formuladas foram anotadas de acordo com as respostas dadas pelo entrevistado e que todas as colunas e espaços que requerem preenchimentos foram completados de acordo com as instruções recebidas. Eu me comprometo a manter sob estrita confidencialidade o conteúdo das perguntas, das respostas e dos comentários do entrevistado, como também sua identidade.

Nome do Entrevistador _____.
 Nome do Supervisor _____

Assinatura do Entrevistador

Assinatura do Entrevistado

ANEXOS

ANEXO A – Parecer Favorável do Comitê de Ética em Pesquisa


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMITÉ DE ÉTICA
PARECER CONSUBSTANCIADO


Montes Claros, 15 de outubro de 2010

Processo N.º 2185/10.

Título do Projeto: Estudo das características epidemiológicas, qualidade de vida, dos fatores clínico-terapêuticos, da condição normativa da saúde bucal e dos achados moleculares em pacientes com Hanseníase e seus contatos

Coordenador: Profº Dr. Alfredo Mauricio Batista de Paula

Relator: Profº Ms. Simone de Melo Costa

Histórico

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Ela causa lesões na pele e nos nervos periféricos, tais como perda de sensibilidade e hipocromicidade, e neuropatia. Este trabalho tem como objetivo geral caracterizar fatores ambientais (sócio-demográficos), clínicos e genéticos de indivíduos com Hanseníase e seus contatos. Ainda, analisar entre esses grupos de indivíduos, condições normativas da saúde bucal, características da dieta, qualidade de vida e aspectos da relação conjugal paciente/cônjuge. Trata-se de um estudo quantitativo, do tipo caso controle. Será também adotada uma abordagem qualitativa. A amostra será composta por 90 pacientes já diagnosticados com Hanseníase, cadastrados no SINAN (Sistema Nacional de Agravos de Notificação) (casos), e 90 contatos intradomiciliares, maiores de 16 anos (controle), além de 90 indivíduos saudáveis pareados individualmente por sexo e idade a cada um dos casos (controle). A coleta de dados quantitativos será feita nos domicílios dos pesquisados por meio de questionários estruturados e semi-estruturados. A avaliação da condição de saúde bucal será realizada pelo pesquisador cirurgião-dentista num consultório odontológico localizado numa Unidade Básica de Saúde- UBS. Para a pesquisa qualitativa serão selecionados indivíduos do grupo caso e dos controles que possuem companheiros. Eles serão entrevistados e as falas gravadas para posterior transcrição e análise. O critério para interrupção das entrevistas será o de saturação das respostas. Será feita a análise molecular do polimorfismo do gene candidatos IL12p40 e IFN-gama após a coleta da amostra e extração do DNA. O DNA será extraído a partir do produto da raspagem da mucosa jugal, e tratado com reagentes específicos e protocolos pré-determinados, a fim de se obter uma amostra adequada do DNA, que possa, inclusive, ser armazenada para análises subsequentes. Para a amplificação do DNA será utilizada a técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), a partir do material obtido no procedimento de extração, a fim de produzir cópias da sequência de nucleotídeos que codifica a síntese de interferon-gama. Para cada reação de PCR, a fim de verificar-se a ausência de contaminação dos componentes da cadeia, será avaliado um controle negativo contendo todos os reagentes necessários para a realização da reação, com exceção da amostra do DNA. Os produtos da PCR serão verificados através da elektroforese de gel em poliacrilamida. Posteriormente, cada gel será corado por prata para verificação em análise do material amplificado. Será conduzido um estudo piloto para verificar a viabilidade da pesquisa, a aplicabilidade e compreensão dos questionários, treinamento dos pesquisadores envolvidos, além da calibração do instrumental utilizado para as análises laboratoriais. Para o estudo piloto, serão selecionados 10 indivíduos com domicílio na cidade de Almenara/MG, que possuam características semelhantes aos componentes da amostra.

Mérito

A Hanseníase representa um desafio para as organizações de saúde, nacional e internacional, causando danos físicos, psicossociais e econômicos. O estudo pretende gerar conhecimentos importantes que poderão contribuir na implantação de estratégias que melhorem a qualidade de vida física e emocional do portador de hanseníase, além de propiciar a identificação de marcadores de diagnóstico, fatores de risco e de resistência terapêutica e de prognóstico para a doença.

Parecer

O Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes analisou o processo 2185/10, e entende que o mesmo está completo e dentro das normas do Comitê e das Resoluções do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa.

30as
Prof. Vânia Silva Vilas Boas Vieira Lopes
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes

ANEXO B – Ficha de Notificação de Hanseníase.

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO	Nº																																																																																																									
FICHA DE NOTIFICAÇÃO/ INVESTIGAÇÃO HANSENIASE																																																																																																												
Caso confirmado de Hanseníase: peleos que apresenta uma ou mais das seguintes características e que requer poliquimioterapia: - lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo (s) com espessamento neural; baciloscópio positiva.																																																																																																												
Dados Gerais	1	Tipo de Notificação <input type="checkbox"/> Agrevadocença	2 - Individual HANSENIASE	3	Código (CID10)	4	Data de Notificação A 3.0.9	5	Município de Notificação		Código (IBGE)	6	UF	7	Data do Diagnóstico	8	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	9	Data de Nascimento	10	Nome do Paciente	11	Raca/Cor	12	(ou) Idade	13	Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	14	Escolaridade	15	Grau de instrução 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mes 4 - Ano	16	Número do Cartão SUS	17	Nome da mãe	Dados de Residência	18	UF	19	Município de Residência	20	Bairro	21	Logradouro (rua, avenida,...)	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)	24	Geo campo 2	25	Ponto de Referência	26	(DDD) Telefone	27	CEP	28	Zona	29	1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	30	Pais (se residente fora do Brasil)			31	Nº do Prontuário	32	Ocupação	33	Nº de Lesões Cutâneas	34	Forma Clínica 1 - I 2 - T 3 - D 4 - V 5 - Não classificado	35	Classificação Operacional	36	Nº de Nervos afetados 1 - PB 2 - MB	37	Avaliação do Grau de Incapacidade Física no Diagnóstico	38	0 - Grau Zero 1 - Grau I 2 - Grau II 3 - Não Avaliado	39	Modo de Entrada	40	1 - Caso Novo 2 - Transferência do mesmo município (outra unidade) 3 - Transferência de Outro Município (mesma UF) 4 - Transferência de Outro Estado 5 - Transferência de Outro País 6 - Recidiva 7 - Outros Reingressos 9 - Ignorado	41	Modo de Detecção do Caso Novo	42	1 - Encaminhamento 2 - Demanda Espontânea 3 - Exame de Coletividade 4 - Exame de Contatos 5 - Outros Modos 9 - Ignorado	43	Baciloscópio	44	1. Positivo 2. Negativo 3. Não realizado 9. Ignorado	45	Data do Início do Tratamento	46	Esquema Terapêutico Inicial 1 - PQT/PB/6 doses 2 - PQT/MB/12 doses 3 - Outros Esquemas Substitutos	47	Número de Contatos Registrados			Observações adicionais:				Investigador	Município/Unidade de Saúde Nome Hanseníase		Código da Unid. de Saúde Assinatura SVS 30/10/2007
	1	Tipo de Notificação <input type="checkbox"/> Agrevadocença	2 - Individual HANSENIASE																																																																																																									
	3	Código (CID10)	4	Data de Notificação A 3.0.9																																																																																																								
	5	Município de Notificação		Código (IBGE)																																																																																																								
	6	UF	7	Data do Diagnóstico																																																																																																								
	8	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	9	Data de Nascimento																																																																																																								
	10	Nome do Paciente	11	Raca/Cor																																																																																																								
	12	(ou) Idade	13	Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado																																																																																																								
	14	Escolaridade	15	Grau de instrução 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mes 4 - Ano																																																																																																								
	16	Número do Cartão SUS	17	Nome da mãe																																																																																																								
Dados de Residência	18	UF	19	Município de Residência	20	Bairro	21	Logradouro (rua, avenida,...)	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)	24	Geo campo 2	25	Ponto de Referência	26	(DDD) Telefone	27	CEP	28	Zona	29	1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	30	Pais (se residente fora do Brasil)			31	Nº do Prontuário	32	Ocupação	33	Nº de Lesões Cutâneas	34	Forma Clínica 1 - I 2 - T 3 - D 4 - V 5 - Não classificado	35	Classificação Operacional	36	Nº de Nervos afetados 1 - PB 2 - MB	37	Avaliação do Grau de Incapacidade Física no Diagnóstico	38	0 - Grau Zero 1 - Grau I 2 - Grau II 3 - Não Avaliado	39	Modo de Entrada	40	1 - Caso Novo 2 - Transferência do mesmo município (outra unidade) 3 - Transferência de Outro Município (mesma UF) 4 - Transferência de Outro Estado 5 - Transferência de Outro País 6 - Recidiva 7 - Outros Reingressos 9 - Ignorado	41	Modo de Detecção do Caso Novo	42	1 - Encaminhamento 2 - Demanda Espontânea 3 - Exame de Coletividade 4 - Exame de Contatos 5 - Outros Modos 9 - Ignorado	43	Baciloscópio	44	1. Positivo 2. Negativo 3. Não realizado 9. Ignorado	45	Data do Início do Tratamento	46	Esquema Terapêutico Inicial 1 - PQT/PB/6 doses 2 - PQT/MB/12 doses 3 - Outros Esquemas Substitutos	47	Número de Contatos Registrados			Observações adicionais:				Investigador	Município/Unidade de Saúde Nome Hanseníase		Código da Unid. de Saúde Assinatura SVS 30/10/2007																																				
	18	UF	19	Município de Residência																																																																																																								
	20	Bairro	21	Logradouro (rua, avenida,...)																																																																																																								
	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)																																																																																																								
	24	Geo campo 2	25	Ponto de Referência																																																																																																								
	26	(DDD) Telefone	27	CEP																																																																																																								
	28	Zona	29	1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado																																																																																																								
	30	Pais (se residente fora do Brasil)																																																																																																										
	31	Nº do Prontuário	32	Ocupação																																																																																																								
	33	Nº de Lesões Cutâneas	34	Forma Clínica 1 - I 2 - T 3 - D 4 - V 5 - Não classificado																																																																																																								
35	Classificação Operacional	36	Nº de Nervos afetados 1 - PB 2 - MB																																																																																																									
37	Avaliação do Grau de Incapacidade Física no Diagnóstico	38	0 - Grau Zero 1 - Grau I 2 - Grau II 3 - Não Avaliado																																																																																																									
39	Modo de Entrada	40	1 - Caso Novo 2 - Transferência do mesmo município (outra unidade) 3 - Transferência de Outro Município (mesma UF) 4 - Transferência de Outro Estado 5 - Transferência de Outro País 6 - Recidiva 7 - Outros Reingressos 9 - Ignorado																																																																																																									
41	Modo de Detecção do Caso Novo	42	1 - Encaminhamento 2 - Demanda Espontânea 3 - Exame de Coletividade 4 - Exame de Contatos 5 - Outros Modos 9 - Ignorado																																																																																																									
43	Baciloscópio	44	1. Positivo 2. Negativo 3. Não realizado 9. Ignorado																																																																																																									
45	Data do Início do Tratamento	46	Esquema Terapêutico Inicial 1 - PQT/PB/6 doses 2 - PQT/MB/12 doses 3 - Outros Esquemas Substitutos																																																																																																									
47	Número de Contatos Registrados																																																																																																											
Observações adicionais:																																																																																																												
Investigador	Município/Unidade de Saúde Nome Hanseníase		Código da Unid. de Saúde Assinatura SVS 30/10/2007																																																																																																									