



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

---



**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DAS MOLÉCULAS  
COESTIMULATÓRIAS CD80 E CD86 EM PACIENTES  
PORTADORES DE HANSENÍASE**

**Maisa Porto dos Santos**

**Manaus - AM**

**2012**



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

---



**MAISA PORTO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DAS MOLÉCULAS  
COESTIMULATÓRIAS CD80 E CD86 EM PACIENTES  
PORTADORES DE HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Lucia de Paula**

**Coorientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca**

**MANAUS**

## **DEDICO**

**Aos meus pais Raimundo José e Magna Santos, pelo intenso amor e carinho com que me ensinaram a viver, pela minha formação, por serem exemplos de vida e principalmente por acreditarem e apoiarem mesmo sem entenderem meu trabalho e sempre torcerem pelo meu sucesso.**

## Agradecimentos

- A Deus, pela minha existência e por estar sempre ao meu lado mostrando os melhores caminhos a serem seguidos;
- À professora Dra. Lucia de Paula, pela orientação, por tudo que me ensinou, pela compreensão e confiança;
- Ao Dr. Felipe Naveca pela coorientação e por estar sempre pronto para esclarecer as dúvidas em Biologia Molecular;
- Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pelo conhecimento transmitido;
- A todos os voluntários que aceitaram a participar do estudo doando preciosas amostras de sangue;
- A todos os meus amigos de pós-graduação pela companhia durante estes 2 anos em especial a George Villarouco, Isabella Passos, Matilde Contreras e Raika Guimarães;
- Ao meu amigo George Villarouco, que me acompanha desde a época da graduação pelo apoio, compreensão e amizade constantes tanto na vida pessoal quanto na profissional;
- Aos professores Dr. Antonio Luiz Boechat e Dra. Aya Sadahiro, que prontamente me ajudaram com as análises estatísticas;
- Aos meus irmãos e os meus sobrinhos por fazerem parte de minha vida e dos momentos de felicidades e tristeza;
- Ao Diego Lucena, pela paciência nos momentos de maior estresse, mas, sobretudo, pelo seu companheirismo, apoio e por ter me ensinado o que significa amor;
- Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta, pela amizade e todo o carinho;
- Ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro para realização do estudo;
- Enfim, a todas as pessoas que de uma maneira, prestaram o seu apoio e incentivo para realização deste trabalho.

**“... O futuro é uma astronave que tentamos pilotar. Não tem tempo nem piedade, nem tem hora de chegar. Sem pedir licença muda nossa vida e depois convida a rir ou chorar...”.**

**Toquinho - Aquarela**

## Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que é influenciada por aspectos genéticos do hospedeiro. Os pólos da hanseníase são ocupados por espectros imunológicos opostos, de um lado pela forma tuberculoide, com predominante resposta imunológica Th1 e do outro pela forma virchowiana, com predominante resposta Th2. Durante o desenvolvimento da resposta imune, além do sinal antígeno-específico é necessário um segundo sinal para ativação dos linfócitos T, denominado coestimulação. Este sinal pode ser fornecido pelas moléculas CD80 e CD86 presentes nas superfícies das células apresentadoras de antígenos. A ligação destas moléculas aos receptores CD28 e CTLA-4 presentes nos linfócitos T conduz à ativação ou à inibição da resposta imune, respectivamente. A baixa regulação de CD80 e CD28 em pacientes com hanseníase borderline virchowiana ou virchowiana pode ser responsável pela defeituosa sinalização de células T específicas para os antígenos de *M. leprae* pela via CD80/CD28. Isto pode levar à inativação clonal de células T reativas aos antígenos de *M. leprae* e, conseqüentemente, o bacilo cresceria sem restrição nos macrófagos. No presente trabalho foi investigada a possível relação entre polimorfismos presentes nos genes *CD80* e *CD86* com a susceptibilidade à hanseníase e/ou às formas clínicas da doença. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada pelo método de sequenciamento direto. Foram analisados no gene *CD80* seis SNP localizados na região promotora (-454 C/A, -387 T/C, -232 G/A, -79 C/G, -7T/C e +5C/A) e um polimorfismo de inserção/deleção (-557\_-561 CATGA) e no gene *CD86* foi analisado um SNP no éxon 8, posição +1057G/A. Quanto ao gene *CD86* foi observada distribuição genotípica semelhante entre os pacientes e indivíduos controles, sendo os genótipos G/G e G/A os mais prevalentes em ambas as populações. Também não foram observadas diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas entre os pacientes com hanseníase e indivíduos controles referentes aos polimorfismos do gene *CD80*. Embora CD80 e CD86 tenham funções importantes na resposta imune os dados obtidos neste estudo demonstram que os polimorfismos analisados não têm influência na susceptibilidade à hanseníase e/ou diferentes formas clínicas da hanseníase.

**Palavras-chave:** Hanseníase; Polimorfismos; Moléculas Coestimulatórias; CD80 e CD86.

## Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that is influenced by host genetic. The poles of the leprosy are occupied by spectrum immunological opposite of the tuberculoid one hand, predominantly of the Th1 immune response and the other by the lepromatous, with predominant Th2 immune response. During the development of immune response, beyond antigen-specific signal is necessary a second signal for activation of T lymphocytes, termed costimulation. This signal can be delivered by costimulatory molecules CD80 and CD86 present on cell surfaces of antigen presented. The binding of these molecules to the receptors CD28 and CTLA-4 T lymphocytes present in the leads to the activation or inhibition of immune response, respectively. The down-regulation of CD80 and CD28 in patients with lepromatous leprosy, and lepromatous borderline can be responsible for defective signaling T cell specific for the antigens of *M. leprae* through CD80/CD28. This can lead to clonal inactivation of T cells reactive to antigens of *M. leprae*, and consequently, the bacillus grows without restraint in macrophages. In this work we investigated the possible relationship between this polymorphism in the CD80 and CD86 genes with susceptibility to leprosy and/or clinical forms of the disease. Genotyping of polymorphisms was performed by direct sequencing. CD80 were analyzed six gene SNPs located in the gene promoter region (-454 C/A, -387 T/C, -232 G/A, -79 C/G, -7 T/C and +5 C/A) and Polymorphism insertion/deletion (-557\_-561 CATGA) and the CD86 gene was analyzed a SNP in exon 8, position +1057 G/A. For the CD86 gene was observed a similar genotype distribution among leprosy patients and control subjects, and the genotypes G/G and G/A the most prevalent in both populations. There were also no significant differences between the allelic and genotypic frequencies among leprosy patients and healthy controls regarding the polymorphisms of the CD80 gene. Although CD80 and CD86 have important functions in the immune response data obtained in this study demonstrate that the analyzed polymorphisms do not influence the susceptibility to leprosy and/or different clinical forms of leprosy.

**Keywords:** leprosy; polymorphisms; costimulatory molecule; CD80; CD86,

## Lista de figuras

- Figura 1** Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*.
- Figura 2** Taxas de prevalência de hanseníase, os dados relatados no início janeiro de 2011
- Figura 3** Taxas de detecção de casos novos de hanseníase do início de 2011.
- Figura 4** Coeficiente de detecção geral de casos novos de hanseníase no Brasil e nas regiões, 1990 a 2010.
- Figura 5** Coeficiente de detecção de hanseníase na capital, interior e estado do Amazonas de 1989 a 2010.
- Figura 6** Modelo esquemático do espectro clínico da hanseníase, sugerindo a participação de conjuntos diferentes de genes no controle das duas etapas da patogênese da doença.
- Figura 7** Moléculas coestimulatórias das famílias B7 e seus receptores da família CD28.
- Figura 8** Sequência da região promotora do gene *CD80* (sentido 5'-3'), ilustrando o segmento amplificado por PCR, as posições dos SNP e os oligonucleotídeos iniciadores.
- Figura 9** Sequência do *éxon 8* do gene *CD86* (sentido 5'-3'), ilustrando o segmento amplificado por PCR, a posição do SNP e os oligonucleotídeos iniciadores.
- Figura 10** Gel de agarose 1% corado com SYBR Safe representando as amplificações da região promotora do gene *CD80* de participantes da pesquisa.
- Figura 11** Fluxograma com as principais etapas desenvolvidas ao longo do trabalho.



## Lista de tabelas

- Tabela 1** Volume e concentração final dos reagentes utilizados para a amplificação dos genes *CD80* e *CD86*.
- Tabela 2** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *CD80* e *CD86*.
- Tabela 3** Volume e concentração final dos reagentes utilizados para sequenciamento de *CD80* e *CD86*.

## Lista de abreviaturas

- APC** – células apresentadoras de antígeno
- BAAR** – Bacilo álcool ácido resistente
- BT** – borderline tuberculoide
- BB** – borderline-borderline
- BL** – borderline lepromatosa
- CMI** – Imunidade Mediada por Células
- CD80** - Gene que codifica a proteína CD80
- CD86** - Gene que codifica a proteína CD86
- CTLA-4** - *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- HI** – Hanseníase indeterminada
- HB** – Hanseníase borderline
- LL** – Hanseníase lepromatosa ou virchowiana
- MB** – Multibacilar
- MHC** – complexo principal de histocompatibilidade
- mM** – Milimolar
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PB** - Paucibacilar
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PGL -I** - Glicolípido fenólico - I
- PQT** – Poliquimioterapia
- SNP** – Polimorfismo de nucleotídeo único
- TCLE** – Termo de Consentimento Livre Esclarecido
- TCR** – Receptor de célula T
- TLR** – Receptor semelhante ao Toll
- TT** – Hanseníase tuberculoide
- μL** – Microlitros

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>4</b>
2.1	Hanseníase e bacilo de Hansen .....	4
2.2	Classificação da hanseníase .....	6
2.3	Aspectos epidemiológicos .....	7
2.4	Manifestações clínicas e imunológicas .....	12
2.4	Genética na hanseníase .....	14
2.5	Moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 .....	16
2.6	Polimorfismos dos genes CD80 e CD86 .....	19
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>23</b>
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivos específicos .....	23
<b>4</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>24</b>
4.1	Tipo de estudo e aspectos éticos.....	24
4.2	População de estudo .....	24
4.2.1	Pacientes com hanseníase .....	25
4.2.2	Indivíduos controle .....	25
4.3	Material biológico .....	26
4.4	Extração de DNA .....	26
4.5	Quantificação de DNA.....	27
4.6	Genotipagem das mutações de CD80 e CD86 .....	27
4.6.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
4.6.2	Purificação e quantificação do produto da PCR .....	31
4.6.3	Reação de sequenciamento.....	32
4.6.4	Purificação da reação de sequenciamento.....	33
4.6.5	Eletroforese capilar .....	33
4.7	Análise estatística .....	34
<b>4.8</b>	<b>Fluxograma de procedimentos.....</b>	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>36</b>
	Artigo de Revisão: Polimorfismos genéticos: potenciais marcadores da patogênese da hanseníase .....	36
	Artigo Original: A lack of an association between CD80 and CD86 genes polymorphisms and leprosy susceptibility or its clinical presentation in a Brazilian Amazon population. ....	52
	<b>Apêndices .....</b>	<b>68</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>77</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>81</b>

## 1 Introdução

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, de amplo espectro clínico, que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos sendo influenciada por aspectos genéticos do hospedeiro (MENDONÇA et al., 2008; CARDOSO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011).

As formas clínicas da hanseníase estão diretamente relacionados com a imunidade do hospedeiro. A resposta imune celular (CMI) do hospedeiro é de extrema importância no controle da infecção e durante estas alterações fisiológicas do organismo, podendo resultar na cura ou na evolução para uma das formas clínicas da hanseníase (MORAES et al., 2006). A forma clínica tuberculoide (TT) reflete a CMI com contenção do bacilo, caracterizada pela formação de granulomas epitelioides. Inversamente, a hanseníase virchowiana ou lepromatosa (LL ou VV) apresenta resposta imune predominantemente humoral com disseminação do bacilo, onde podem ser encontrados nódulos e tubérculos, além do comprometimento de múltiplos troncos nervosos (MENDONÇA et al., 2008). Dentro do espectro clínico da doença, a hanseníase borderline é a forma clínica que caminha entre os pólos tuberculoide e lepromatoso e pode ser dividida em três subtipos: borderline tuberculoide (BT), borderline borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL) (GOULART et al., 2002; SCOLLARD et al., 2006).

Para o desenvolvimento da resposta imune, além do sinal antígeno-específico, resultante da ligação do receptor da célula T (TCR) ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) associado ao antígeno, um segundo sinal é necessário para a efetiva ativação dos linfócitos T, este sinal coestimulatório pode ser induzido pelas moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC) (LENSCHOW et al., 1996). As moléculas CD80 e CD86 pertencem à família de moléculas B7 presentes nas APC e ligam-se aos membros da família de receptores CD28 nas células T. A união de B7/CD28 é responsável pela maior parte da atividade coestimulatória fornecida pelas APC para ativação das células T *naïves* (WANG e CHEN, 2004).

Agrewala et al., (1998) observaram que a expressão de CD28 e CD80 é significativamente diminuída em células mononucleares de pacientes com hanseníase BL e VV que não fazem uso

da poliQuiomioterapia (PQT). Também foi demonstrado que a expressão de mRNA de CD80 e CD86 é aumentada em biópsias de pele de pacientes TT em comparação com pacientes VV (SCHLIENGER et al., 1998).

A falha na resposta imunológica mediada por células específicas do hospedeiro resulta na infecção *pelo M. leprae*, porém as razões pelas quais a imunidade celular encontra-se diminuída são amplamente discutidas na literatura. Além dos fatores ambientais que determinam a doença, fatores genéticos tanto do hospedeiro quanto do *M. leprae* são importantes na interação patógeno - hospedeiro.

Recentemente, diversos genes e regiões genômicas do hospedeiro humano foram relacionados ao controle da susceptibilidade à hanseníase e às diferentes formas clínicas da doença. Diversos estudos indicam que variações genéticas no sistema imune do hospedeiro (polimorfismos genéticos) podem alterar o seu perfil imunológico, podendo influenciar na susceptibilidade e no curso da infecção (MORAES et al., 2006; ZHANG et al., 2009; CARDOSO et al., 2011).

A baixa regulação de CD80, CD86 e CD28 em pacientes com hanseníase BV/VV pode ser responsável pela defeituosa sinalização de células T pela via B7/CD28, podendo levar à inativação clonal de células T reativas aos antígenos de *M. leprae* e, conseqüentemente, proliferação bacilar nos macrófagos. O sinal coestimulatório é essencial para ativação dos linfócitos e desencadeamento de uma resposta imune adaptativa. Nesse processo as moléculas coestimulatórias são de extrema importância, fornecendo o segundo sinal de ativação e devido a essa função alguns estudos investigam polimorfismos dos genes que as codificam. Essas variantes podem estar relacionadas a mudanças na função ou com aos níveis de expressão dessas moléculas podendo interferir na susceptibilidade às diversas doenças.

Tendo em vista o panorama acima exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal testar a hipótese de que polimorfismos em genes que codificam as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 implicadas na resposta imune sejam corresponsáveis pela diferença de susceptibilidade à hanseníase.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Hanseníase e bacilo de Hansen

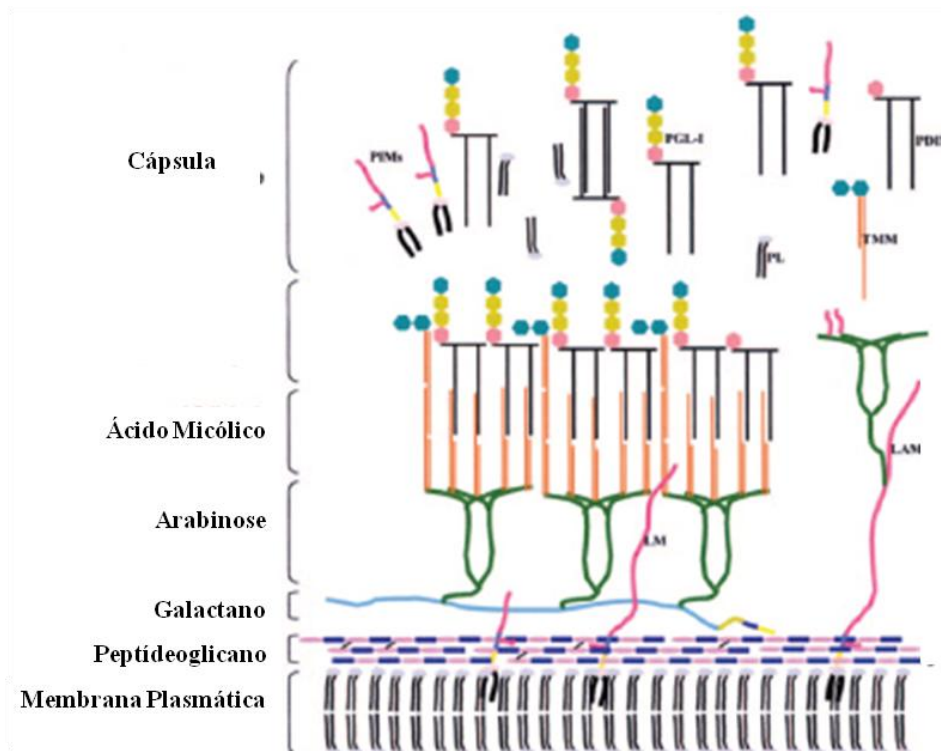
A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, proveniente de infecção causada pelo *Mycobacterium leprae*, sendo descrita desde 4000 a.c, nos papiros do Egito antigo (TAN e GRAHAM, 2008). Esta doença é transmitida de pessoa para pessoa, no convívio com doentes multibacilares (doentes bacilíferos) que ainda não iniciaram o tratamento, os quais possuem carga bacilar suficiente para favorecer a transmissão (TALHARI et al., 2006).

O contato com *M. leprae* se faz principalmente pelas vias aéreas superiores e a infecção subclínica ocorre em uma grande proporção da população, sendo que as principais fontes de bacilos são as mucosas das vias aéreas superiores. *M. leprae* apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade, embora a maioria da população (mais de 95%) seja naturalmente imune (TALHARI e NEVES, 1997).

A hanseníase afeta, principalmente, a pele e os nervos periféricos e não teria a importância que tem em saúde pública se fosse apenas uma doença de pele contagiosa, mas em decorrência do acometimento do sistema nervoso periférico surgem a perda de sensibilidade, as atrofias e paralisias musculares que, se não diagnosticadas e tratadas adequadamente, podem evoluir para incapacidades físicas permanentes e deformidades nos pacientes, ocasionando danos psicológicos e estigma social (DUERKSEN, 1997; BRASIL, 2011).

O agente etiológico da hanseníase, *M. leprae* (Bacilo de Hansen) descoberto por Gerhard Henrik Armauer Hansen, na Noruega em 1873, faz parte do grupo de bactérias patogênicas mais antigas conhecidas pelo homem. É um bacilo intracelular obrigatório que infecta macrófagos e células de Schwann, porém não é cultivável em meios artificiais. Possui forma de bastonete reto ou ligeiramente curvado, de 1 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,3  $\mu\text{m}$  de largura. Apresenta parede celular constituída por uma camada de peptidoglicano, que se liga covalentemente ao açúcar arabinogalactano e posteriormente ao ácido micólico. *M. leprae* também apresenta um folheto externo formado pelo ácido micólico que se intercala com o ácido micoserosoico e glicolípídeos

fenólicos (PGL). Devido à composição de sua parede celular, o bacilo cora-se de vermelho pela fucsina e não se descolora pela lavagem no álcool e ácidos, o que o caracteriza como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (BRYCESON e PFALTZGRAFF, 1990; SCOLLARD et al., 2006; TALHARI, et al., 2006).



**Figura 1** - Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*.

**Fonte:** Scollard et al., (2006).

Os bacilos podem mostrar-se uniformemente sólidos, fragmentados ou granulados. O aspecto fragmentado e granuloso parece indicar sofrimento bacilar por ação de medicamentos e é observado em paciente em tratamento (TALHARI e NEVES, 1997). Em esfregaços de pele ou em cortes histológicos, os bacilos podem ser vistos isolados, em grupamentos variados e em arranjos especiais denominados globias, que constituem uma característica peculiar do *M. leprae* (TALHARI et al., 2006).

O sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* revelou perda de grande número de genes em comparação com o *M. tuberculosis*. O genoma do *M. leprae* contém 3.27-megabase (Mb), enquanto o do *M. tuberculosis* possui 4.41 Mb. No *M. leprae* persistem genes necessários para a produção de enzimas importantes para a sobrevivência do bacilo nas células hospedeiras. A manutenção de um conjunto mínimo de genes pode ser a explicação para algumas características únicas do *M. leprae*, tais como a incapacidade de ser cultivado em meio artificial, o longo tempo de duplicação e a altíssima especificidade por seus alvos celulares (COLE et al., 2001).

## 2.2 Classificação da hanseníase

A primeira classificação internacionalmente aceita foi proposta em um congresso em Madri em 1953, pelo dermatologista brasileiro Rabelo Junior, enquadrando os pacientes com hanseníase em quatro grupos: o grupo transitório, inicial da doença chamado de forma indeterminada (HI) que poderia evoluir para as demais formas; o pólo tuberculoide (TT); com as formas borderline (B) ou dimorfa (D); e o pólo virchowiano ou lepromatoso (VV e LL). Essa classificação era baseada nos aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase. Ridley e Jopling em 1966 propuseram modificação e subdividiram o grupo borderline em: borderline borderline (BB), borderline tuberculoide (BT) e borderline lepromatoso (BL), surgindo assim, cinco formas clínicas. Essa classificação adota critérios clínicos e bacteriológicos e enfatiza os aspectos imunológicos e histopatológicos (JOPLING e MCDUGALL 1991; TALHARI e NEVES, 1997).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) desde a introdução da PQT, em 1982, propôs uma classificação simplificada e operacional para fins de orientação terapêutica, classificando os pacientes com hanseníase em: paucibacilar (PB) com até cinco lesões de pele, até um tronco nervoso acometido e baciloscopia negativa; e em multibacilar (MB) mais de cinco lesões de pele, mais de um tronco nervoso acometido e baciloscopia positiva. Esta classificação é utilizada para delimitar melhor o esquema terapêutico e os pacientes PB e MB recebem tratamento de 6

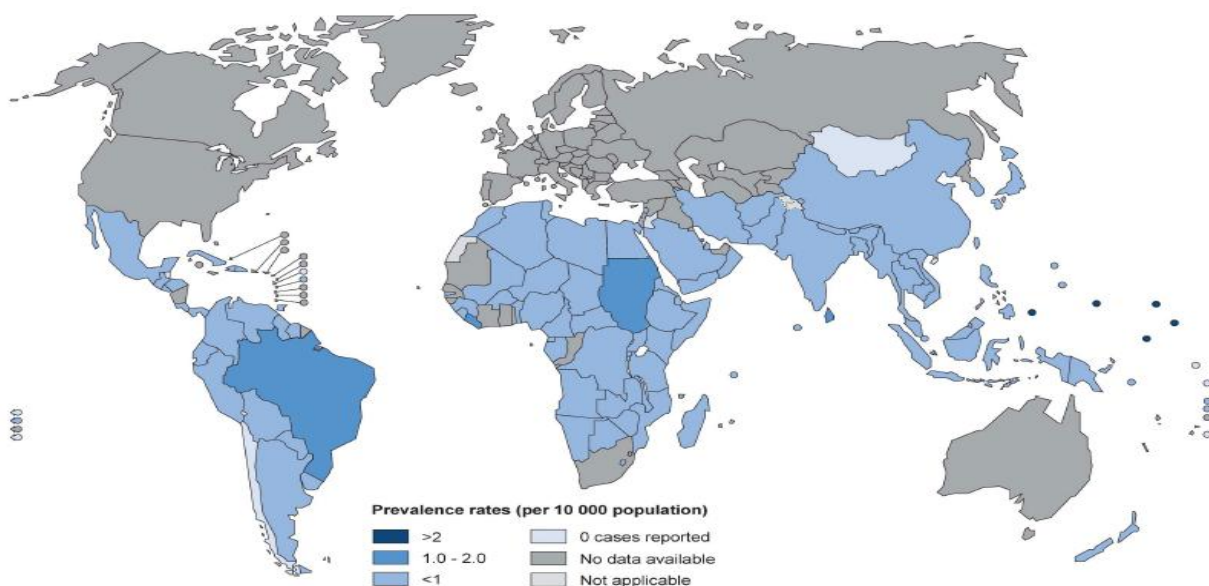


meses e 12 meses, respectivamente. As formas TT, BT e I são chamadas de formas PB, devido ao limitado número de bacilos encontrados. Já as formas BB, BL e LL constituem as formas MB, apresentando uma elevada carga bacilar (BRASIL, 2002).

### 2.3 Aspectos epidemiológicos

A hanseníase constitui importante problema de saúde pública em alguns países da América Latina, da Ásia e da África onde é considerada uma doença endêmica (**Figura 2**). Durante muitos anos o controle da doença foi um grande desafio para as políticas públicas, até que em 1982 a OMS introduziu a poliquimioterapia (PQT). A partir de então houve uma redução drástica na prevalência e na detecção de casos novos de hanseníase no mundo. Globalmente, o número de casos novos decresceu, de 407.791 no ano de 2004 para 228.474 em 2010 (WHO, 2011).

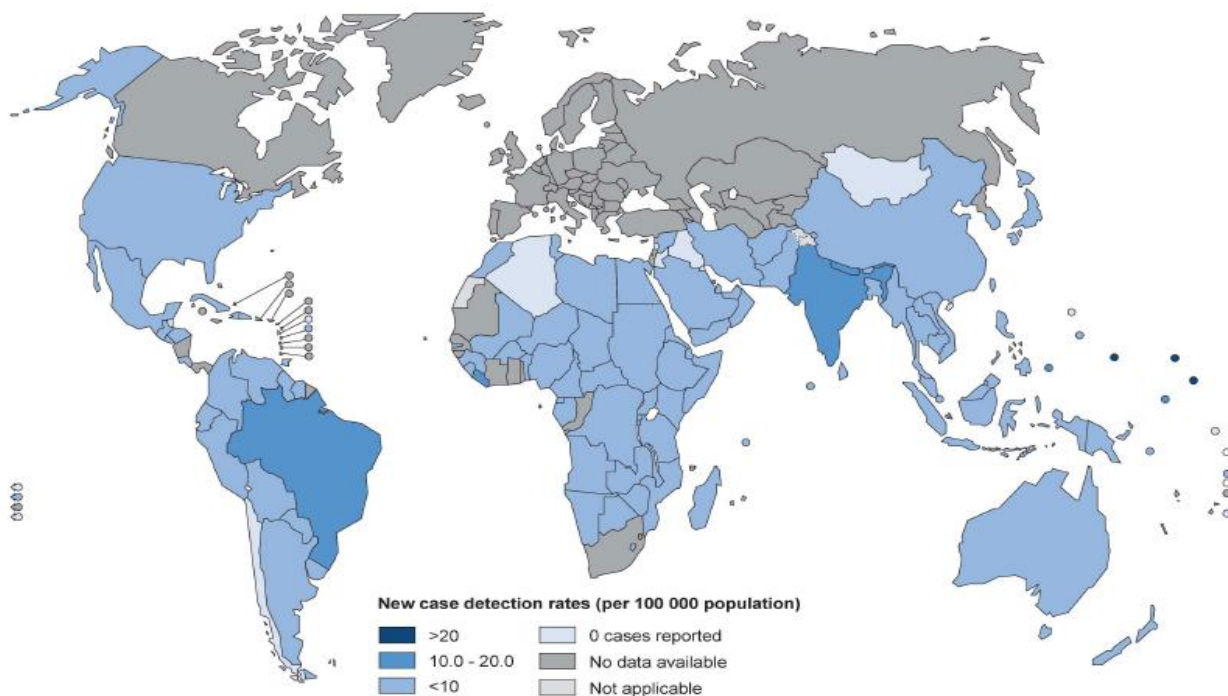
De acordo com OMS (WHO, 2011), no início do ano de 2011 foram reportados 130 países ou territórios apresentando casos de hanseníase: 36 países da Região da África, 27 da Região das Américas, 10 da Região Sudeste da Ásia, 22 da Região Leste do Mediterrâneo e 35 da Região do Pacífico Ocidental onde a prevalência global registrada da hanseníase no início de 2011 foi de 192.246 casos, enquanto o número de casos novos detectados durante 2010 foi de 228.474 representando um coeficiente de incidência de 3,93/100.000 habitantes. Dezesete países foram responsáveis por 95% dos casos novos detectados em todo o mundo durante 2010 e a Índia ocupou o primeiro lugar com um total de 126.800 seguida do Brasil com um total de 34.894 novos casos (WHO, 2011).



**Figura 2** - Taxas de prevalência de hanseníase, os dados relatados no início janeiro de 2011.

Fonte: WHO, 2011.

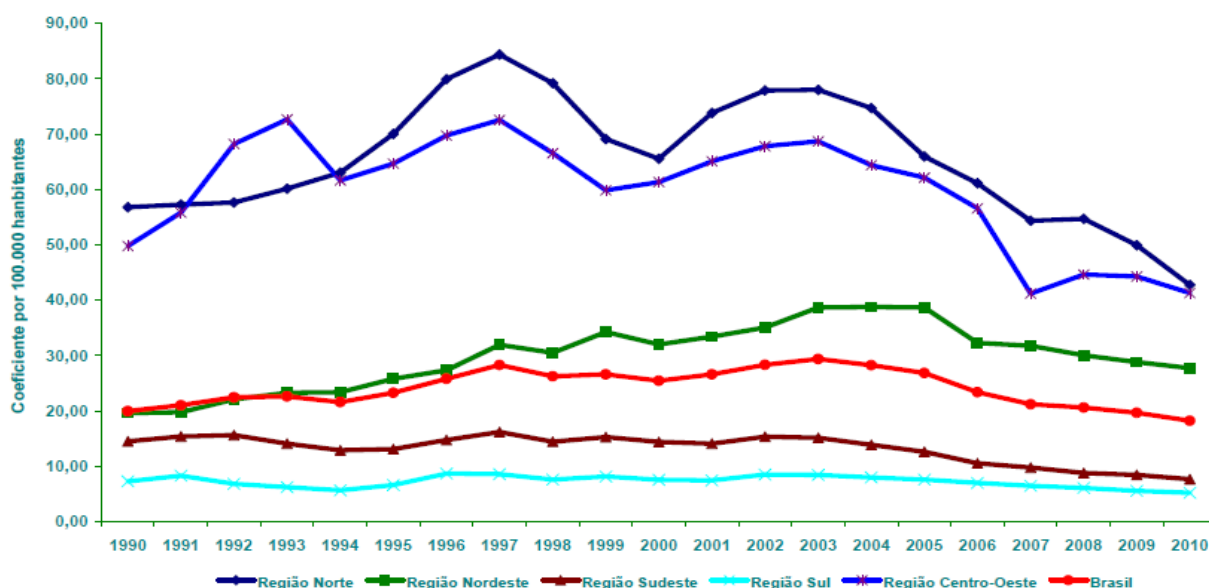
No Brasil ao longo dos anos de 2005 a 2010 houve redução do número de casos novos detectados, tendo o registro de 49.448 casos novos detectados em 2005 sido reduzido para 34.894 casos em 2010. No ano de 2010 a prevalência da hanseníase foi de 29.761 casos, com coeficiente de prevalência de 1,56 por 10.000 habitantes. No ano de 2011, dados preliminares do Ministério da Saúde (MS) mostram uma prevalência de 23.660 casos e coeficiente de prevalência de 1,24/10.000 habitantes, não conseguindo ainda alcançar a meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (definida como prevalência inferior a um caso a cada 10 mil habitantes) (**Figura 2**). Neste mesmo período foram notificados 30.298 casos novos com coeficiente geral de detecção de 15,88 por 100.000 habitantes como demonstrado na **Figura 3** (BRASIL, 2012). Apesar da tendência na redução de casos novos no Brasil a situação da hanseníase, na maioria dos Estados brasileiros ainda é preocupante e as regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste ainda se mantêm em patamares muitos elevados, quando comparados aos Estados das regiões Sul e Sudeste (**Figura 4**) (BRASIL, 2011).



**Figura 3** - Taxas de detecção de casos novos de hanseníase do início de 2011.

**Fonte:** OMS, 2011.

A **Figura 4** mostra o coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase, para o Brasil e regiões, no período 1990-2010. Observa-se que o país, de maneira geral, vem apresentando redução na detecção de casos novos, no período analisado e também do coeficiente de detecção de casos novos em todas as regiões geográficas. Os maiores coeficientes de detecção por região geográfica foram verificados nas regiões Norte e Centro-Oeste. A redução na detecção de casos novos teve início entre 2002-2004 e se manteve até o ano de 2010.



**Figura 4** - Coeficiente de detecção geral de casos novos de hanseníase no Brasil e nas regiões, 1990 a 2010.

**Fonte:** Sinan/SVS-MS, 2011

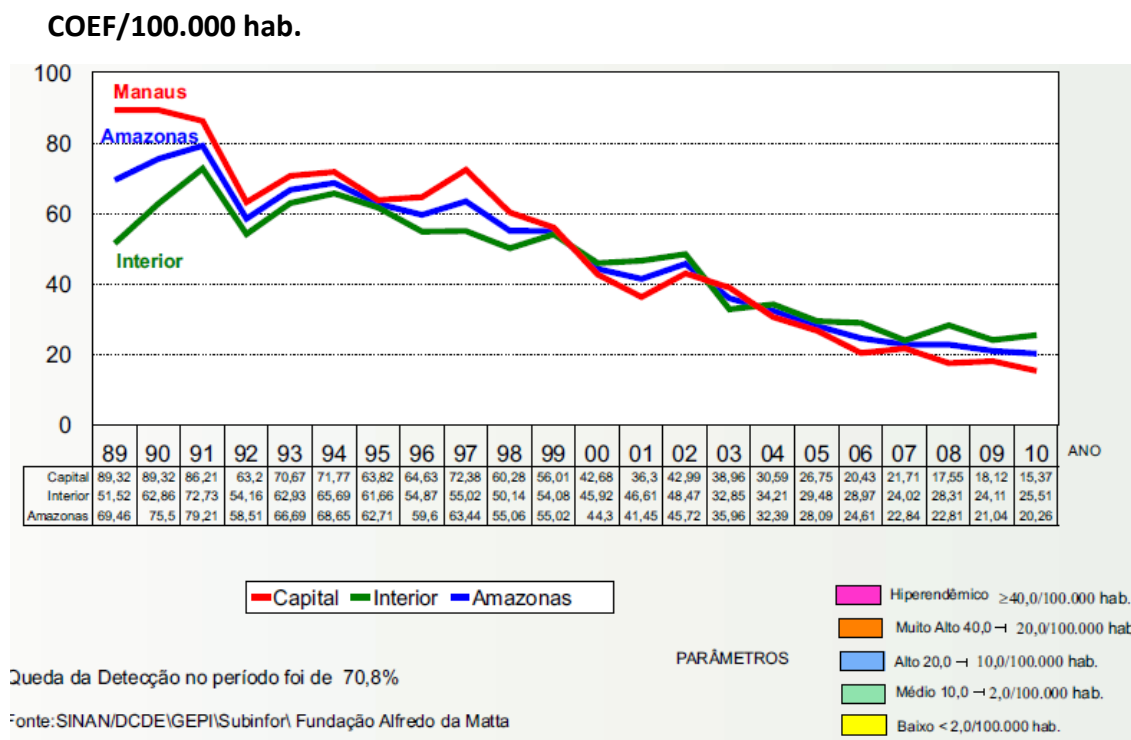
([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf\\_5\\_coeficiente\\_deteccao\\_geral\\_casos1990\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf_5_coeficiente_deteccao_geral_casos1990_2010.pdf)).

A região Norte apresentou nos últimos anos um coeficiente de detecção com valor médio de 67,57/100.000 habitantes tendo classificação hiperendêmica segundo parâmetro do MS, variando de 84,40/100.000 em 1997, o mais alto índice registrado e 54,34/100.000 em 2007 (BRASIL, 2009). Dados preliminares do Ministério da Saúde mostram que no ano de 2011 foram notificados 6.343 casos novos de hanseníase na região Norte com coeficiente de detecção de 39,98, ainda classificada como muito alto segundo parâmetros do MS apesar da tendência à redução na detecção (BRASIL, 2012). Na região Centro-Oeste, o coeficiente apresentou um valor médio de 60,77/100.000 habitantes, variando de 68,69/100.000, em 2003 e 40,65/100.000, em 2007. A média do coeficiente, para o período, referente à região Nordeste foi de 35,48/100.000 habitantes, sendo o valor anual mais baixo de 31,53/100.000, em 2007, e o mais alto, de 38,75/100.000, registrado em 2004. Na região Sudeste, o coeficiente ascendeu de 14,06/100.000 habitantes, em 2001, para 15,32/100.000 em 2002, e decresceu até 9,75/100.000 em 2007. Já na região Sul, onde foram registrados os valores mais baixos do país,

o coeficiente passou de 7,44/100.000 em 2001 a 8,50/100.000 em 2002, decrescendo até 2007, quando alcançou 6,45/100.000 habitantes (BRASIL, 2008).

No Estado do Amazonas em 2008 foram detectados 710 casos novos de hanseníase, representando um coeficiente de detecção de 21,25 casos/100.000 habitantes (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). No ano de 2010 foram detectados 814 casos de hanseníase no Estado, sendo 706 (86,7%) casos novos. Do total de casos novos, 277 (39,2%) eram residentes da cidade de Manaus e 429 (60,8%) de outros municípios. A capital do Estado no período de 1989 a 2010 apresentou comportamento descendente com uma queda de detecção de 82,8% diferente do interior do Estado que vem apresentado comportamento instável, com aumento no coeficiente de detecção de casos novos no ano de 2010, como demonstrado na **Figura 5** (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO FUAM, 2010). Essa redução do coeficiente de detecção observada na capital pode estar diretamente relacionada com execuções de atividades de controle e eliminação da hanseníase realizadas pela Fundação Alfredo da Matta (FUAM) que atua como Centro de Referência Nacional para Programas de Controle em Dermatologia Sanitária, especialmente hanseníase.

Buscando a meta de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, no Brasil, ainda se faz necessária intensificação das ações de vigilância, voltadas especialmente à maior efetividade no diagnóstico e tratamento da doença, especialmente nas regiões mais endêmicas.



**Figura 5** – Coeficiente de detecção de hanseníase na capital, interior e Estado do Amazonas de 1989 a 2010.

**Fonte:** Boletim Epidemiológico da Fundação Alfredo da Matta – 2011 (SIVAN/DCDR/GEPI/Subinfor/FUAM).

## 2.4 Manifestações clínicas e imunológicas

As características clínicas dos pacientes com hanseníase estão diretamente relacionadas com a sua imunidade celular. A doença inicia-se como HI, caracterizada pelo aparecimento de manchas hipocrômicas, com alteração da sensibilidade, ou simplesmente por áreas de hipoestesia na pele (ARAÚJO, 2003), podendo evoluir para cura ou para uma das outras formas clínicas, de acordo com a resposta imune mediada por células (CMI) a ser desenvolvida no hospedeiro ou permanece como HI por um longo período (FOSS, 1999).

Na forma clínica TT as lesões apresentam-se como máculas hipopigmentadas ou placas eritematosas, assimetricamente distribuídas pelo corpo, com alterações tanto sensitivas quanto autonômicas, as quais evoluem para hipostesia e anestesia, hipodrótica, com diminuição ou ausência de pelos. Pacientes TT apresentam padrão de citocinas Th1 com inflamação granulomatosa e destruição dos bacilos. Esses pacientes apresentam uma resposta imune de caráter protetor, caracterizada pela formação de granulomas epitelioides, rodeando os elementos neurovasculares, com denso infiltrado linfocítico. No entanto, em alguns indivíduos essa resposta é muito intensa e pode ocasionar danos neurais. Em indivíduos com hanseníase TT as células dendríticas e macrófagos apresentam mais receptores do tipo toll (TLR) tais como TLR1 e TLR2 em suas superfícies do que os pacientes VV (KRUTZIK, et al., 2003).

Os TLR1 e TLR2 podem formar heterodímeros que ativam a transcrição de genes de citocinas pro-inflamatórias, tais como interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon (IFN- $\gamma$ ), quando estimulados pelo antígeno triacil-lipoproteína (19-kDa e 33-kDa) e a lipoproteína MMP-II (major membrane protein-II) do *M. leprae* (KRUTZIK, et al., 2003; KRUTZIK, et al., 2005; MAEDA, et al., 2005).

Estudos detectaram que polimorfismos nos genes dos receptores TLR1 e TLR2 ocorrem em pacientes com hanseníase. Kang e Chae, (2001) associaram polimorfismo no nucleotídeo 2019C/T do gene *TLR2* em pacientes do polo lepromatoso nascidos na Korea. Posteriormente, observou-se que pacientes com este polimorfismo apresentam deficiência na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, diminuindo a produção de citocinas IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , porém aumentando a produção de IL-10 (KANG et al., 2004).

Pacientes VV apresentam resposta imune predominantemente do tipo Th2, com elevada produção de anticorpos, os quais são ineficazes na eliminação do *M. leprae*. Portanto, nestes pacientes ocorre proliferação disseminada dos bacilos resultando em lesões difusamente distribuídas na pele (SCOLLARD et al., 2006; MENDONÇA et al., 2008).

A imunidade humoral está mais frequente nos indivíduos virchowianos, borderline tuberculoides, borderline borderline e borderline lepromatosos, os quais apresentam altos títulos de anticorpos específicos contra o glicolípido-fenólico 1 (PGL-1), antígeno específico de *M. leprae*, sem, contudo conferir proteção significativa, pois esses indivíduos apresentam uma

grande disseminação bacilar (CHIN-A-LIEN et al., 1992.; SIELING e MODLIN., 1992). A progressiva redução da resposta imune mediada por célula é acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (GOULART et al., 2002) Este grupo de pacientes é altamente complexo e tem instabilidade de formas clínicas. A distinção entre um sub-grupo de maior resistência (borderline tuberculoide) para outro de menor resistência (borderline lepromatoso) baseia-se na indiferenciação progressiva dos macrófagos, diminuição do número de linfócitos, aumento do número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos comprometidos.

A CMI tem um papel chave na hanseníase uma vez que ela protege contra doença e contra a disseminação do bacilo, como acontece na forma clínica tuberculoide já que o bacilo é intracelular obrigatório havendo a participação principalmente de macrófagos e células TCD4<sup>+</sup> Th1, que produzem IFN- $\gamma$  e ativam macrófagos a destruírem micro-organismos intracelulares (GOULART et al., 2002). No entanto, não se sabe ao certo a que se devem as várias apresentações clínicas da hanseníase, mas certamente importante papel é atribuído aos fatores genéticos do hospedeiro, como polimorfismos de receptores e de citocinas (MORAES et al., 2006).

## 2.4 Genética na hanseníase

A hanseníase é uma doença multifatorial, cujo desfecho resulta de uma combinação entre a relação parasita-hospedeiro, fatores ambientais e socioeconômicos. Durante a interação parasita-hospedeiro fatores genéticos humanos e do *M. leprae* são importantes devido à ocorrência da hanseníase ser controlada também por componentes genéticos (MORAES et al., 2006; PREVEDELLO e MIRA, 2007).

O sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* revelou extensa redução de carga genética, com perda de grande número de genes ficando o bacilo restrito a poucas vias metabólicas e ambientes específicos para seu crescimento (COLE et al., 2001). Em um estudo recente a variabilidade genética de quatro cepas do *M. leprae* originadas do Brasil, América do



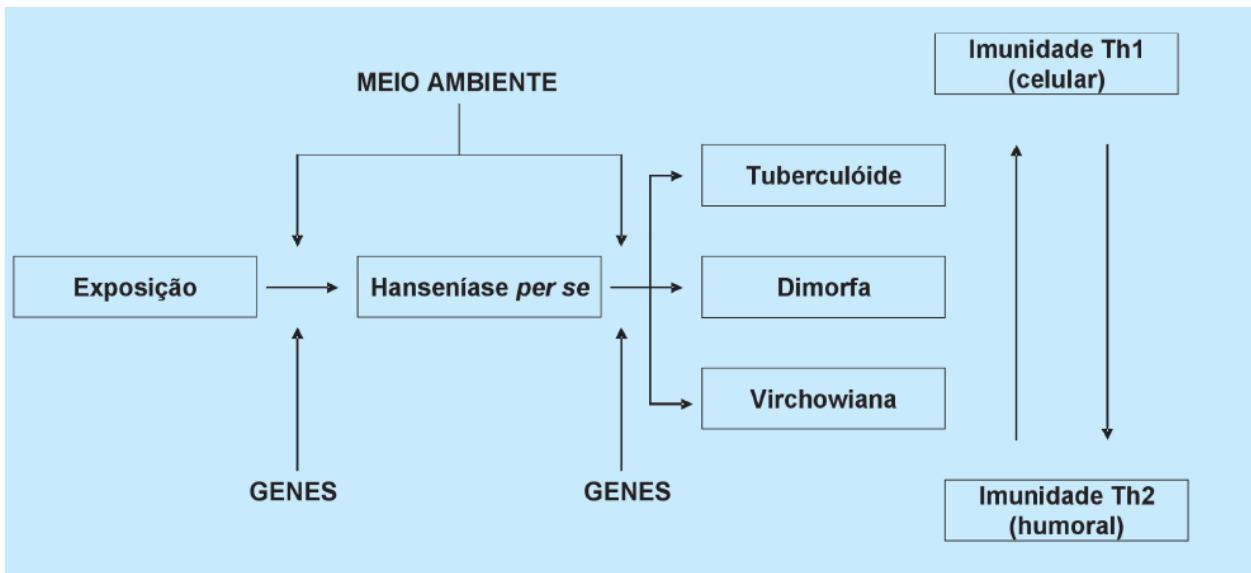
Norte, Índia e da Tailândia foram comparadas e foi observado que estas eram 99,995% idênticas (MONOT et al., 2009). Esses dados mostram que *M. leprae* apresenta baixa variabilidade genética entre as diferentes cepas e, portanto, as diferentes cepas não podem ser responsáveis pelos diferentes padrões clínicos da doença, restando a possibilidade da variabilidade genética humana ser a responsável tanto pela susceptibilidade à hanseníase e/ou às formas clínicas.

A estimativa que somente uma pequena parcela de indivíduos infectados adoece e que a prevalência é dependente da etnia, ou seja, populações com etnias diferentes que convivem em um mesmo ambiente apresentam diferenças na prevalência da doença, reforçaram a teoria de susceptibilidade genética do hospedeiro humano para a hanseníase (BAYLEY et al., 2004).

Rotberg já em 1938 especulava a presença de um “Fator N”, que seria responsável pela resistência natural contra *M. leprae*, presente em 90 a 95% dos indivíduos adultos. As pessoas não portadoras do “Fator N” seriam anérgicas e desenvolveriam a forma lepromatosa após infecção (MACHADO, 2006). Hoje, pode-se especular que o “Fator N” é um conjunto de genes humano interagindo para o desfecho da doença.

A genética dos indivíduos modifica a susceptibilidade à doença em dois momentos distintos, primeiro no controle da infecção *per se*, isto é, a doença independentemente de sua forma de manifestação clínica, e segundo podendo estar associada com o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença, conforme ilustrado na **Figura 6** (PREVEDELLO e MIRA, 2007). Diferentes genes envolvidos na resposta imune têm sido associados à hanseníase *per se* e ao desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença, tais como: *receptor da vitamina D (VDR)* (ROY et al., 1999), *interleucina-10 (IL-10)* (MORAES et al., 2004; SANTOS et al., 2002), *TNF- $\alpha$*  (SANTOS et al., 2002; SANTOS et al., 2000; ROY et al., 1997) *TRL-2* (KANG et al., 2001).

Diversas regiões genômicas do hospedeiro humano foram relacionadas ao controle da susceptibilidade à hanseníase e às diferentes formas clínicas da doença, tais como: as regiões 6q25, 17q11 e 10p13 as quais contêm genes importantes para a resposta imune (MIRA et al., 2004; MILLER et al., 2004; SIDDIQUI et al., 2001).



**Figura 6:** Modelo esquemático do espectro clínico da hanseníase, sugerindo a participação de conjuntos diferentes de genes no controle das duas etapas da patogênese da doença – infecção *per se* e manifestação clínica, após a exposição a maioria dos indivíduos é resistente à hanseníase. Os susceptíveis podem apresentar a infecção *per se* ou desenvolver uma das formas clínicas do espectro da hanseníase, as quais são dependentes do padrão de resposta imune apresentada pelo hospedeiro.

**Fonte:** Prevedello e Mira (2007).

## 2.5 Moléculas coestimulatórias CD80 e CD86

As moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 pertencem à família B7 com 8 membros, os quais incluem: CD80, CD86, ligante do ICOS, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H3, B7-H4 e B7-H6, que ligam-se a diferentes receptores podendo induzir a estimulação ou inibição da resposta de linfócitos T (PETROFF e PERCHELLET, 2010) (**Figura 7**). Com exceção de B7-H4, que é ligada à membrana celular por glicosilfosfatidilinositol (GPI), todas as demais são proteínas transmembranas caracterizadas por domínios extracelulares semelhantes aos domínios variáveis (IgV) e constantes (IgC) das imunoglobulinas (Ig) (COLLINS et al., 2005).

A expressão das moléculas coestimulatórias CD80, CD86 e PDL-2 é restrita às células linfoides, enquanto ICOS-L, PD-L1, B7-H3, B7-H4 e B7-H6 também são expressas em células não

linfoides. Contudo, todas as moléculas coestimulatórias B7 são expressas em células apresentadoras de antígenos, incluindo células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, que funcionam na iniciação e amplificação das respostas imunes (PETROFF e PERCHELLET, 2010).

As moléculas coestimulatórias ligam-se aos membros da família de receptores CD28 nos linfócitos T e, juntos são responsáveis pela maior parte da atividade coestimuladora fornecida pelas APC para ativação dos linfócitos T *naives*. A ligação de moléculas B7 presentes nas células APC ao CD28 promove sinais para os linfócitos T que induzem a expressão de proteínas anti-apoptóticas, estimulam a produção de fatores de crescimento e outras citocinas, e deste modo, promovem a diferenciação e proliferação desses linfócitos T (WANG e CHEN, 2004; ABBAS et al., 2008).

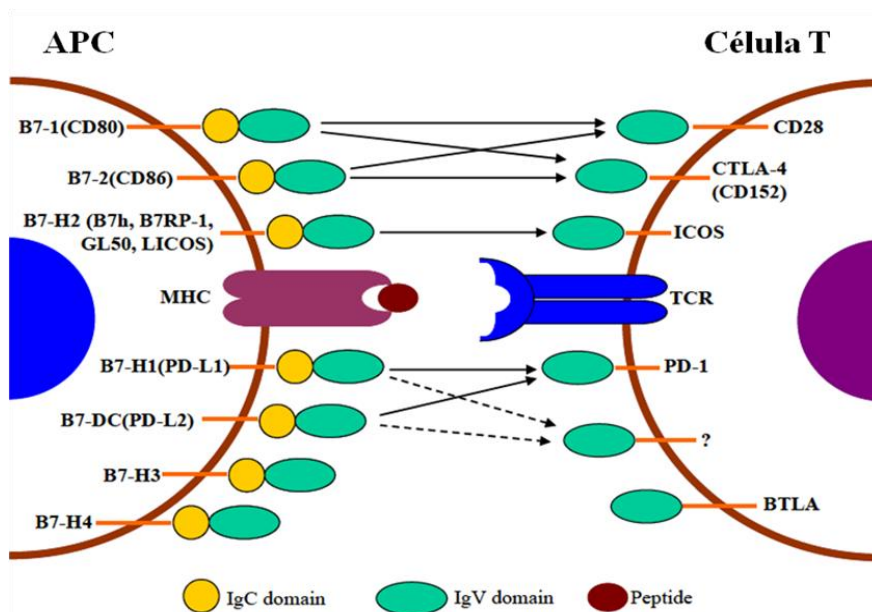
A expressão das moléculas coestimulatórias B7 é aumentada por produtos microbianos que se ligam aos TLR, e por citocinas, como IFN- $\gamma$ , produzidas durante as respostas imunológicas naturais aos micro-organismos. Além disso, os linfócitos T ativados expressam CD40L em sua superfície celular, o qual liga-se ao CD40 expresso pelas APC, enviando sinais que aumentam a expressão dos coestimuladores B7 (ABBAS et al., 2008).

Os membros da família de receptor CD28 nos linfócitos T que ligam-se às moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 presentes nas APC são: CD28 e CTLA-4 (CD152). Esses receptores são proteínas transmembranas que possuem um único domínio semelhante à região variável das imunoglobulinas, e uma cauda citoplasmática com resíduos de tirosina. Tanto CD28 quanto CTLA-4 ligam-se ao CD80 e CD86, embora com afinidades diferentes. CTLA-4 exibe uma afinidade para CD80/CD86 que é de 10 a 100 vezes superior ao CD28 (WANG e CHEN, 2004). Pequena quantidade de CTLA-4 é suficiente para que essas moléculas deixem de se ligar a CD28 e liguem-se ao CTLA-4, fazendo dessa forma a modulação do processo de ativação e inibição de linfócitos T (LISNLEY et al., 1991).

CTLA-4, ou seu recombinante solúvel sintético CTLA-4Ig, na ligação com as moléculas coestimulatórias B7 (CD80 e CD86) de APC, induzem a expressão da enzima indolamina-2, 3-dioxigenase (IDO), uma enzima citosólica que cataliza a etapa inicial do aminoácido essencial triptofano na via das quinureninas que, por sua vez, inibem a imunidade mediada por linfócitos

T. Por outro lado, CD28 durante a interação inibe IDO via expressão aumentada de sinalizador de supressão de citocina 3 (SOCS3) (GROHMANN et al., 2002; LOGUE e SHA, 2004).

As infecções aumentam a expressão de B7, levando à ligação do CD28 e à ativação dos linfócitos T. Sabe-se, também, que os linfócitos T *naïves* expressam CD28, mas a expressão de CTLA-4 requer a ativação do linfócito T. Portanto os linfócitos T *naïves* usam o CD28 para iniciar suas respostas, mas posteriormente, aumentam a expressão de CTLA-4 e sua ligação com B7 pode inibir as respostas (ABBAS et al., 2008).



**Figura 7** - Moléculas coestimulatórias das famílias B7 e seus receptores da família CD28.

**Fonte:** Wang e Chen, (2004).

As moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 apresentam importante papel frente à resposta imune aos vários agentes infecciosos como: *Leishmania* (BRODSKYN et al., 2001; FAVALI et al., 2005), *Toxoplasma gondii* (MORGADO et al., 2011), *M. tuberculosis* (COROMINA et al., 2004), *Porphyromonas gingivalis* (ZHANG et al., 2004), vírus herpes simples tipo 2 (THEBEU et al., 2002) e citomegalovírus (COOK et al., 2004; ARENS et al., 2011).

Estudos recentes mostram que variações genéticas (polimorfismos genéticos) nos genes que codificam as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 estão relacionados com várias

doenças influenciadas pelo sistema imune, tais como: pênfigo foliáceo (DALLA-COSTA et al., 2010), osteosarcoma (<sup>a</sup>WANG et al., 2011), sarcoma de Ewing (<sup>b</sup>WANG et al., 2011), doença pulmonar obstrutiva crônica (LIU et al., 2010), câncer colorretal (PAN et al., 2010), esclerose sistêmica (ABDALLAH et al., 2006) e oftalmopatia de Graves (LIAO et al., 2011).

O papel das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 também já foi previamente investigado na hanseníase (SANTOS et al., 2007; SRIDEVI et al., 2004; SANTOS et al., 2001; SCHLIENGER et al., 1998; AGREWALA et al., 1998). Agrewala e colaboradores (1998) observaram diminuição da expressão de CD80 e CD28 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes borderline e lepromatosos que não estavam fazendo o uso da PQT. Estudos prévios também demonstraram que a expressão de mRNA de CD80, CD86 e CD28 é aumentada em biópsia de pele de pacientes TT quando comparado com pacientes VV (SCHLIENGER et al., 1998). A expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em APCs apresenta um importante papel para geração de uma eficiente resposta imune celular (LENSCHOW et al., 1996). A baixa expressão das moléculas coestimulatórias observadas em pacientes BV e VV pode estar relacionada com a baixa imunidade celular observada nesse pacientes, diferente do que é observado nos pacientes TT com uma alta resposta ICM.

Apesar dos estudos sobre a importância das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em diversas doenças crônicas, acima descritas e tendo sido demonstrado diminuição na expressão dessas moléculas em pacientes com hanseníase, ainda não foi investigado o papel desses polimorfismos presentes nessas moléculas com a hanseníase e as suas diferentes formas clínicas.

## **2.6 Polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86***

O sinal coestimulatório é essencial para ativação dos linfócitos e desencadeamento da resposta imune adaptativa. Nesse processo as moléculas coestimulatórias são de extrema importância, fornecendo o segundo sinal de ativação e devido a essa função alguns estudos investigam polimorfismos dos genes que as codificam. Essas variantes podem estar relacionadas

às mudanças na função ou com os níveis de expressão dessas moléculas podendo interferir na susceptibilidade às diversas doenças.

Os polimorfismos correspondem à alterações na sequência de nucleotídeos em indivíduos da população. O tipo mais comum de polimorfismo é o *single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no qual há uma mutação de base única, que substitui um nucleotídeo por outro. Os SNP nas regiões codificantes dos genes (cSNP) ou em regiões reguladoras são mais propensos a causar diferenças funcionais do que outros SNP. Embora a maioria dos SNP não afete a função do gene, um grande número de SNP mapeados podem ser possíveis marcadores genéticos (COLLINS et al., 1998). Os SNP não necessariamente possuem alguma relevância no desenvolvimento de doenças, pois podem ser variantes sinônimas nos genes ou entre estes, podem ser funcionais ou mutações causais. Estima-se que no genoma humano existe um SNP a cada 1000-2000 bases e que há seis SNP por região codificadora de cada gene (MATIOLI, 2001).

Os genes *CD80* e *CD86* estão ligados no braço curto do cromossomo 3 (posição q21) e codificam glicoproteínas estruturalmente relacionadas, membros da superfamília das Ig, expressas na membrana de células apresentadoras de antígenos e desempenham papel essencial na ativação ou inibição da proliferação de linfócitos T (COLLINS et al., 2005).

Matsushita et al., (2000) investigaram a região promotora do gene *CD80* e toda região codificadora dos genes *CD80* e *CD86* na população japonesa. Neste trabalho foram detectadas variações nos éxons 3 e 4 e no íntron 5 de *CD80*, e no éxon 8 de *CD86*. Os polimorfismos detectados por Matsushita et al., (2000) encontram-se na região promotora do gene *CD80*, localizados nas posições -454A/C, 387T/C, -232A/G, -79G/C, -7C/T e +5C/A e uma inserção de 5 pares de bases -558 (CATGA). Na região codificado de *CD80* foram encontrados polimorfismos nas posições 452G/A e 614C/G do éxon 3; na posição 1018-12T/G do íntron 5 e na posição 864A/G do éxon 4. O polimorfismo do éxon 4 detectado leva à substituição de aminoácido asparagina/aspartato no códon 186 (N186D), introduzindo uma mudança de carga elétrica e consequentemente, interrompendo os sítios de glicosilação no domínio extracelular carboxila (C). Estudos relatam que o domínio C de CD80 é necessário durante a interação com as moléculas CD28 e CTLA-4 presentes nos linfócitos T (PEACH et al., 1995; VASU et al., 2003).

Na região codificadora do gene *CD86* foi encontrado um SNP na posição +1057G/A que leva à substituição do aminoácido alanina por treonina no códon 304 (A304T) localizados no éxon 8, introduzindo um sítio potencial de fosforilação na região citoplasmática da molécula (DELNESTE et al., 2000; MATSUSHITA et al., 2000). No entanto, ainda não foi descrito se as substituições de aminoácidos citadas acima para os genes *CD80* e *CD86* podem influenciar a via de transdução de sinal, responsável pela ativação dos linfócitos T, durante a resposta imunológica.

No gene *CD80*, outras cinco variações foram identificadas, sendo quatro transições e uma deleção, localizadas no éxon 3 nas posições 138G/A e 144G/A, íntron 2 nas posição -56A/G, sendo estas mutações silenciosas. Outra variação também foi descrita para o éxon 6 nas posições 333A/G e 424delC na região 3' (WEINSHENKER et al., 2000).

Embora alguns estudos tenham demonstrado que polimorfismos na região promotora do gene de *CD80* e no éxon 8 de *CD86*, estes não foram associado com doenças autoimunes (MATSUSHITA et al., 2000; TUROEINEN et al., 2002; TEUTSCH et al., 2004) e sarcoidose (HANDA et al., 2005). Estudos recentes relataram a associação do polimorfismo 1057 G/A do gene *CD86* com patologias diversas. Marín et al. (2005) verificaram que o polimorfismo 1057 G/A do gene *CD86* está envolvido na aceitação de transplante de fígado na população espanhola, podendo diminuir a frequência de rejeição aguda e aumentando sobrevida do enxerto na presença do alelo A e do genótipo AA.

Na população brasileira foi descrita associação com a doença autoimune pênfigo foliáceo, sendo verificada associação negativa com o genótipo A/A do SNP 1057G/A do gene *CD86* e maior susceptibilidade quando o alelo 1057G está presente tanto em homozigose quanto em heterozigose (DALLA-COSTA et al., 2010).

Também foi observado em uma população chinesa que o polimorfismo 1057G/A do gene *CD86* pode contribuir para a susceptibilidade genética ao câncer colorretal (CRC), mostrando uma significativa diferença na distribuição dos genótipos e alelos relacionados a este polimorfismo entre os grupos caso e controle, sendo o genótipo AA associado ao aumento significativo de desenvolvimento do CRC, quando comparado com o genótipo GG (PAN et al., 2010).

Diante do importante papel desempenhado pelas moléculas coestimulatórias na ativação da resposta imune celular, é de fundamental importância averiguar a ocorrência de polimorfismos nos genes que as codificam para verificar um possível envolvimento destes polimorfismos com a susceptibilidade a hanseníase e/ou com suas formas clínicas na população amazonense.



### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar se polimorfismos em genes que codificam as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 estão associados à susceptibilidade à hanseníase e/ou às suas formas clínicas em pacientes da Amazônia Legal, Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Analisar possível associação da frequência alélica e genotípica de polimorfismos genéticos do gene *CD80* com a hanseníase e suas formas clínicas;

3.2.1.1 Analisar possível associação da frequência alélica e genotípica de polimorfismos genéticos de nucleotídeo único (SNP) na posição +1057 do gene *CD86* com a hanseníase e suas formas clínicas.

## **4 Metodologia**

### **4.1. Tipo de estudo e aspectos éticos**

Estudo de associação de caso-controle proposto a partir dos objetivos contemplados pelo projeto “Avaliação do perfil imunológico e de polimorfismos genéticos em pacientes portadores de hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta”, do Programa de Desenvolvimento Científico Regional (DCR) fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e coordenado pela Profa. Dra. Lúcia de Paula. O projeto DCR acima descrito foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (CEP – FUAM), sob parecer cosubstanciado nº 019/2008 (ANEXO A) e em virtude de termos acrescentado maior número de pacientes, o projeto atual foi também aprovado sob parecer 002/10 (ANEXO B).

### **4.2. População de estudo**

A população de estudo consistiu de 120 pacientes com hanseníase e 115 indivíduos controles. Foi realizado o contato pessoal com cada participante, que recebeu esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa. Todos os pacientes incluídos neste projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) e responderam ao formulário para coleta de informações pessoais e quadro clínico dos pacientes (APÊNDICE B).

### 4.2.1 Pacientes com hanseníase

Foram convidados a participar deste estudo, pacientes de hanseníase, de ambos os sexos, atendidos na FUAM, com procedência dos Estados da Amazônia Legal e faixa etária de 18 a 65 anos. Para o diagnóstico clínico da hanseníase o estudo contou com o apoio de médicos especializados da FUAM. Para o diagnóstico laboratorial foram realizadas baciloscopia e histopatologia da lesão cutânea afetada.

Os pacientes foram classificados de acordo com o sistema de classificação de Ridley e Jopling (1966) baseado em critérios clínicos e histológicos, e também foram agrupados de acordo com a classificação operacional em paucibacilar (PB) ou multibacilares (MB). PB com índice baciloscópico (IB)=0 com até cinco lesões de pele, um tronco nervoso acometido e histologicamente foram classificados como indeterminada (I), tuberculoide (TT) ou borderline-tuberculoide (BT). MB, IB>0, mais de cinco lesões de pele, com mais de um tronco nervoso acometido, baciloscopia positiva e histologicamente classificados como borderline-borderline (BB), borderline-virchowiano (BV) ou virchowiano (VV).

Foram critérios para exclusão: hanseníase neural pura, gestação, presença de doenças infecciosas, imunodeficiência diagnosticada, pacientes indígenas e indivíduos cosanguíneos (parentesco com indivíduos incluídos).

### 4.2.2 Indivíduos controle

O grupo controle do estudo foi constituído de 115 indivíduos saudáveis, sem evidências clínicas de hanseníase, com idade variando entre 18 e 65 anos. Após a aplicação e assinatura do TCLE (APÊNDICE C) foi realizada entrevista com indivíduo, utilizando formulário para coleta de informações pessoais (APÊNDICE D). Os critérios de exclusão foram: a presença de doenças infecciosas, imunodeficiência diagnosticada, histórico de hanseníase e parentesco com pacientes portadores de hanseníase.

### 4.3 Material biológico

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) dos pacientes com hanseníase e dos indivíduos controle. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da FUAM onde foi realizada extração do DNA total e análise de polimorfismos na região cromossômica 3q21 que contém os genes de *CD80* e *CD86*.

### 4.4. Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada utilizando-se o Kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, Wisconsin), de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações conforme descrito abaixo:

#### A- Lavagem das células:

1. O tubo contendo sangue foi centrifugado a 3.000 g, durante 10 minutos. Em seguida, 100 µL da camada leucocitária foram coletados com auxílio de pipeta e acondicionados em tubo plástico de 1,5 mL;
2. Foram adicionados à camada leucocitária 500 µL de solução salina fisiológica com fosfato (PBS pH 7,4), seguindo nova centrifugação a 3.000 g por 10 minutos;
3. O volume de 100 µL da camada leucocitária foi pipetado e acondicionado em outro tubo de 1,5 mL;

#### B- Ruptura da membrana celular, precipitação de resíduos e remoção de resíduos

1. Adicionou-se 300 µL da solução lise celular e homogeneizou-se com auxílio da pipeta em seguida incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos;
2. Centrifugou-se a 14.000 g por 1 minuto e descartou-se o sobrenadante;
3. Adicionou-se 100 µL da solução lise nucleica e homogeneizou, com o auxílio da pipeta;

4. Adicionou-se 0,5  $\mu\text{L}$  da solução RNAs e 33  $\mu\text{L}$  da solução de precipitação de proteína em seguida agitou-se com auxílio da pipeta;
5. Centrifugou-se a 14.000 g por 5 minutos;
6. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo contendo 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol e homogeneizou-se suavemente por inversão;
7. Centrifugou-se a 14.000 g por 2 minutos;
8. Descartou-se sobrenadante, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e homogenizou-se com auxílio da pipeta;
9. Centrifugou-se a 14.000 g por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e deixou-se evaporar o etanol por 15 minutos;

#### **C- Eluição do DNA:**

1. Adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução de re-hidratação de DNA, sendo o tubo incubado a temperatura ambiente por 20 minutos;
2. Incubou-se overnight a 4°C, para total eluição do DNA;
3. Em seguida armazenou-se a  $-80^\circ\text{C}$ .

## **4.5 Quantificação de DNA**

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (ACTGene ASP-3700), comprimento de onda de 260 e 280 nm. Os valores referentes à concentração são expressos em ng/ $\mu\text{L}$  e os referentes à qualidade por meio da relação das absorbâncias em 260 nm e 280 nm.

## **4.6 Genotipagem das mutações de CD80 e CD86**

Para a genotipagem da detecção das mutações foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação das regiões de interesse seguida pelo sequenciamento direto do produto amplificado.

#### 4.6.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA dos pacientes e dos indivíduos controles foram amplificadas por PCR. Nas PCR foram utilizados Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase contendo Tampão Rxn (10X), MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Invitrogen, Brasil), dNTP Mix (10 mM) (Invitrogen, Brasil), oligonucleotídeos iniciadores (10 μM) (Invitrogen) e amostra de DNA em uma concentração final para reação contendo aproximadamente de 50-200 ng.

Para o gene que codifica a molécula coestimulatória CD80 foram escolhidos seis SNP localizados na região promotora do gene (-454 C/A, -387 T/C, -232 G/A, -79 C/G, -7 T/C e +5 C/A) e um polimorfismo de inserção/deleção (-557\_-561 CATGA), descritos na **Figura 8**.



**Figura 8** – Sequência da região promotora do gene CD80 (sentido 5'-3'), ilustrando o segmento amplificado por PCR (grifado), as posições dos SNP (em vermelho) e os oligonucleotídeos iniciadores (em amarelo). Fonte da sequência: GenBank (EF064750).

Para a análise uma única PCR foi realizada, englobando todos os polimorfismos da região promotora descritos por Matsushita et al., (2000) e Handa et al., (2005), seguindo as condições de reagentes descritas na **Tabela 1**. Para a amplificação da região promotora do gene *CD80* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (**Tabela 2**), descritos na metodologia de Matsushita et al., (2000).

**Tabela 1** – Volume e concentração final dos reagentes utilizados para a amplificação dos genes *CD80* e *CD86*.

Reagentes	Volume na Reação	Concentração Final
Tampão Rxn (10X)	2,5 µL	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25 µL	2,5 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µL	0,2 mM
Oligonucleotídeos iniciadores (10 µM)	1,0 µL (cada iniciador)	0,4 mM
Taq Polimerase (5U/µL)	0,2 µL	1 Unidade
DNA	1 µL	50-200 ng
Água	q.s.q	
Total	25 µL	

**Tabela 2** – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *CD80* e *CD86* (Matsushita et al., 2000).

Localização	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' - 3')
<i>CD80</i>	<i>CD80 Forward</i> : AAGTACACTGGTCCAGCATG <i>CD80 Reverse</i> : CTTCAGAGAGGGCGACATTC
<i>Exon 8 CD86</i>	<i>CD86 Forward</i> : CTCAAATGTGAAATATCACC <i>CD86 Reverse</i> : TACTTGTATGGGCTTTACTC

Foi analisado o SNP de *CD86* no éxon 8, posição +1057G/A (**Figura 9**) descrito por Matsushita et al., (2000). Para a análise, uma única PCR foi realizada, seguindo as condições de reagentes descritas na **Tabela 1**. Para a amplificação foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (**Tabela 2**), descritos na metodologia de Matsushita et al., (2000).

```

AGCGGCCTCGCAACTCTTATAAATGTGGAACCAACACAATGGAGAGGGAAGAGAGTG
AACAGACCAAGAAAAGAGAAAAAATCCATATACCTGAAAGATCTGATGAACCCCAGC
GTGTTTTTAAAAGTTCGAAGACATCTTCATGCGACAAAAGTGATACATGTTTTTAATTA
AAGAGTAAAGCCCATACAAGTATTCATTTTTTCTACCCTT

```

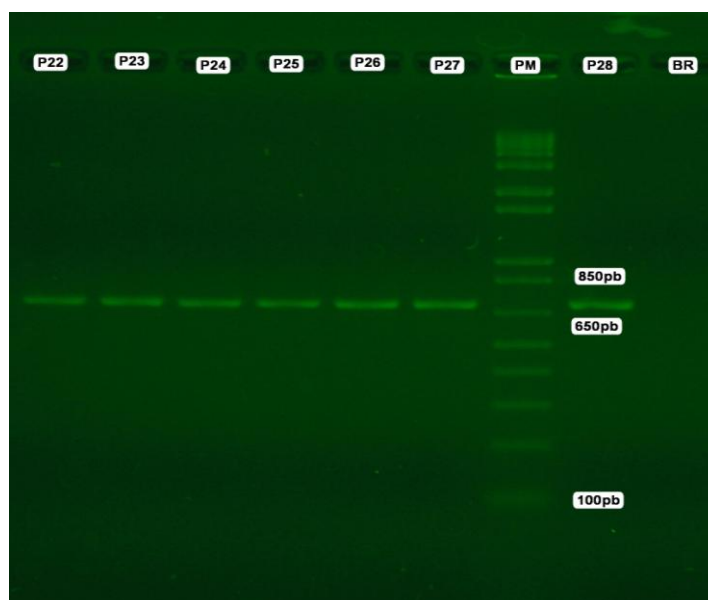
**Figura 9** – Sequência do éxon 8 do gene *CD86* (sentido 5'-3'), ilustrando o segmento amplificado por PCR (grifado), a posição do SNP (em vermelho) e os oligonucleotídeos iniciadores (em amarelo). Fonte da sequência: GenBank (U04343).

Os processos de ciclagens térmicas foram realizados no termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para *CD80* foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação (96° C por 30 segundos), hibridização (60° C por 30 segundos) e extensão (72° C por 1 minuto), seguindo-se uma extensão final (72° C por 1 minuto). Para o *CD86* as condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação (94° C por 30 segundos), hibridização (56° C por 30 segundos) e extensão (72° C por 1 minuto), seguindo-se extensão final a 72° C. O produto final da amplificação do gene *CD80* foi de 690 ou 695 pares de bases (pb) de DNA, sendo esta variação devida à inserção de 5 pares de bases nas posições -557\_-561 (CATGA) e do éxon 8 do gene *CD86* foi de 166 pb.

Para a confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA, os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *SYBR Safe* (Invitrogen, Brasil). Foram utilizados 5 µL do produto da PCR misturado com 2 µL de 10x Blue Juice (*Gel loading buffer*, Invitrogen,USA). A eletroforese foi realizada em cuba para sistema horizontal LCH 7X8 (Loccus Biotecnologia, Brasil) alimentada por fonte (LPS 300, Loccus Biotecnologia, Brasil) nas seguintes condições: 100 V constantes durante 50 minutos. Os resultados foram visualizados



sob transiluminador safe imager blue-light (Invitrogen, USA), analisado a partir da comparação visual dos fragmentos de DNA obtidos com o padrão de pares de base *ladder 1 Kb DNA plus* (Invitrogen, USA). Foram considerados amplificados os produtos das amostras que apresentaram sinal positivo de bandas observadas à exposição do gel em luz azul, pela comparação com padrão de pares de base, na região de 166 pb e 690-695pb (**Figura 10**). Todos os géis foram fotografados pelo sistema de captura de imagem digital (LPIX – Loccus Biotecnologia, Brasil), gravados eletronicamente e impressos para registro de dados.



**Figura 10**– Gel de agarose 1% corado com SYBR Safe representando as amplificações da região promotora do gene CD80 de participantes da pesquisa. P22-P28: Amostras de pacientes; PM: padrão de pares de base 1 Kb; BR: controle negativo da reação de PCR.

#### 4.6.2 Purificação e quantificação do produto da PCR

Com o intuito de eliminar os dNTPs, os *primers* que não foram incorporados e o excesso de sais da PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento, foi realizada a purificação dos produtos das PCR utilizando o kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*

(Promega, Madison, Wisconsin) conforme recomendações do fabricante (APÊNDICE E). Após a purificação dos produtos da PCR, o conteúdo de DNA foi quantificado em espectrofotômetro (ACTGene, ASP-3700). A quantificação do produto de PCR purificado é um passo muito importante, pois para cada tamanho de fragmento de DNA que se pretende sequenciar, há uma quantidade indicada de material de partida para a reação de sequenciamento. O DNA purificado de cada amostra foi estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser utilizado para a reação de sequenciamento.

#### 4.6.3 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, cujo princípio foi descrito por Sanger et al. (1977). Nas reações de sequenciamento, dos fragmentos *CD80* e *CD86* foram utilizados de 5-20 e 1-3 ng dos produtos da PCR purificados respectivamente, usando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores *forward* ou *reverse* utilizados na PCR em cada amostra e o kit *BigDye<sup>®</sup> Cycle Sequencing Terminator v.3.1* (Applied Biosystems), de acordo com Platt et al., (2007) com algumas alterações como descritas na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Volume e concentração final dos reagentes utilizados para sequenciamento de *CD80* e *CD86*.

Reagentes	Volume na Reação
Produto de PCR purificado	1 $\mu\text{L}$ (5-20/1-3 ng)
BigDye <sup>®</sup> Terminator v 3.1	0,3 $\mu\text{L}$
Tampão BigDye <sup>®</sup> 5x	2 $\mu\text{L}$
Oligonucleotídeo iniciador 3,3 $\mu\text{M}$ ( <i>forward</i> ou <i>reverse</i> )	1 $\mu\text{L}$
Água destilada	5,7 $\mu\text{L}$
Volume Final	10 $\mu\text{L}$

As amostras foram sequenciadas em ambas as direções da dupla fita. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) devidamente seladas (Applied Biosystems), em termociclador utilizando o seguinte programa : desnaturação inicial a 96° C por 1 minuto, seguido de 15 ciclos de desnaturação (96°C por 10 segundos), hibridização (50° C por 15 segundos) e extensão (60° C por 75 segundos) 5 ciclos de desnaturação (96°C por 10 segundos), hibridização (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 90 segundos), 5 ciclos de desnaturação (96°C por 10 segundos), hibridização (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 2 minutos).

#### 4.6.4 Purificação da reação de sequenciamento

No final da reação de sequenciamento há sobras de primers, ddntps, alguns sais entre outros resíduos que podem interferir na eletroforese capilar. A purificação da reação visa eliminar tais resíduos aumentando a qualidade das sequências produzidas. Após as reações de sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando o método de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio (APÊNDICE F).

#### 4.6.5 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar foi realizada utilizando o sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e polímero POP-7 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas utilizando o software *Sequencing Analyzer* (Applied Biosystems v5.3.1). As sequências *forward* e *reverse* de cada amostra foram alinhadas e utilizadas para definir a sequência final com as respectivas sequências de referência para cada gene publicada no *GenBank* utilizando o software SeqMan (DNASTAR Lasergene, v7.0) para montagem dos *contig* e identificação dos polimorfismos presentes em cada amostra.

## 4.7 Análise estatística

As frequências genóticas e alélicas foram calculadas por simples contagem. As distribuições de genótipos foram comparadas com as esperadas com base no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para analisar a associação entre a variante polimórfica nos genes estudados e a hanseníase foram comparadas as frequências genóticas e alélicas de pacientes com hanseníase e indivíduos controles, através da análise das tabelas de contingência, para se obter o valor de  $p$  foi avaliado *Odds ratio* no intuito de se definir a probabilidade de risco.

## 4.8 Fluxograma de procedimentos

O fluxograma abaixo ilustra os procedimentos realizados ao longo do trabalho.



**Figura 11** - Fluxograma referente às principais etapas desenvolvidas ao longo do trabalho, no qual estão, inicialmente, inclusão dos participantes, coleta das amostras. Em seguida, extração do DNA, PCR, purificação dos *amplicons* e sequenciamento. A reação foi purificada e submetida à eletroforese de capilaridade para, posteriormente, análise dos dados.

## 5. Resultados

**Artigo de Revisão:** Polimorfismos genéticos: potenciais marcadores da patogênese da hanseníase

Genetic polymorphisms: potential markers of the leprosy pathogenesis

Maísa P. Santos<sup>1</sup>, George Allan Villarouco Silva<sup>1</sup>, Felipe G. Naveca<sup>1,2</sup>, Lúcia de Paula<sup>1,3\*</sup>

1 Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

2 Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ, Manaus, Brasil

3 Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Brasil

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

**Resumo:** A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que é influenciada por aspectos genéticos do hospedeiro e acomete principalmente pele e nervos. Com o avanço nos estudos genéticos, diversos autores têm relatado associação de polimorfismos genéticos com a susceptibilidade à doença e/ou suas diferentes formas clínicas. Em base a estes estudos, o presente artigo visa abordar alguns dos polimorfismos genéticos estudos relacionados com a hanseníase.

**Palavras-chave:** Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, Polimorfismos genéticos.

**Abstract:** Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that is influenced by host genetic and affects mainly skin and nerves. With advances in genetic studies, several authors have reported the association of genetic polymorphisms with susceptibility to disease and / or its various clinical forms. On the basis of these studies, this paper aims to address some of the study and genetic polymorphisms related to leprosy.

**Keywords:** Leprosy, *Mycobacterium leprae*, Genetic polymorphisms.

## INTRODUÇÃO

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, de amplo espectro clínico, que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos sendo influenciada por aspectos genéticos do hospedeiro<sup>1-3</sup>. Durante muitos anos o controle da doença foi um grande desafio para as políticas públicas, até que em 1982 a Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu a poliquimioterapia (PQT). A partir de então houve uma redução drástica na prevalência e na detecção de casos novos de hanseníase no mundo. De acordo com relatórios oficiais de 130 países e territórios, recebidos pela OMS em 2011, a prevalência global registrada da hanseníase no primeiro trimestre de 2011 foi de 192,246 casos, enquanto o número de casos novos detectados durante 2010 foi de 228,474 representando um coeficiente de detecção de 3,93/100.000 habitantes<sup>4</sup>.

As características clínicas dos pacientes com hanseníase estão diretamente relacionadas com a sua imunidade. A forma clínica tuberculoide (TT) reflete intensa resposta imune celular com contenção do bacilo, caracterizada pela formação de granulomas epitelioides. Inversamente, a hanseníase virchowiana ou lepromatosa (LL) apresenta resposta imune predominantemente humoral, com múltiplas lesões espalhadas pelo corpo, além do comprometimento de múltiplos troncos nervosos<sup>2</sup>. Dentro do espectro clínico da doença, a hanseníase borderline é a forma clínica que caminha entre os pólos tuberculoide e lepromatoso

e pode ser dividida em três subtipos: borderline tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL)<sup>5,6</sup>.

A hanseníase é uma doença complexa, cujo desfecho resulta de uma combinação entre a ação do *M. leprae*, fatores ambientais, socioeconômicos e a predisposição individual<sup>7</sup>. Diversos genes e regiões genômicas foram relacionados à susceptibilidade à hanseníase e suas diferentes formas clínicas. Neste contexto, variações genéticas em genes envolvidos na resposta imunológica são importantes alvos para estudos genéticos nos pacientes. Diversos estudos indicam que variações genéticas (polimorfismos genéticos) no hospedeiro podem alterar o seu perfil imunológico, podendo influenciar na susceptibilidade e no curso da infecção<sup>1,7-9</sup>.

Vários estudos têm sido realizados à procura de marcadores genéticos que auxiliem na identificação da suscetibilidade à hanseníase e/ou suas formas clínicas. No decorrer desta revisão serão destacadas alterações genéticas em genes importantes envolvidos na resposta imunológica e que estão relacionados com o desenvolvimento da hanseníase e/ou com os aspectos clínicos da doença.

### **Receptores *Toll-like* na Hanseníase**

A primeira interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro humano é mediada por receptores que reconhecem padrões antigênicos do patógeno. Existem diversos tipos de receptores nas células de defesa como os receptores *Toll-like* (TLRs) presentes sobre as células do sistema imune inato e em outras células, como linfócitos B que atuam no reconhecimento de padrões moleculares (PAMP). Os receptores TRL são responsáveis pela estimulação das células e consequentemente produção de componentes antimicrobianos, como o óxido nítrico, um potente antimicrobiano, e de interleucina 12 (IL-12) que atuam na amplificação da resposta imune adaptativa<sup>10</sup>.

Krutzik e colaboradores observaram a expressão aumentada de TLR1 e TLR2 nos pacientes com hanseníase<sup>11</sup>. O TLR-2 é específico para peptídeo glicano e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas<sup>12</sup> e também lipoproteínas e açúcares modificados presente na parede



de bactérias e fungos<sup>13</sup>. Os heterodímeros TLR2-TLR1, homodímeros TLR-2 e TLR-4 atuam no reconhecimento de micobactérias<sup>6,14</sup>.

Vários estudos detectaram polimorfismos nos genes *TLR1* e *TLR2*. Kang e Chae (2001) associaram em indivíduos nascido na Coreia polimorfismos no nucleotídeo 2029 C/T do gene *TLR2* ao pólo LL da hanseníase<sup>15</sup>. Posteriormente, observou-se que células com este polimorfismo apresentam deficiência na ativação do fator de transcrição NF-κB, diminuindo a produção de citocinas IL-12, IL-2, TNF-α e IFN-γ, porém aumentando a produção de IL-10, citocina inibitória da resposta celular<sup>16</sup>.

Outro polimorfismo no *TLR1* no nucleotídeo 1805 T/G que leva à troca de isoleucina para serina no resíduo 602, demonstrou relação com distúrbio regulatório da resposta imune inata, diminuindo a produção de IL-1β, IL-6 e TNF-α em células mononucleares do sangue periférico quando estimuladas com *M. leprae* em pacientes de hanseníase do Nepal<sup>17</sup>. Também outro estudo realizado com pacientes de hanseníase na Turquia relatou a associação do polimorfismo com a resistência à hanseníase conferida pelo alelo 602S de *TLR1*<sup>18</sup>. Em estudo recente foram identificados SNPs no gene de *TLR-4*, como o SNP 896G/A (D299G) e 1196C/T (T399I) relacionados com proteção à hanseníase em pacientes na Etiópia<sup>19</sup>.

Além de afetar a susceptibilidade à doença e/ou às formas clínicas também foi demonstrado que alterações genéticas presentes nos genes *TLR2* e *TLR1* estão associadas com a ocorrência de reação reversa (RR) nos pacientes com hanseníase<sup>17, 20, 21</sup>. No gene *TLR2*, o polimorfismo 597C/T e uma região de microssatélite foram associados à RR em pacientes com hanseníase na Etiópia sendo que o alelo T foi associado à proteção e a região do microssatélite ao aumento do risco em apresentar a RR<sup>20</sup>. Já o alelo 602S (1805G) do gene *TLR1* quando presente mostrou-se capaz de conferir proteção contra a RR reverse em pacientes de hanseníase do Nepal<sup>17</sup>.

Devido ao importante papel dos receptores TLR na resposta imune é possível observar que modificações ou falhas na expressão dos mesmos podem ser determinantes na patogênese de certas doenças infecciosas, como as causadas por micobactérias<sup>22</sup>.

## Antígeno Leucocitário Humano – HLA

*M. leprae* pode ser apresentado para os linfócitos T via HLA, onde esta molécula polimórfica seleciona e apresenta peptídeos antigênicos aos linfócitos T. Diversos autores descrevem peptídeos que são capazes de se ligar a fenda do HLA classe I (HLA-A, -B e -C) e/ou Classe II (HLA-DR, -DP e DQ) e serem apresentados por macrófagos ou células dendríticas ao linfócito T<sup>23, 24</sup>

Em estudo realizado na Índia foi observada maior frequência de HLA-A2, HLA-A11, HLA-B40 e HLA-Cw7 entre os pacientes com hanseníase e frequências maiores dos haplótipos A\*1102-B\*4006-C\*1502, A\*0203-B\*4016-C\*0703 e A\*11-B\*40 nos pacientes multibacilares em comparação com os indivíduos controles<sup>25</sup>. Nestes indivíduos os alelos de HLA de classe I A\*1102, A\*0206, B\*5110, C\*0407, C\*0703 foram associados à susceptibilidade à hanseníase enquanto os alelos A\*0101 e C\*401 foram associados à proteção contra a hanseníase multibacilar<sup>25</sup>.

Os HLA-DR/HLA-DQ revelaram-se os genes que possuem maior associação com a hanseníase no estudo de *Genome-wide Association (GWA)*<sup>26</sup>. O HLA de classe II também foi associado com a hanseníase, sendo os alelos HLA-DQB1\*0501, DQA1\*0101<sup>27</sup>, DRB1\*10, DRB1\*15<sup>28</sup> mais frequentes em pacientes, ou seja, relacionados com a susceptibilidade para o desenvolvimento da doença. Ao contrario dos alelos DQB1\*0201, DQA1\*0201<sup>27</sup>, DRB1\*04<sup>25, 28</sup> e DQB1\*03<sup>29</sup> estão associados com a resistência ao *M. leprae*.

Com o avanço dos estudos genéticos foram enfatizados o HLA-DRB1\*16, DQA1\*05 e DQB1\*02 como marcadores para pacientes LL, enquanto DRB1\*1602 e DQA1\*05 foram mais frequentes na forma TT<sup>29</sup>. O HLA- DQB1, DRB1b, DQA1<sup>27, 29, 30</sup> e DR2 são associados com a susceptibilidade à hanseníase<sup>29</sup>, podendo ser considerados como determinantes para predisposição à doença.

Com estas observações, é possível vislumbrar que os alelos de HLA presentes no indivíduo podem auxiliar na indução de intensa ou branda resposta imune celular que irá influenciar a susceptibilidade a hanseníase. Importante papel desempenhado pelo HLA no desenvolvimento da resposta imune, a ativação desta é também dependente de outros genes,

os quais modulam a resposta imunológica do hospedeiro, podendo ou não resultar no desenvolvimento da doença.

### **Receptor da vitamina D (VDR)**

A vitamina D apresenta vários efeitos imunomoduladores podendo agir sobre diferentes células como monócitos, linfócitos e macrófagos que apresentam seu receptor<sup>31</sup>. Vários estudos relatam polimorfismos no receptor de vitamina D com associação com a hanseníase<sup>32-36</sup>. O polimorfismo TaqI no gene VDR, consiste na substituição de T para C no códon 352 no exon 9. Em um estudo com pacientes indianos, o genótipo TT foi associado com a forma LL da hanseníase, enquanto o genótipo tt (CC) foi associado à forma tuberculoide, sendo a resistência à hanseníase associada ao genótipo heterozigoto "Tt"<sup>32</sup>. Contrariamente em um estudo realizado na população de Malau, o genótipo tt foi associado à susceptibilidade à hanseníase *per se*<sup>35</sup>.

Em estudo com pacientes brasileiros foi demonstrado que os indivíduos que carregam a combinação do genótipo TT e tem teste de Mitsuda negativo são suscetíveis a desenvolverem a doença<sup>33</sup>. Em estudo realizado com a população mexicana o genótipo TT foi significativamente mais frequente em pacientes com hanseníase quando comparado com os indivíduos controle<sup>36</sup>

### **Citocinas**

As citocinas desempenham importante papel na regulação da resposta imune do hospedeiro contra *M. leprae* e polimorfismos nos genes de citocinas têm sido implicados como fatores do hospedeiro influenciando à susceptibilidade hanseníase e/ou às formas clínicas da doença. Polimorfismo na região promotora do gene do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) na posição -308 G/A foi associado à proteção à hanseníase em população do Nepal e do Brasil<sup>27, 34</sup>,

<sup>37, 38</sup>. Contrariamente em pacientes de hanseníase do Malauí e da Polinésia não foi significativa a associação deste polimorfismo<sup>35, 39</sup>.

O alelo A do SNP -308 foi associado à hanseníase multibacilar em estudos com pacientes indianos<sup>40</sup> e tailandeses<sup>41</sup>. Contrariamente em estudos realizados com pacientes brasileiros esse mesmo alelo foi associado à resistência à hanseníase<sup>27, 38, 42, 43</sup>.

Altos níveis de TNF- $\alpha$  tem sido associados a imunopatogenia da hanseníase em virtude de sua participação no desenvolvimento de estados reacionais e dano neural. Foi demonstrado que o polimorfismo TNF-308G/A também regula a produção de TNF- $\alpha$  durante os episódios reacionais e que a frequência de neurites é muito maior nos pacientes com o genótipo heterozigoto<sup>44</sup>.

Também a citocina anti-inflamatória IL-10 é de fundamental importância na resposta imunológica de pacientes com hanseníase, visto que polimorfismos genéticos na região promotora dos genes que codificam deste gene terem sido relacionados com a susceptibilidade à doença. Polimorfismo na região promotora de *IL-10* na posição -819T/C mostrou associação entre o alelo T na e a susceptibilidade a hanseníase e as suas diversas formas clínicas<sup>38, 43, 45, 46</sup>. Na população brasileira o genótipo -819TT foi associado com hanseníase *per ser* e à pacientes paucibacilar<sup>43</sup>.

Em pacientes indianos, estudo de polimorfismos de IL-10 demonstrou que o haplótipo -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C foi associado à resistência à hanseníase *per ser* e o haplótipo-3575T/-2849G/-2763C/ -1082A/-819T/-592A ao desenvolvimento das formas clínicas da doença<sup>47</sup>. Neste mesmo gene o haplótipo -375A/-2849G/-2763C foi associado à resistência à hanseníase na população brasileira enquanto o haplótipo -3575T/-2849A/2763C foi associado à susceptibilidade à hanseníase<sup>48</sup>

Outro polimorfismo estudado é o do gene interferon-gama (*IFN- $\gamma$* ), o SNP +874T/A caracterizado pela alteração de timina para adenina, cuja localização coincide com o local de ligação do NF- $\kappa$ B. Deste modo, tal SNP representa importantes consequências na transcrição do gene de IFN- $\gamma$  e tem sido relacionado com os níveis de citocina produzida<sup>49</sup>. Em estudo realizado com pacientes brasileiros foi observada uma associação entre o microsatélite adjacente a este SNP +874T/A e a susceptibilidade à hanseníase<sup>50</sup>. Em estudos realizados nas populações do

Malauí<sup>35</sup> e do Brasil<sup>38</sup> não foi observada qualquer associação entre o SNP +874T/A e a susceptibilidade à hanseníase e estudo caso-controle na população brasileira no qual foi observado associação do alelo T a resistência à hanseníase<sup>51</sup>

Outra citocina também envolvida na resposta imune ao *M. leprae* é a interleucina 4 (IL-4)<sup>52, 53</sup>, a qual inibe a expressão de TLR2 e ativação do heterodímero TLR2-TLR1, receptores importantes no reconhecimento do *M. leprae*<sup>11</sup>. Em estudo realizado com pacientes de hanseníase na China o polimorfismo no gene da *IL-4* na posição -590T/C foi associado à resistência hanseníase *per ser* sendo o genótipo CC e o alelo C mais frequente em indivíduos controles quando comparados com os pacientes com hanseníase<sup>54</sup>.

Polimorfismo genético na região promotora do gene da *interleucina 6 (IL-6)* na posição -597 G/A, foi associado com a susceptibilidade à hanseníase na população sendo o alelo A relacionado ao risco em desenvolver a doença<sup>55</sup>. Polimorfismo genético no mesmo gene na posição -174 G/C em pacientes de hanseníase do Egito não foi associado à hanseníase<sup>56</sup>. Também os polimorfismos genéticos rs2069832, rs2069840 e rs2069845 nesse gene foram associados aos episódios reacionais do tipo 2 (eritema nodoso hansênico) na população brasileira<sup>57</sup>.

O gene *IL12RB2*, que codifica a cadeia  $\beta 2$ , presente no receptor da interleucina 12 (IL-12), foi associado ao desenvolvimento de hanseníase multibacilar em pacientes japoneses. Neste estudo foi identificada a presença de 12 SNPs na região 5' de *IL12RB2*, sendo os SNP -1035A/G, -1023A/G, -650delG e -464A/G associados com as formas multibacilares da doença. Maior expressão de *IL12RB2* foi observada no haplótipo -1035A/-1023A/-650G/-464A<sup>58</sup>.

A hanseníase pode causar em alguns casos neuropatia, a ninjurina é uma proteína expressa nos nervos periféricos promove a adesão entre células de Schwann, é codificada pelo gene *NINJ1* o qual tem expressão aumentada nas células de Schwann após a ocorrência de dano neural, sugerindo um papel desta molécula na regeneração do tecido nervoso<sup>56</sup>. A presença do alelo C na posição 110 do polimorfismo 110A/C no gene *NINJ1* com níveis menores de mRNA para ninjurina e ocorrência de dano neural na hanseníase<sup>55</sup>. Em estudo recente também foi encontrada associação significativa entre o alelo 110 C e danos nervos em pacientes com hanseníase, sendo a frequência do alelo C maior nos pacientes com comprometimento dos

nervos. Além disso, pacientes com o genótipo CC apresentaram risco maior de desenvolver lesão de nervos quando comparado ao portadores do genótipo AA<sup>57</sup>.

### ***Lectina ligante de manose 2 (MBL2)***

A lectina ligante de manose é uma proteína solúvel do sistema imune inato conhecida por desempenhar importante papel no reconhecimento de patógenos promovendo ativação do complemento e opsonização. Em estudo realizado com pacientes da região Sul do Brasil o haplótipo LYPA de MBL2 foi associado à hanseníase e a progressão para formas clínicas LL e LV<sup>59</sup>. No entanto, outro estudo também realizados com brasileiros não foi encontrada associação de polimorfismo de MBL2 com a susceptibilidade à hanseníase e as suas formas clínicas<sup>60</sup>.

Também outro estudo realizado com população do Nepal demonstrou que o SNP na posição 161G/A de *MBL* foi associado com a proteção a forma clínica LL e os SNPs nas posições 154C/T e 170G/A não mostraram nenhuma associação com a hanseníase na população do Nepal<sup>34</sup>.

### ***Proteína 1 associada à resistência natural do macrófago (NRAMP1)***

Estudo realizado em famílias vietnamitas demonstra evidência de ligação entre o gene *NRAMP1* e a susceptibilidade à hanseníase *per ser*<sup>61</sup>. Em estudo de associação realizado em pacientes africanos compararam a distribuição do polimorfismo 1729+55del4 presente no gene *NRAMP1* e observaram maior frequência de heterozigose entre multibacilares<sup>62</sup>. Também na população brasileira foi observada associação entre polimorfismo de repetição (GT) no gene *NRAMP1* na região promotora com a hanseníase<sup>63</sup>. Entretanto em pacientes da Tailândia não foram observadas diferenças significativas na distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos D543N, INT4 e 1729+55del entre pacientes com hanseníase e indivíduos controles<sup>41</sup>,

corroborando com estudo realizado na Índia no qual esses polimorfismos não foram associados à hanseníase<sup>32</sup>.

Diante desses resultados discordantes, ainda é incerta a magnitude e a natureza da participação do gene *NRAMP1* no controle da manifestação de fenótipos da hanseníase em diferentes populações humanas<sup>32, 62, 63</sup>.

### ***CD80 e CD86***

Os genes *CD80* e *CD86* estão ligados no braço curto do cromossomo 3 (posição 3q21) e codificam glicoproteínas estruturalmente relacionadas, membros da superfamília das imunoglobulinas, expressas na membrana de células apresentadoras de antígenos e desempenham papel essencial na ativação e inibição da proliferação de linfócitos T<sup>64</sup>

O sinal coestimulatório é essencial para ativação dos linfócitos e desencadeamento de resposta imune adaptativa. Nesse processo as moléculas coestimulatórias são de extrema importância, fornecendo o segundo sinal de ativação e, devido a essa função alguns estudos investigam polimorfismos dos genes que as codificam. Essas variantes podem estar relacionadas à mudanças na função ou aos os níveis de expressão dessas moléculas podendo interferir na susceptibilidade às diversas doenças.

Na região codificadora do gene *CD86* foi encontrado um SNP localizado no éxon na posição 1057A>G que leva à substituição do aminoácido alanina por treonina no códon 304 (A304T), introduzindo um sítio potencial de fosforilação na região citoplasmática da molécula<sup>65, 66</sup>.

No gene *CD80*, outras cinco variações que correspondem a mutações silenciosas foram identificadas, sendo quatro transições e uma deleção, localizadas nas posições 138G/A e 144G/A do éxon 3 e no íntron 2 posição -56A/G. Outra variação também foi descrita para o éxon 6 nas posições 333A/G e 424delC<sup>67</sup>.

Estudos recentes relataram a associação do polimorfismo 1057 G/A do gene *CD86* com patologias diversas, tais como pênfigo foliáceo<sup>68</sup>, osteosarcoma<sup>69</sup>, sarcoma de Ewing<sup>70</sup>, doença

obstrutiva pulmonar crônica<sup>71</sup>, câncer de colorretal<sup>72</sup>, esclerose sistêmica<sup>73</sup> e oftalmopatia<sup>74</sup>. Possíveis polimorfismos nos genes CD80 e CD86 podem estar relacionados com a hanseníase, por se tratarem de moléculas coestimulatórias da resposta imune mediada por células.

O papel das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 também já foi previamente investigado na hanseníase<sup>75-79</sup>. Agrewala e colaboradores (1998)<sup>75</sup> observaram diminuição da expressão de CD80 e CD28 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes borderline e lepromatosos que não estavam fazendo o uso da PQT. Estudos também demonstraram que a expressão de mRNA de CD80, CD86 e CD28 é aumentada em biópsia de pele de pacientes TT quando comparado com pacientes VV<sup>76</sup>. A expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em APCs apresenta um importante papel para geração de uma eficiente resposta imune celular<sup>80</sup>. A baixa expressão das moléculas coestimulatórias observadas em pacientes BV e VV pode estar relacionada com a baixa imunidade celular observada nesse pacientes, diferente do observado nos pacientes TT com alta resposta ICM.

No entanto foi recentemente demonstrado que polimorfismos presentes na região promotora do CD80 e no *éxon* 8 de CD86 não têm associação com a hanseníase e suas diferentes formas clínicas em uma população da Amazônia brasileira (SANTOS et al.,: submetidos para publicação).

## **Considerações**

A investigação genética dos indivíduos acometidos com hanseníase torna-se uma importante ferramenta para a elucidação dos marcadores genéticos de susceptibilidade. Os polimorfismos destacados neste estudo, que mostram associação positiva com a doença, podem ser considerados possíveis marcadores genéticos para a predisposição à hanseníase. Porém é necessária a investigação destes marcadores genéticos em populações distintas, uma vez que estas podem apresentar diferentes frequências desses marcadores e cada população pode também apresentar um marcador específico de susceptibilidade. A descoberta destes



marcadores genéticos poderá levar no futuro ao desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

1. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiology* 2011;6:533-49.
2. Mendonça VA, Costa RD, de Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia da hanseníase immunology of leprosy. *An Bras Dermatol* 2008;83:343-50.
3. Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiology* 2011;6:217-30.
4. Organization WH. Leprosy update, 2011. *Weekly epidemiological record* 2011;86:389-400.
5. Goulart IMB, 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;35:363-75.
6. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* 2006;19:338-81.
7. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Leprosy Review* 2006;77:189.
8. Souza VNB, Pereira AC. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. *Hansenologia Internationalis* 2007;32.
9. Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? Leprosy: a genetic disease. *An Bras Dermatol* 2007;82:451-9.
10. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang R-B, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science* 1999;285:732-6.
11. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature medicine* 2003;9:525-32.
12. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:17406-9.
13. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 2003;21:335-76.
14. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human Toll-Like Receptors Mediate Cellular Activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* 1999;163:3920-7.
15. Kang T-J, Chae G-T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2001;31:53-8.
16. Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* 2004;112:674-80.

17. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008;2:231.
18. Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. Cutting Edge: A Common Polymorphism Impairs Cell Surface Trafficking and Functional Responses of TLR1 but Protects against Leprosy. *The Journal of Immunology* 2007;178:7520-4.
19. Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, Siddiqui M, Saunderson P, Britton S, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2009;28:1055-65.
20. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *Journal of Infectious Diseases* 2008;197:253.
21. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-Like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *Journal of Infectious Diseases* 2009;199:1816-9.
22. Texereau J, Chiche J-D, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira J-P. The importance of Toll-Like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clinical Infectious Diseases* 2005;41:408-15.
23. Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MAM, Williams DL, Martins MVS, et al. Identification of Specific Proteins and Peptides in *Mycobacterium leprae* Suitable for the Selective Diagnosis of Leprosy. *The Journal of Immunology* 2005;175:7930-8.
24. Geluk A, van den Eeden SJF, Dijkman K, Wilson L, Kim HJ, Franken KLMC, et al. ML1419c Peptide Immunization Induces *Mycobacterium leprae*-Specific HLA-A\*0201-Restricted CTL In Vivo with Potential To Kill Live Mycobacteria. *The Journal of Immunology* 2011;187:1393-402.
25. Shankarkumar U. HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. *Leprosy Review* 2004;75:79-85.
26. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine* 2009;361:2609-18.
27. Shaw M, Donaldson I, Collins A, Peacock C, Lins-Lainson Z, Shaw J, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes and Immunity* 2001;2:196-204.
28. Vanderborgh P, Pacheco A, Moraes M, Antoni G, Romero M, Verville A, et al. HLA-DRB1\*04 and DRB1\*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes and Immunity* 2007;8:320-4.
29. da Silva S, Mazini P, Reis P, Sell A, Tsuneto L, Peixoto P, et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC infectious diseases* 2009;9:134.
30. Miller E, Jamieson S, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock C, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes and Immunity* 2004;5:63-7.
31. Bertolini DL, Tzanno-Martins C. Revisão: Efeitos imunomoduladores da vitamina D. *J Bras Nefrol* 2000;22:157-61.
32. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra S, Mascie-Taylor C, Hill A. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *Journal of Infectious Diseases* 1999;179:187.
33. Goulart LR, Ferreira FR, Goulart IMB. Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2006;48:91-8.
34. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch E, Ranjit C, Siddiqui MR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Human Immunology* 2010;71:992-8.

35. 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004;71:330-40.
36. Velarde Félix JS, Cázarez Salazar SG, Castro Velázquez R, Rendón Maldonado JG, Rangel Villalobos H. Association between the TaqI polymorphism of vitamin D receptor gene and lepromatous leprosy in a Mexican population sample. *Salud Pública de México* 2009;51:59-61.
37. Blackwell JM. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *International Journal for Parasitology* 1998;28:21-8.
38. 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;13:493-8.
39. Levée G, Schurr E, Pandey J. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1-beta and immunoglobulin (GM and KM) polymorphisms in leprosy. A linkage study. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 1997;14:160.
40. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor C, Saha B, Hazra S, Hill A, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *Journal of Infectious Diseases* 1997;176:530.
41. Vejbaesya S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *Journal-Medical Association of Thailand* 2007;90:1188.
42. Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, Moraes MO, Mattos HJ, Nery JAC, 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. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 2000;68:325-7.
43. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *Journal of Infectious Diseases* 2002;186:1687-91.
44. Sarno E, Santos A, Jardim M, Suffys P, Almeida A, Nery J. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF. *Lepr Rev* 2000;71:S154-60.
45. Pereira A, Brito-de-Souza V, Cardoso C, Dias-Baptista I, Parelli F, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes and Immunity* 2008;10:174-80.
46. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Human genetics* 2005;118:295-300.
47. Malhotra D, Darvishi K, Lohra M, Kumar H, Grover C, Sood S, et al. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. *European Journal of Human Genetics* 2005;14:438-42.
48. Moraes M, Pacheco A, Schonkeren J, Vanderborght P, Nery J, Santos A, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes and Immunity* 2004;5:592-5.
49. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A Single Nucleotide Polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  production. *Human Immunology* 2000;61:863-6.
50. Reynard M, Turner D, Junqueira-Kipnis A, Ramos de Souza M, Moreno C, Navarrete C. Allele frequencies for an interferon- $\gamma$  microsatellite in a population of Brazilian leprosy patients. *European Journal of Immunogenetics* 2003;30:149-51.

51. Cardoso C, Pereira A, Brito-de-Souza V, Dias-Baptista I, Maniero V, Venturini J, et al. IFNG+ 874 T> A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Human genetics* 2010;128:481-90.
52. Teles RMB, Krutzik SR, Ochoa MT, Oliveira RB, Sarno EN, Modlin RL. Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of *Mycobacterium leprae* by Schwann cells in human leprosy. *Infection and Immunity* 2010;78:4634-43.
53. Sieling PA, Modlin RL. Regulation of Cytokine Patterns in Leprosy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994;730:42-52.
54. Yang D, Song H, Xu W, Long H, Shi C, Jing Z, et al. Interleukin 4-590T/C polymorphism and susceptibility to leprosy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2011;15:877-81.
55. Aggarwal S, Ali S, Chopra R, Srivastava A, Kalaiarasan P, Malhotra D, et al. Genetic variations and interactions in anti-inflammatory cytokine pathway genes in the outcome of leprosy: a study conducted on a MassARRAY Platform. *Journal of Infectious Diseases* 2011;204:1264-73.
56. Settin A, Nassar S, Abdel-Latif A, Elbaz R, El-Mongy S, Hassan A, et al. Association of cytokine gene polymorphism with susceptibility and clinical types of leprosy. *International Journal of Health Sciences* 2007;1:25.
57. Sousa ALM, Fava VM, Sampaio LH, Martelli CMT, Costa MB, Mira MT, et al. Genetic and immunological evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction. *Journal of Infectious Diseases* 2012;205:1417-24.
58. Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, et al. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor  $\beta$ 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *Journal of Clinical Pathology* 2005;58:740-3.
59. De Messias-Reason IJ, Boldt ABW, Braga ACM, Stahlke EVRS, Dornelles L, Pereira-Ferrari L, et al. The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. *Journal of Infectious Diseases* 2007;196:1379.
60. Vasconcelos L, Fonseca J, Carmo RF, Mendonça TF, Pereira V, Lucena-Silva N, et al. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. *International Journal of Infectious Diseases* 2011.
61. Abel L, Sánchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:133.
62. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill A. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001;65:733-5.
63. Ferreira FR, Goulart LR, Diniz SH, Bernardes GIM. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 2004;72:457-67.
64. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biology* 2005;6:223.
65. Delneste Y, Bosotti R, Magistrelli G, Bonnefoy J-Y, Gauchat J-F. Detection of a polymorphism in exon 8 of the human CD86 gene. *Immunogenetics* 2000;51:762-3.
66. Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes and Immunity* 2000;1:428-34.
67. Weinshenker BG, Hebrink DD, Klein C, Atkinson EJ, O'Brien PC, McMurray CT. Genetic variation in the B7-1 gene in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2000;105:184-8.
68. Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. *Human Immunology* 2010;71:809-17.

69. Wang W, Song H, Liu J, Song B, Cao X. CD86 + 1057G/A Polymorphism and susceptibility to osteosarcoma. *DNA and Cell Biology* 2011;30:925-9.
70. Wang J, Zhou Y, Feng D, Yang H, Li F, Cao Q, et al. CD86 +1057G/A Polymorphism and susceptibility to Ewing's sarcoma: A Case–Control Study. *DNA and Cell Biology* 2011.
71. Liu Y, Liang WB, Gao LB, Pan XM, Chen TY, Wang YY, et al. CTLA4 and CD86 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Human Immunology* 2010;71:1141-6.
72. Pan XM, Gao LB, Liang WB, Liu Y, Zhu Y, Tang M, et al. CD86+ 1057 G/A polymorphism and the risk of colorectal cancer. *DNA and Cell Biology* 2010;29:381-6.
73. Abdallah A, Renzoni E, Anevlavis S, Lagan A, Munkonge F, Fonseca C, et al. A polymorphism in the promoter region of the CD86 (B7. 2) gene is associated with systemic sclerosis. *International Journal of Immunogenetics* 2006;33:155-61.
74. Liao WL, Chen RH, Lin HJ, Liu YH, Chen WC, Tsai Y, et al. The association between polymorphisms of B7 molecules (CD80 and CD86) and graves' ophthalmopathy in a Taiwanese population. *Ophthalmology* 2011;118:553-7.
75. Agrewala, Kumar, Vohra. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. *Clinical & Experimental Immunology* 1998;111:56-63.
76. Schlienger K, Uyemura K, Jullien D, Sieling PA, Rea TH, Linsley PS, et al. B7-1, But Not CD28, Is Crucial for the Maintenance of the CD4+ T Cell Responses in Human Leprosy. *The Journal of Immunology* 1998;161:2407-13.
77. Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van Heuverswyn H, et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clinical and Experimental Dermatology* 2007;32:75-80.
78. Sridevi K, Neena K, Chitralkha K, Arif A, Tomar D, Rao D. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alphabeta, TCR gammadelta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trat protein. *International immunopharmacology* 2004;4:1-14.
79. Santos D, Santos S, Esquenazi D, Nery J, Defruyt M, Lorre K, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai zasshi Japanese journal of leprosy: official organ of the Japanese Leprosy Association* 2001;70:15-24.
80. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annual Review of Immunology* 1996;14:233-58.

**Artigo Original:** A lack of an association between CD80 and CD86 genes polymorphisms and leprosy susceptibility or its clinical presentation in a Brazilian Amazon population

Maisa Porto Santos <sup>a</sup>, George Allan Villarouco da Silva <sup>a</sup>, Isabella da Motta-Passos <sup>a</sup>, Maria da Graça Souza Cunha <sup>b</sup>, Antonio Luiz Boechat <sup>a</sup>, Adriana Malheiro <sup>a,c</sup>, Felipe Gomes Naveca <sup>d</sup>, Lúcia de Paula <sup>a,e\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

<sup>b</sup> Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta, Manaus, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Brazil

<sup>d</sup> Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ, Manaus, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Brazil

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

## Summary

**Objective:** We aimed to determine whether polymorphisms in *CD80* and *CD86* are associated with susceptibility to leprosy and/or its clinical presentation in a Brazilian Amazon population.

**Methods:** Six single-nucleotide polymorphisms (-454C/A, -387T/C, -232G/A, -79C/G, -7T/C and +5C/A), one insertion/deletion polymorphism (-558insCATGA) located in the promoter region of *CD80* and one polymorphism (+1057G/A) in exon 8 of *CD86* in 120 leprosy patients and 115 controls individuals were analyzed via direct sequencing.

Results: For all polymorphisms, there were no significant differences in the distribution of the genotypes and alleles between the leprosy patients and the control individuals. Similarly, there was no association between the polymorphisms and the different clinical forms of leprosy.

**Conclusions:** There was no relationship between the examined *CD80* and *CD86* polymorphisms and either susceptibility to leprosy or the different clinical forms of leprosy in a Brazilian Amazon population.

**Keywords:** CD80; CD86; SNP; leprosy.

## Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*; it is characterized by a wide spectrum of clinical manifestations that are directly related to the immunity of the host<sup>1</sup>. Patients with the tuberculoid form (TT) of leprosy have a strong cellular immune response, with an increased Th1 response that results in the containment of the infection and the formation of epithelioid granulomas. By contrast, patients with lepromatous leprosy (LL) have a poor cellular immune response that is predominantly Th2 cell driven, which results in a disseminated disease that is characterized by diffuse cell infiltration into the skin and nerves. In the clinical spectrum of the disease, borderline leprosy lies between TT and LL leprosy and can be divided into three subtypes: borderline tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB) and borderline lepromatous (BL)<sup>2,3</sup>.

Many studies have suggested that genetic variants in the immune system of the human host can predict susceptibility to leprosy and/or its clinical presentation<sup>4-7</sup>. Genes involved in the activation and modulation of T cells are candidates genes that may affect the susceptibility to leprosy.

Activation of T cells is mediated through two critical signals to promote clonal expansion, cytokine secretion and effector function. The first signal is antigen specific and is provided by the interaction of the antigen/major histocompatibility complex presented on antigen

presenting cells (APCs) to the T cell receptor. The second, costimulatory signal is antigen independent and involves the interaction of costimulatory molecules on APCs that bind to their respective ligands on the T cell surface<sup>8</sup>. Among the known costimulatory molecules, CD80 and CD86 and their counter-receptor on T cells, CD28, are the most extensively characterized<sup>9,10</sup>. In the absence of this second signal, T cells undergo apoptosis or become anergic, demonstrating the important role of the costimulatory signal in T cell activation<sup>11</sup>.

Costimulatory molecules are important mediators of T cell activation in the immune response<sup>9, 12, 13</sup>. In vitro and in vivo studies have demonstrated that the CD80 and CD86 can differentially influence the development of Th1 or Th2 responses. CD80 signals preferentially promote the development of Th1 cells, whereas CD86 signals promote Th2 cell development<sup>14, 15</sup>.

The role of CD80 and CD86 in leprosy has been previously examined<sup>16-19</sup>. Previous studies have demonstrated that tuberculoid leprosy lesions predominantly contain T cell clones that are CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>. By contrast, T cell clones from lepromatous lesions are predominantly CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-18</sup>.

Additionally, decreased expression of CD80 and CD28 has been detected on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with untreated borderline or lepromatous leprosy<sup>20</sup>. Previous studies have also demonstrated that the mRNA expression of CD80 and CD86 is increased in skin biopsies of tuberculoid leprosy patients compared with lepromatous leprosy patients. Furthermore, the expression of CD28 is increased in the lesions of tuberculoid leprosy patients, whereas the expression of CTLA-4 is increased in lesions from lepromatous leprosy patients<sup>18</sup>.

The success of cell-mediated immunity (CMI) depends on the function of CD80 and CD86 as a costimulatory element on the surface of APCs. Thus, the expression of these costimulatory molecules by dendritic cells (DCs) plays an important role in the generation of an efficient T cell response<sup>8</sup>. When compared with macrophages, DCs stimulated by *M. leprae* express increased levels of CD80 and CD86, and in vitro tests of the T cell response to *M. leprae* have also shown that DCs are significantly better APCs when compared with monocytes<sup>16</sup>.



Although some reports have suggested that *CD80* promoter polymorphisms and the *CD86* +1057G/A polymorphism are not associated with most autoimmune diseases<sup>21,22,23</sup> and sarcoidosis<sup>24</sup>, recent reports have suggested that an association exists between the *CD86* +1057G/A polymorphism and several diseases, including pemphigus foliaceus<sup>25</sup>, osteosarcoma<sup>26</sup>, Ewing's Sarcoma<sup>27</sup>, chronic obstructive pulmonary disease<sup>28</sup>, colorectal cancer<sup>29</sup>, systemic sclerosis<sup>30</sup> and Graves' ophthalmopathy<sup>31</sup>. In spite of these associations, the association between polymorphisms in *CD80* and *CD86* and leprosy and its clinical presentation have not been examined. Therefore, we aimed to investigate the association between polymorphisms in *CD80* and *CD86* and the susceptibility to leprosy and its clinical presentation in a Brazilian Amazon population.

## Methods

### Study population

The study population consisted of 120 patients with leprosy and 115 control individuals without any history of mycobacterial infection. All patients with leprosy and control individuals were genetically unrelated and from the Brazilian Legal Amazonia states, and all subjects were seen at the Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM), a reference center for dermatology in Manaus, Amazonas, Brazil.

Leprosy was diagnosed by experienced professionals from the FUAM through clinical examinations and bacteriological and standard histopathological analyses of the affected skin lesions. Patients with leprosy were classified both according the Ridley and Jopling<sup>32</sup> classification system based on clinical and histological criteria and as paucibacillary (PB) or multibacillary (MB). PB patients were characterized by the presence of  $\leq 5$  skin lesions and a bacteriologic index (BI) of 0 and histologically determined to have indeterminate (I), TT, or borderline tuberculoid (BT) leprosy. MB patients were characterized by the presence of  $> 5$  skin

lesions and a BI >0 and histologically determined to have borderline borderline (BB), borderline lepromatous (BV), or lepromatous (LL) leprosy.

The control group was composed of genetically unrelated individuals who lived in the same endemic area as the leprosy patients and had no family history of leprosy. All participants with any diagnosed infectious disease or immunodeficiency were excluded from the study. The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the FUAM, and informed written consent was obtained from each included participant.

### **DNA extraction and PCR**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin), as recommended by the manufacturer, and DNA samples were stored at -80°C until use. PCR was used to amplify the *CD80* promoter region (690 or 695 bp), which included the -558indel (CATGA), -454C/A (rs68180496), -387T/C (rs1880661), -232G/A (rs41271393), -79C/G (rs16829984), -7T/C (rs16829980), and +5C/A (rs41271391) polymorphisms, and exon 8 of *CD86* (166 bp), which contained the 1057G/A single-nucleotide polymorphism (SNP; rs1129055), using the primers described by Matsushita et al.<sup>23</sup>.

### **Purification of the PCR product and DNA sequencing**

The PCR product was purified using the Wizard SV Gel and PCR Kit (Promega, Madison, Wisconsin). Genotyping of the polymorphisms was performed via direct sequencing, and the sequencing reactions were performed using the same primers that were used for amplification and the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), as described by Platt et al.<sup>33</sup>, except the BigDye Terminator reagent volume was reduced by 0.3 µL. Capillary electrophoresis was performed using a 3130 Genetic Analyzer equipped with capillaries containing the POP-7 polymer (Applied Biosystems).

## Sequence Analysis

The analysis of the sequences was performed using the Sequencing Analysis Software v5.3.1 (Applied Biosystems), and contiguous sequences were constructed using SeqMan v7.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA).

## Statistical analysis

The allelic and genotypic frequencies were obtained by direct counting and differences between either the leprosy patients and control individuals or the PB and MB patients were compared using the  $\chi^2$  test. The  $\chi^2$  test was also used to investigate the Hardy-Weinberg equilibrium of each group. To determine the risk associated with the *CD80* and *CD86* SNPs, odds ratios were calculated using the observed genotypes of the patients and compared with those of the control individuals using the BioEstat (v.5.2) software package<sup>34</sup>. The subgroup analysis of the patient population was performed using the leprosy classification. *p* values less than 0.05 were considered significant.

## Results

### Characteristics of the study population

The general characteristics of the 120 leprosy patients and 115 control individuals, including sex, age and clinical classification are presented in Table 1. There were no differences in the mean age of the control individuals and the leprosy patients; however, there were more males among the leprosy patients. A similar proportion of patients were classified as paucibacillary and multibacillary (49.2% and 50.8%, respectively; Table 1). A total of 61 leprosy patients were grouped as MB, including 9 BB, 23 BV, and 29 VV; 59 leprosy patients were grouped as PB (15 I, 10 TT, and 36 BT). The genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium in each group studied.

Table 1. General characteristics of the study population

		Leprosy patients n=120	Control individuals n=115
Age (years)	n (%)		
	Mean $\pm$ SD	36.4 $\pm$ 13.1	36.2 $\pm$ 12.5
Sex			
	Male	78 (65.0)	43 (37.4)
	Female	42 (35.0)	72 (62.6)
Operational classification			
	PB	59 (49.2)	
	MB	61 (50.8)	
Ridley-Jopling			
	TT	10 (8.3)	
	BT	34 (28.3)	
	BB	9 (7.5)	
	BV	23 (19.2)	
	VV	29 (24.2)	

Tuberculoid (TT); Borderline Tuberculoid (BT); Borderline Borderline (BB); Borderline Lepromatous (BL); Lepromatous (LL); SD, standard deviation. Mann Whitney Test for age and subjects controls  $p > 0.05$ ; Chi-square test for sex  $p < 0.0001$ .

### Genotype and allele frequencies of the *CD86 +1057 A/G* polymorphism

The genotype and allele frequencies of the *CD86 +1057 A/G* polymorphism of the leprosy patients and the control individuals are presented in Table 2.

Table 2. Distribution of the CD86+1057G/A polymorphism alleles and genotypes in leprosy patients and control individuals

Polymorphism	Patients n= 120 (%)	Controls n=115 (%)	OR (95% CI)
Genotypes			
G/G	84 (70.0)	83 (72.2)	0.90 (0.51 - 1.58)
G/A	35 (29.2)	26 (22.6)	1.41 (0.78 - 2.54)
A/A	1 (0.8)	6 (5.2)	0.15 (0.02 - 1.29)
Alleles			
G	203 (84.6)	192 (83.5)	1.09 (0.66 - 1.78)
A	37 (15.4)	38 (16.5)	0.92 (0.56 - 1.51)

OR, odds ratio; 95% CI, confidence interval. The *p* values are for comparison between leprosy patients and control individuals. Comparisons between the genotype and allele frequencies of the two groups were made using the Chi-square test. No significant differences were found in the distribution of the genotype and allele frequencies between the two groups.

There was a similar genotype distribution among the 120 leprosy patients and 115 control individuals, with the G/G and G/A genotypes being the most prevalent in both populations. The frequency of the G/G, G/A, and A/A *CD86 +1057* genotypes were 70%, 29.2% and 0.8%, respectively, in the leprosy patients and 72.2%, 22.6% and 5.2%, respectively, in the control subjects. Overall, there was no significant difference between leprosy patients and control individuals for the allele frequencies and *CD86 +1057* G/A genotypes. There were no also significant differences in the *CD86 +1057* G/A genotype frequencies among the leprosy subgroups (data not shown).

### Genotype and allele frequencies of the *CD80* promoter polymorphisms

Table 3 shows the allele and genotype frequencies of the polymorphisms present in the *CD80* promoter region in the control individuals and leprosy patients. The *CD80* -558 del, -454 C, -387 C, -232 G, -79 C, -7 T, and 5 C alleles were the most common alleles in the study population. All individuals in the study population who had the genotype -558del/del were -454C/C, -232G/G, -7T/T and +5C/C, and most individuals who had the genotype -558del/ins were -454C/A, -232G/A, -79T/C and 5C/A. The -79 C allele was the most frequently detected allele in this study: over 90% of the study population was -79 C. There were no significant

differences in the genotype and allele frequencies of the *CD80* promoter polymorphisms between the leprosy patients and the control individuals (Table 3). Similarly, a comparison of the two patient subgroups based on the operational classification did not show any evidence for an association between the *CD80* promoter polymorphisms and paucibacillary or multibacillary disease (data not shown).

Table 3. Distribution of *CD80* promoter polymorphism alleles and genotypes in leprosy patients and control individuals

Polymorphisms	Patients n=120 (%)	Control n=115 (%)	OR (95% CI)
-558indel			
del	209 (87.1)	204 (88.7)	0.86 (0.49 - 1.50)
ins	31 (12.9)	26 (11.3)	1.16 (0.67 - 2.03)
del/del	89 (74.2)	90 (78.3)	0.80 (0.44 - 1.46)
del/ins	31 (25.8)	24 (20.9)	1.32 (0.72 - 2.43)
ins/ins	0	1 (0.87)	
-454 C>A			
C	206 (85.8)	204 (88.7)	0.77 (0.45 - 1.33)
A	34 (14.2)	26 (11.3)	1.29 (0.75 - 2.24)
C/C	89 (74.2)	90 (78.3)	0.80 (0.44 - 1.46)
C/A	28 (23.3)	24 (20.9)	1.15 (0.62 - 2.14)
A/A	3 (2.5)	1 (0.87)	2.92 (0.30 - 28.52)
-387 T>C			
T	114 (47.5)	106 (46.1)	1.06 (0.74 - 1.52)
C	126 (52.6)	124 (53.9)	0.94 (0.66 - 1.36)
T/T	30 (25.0)	23 (20.0)	1.33 (0.72 - 2.47)
T/C	54 (45.0)	60 (52.2)	0.75 (0.45 - 1.25)
C/C	36 (30.0)	32 (27.8)	1.11 (0.63 - 1.96)
-232 G>A			
G	206 (85.8)	204 (88.7)	0.77 (0.45 - 1.33)
A	34 (14.2)	26 (11.3)	1.29 (0.75 - 2.24)
G/G	89 (74.2)	90 (78.3)	0.80 (0.44 - 1.46)
G/A	28 (23.3)	24 (20.9)	1.15 (0.62 - 2.14)
A/A	3 (2.5)	1 (0.87)	2.92 (0.30 - 28.52)
-79 C>G			
C	222 (92.5)	206 (89.6)	1.44 (0.76 - 2.72)
G	18 (7.5)	24 (10.4)	0.70 (0.37 - 1.32)
C/C	103 (85.8)	94 (81.74)	1.35 (0.67 - 2.72)
C/G	16 (13.3)	18 (15.65)	0.83 (0.40 - 1.72)
G/G	1 (0.84)	3 (2.61)	0.29 (0.03 - 2.79)
-7 T>C			
T	206 (85.8)	204 (88.7)	0.77 (0.45 - 1.33)
C	34 (14.2)	26 (11.3)	1.29 (0.75 - 2.24)
T/T	89 (74.2)	90 (78.3)	0.80 (0.44 - 1.46)
T/C	28 (23.3)	24 (20.9)	1.15 (0.62 - 2.14)
C/C	3 (2.5)	1 (0.87)	2.92 (0.30 - 28.52)
5 C>A			
C	206 (85.8)	204 (88.7)	0.77 (0.45 - 1.33)
A	34 (14.2)	26 (11.3)	1.29 (0.75 - 2.24)
C/C	89 (74.2)	90 (78.3)	0.80 (0.44 - 1.46)
C/A	28 (23.3)	24 (20.9)	1.15 (0.62 - 2.14)
A/A	3 (2.5)	1 (0.87)	2.92 (0.30 - 28.52)

The p values are for comparison between the leprosy patients and the control individuals. Comparisons between the genotype and allele frequencies of the two groups were made using the Chi square test. No significant differences were found in the distribution of the genotype and allele frequencies between the two groups ( $p > 0.05$  for all).

## Discussion

CMI is critical in resistance against *M. leprae*, and T cell activation requires signals provided by costimulatory molecules. CMI plays a key role because it can protect against the spread of the bacteria, as illustrated by the different disease course in TT patients and LL patients, who fail to eradicate *M. leprae* because of poor CMI resulting from antigen-specific T cell anergy. The CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in LL patients fail to respond to *M. leprae*, allowing the bacteria to proliferate, resulting in an increased bacterial load<sup>2</sup>. The costimulatory signal is essential for the activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the induction of the immune response. The costimulatory molecules are extremely important and provide the second signal necessary for T cell activation.

CD80 and CD86 are important mediators of T cell activation in the immune response. A number of cytokines secreted from helper T cells infiltrating into the inflammatory microenvironment, including IL-2, IL-4, GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), IFN- $\gamma$  and IL-10, modulate the expression of CD80 and CD86 on human Langerhans cells<sup>35</sup>. Furthermore, the expression of CD80 and CD86 is also induced by bacterial lipopolysaccharides<sup>36, 37</sup>, and CD80 and CD86 have been shown to play an important role in a number of infections, including *Leishmania*<sup>38, 39</sup>, *Toxoplasma gondii*<sup>40, 41</sup>, *M. leprae*<sup>18-20</sup>, *M. tuberculosis*<sup>42</sup>, *Porphyromonas gingivalis*<sup>15</sup>, herpes simplex virus type 2<sup>43</sup> and cytomegalovirus<sup>44, 45</sup>. The CD86 + 1057G/A polymorphism is associated with many diseases, including pemphigus foliaceus<sup>25</sup>, osteosarcoma<sup>26</sup>, Ewing's Sarcoma<sup>27</sup>, chronic obstructive pulmonary disease<sup>28</sup>, colorectal cancer<sup>29</sup>, systemic sclerosis<sup>30</sup> and Graves' ophthalmopathy<sup>31</sup>. However, some studies have reported that polymorphisms in the CD80 promoter and the CD86 +1057G/A polymorphism are not associated with most autoimmune diseases<sup>21,22,23</sup> and sarcoidosis<sup>24</sup>.

In leprosy, the role of CD80 and CD86 has been previously examined<sup>16-20</sup>. Previous studies have shown that the expression of CD80 is reduced in patients with untreated borderline or lepromatous leprosy<sup>20</sup> and that cells from tuberculoid and lepromatous patients express altered mRNA levels of CD80, CD86, CD28 and CTLA4<sup>18</sup>. Overall, these changes can negatively affect the induction of the cellular immune response to *M. leprae*.



The differential expression of CD80 and CD86 in leprosy patients may be conditioned by genetic and immunological factors. In addition to the genetic regulatory elements controlling their expression, other factors can modulate the expression CD80 and CD86. For example, exposure to antigens, especially contact with the same antigen repeatedly, increases the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells from leprosy patients. This increase may be due to factors associated with unknown antigens that are thought to cause disease or some other factors that influence the expression of CD80 and CD86 in susceptible individuals. Therefore, additional studies of other polymorphic immunoregulatory genes are needed to understand the mechanisms underlying susceptibility or resistance to leprosy and its clinical presentations.

In this study, polymorphisms in *CD80* and *CD86* were investigated for associations with leprosy and its clinical presentations. To our knowledge, the association of these polymorphisms with leprosy has not been investigated in previous studies; therefore, this is the first study to investigate associations between polymorphisms in costimulatory genes and leprosy.

The *CD80* alleles -558del, -454C, -232G, -79C, -7T, and 5C were the most frequently detected alleles in the Amazon population studied here. Similar results were found by Beltrame and collaborators in Afro-Brazilians and Euro-Brazilians<sup>46</sup>.

The *CD86* 1057G/A polymorphism is a nonsynonymous SNP in exon 8 that results in either an alanine or threonine at position 304. Importantly, the presence of a threonine introduces a potential phosphorylation site in the cytoplasmic region<sup>47</sup>. Studies have shown that there are variations in the frequency of the *CD86* +1057 A/G polymorphism among different ethnic groups. Studies performed in Chinese individuals<sup>28, 29</sup>, Japanese individuals<sup>23, 24</sup> and Brazilians of Japanese descent<sup>46</sup> have shown the 1057A allele was more prevalent. By contrast, in the present study, the *CD86* +1057 G/G genotype and the 1057G allele were more prevalent in an Amazon population. Similar frequencies have been found in Afro-Brazilian and Euro-Brazilian populations<sup>46</sup>.

A study performed in southern Brazil investigated the association of the *CD86* 1057G/A SNP with pemphigus foliaceus in 269 patients and 395 controls subdivided as Euro-Brazilian or Afro-Brazilian on the basis of their predominant ancestry. Associations were found for the *CD86* 1057G/A SNP in Afro-Brazilians, with the 1057G allele being more prevalent in pemphigus

foliaceus patients and the 1057A allele associated with increased resistance to pemphigus foliaceus (1057A-homozygous individuals were particularly resistant). However, no association was observed in the Euro-Brazilian population<sup>25</sup>. The *CD86* +1057 G/A and A/A genotypes and the 1057A allele, which had an overall low prevalence in our study population, have been previously associated with several diseases, including a higher risk of developing colorectal cancer in Chinese individuals<sup>29</sup> and chronic obstructive pulmonary disease<sup>28</sup>.

Our results show that there are no significant differences in the genotype and allelic distribution of the *CD86* +1057 A/G polymorphism and polymorphisms present in the *CD80* promoter region between control individuals and leprosy patients, demonstrating that *CD80* and *CD86* polymorphisms have no relationship with susceptibility to leprosy, at least in Amazonian Brazilian leprosy patients. Overall, we conclude that although CD80 and CD86 have important functions in the immune response, polymorphisms in these genes have no influence on susceptibility to leprosy.

### **Acknowledgements**

We would like to thank all of the study participants for their participation in this study and the Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta staff for hospitality and information, especially Megumi Sadahiro; the medical team, particularly Paula Frassinette Bessa Rebello and Evanilda Braga Fernandes Oliveira; the nursing staff, especially Maria Cilene Dias da Costa and Maria Marlice Mar Nunes for their attention to the patients. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). The funding sources had no role in the study design or the collection, analysis, and interpretation of the data. Conflict of interest: No conflict of interest to declare.

## References

1. Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiology* 2011;6:217-30.
2. Goulart IMB, 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;35:363-75.
3. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clinical microbiology reviews* 2006;19:338-81.
4. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiology* 2011;6:533-49.
5. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine* 2009;361:2609-18.
6. Cardoso C, Pereira A, Brito-de-Souza V, Dias-Baptista I, Maniero V, Venturini J, et al. IFNG+ 874 T> A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Human genetics* 2010;128:481-90.
7. 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;13:493-8.
8. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annual Review of Immunology* 1996;14:233-58.
9. Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunology and cell biology* 1999;77:304-11.
10. Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Critical reviews in immunology* 1998;18:389-418.
11. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *The Journal of Clinical Investigation* 2002;109:295-9.
12. Lanier L, O'Fallon S, Somoza C, Phillips J, Linsley P, Okumura K, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *The Journal of Immunology* 1995;154:97-105.
13. Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol* 1999;77:304-11.
14. Kuchroo VK, Prabhu Das M, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707-18.
15. Zhang P, Martin M, Yang Q-B, Michalek SM, Katz J. Role of B7 Costimulatory Molecules in Immune Responses and T-Helper Cell Differentiation in Response to Recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 2004;72:637-44.
16. Santos D, Santos S, Esquenazi D, Nery J, Defruyt M, Lorre K, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai zasshi Japanese journal of leprosy: official organ of the Japanese Leprosy Association* 2001;70:15-24.
17. Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van Heuverswyn H, et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clinical and Experimental Dermatology* 2007;32:75-80.

18. Schlienger K, Uyemura K, Jullien D, Sieling PA, Rea TH, Linsley PS, et al. B7-1, But Not CD28, Is Crucial for the Maintenance of the CD4+ T Cell Responses in Human Leprosy. *The Journal of Immunology* 1998;161:2407-13.
19. Sridevi K, Neena K, Chitralkha K, Arif A, Tomar D, Rao D. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alphabeta, TCR gammadelta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using *Mycobacterium leprae* antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trat protein. *International immunopharmacology* 2004;4:1-14.
20. Agrewala, Kumar, Vohra. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. *Clinical & Experimental Immunology* 1998;111:56-63.
21. Teutsch SM, Booth DR, Bennetts BH, Heard RNS, Stewart GJ. Association of common T cell activation gene polymorphisms with multiple sclerosis in Australian patients. *Journal of Neuroimmunology* 2004;148:218-30.
22. Turpeinen HT, Laine APL, Nejentsev SN, Sjöroos MS, Simell OS, Veijola RV, et al. CD86 gene polymorphisms: no association with Type I diabetes among Finnish subjects. *Diabetologia* 2002;45:1041-2.
23. Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity* 2000;1:428-34.
24. Handa T, Nagai S, Ito I, Tabuena R, Shigematsu M, Hamada K, et al. Polymorphisms of B7 (CD80 and CD86) genes do not affect disease susceptibility to sarcoidosis. *Respiration* 2005;72:243-8.
25. Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. *Human Immunology* 2010;71:809-17.
26. Wang W, Song H, Liu J, Song B, Cao X. CD86 +1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Osteosarcoma. *DNA and Cell Biology* 2011;30:925-9.
27. Wang J, Zhou Y, Feng D, Yang H, Li F, Cao Q, et al. CD86 +1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Ewing's Sarcoma: A Case–Control Study. *DNA and Cell Biology* 2011.
28. Liu Y, Liang WB, Gao LB, Pan XM, Chen TY, Wang YY, et al. CTLA4 and CD86 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Human Immunology* 2010;71:1141-6.
29. Pan XM, Gao LB, Liang WB, Liu Y, Zhu Y, Tang M, et al. CD86+ 1057 G/A polymorphism and the risk of colorectal cancer. *DNA and Cell Biology* 2010;29:381-6.
30. Abdallah A, Renzoni E, Anevlavis S, Lagan A, Munkonge F, Fonseca C, et al. A polymorphism in the promoter region of the CD86 (B7. 2) gene is associated with systemic sclerosis. *International Journal of Immunogenetics* 2006;33:155-61.
31. Liao W-L, Chen R-H, Lin H-J, Liu Y-H, Chen W-C, Tsai Y, et al. The Association between Polymorphisms of B7 Molecules (CD80 and CD86) and Graves' Ophthalmopathy in a Taiwanese Population. *Ophthalmology* 2011;118:553-7.
32. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association* 1966;34:255-73.
33. Platt AR, Woodhall RW, George AL. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 2007;43:58-62.
34. Ayres M. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Sociedade Civil Mamirauá; 2007.

35. Yokozeki H, Takayama K, Ohki O, Satoh T, Umeda T, Katayama I, et al. Comparative analysis of CD80 and CD86 on human Langerhans cells: expression and function. *Archives of dermatological research* 1998;290:547-52.
36. Liu Y, Janeway CA. Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *International immunology* 1991;3:323-32.
37. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *The Journal of experimental medicine* 1994;180:631-40.
38. Brodskyn CI, DeKrey GK, Titus RG. Influence of Costimulatory Molecules on Immune Response to *Leishmania major* by Human Cells *In Vitro*. *Infection and Immunity* 2001;69:665-72.
39. Favali C, Costa D, Afonso L, Conceição V, Rosato A, Oliveira F, et al. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Microbes and Infection* 2005;7:86-92.
40. Subauste CS, de Waal Malefyt R, Fuh F. Role of CD80 (B7. 1) and CD86 (B7. 2) in the immune response to an intracellular pathogen. *The Journal of Immunology* 1998;160:1831.
41. Morgado P, Ong Y-C, Boothroyd JC, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* Induces B7-2 Expression through Activation of JNK Signal Transduction. *Infection and Immunity* 2011;79:4401-12.
42. Corominas M, Cardona V, Gonzalez L, Caylà J, Rufi G, Mestre M, et al. B-lymphocytes and co-stimulatory molecules in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2004;8:98-105.
43. Thebeau LG, Morrison LA. B7 Costimulation Plays an Important Role in Protection from Herpes Simplex Virus Type 2-Mediated Pathology. *Journal of virology* 2002;76:2563-6.
44. Cook CH, Chen L, Wen J, Zimmerman P, Zhang Y, Trgovcich J, et al. CD28/B7-mediated co-stimulation is critical for early control of murine cytomegalovirus infection. *Viral immunology* 2009;22:91-103.
45. Arens R, Loewendorf A, Her MJ, Schneider-Ohrum K, Shellam GR, Janssen E, et al. B7-Mediated Costimulation of CD4 T Cells Constrains Cytomegalovirus Persistence. *Journal of virology* 2011;85:390-6.
46. Beltrame MH, Pincerati MR, Dalla-Costa R, Wassem R, Köhler KF, Chautard-Freire-Maia EA, et al. CD80 and CD86 polymorphisms in populations of various ancestries: 5 new CD80 promoter alleles. *Human Immunology* 2012;73:111-7.
47. Delneste Y, Bosotti R, Magistrelli G, Bonnefoy J-Y, Gauchat J-F. Detection of a polymorphism in exon 8 of the human CD86 gene. *Immunogenetics* 2000;51:762-3.

## Apêndices

**APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) destinado aos pacientes com hanseníase**

**TÍTULO DO ESTUDO:** Avaliação de polimorfismos genéticos das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em pacientes portadores de hanseníase.

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

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

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

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

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

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**



Manaus, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

(Impressão dactiloscópica)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Nome do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

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



**APÊNDICE B – Formulário para coleta de dados dos pacientes com hanseníase**

INICIAIS DO PACIENTE										PRONTUÁRIO DO PACIENTE:								DATA DA VISITA:								
-------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

**DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO PACIENTE**

IDADE <input type="checkbox"/>				
<b>EXAME DERMATONEUROLÓGICO E EXAMES COMPLEMENTARES</b>				
Início dos sintomas No de meses _____	Tipo da lesão 1. Mácula <input type="checkbox"/> 2. Placa 3. Pápula 4. Infiltração difusa 5. Nódulo 6. Área anestésica	Cor da lesão 1. Hipocrômica <input type="checkbox"/> 2. Eritemátosa 3. Hipercrômica 4. Normocrômica	Sensibilidade 1. Alterada 2. Duvidosa 3. Normal	
Número de lesões <input type="checkbox"/> De 1 a 10 lesões (por o número exato) 11 ou mais lesões 88. Infiltração difusa	Baciloscópia <input type="checkbox"/> 1. Positiva 2. Negativa Resultado do IB _____	ML-FLOW <input type="checkbox"/> 1. Positiva 2. Negativa 3. Duvidoso 4. Não realizado	Intensidade do ML-FLOW <input type="checkbox"/> 1+ 2+ 3+ 4+	
<b>CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL</b>				
1. Paucibacilar (até 5 lesões cutâneas) <input type="checkbox"/> 2. Multibacilar (mais de cinco lesões cutâneas) <input type="checkbox"/>				
<b>CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA</b>				
1. Hanseníase indeterminada      2. Hanseníase Tuberculóide      3. Hanseníase Lepromatosa 4. Hanseníase Borderline Tuberculóide      5. Hanseníase Borderline Borderline <input type="checkbox"/> 6. Hanseníase Borderline Lepromatosa				
<b>EXAME DOS NERVOS PERIFÉRIOS – INÍCIO DO TRATAMENTO</b>				
	<b>LEGENDA EXAME DO NERVO</b> 0. NORMAL 1. ESPESSADO 2. ABSCESSO DE NERVO		<b>LEGENDA ESCALA DE DOR REFERIDA</b> 0. SEM DOR 1. DOR FRACA 2. DOR FORTE	
<b>NERVOS</b>	<b>DIREITO</b>	<b>ESQUERDO</b>	<b>DIREITO</b>	<b>ESQUERDO</b>
Ulnar				
Mediano				
Radial				
Fibular				
Tíbia posterior				
Outros				

Assinatura e carimbo do médico examinador

Obs: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) destinado aos indivíduos do grupo controle da pesquisa.**

**TÍTULO DO ESTUDO:** Avaliação de polimorfismos genéticos das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em pacientes portadores de hanseníase.

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

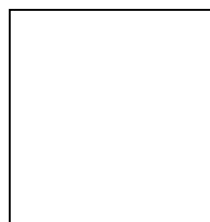
**PROCEDIMENTOS:** Para este estudo serão coletados 5 mL de sangue para análise laboratorial a ser realizada na Fundação Alfredo da Matta.

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

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

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

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**



Manaus, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

(Impressão dactiloscópica)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Nome do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

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

**APÊNDICE D – Formulário para coleta de dados dos indivíduos do grupo controle.****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA**

NOME: \_\_\_\_\_

Sexo: M ( ) F ( )    Data de Nascimento \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_    Idade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**Outros dados**

Cicatrizes BCG: 1 ( ) 2 ( ) Nenhuma ( )

Apresenta histórico de hanseníase: Sim ( ) Não ( )

Existe algum relato de hanseníase na família: Sim ( ) Não ( )

Apresenta alguma doença genética: Sim ( ) Não ( )

Qual? \_\_\_\_\_

**APÊNDICE E – Protocolo de purificação do produto PCR a partir de gel – kit *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, Wisconsin)**

- 1- Realizar a eletroforese em gel de agarose 1% das amostras a ser purificadas;
- 1- Identificar e pesar os tubos de 1,5 mL;
- 2- Após a fim da eletroforese cortar os fragmentos de DNA esperada;
- 3- Colocar o pedaço do gel cortado em seu respectivo tubo e pesar;
- 4- Acrescentar a solução *Membrane Binding* a quantidade será a diferença do peso inicial ao peso final, seguindo a relação 10 mL *Membrane Binding Solution* por 10 mg de gel cortado
- 5- Misturar e incubar a 59<sup>0</sup> C até o gel estar completamente dissolvido;
- 6- Identificar a coluna e o tubo coletor;
- 7- Inserir a coluna no tubo coletor e transferir a mistura do gel dissolvida para coluna;
- 8- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente;
- 9- Centrifugar a 13500 g por 1 minuto e descartar o conteúdo do tubo coletor e recolocar a coluna;
- 10- Adicionar 700 µL da solução *Membrane Wash* e centrifugar a 13500 g por 1 minuto;
- 11- Descartar o conteúdo do tubo coletor e recolocar a coluna;
- 12- Adicionar 500 mL solução *Membrane Wash* e centrifugar a 13500 g por 5 minutos;
- 13- Descartar o conteúdo do tubo coletor e centrifugar por 1 minuto com a tampa dos tubos aberta para a total evaporação de resíduos de etanol e descartar o conteúdo remanescente;
- 14- Transferir a coluna para um tubo de 1,5 mL novo e com sua respectiva identificação
- 15- Adicionar 30 µL de *Nuclease – Free Water* no centro da coluna e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- 16- Centrifugar a 13500 g por 1 minuto, descartar a coluna e estocar a 4<sup>0</sup> C em caso de uso imediato ou a 20<sup>0</sup> C para uso posterior.

**APÊNDICE F – Protocolo precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio – Big Dye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystem.**

1. Remover a placa do termociclador e centrifugue 1 minuto 200 RCF;
2. Adicionar 1 µL de EDTA 125 mM a cada um dos poços;  
**Nota:** Tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços.
3. Adicionar 1 µL de acetato de sódio 3 M (Ph 5,2) a cada um dos poços;  
**Nota:** Tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços.
4. Adicionar 25 µL de EtOH 100% gelado a cada um dos poços;
5. Selar a placa com strips e misture por inversão 4 vezes;
6. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz;
7. Centrifugar a 2000 RCF por 45 minutos;  
**Importante:** O próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível, então faça um spin na placa por mais 2 minutos antes de recomeçar.
8. Inverter a placa e fazer um spin até 180 RCF 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;
9. Adicionar 35 µL de EtOH 70% em cada um dos poços;
10. Centrifugar a 1650 RCF por 15 minutos à 4<sup>0</sup> C;
11. Inverter a placa e fazer um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;  
**Nota:** Comece a contar o tempo assim que o motor começar a se mover.
12. Cobrir a placa com papel alumínio e incubar a 52<sup>0</sup> C por 15 minutos no termociclador;
13. Se não for colocar imediatamente no sequenciador deve ser armazenada a -20<sup>0</sup> C ao abrigo da luz;
14. No momento de sequenciar ressuspender com 10 µL de formamida Hi-Di;
15. Aquecer a placa 95<sup>0</sup> C por 1 minuto, montar e coloque no sequenciador.

## **Anexos**

## ANEXO A – Liberação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta para realização do “Projeto DCR”.



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



PARECER CONSUBSTANCIADO Nº 019/2008

### I. IDENTIFICAÇÃO

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

### II. OBJETIVOS DO PROJETO

#### Objetivo geral:

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

#### Objetivos específicos

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

### III. RESUMO DO PROJETO

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

### IV. ANÁLISE DOS ELEMENTOS METODOLÓGICOS





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



(Resolução CNS 196/96 e complementares)

Estrutura do protocolo: Adequado.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado.

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

Informação adequada quanto ao financiamento: Adequado.

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

Cronograma de execução: Adequado.

Recursos humanos envolvidos e orçamento: Adequados.

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

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

**VI. Parecer**  
Aprovado.

Manaus, 02 de outubro de 2008.

*Rosilene Conceição da Silva Cruz*  
**ROSSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ**  
Coordenadora do CEP

**ANEXO B – Liberação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da  
Matta para realização do projeto dissertação.**



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



Manaus, 29 de março 2010

Parecer 002/10 – CEP/FUAM

A Pesquisadora:

**Lúcia de Paula**

Assunto: Parecer

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

Respeitosamente,

*Rosilene Conceição da Silva Cruz*  
**ROSSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

## Referências

- ABBAS AK; LICHTMAN AH; OBER JS. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2008.
- ABDALLAH, A.M; RENZONI, E.A.; ANEVLAVIS, S.; LAGAN, A.L.; MUNKONGE, F.M.; FONSECA C.; et al. A polymorphism in the promoter region of the CD86 (B7. 2) gene is associated with systemic sclerosis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, n. 3, p. 155-61, 2006.
- AGREWALA, J.N.; KUMAR, B.; VOHRA, H. Potential Role of B7-1 and CD28 Molecules in Immunosuppression in Leprosy. **Clin. Exp. Immunol**; v. 111, n.1, p. 56-63, 1998.
- ALCAÏS, A.; MIRA, M.; CASANOVA, J.L.; SCHURR, E.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion Immunology**, v. 17, n.1, p. 44-8, 2005.
- ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, no. 3, p.373-82, 2003.
- ARENS, R.; LOEWENDORF, A.; HER, M.J.; SCHNEIDER-OHRUM, K.; SHELLAM, G.R.; JANSSEN, E.; et al. B7-Mediated Costimulation of CD4 T Cells Constrains Cytomegalovirus Persistence. **Journal of virology**, v. 85, n. 1, p. 390-96, 2011.
- BEIGUELMAN, B. Genética e Hanseníase **Ciências & Saúde Coletiva**, v.7, n. 1, p. 117-28, 2002.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO FUAM, Gerência de epidemiologia, Subgerência de informação em Saúde, Fundação Alfredo da Matta. **Boletim Epidemiológico 2010**. Manaus, 2011.
- BOCHUD PY, HAWN TR, SIDDIQUI MR, SAUNDERSON P, BRITTON S, ABRAHAM I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **J Infect Dis**, v.197, p. 253-61, 2008.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de prevenção de incapacidades. Brasília: Área Técnica de Dermatologia Sanitária, 2001.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil, 2008.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Hanseníase no Brasil: Dados e indicadores selecionados, 2009.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Coeficiente de detecção geral de casos novos de hanseníase Brasil e regiões, 1990 a 2010, [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf\\_5\\_coeficiente\\_deteccao\\_geral\\_casos1990\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf_5_coeficiente_deteccao_geral_casos1990_2010.pdf), 2011.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase Brasil 2000 – 2011, 2012

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab\\_indicadoresbrasil20002011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_indicadoresbrasil20002011.pdf). consultado em 28/03/2012.

BRODSKYN, C. I.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Influence of Costimulatory Molecules on Immune Response to *Leishmania major* by Human Cells In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 665-72, 2001

BRYCESON, A.; PFALTZGRAFF, R. E. **Leprosy**. 3. ed. New York: Churchill Livingstone; 1990.

CARDOSO, C.C.; PEREIRA, A.C.; DE SALES MARQUES, C.; MORAES, M.O.; Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology**, v.6, n. 5, p. 533-49, 2011.

CHIN-A-LIEN, R.A.M.; FABER, W.R.; VAN, RENS M.M.; LEIKER, D.L.; NAAFS, B.; KLATSER, P.R. Follow-up of multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-I based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? **Leprosy Review** v. 63, p. 21-7, 1992.

COLE, S.T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL J; JAMES, K.D.; THOMSON, J.R.; WHEELER, R.P.; HONORE, N.; et al., Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007–11, 2001.

COLLINS, M.; LING, V.; CARRENO, B.M. The B7 family of immune-regulatory ligands. **Genome Biology**, v. 6, p. 223.1-223.7, 2005.

COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. **Genome Research**, 8:p. 1229–31, 1998.

COOK, C.H.; CHEN, L.; WEN, J.; ZIMMERMAN, P.; ZHANG, Y.; TRGOVCICH, J.; et al. CD28/B7-mediated co-stimulation is critical for early control of murine cytomegalovirus infection. **Viral immunology**, v. 22, n. 2, p. 91-103, 2009.

COROMINAS, M.; CARDONA, V.; GONZALEZ, L.; CAYLÀ, J.; RUFÍ, G.; MESTRE, M.; et al. B-lymphocytes and co-stimulatory molecules in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 1, p. 98-105, 2004.

DALLAS-COSTA, R.; PINCERATI, M.R.; BELTRAME, M.H.; MALHEIRO, D.; PETZL-ERLER. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 71, n 8, p. 809-17, 2010.

DELNESTE, Y.; BOSOTTI, R.; MAGISTRELLI, G.; BONNEFOY, J.Y.; GAUCHAT, J.F. Detection of a polymorphism in exon 8 of the human CD86 gene. **Immunogenetics**, v. 51, n. 8, 762–63, 2000.

DUERKSEN, F. **Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase**. American Leprosy Missions, 1997.

FAVALI C, COSTA D, AFONSO L, CONCEIÇÃO V, ROSATO A, OLIVEIRA F, et al. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 1, p. 86-92, 2005

FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 74, n. 2, p. 113-19, 1999.

GOULART, IMB; PENNA, GO; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.35, n. 4, p. 365-75, 2002.

GROHMANN, U.; ORABONA, C.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; CALCINARO, F.; FALORNI, A.; CANDELORO, P.; BELLADONNA, BIANCHI, R.; FIORETTI, A.; PUCCETTI, P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vitro. **Nat. Immunol.**, v. 3, p.1097–101, 2002

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.**,v. 41, p. 95-98, 1999.

HANDA, T.; NAGAI, S.; ITO, I.; TABUENA, R.; SHIGEMATSU, M.; HAMADA, K.; KITAICHI, M.; IZUMI, T.; AOYAMA, T.; TOGUCHIDA, J.; MISHIMA, M. Polymorphisms of B7 (CD80 and CD86) genes do not affect disease susceptibility to sarcoidosis. **Clinical Investigations Respiration**, v. 72, p.243–48, 2005.

JOPPLING, W.H.; MCDOUGALL, A.C. **Manual de hanseníase**. Rio de Janeiro: Atheneu; 1991.

KANG, T.J.; CHAE, G.T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.31, p.53-8, 2001.

KANG TJ, YEUM CE, KIM BC, YOU EY, CHAE GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunol**,v.112, p.674-80, 2004.

KRUTZIK, S.R.; OCHOA, M.T.; SIELING, P.A.; UEMATSU, S.; N.G Y.W, LEGASPI, A.; et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med.** ,v.9, p. 525-32, 2003.

KRUTZIK SR, TAN B, LI H, OCHOA MT, LIU PT, SHARFSTEIN SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med**, v. 11 p. 653-60, 2005.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. **Annual Review of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 233-258, 1996.

LINSLEY, P.S.; BARDY, W.; URNES, M.; GROSMARE, L.S.; DAMLE, N.K.; LEDBETTER, J.A. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. **Journal of Experimental Medicine**; 174, p.561-69, 1991.

LIAO, W.L.; CHEN, R.H.; LIN, H.J.; LIU, Y.H.; CHEN, W.C.; TSAI, Y.; et al. The Association between Polymorphisms of B7 Molecules (CD80 and CD86) and Graves' Ophthalmopathy in a Taiwanese Population. **Ophthalmology**, v. 118, n. 3, p. 553-57, 2011.

LIU, Y.; LIANG, W.B.; GAO, L.B.; PAN, X.M.; CHEN, T.Y.; WANG, Y.Y.; et al. CTLA4 and CD86 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. **Human Immunology**, v. 71, n. 11, p. 1141-46, 2010.

LOGUE, E. C.; SHA, W. C. CD28-B7 bidirectional signaling: a two-way street to activation. **Nature immunology**, v. 5, n. 11, p. 1103, 2004.

MACHADO, PRL. Imunologia. In: Dermatologia Tropical: Hanseníase. Talhari S, Neves RO, Penna GO, Oliveira ML (Editors), **Dermatologia Tropical: Hanseníase**. Manaus: Tropical; 2006p.111-120.

MAEDA Y, MUKAI T, SPENCER J, MAKINO M. Identification of an immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. **Infect Immun**, v. 73, p. 2744–50, 2005.

MARÍN, L.A.; MOYA-QUILES, M.R; MIRAS, M.; MURO, M.; MINGUELA, A.; BERMEJO, J.; RAMÍREZ, P.; GARCIA –ALONSO, A.M.; PARRILLA P.; ALVAREZ-LÓPEZ, M.R. Evaluation of CD86 gene polymorphism at +1057 position in liver transplant recipients, **J Clin Immunol**, v.15, n. 1, p. 69-74, 2005.

MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Riberão Preto: Holos, 2001.

MATSUSHITA, M.; TSUCHIYA, N.; OKA, T.; YAMANE, A.; TOKUNAGA, K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Genes and Immunity**, v. 1, p. 428–34, 2000.

MENDONÇA, V.A; COSTA, R.D.; MELO, G.E.B.A.; ANTUNES, C.M.; TEIXEIRA, A.L. Imunologia da hanseníase. **An Bras Dermatol**, v.83, no.4, p.343-350, 2008.

MILLER, E.N.; JAMIESON, S.E.; JOBERTY, C.; FAKIOLA, M.; HUDSON, D.; PEACOCK, C.S.; et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. **Genes Immun**, v.5, p.63–7, 2004.

MIRA, M.T.; ALCAÏS, A.; VAN, THUC, N.; MORAES, M.O.; DI FLUMERI, C.; THAI, V.H.; et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v.427, p.636-40, 2004.

MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ZIDANE, N.; SHERAFI, D.; PANIZ-MONDOLFI, A.; et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1282-89, 2009.

MORAES, M.O.; CARDOSO C.C.; VANDERBORGHT, P.R.; PACHECO, A.G.; Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v. 77, p.189-202, 2006.

MORGADO, P.; ONG, Y.C.; BOOTHROYD, J.C.; LODOEN, M.B. *Toxoplasma gondii* Induces B7-2 Expression through Activation of JNK Signal Transduction. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 11, p. 4401-12, 2011.

PAN, X.N.; GAO, L.B.; LIANG, W.B.; LIU, Y.; ZHU, Y.; TANG, M.; LI, Y.B.; LIN, Z. CD86 +1057 G/A Polymorphism and the Risk of Colorectal Cancer. **DNA and Cell Biology**. v. 29, n. 7, p. 381-86, 2010.

PEACH, R.J.; BAJORATH, J.; NAEMURA, J.; LEYTZE, G.; GREENE, J.A.; ARUFFO, A.; LINSLEY, J. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. **J Biol Chem**; v.270, n. 36, p. 21181–87, 1995.

PETROFF, M. G.; PERCHELLET, A. B7 Family Molecules as Regulators of the Maternal Immune System in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 506-19, 2010.

- PINHEIRO, R.O; DE SOUZA SALLES, J.; SARNO, E.N; SAMPAIO, E.P. Mycobacterium leprae–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 217-230, 2011.
- PLATT, A. R.; WOODHALL, R. W.; GEORGE, A. L. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. **BioTechniques**, v. 43, n. 1, p. 58-62, 2007.
- PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? Leprosy: a genetic disease. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 5, p. 451-9, 2007.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966.
- ROY, S.; MCGUIRE, W.; MASCIE-TAYLOR, C.G.; et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J Infect Dis**, v.176, p. 530–32, 1997.
- ROY, S.; FRODSHAM, A.; SAHA, B.; HAZRA, S.; MASCIE-TAYLOR, C.G; HILL, A. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n.1, p.187-91.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463, 1977.
- SANTOS, A.R.; ALMEIDA, A.S.; SUFFYS, P.N.; 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**, v.68, p.325–27, 2000.
- SANTOS, D.; SANTOS, S.; ESQUENAZI, D.; NERY, J.; DEFUYT, M.; LORRE, K.; et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. **Nihon Hansenbyo Gakkai zasshi Japanese journal of leprosy: official organ of the Japanese Leprosy Association**, v. 70, n. 1, p. 15-24, 2001.
- SANTOS, D.O.; CASTRO, H.C.; BOURGUIGNON, S.C.; BASTOS, O.M.; RODRIGUES, C.R.; VAN HEUVERSWEYN, H.; et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 75-80, 2007.
- SANTOS, A.R.; SUFFYS, P.N.; VANDERBORGHT, P.R.; et al. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis**, v.186, p. 1687–91, 2002.
- SCHLIENGER, K.; UYEMURA, K.; JULLIEN, D.; SIELING, PA.; REA, T.H.; LINSLEY, P.S.; et al. B7-1, But Not CD28, Is Crucial for the Maintenance of the CD4+ T Cell Responses in Human Leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 5, p. 2407-13, 1998.
- SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L.B.; GILLIS, T.P.; KRAHENBUHL, J.L.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L. The Continuing Challenges of Leprosy . **Clinical. Microbiology. Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–81, 2006.
- SIDDIQI, M.R.; MEISNER S, TOSH K et al. A major susceptibility locus for leprosy on chromosome 10p13. **Nat Genet**, v.27, p.439-41, 2001.

SELING, P.A.; MODLIN, R.L. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. **Springer Seminars Immunopathol.** v.13, p. 413-26, 1992

SRIDEVI, K.; NEENA, K.; CHITRALEKHA, K.T; ARIF, A.K.; TOMAR, D.; RAO, D.N. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alphabeta, TCR gammadelta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trt protein. **International immunopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2004.

TALHARI S.; NEVES R. G. **Dermatologia Tropical: Hanseníase.** 3<sup>a</sup> ed. Manaus: Ed. Tropical, 1997.

TALHARI, S.; NEVES, R.G. PENNA, G.O.; OLIVEIRA, M.L.W. **Dermatologia Tropical: Hanseníase.** 4. ed. Manaus: Ed. Tropical, 2006.

TAN, SY.; GRAHAM, C. Armauer. Hansen (1841-1912): discoverer of the cause of leprosy. **Singapore Med**, v. 49: 520-21, 2008.

TEUTSCH SM, BOOTH DR, BENNETTS BH, HEARD RNS, STEWART GJ. Association of common T cell activation gene polymorphisms with multiple sclerosis in Australian patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 148, n. 2, p. 218-230, 2004.

THEBEAU, L. G.; MORRISON, L. A. B7 Costimulation Plays an Important Role in Protection from Herpes Simplex Virus Type 2-Mediated Pathology. **Journal of virology**, v. 76, n. 5, p. 2563-66, 2002.

TURPEINEN, H.T.; LAINE, A.P.L.; NEJENTSEV, S.N.; SJÖROOS, M.S.; SIMELL, O.S.; VEIJOLA, R.V.; et al. CD86 gene polymorphisms: no association with Type I diabetes among Finnish subjects. **Diabetologia**, v. 45, n. 7, p. 1041-42, 2002.

VASU, C.; WANG, A.; GORLA, S.R.; KAITHAMANA, S.; PRABHAKAR B.S.; HOLTEMAN, M.J. CD80 and CD86 C domains play an important role in receptor binding and co-stimulatory properties **International Immunology**, v. 15, n. 2, p 167-75 2003.

<sup>a</sup>WANG, W.; SONG, H.; LIU, J.; SONG, B.; CAO, X. CD86 + 1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Osteosarcoma. **DNA and Cell Biology**, v.30, p.925-9, 2011.

<sup>b</sup>WANG, J.; ZHOU, Y.; FENG, D.; YANG, H.; LI, F.; CAO, Q.; et al. CD86 +1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Ewing's Sarcoma: A Case–Control Study. **DNA and Cell Biology**, 2011.

WANG, S.; CHEN, L. lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2004.

WEINSHENKER, B. G.; HEBRINK, D. D.; KLEIN, C.; ATKINSON, E. J.; OBRIEN, P. C.; McMURRAY, T. Genetic variation in the B7-1 gene in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 105, p. 184-88, 2000.

ZHANG, F.R.; HUANG, W.; CHEN, S.M.; SUN, L.D.; LIU, H.; LI, Y.; et al. Genomewide association study of leprosy. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609-18, 2009.



ZHANG, P.; MARTIN, M.; YANG, Q.B.; MICHALEK, S.M.; KATZ, J. Role of B7 Costimulatory Molecules in Immune Responses and T-Helper Cell Differentiation in Response to Recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 637-44, 2004.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Weekly epidemiological Record. Leprosy update, v. 36 n. 86, p. 389-400, 2011.