



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**SÉRGIO EDUARDO FONTOURA DA SILVA**

**Estudo de Fatores de Risco Genéticos de  
Suscetibilidade a Hanseníase : O Gene Candidato  
*BCHE* da Enzima Butirilcolinesterase**

**Curitiba**  
**2019**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

Fontoura da Silva, Sérgio Eduardo  
F684ee 2019 Estudo de fatores de risco genéticos de suscetibilidade a hanseníase : o gene candidato BCHE da enzima butirilcolinesterase / Sérgio Eduardo Fontoura da Silva, orientador: Marcelo Távora Mira. – 2019.  
103 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2019  
Bibliografia: 82-110

1. Hanseníase. 2. Genes. 3. Butirilcolinesterase. 4. Predisposição genética para doenças. I. Mira, Marcelo Távora. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.998

**SÉRGIO EDUARDO FONTOURA DA SILVA**

**Estudo de Fatores de Risco Genéticos de Suscetibilidade a  
Hanseníase: O Gene Candidato *BCHE* da Enzima  
Butirilcolinesterase**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
da Pontifícia Universidade Católica do  
Paraná como requisito para obtenção do  
título de Doutor

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

**Curitiba**

**2019**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos dois dias do mês de abril de 2019 às 09hs e 30min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “Estudo de Fatores de Risco Genéticos de Suscetibilidade a Hanseníase: O Gene Candidato BCHE da Enzima Butirilcolinesterase” apresentado por **Sérgio Eduardo Fontoura da Silva** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Marcelo Távora Mira – Presidente (PUCPR)	
Profa. Dra. Renata Iani Werneck (PUCPR)	
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito (PUCPR)	
Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza (UFPR)	
Profa. Dra. Iara José de Taborda Messias Reason (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira                      Conceito Aprovado  
Profa. Dra. Renata Iani Werneck                      Conceito APROVADO  
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito                      Conceito Aprovado  
Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza                      Conceito APROVADO  
Profa. Dra. Iara J. de T. Messias Reason                      Conceito Aprovado  
Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira  
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena  
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela oportunidade de realizar finalmente um sonho antigo.

Aos professores Júlio Merlin e Cynthia Wolanski Bordin, coordenador e ex-coordenadora do curso de Farmácia, pelo apoio e incentivo.

À Scheila, Samantha e Nicolas, meus amores e suporte nesta jornada.

Ao Professor Marcelo Mira, não só pela orientação, mas especialmente pela amizade e ensinamentos preciosos durante este caminho.

Ao grupo, em especial à Priscila e Helena, que sem sua ajuda não conseguiria chegar até aqui.

Aos colegas professores que de um modo ou de outro deram sua contribuição durante o percurso.

*“Cada doença pertence a um doente.  
Cada doente tem uma mente. Cada  
mente é um universo infinito”.*

(Augusto Cury – O Vendedor de Sonhos,  
2008)

## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa causada por uma bactéria (*Mycobacterium leprae*) cuja diversidade genética é muito baixa. Portanto, suscetibilidade à doença e suas formas clínicas são em grande parte determinadas por fatores genéticos do hospedeiro. Vários genes, em especial os relacionados com a resposta imune, estão associados com a suscetibilidade ou resistência à hanseníase, entre eles o gene *BCHE* da butirilcolinesterase (BChE). Estudos realizados nas décadas de 1970 e 1990 demonstraram associação entre um fenótipo atípico de atividade de BChE e suscetibilidade à hanseníase; no entanto, outros estudos realizados no mesmo período falharam em replicar o achado. Em particular, estudo em que se fez a cobertura completa do gene *BCHE* demonstrou associação entre hanseníase e o alelo G da variante rs1799807 através de um desenho de estudo de associação caso-controle realizado em uma amostra recrutada no sul do Brasil. Este achado nunca foi replicado em outra população. No presente estudo, foi utilizada uma estratégia de análise de associação baseado em famílias para se investigar associação de marcadores do gene *BCHE* com hanseníase em uma amostra populacional recrutada em uma região hiperendêmica no norte do Brasil e constituída por 219 indivíduos distribuídos em 64 pedigrees. Foram genotipados os marcadores moleculares rs1126680, rs1355538, rs1799807 e rs1803274. Nesta amostra, nenhum dos SNPs foi encontrado associado à suscetibilidade à doença. Análise de regressão logística mostrou que a idade mais elevada é um fator de risco para a forma multibacilar da doença.

**Palavras-chave:** Hanseníase; *BCHE*; Butirilcolinesterase; Suscetibilidade genética.

## ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease caused by a bacterium (*Mycobacterium leprae*) of very low genetic diversity. Therefore, susceptibility to the disease and its clinical forms is largely determined by host genetic factors. Several genes, mainly related to immune response, are associated with susceptibility or resistance to leprosy; among them, the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase (BChE). Studies conducted in the 1970s and 1990s demonstrated association between an atypical phenotype of BChE activity and susceptibility to leprosy; however, other studies performed during the same period failed to replicate the finding. A full-coverage study of the *BCHE* gene demonstrated association between leprosy and the G-allele of the rs1799807 variant through a case-control study design from a sample recruited in the south of Brazil. This finding is yet to be replicated in an independent population. In the present study, a family-based association analysis strategy was used to investigate the association of *BCHE* gene markers with leprosy in a population sample recruited in a hyperendemic region of north Brazil and composed of 219 individuals distributed in 64 pedigrees. Molecular markers rs1126680, rs1355538, rs1799807 and rs1803274 were genotyped. None of the SNPs were found to be associated with disease susceptibility. Logistic regression analysis showed that the highest age is a risk factor for the multibacillary form of the disease.

**Key-words:** Leprosy; *BCHE*; Butyrylcholinesterase; Genetic susceptibility

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Biópsia de nódulo eritematoso em extremidade de um paciente com hanseníase LL.....	20
Figura 2: Classificações clínica e terapêutica da hanseníase. ....	21
Figura 3: A história natural da infecção humana pelo <i>M. tuberculosis</i> e o subsequente desenvolvimento da Tb clínica ou sintomática .....	34
Figura 4: Países endêmicos para malária em 2000 e em 2016. ....	37
Figura 5: Casos confirmados de malária no Brasil. ....	38
Figura 6: Infecção humana pelo protozoário <i>Plasmodium falciparum</i> , e subsequente desenvolvimento ou não da malária sintomática.....	39
Figura 7: Infecção humana pelo HIV e genes associados com suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento da doença.....	40
Figura 8: Tamanho dos genomas das eubactérias .....	41
Figura 9: O espectro clínico da hanseníase conta com a participação de vários genes associados com a infecção "per se" ou com a forma clínica. ....	44
Figura 10: Genes e seus produtos envolvidos na resposta imune contra o <i>M. leprae</i> . .....	47
Figura 11: O centro ativo da BChE humana.....	48
Figura 12: Expressão do gene BChE em termos de RNA em alguns tecidos ou órgãos humanos.....	50
Figura 13: O nervo vago e os seus ramos formam a CAP .....	52
Figura 14: A localização do gene <i>BCHE</i> no cromossomo 3 com seus exons e introns. .....	53
Figura 15: Anatomia do equipamento ABI Prism e princípio do PCR em tempo real	67
Figura 16: Forma de criação dos <i>pseudo-sibs</i> demonstrado por um exemplo real da amostra analisada .....	69
Figura 17: Análise de DL entre os SNPs do gene <i>BCHE</i> . ....	70
Figura 18: Localização no gene <i>BCHE</i> dos quatro SNPs testados neste estudo.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência em países que registraram mais de 1.000 novos casos anuais, no período de 2007 a 2016. ....	23
Tabela 2: Situação da hanseníase nos países que registraram mais de 1.000 novos casos no período de 2007 a 2016. ....	24
Tabela 3: Situação da hanseníase no Brasil, por região e unidade da federação, no ano de 2015. ....	25
Tabela 4: Esquemas terapêuticos recomendados pelo Ministério da Saúde. ....	27
Tabela 5: Exemplos de doenças de etiologia complexa e genes envolvidos com suscetibilidade ou resistência. ....	33
Tabela 6: Taxa de detecção da tuberculose , no ano de 2015, nos 30 países com maior prevalência da doença e relação com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). ....	35
Tabela 7: Casos novos de Tuberculose por Unidade da Federação no ano de 2016, com e sem SIDA/AIDS. ....	36
Tabela 8: Genomas de algumas bactérias patogênicas e não patogênicas em relação ao <i>Mycobacterium leprae</i> . ....	45
Tabela 9: Genes associados a hanseníase demonstrados em pelo menos dois estudos de replicação ....	46
Tabela 10: A distribuição da BChE em vários tecidos do organismo adulto ....	49
Tabela 11: Os variantes do gene <i>BCHE</i> . ....	61
Tabela 12: Características da amostra analisada ....	65
Tabela 13: Estudo de associação entre a hanseníase <i>per se</i> e dois SNPs com número suficiente de famílias informativas do gene <i>BCHE</i> na amostra analisada. ....	71
Tabela 14: Frequências genotípicas e alélicas dos quatro marcadores (SNPs) testados e análise de associação através da técnica de <i>pseudo sibs</i> . ....	71
Tabela 15: Regressão logística <i>stepwise</i> progressiva mostra que a idade é o principal fator de risco para a forma multibacilar, ....	71
Tabela 16: Estratificação da amostra de acordo com a faixa etária em afetados e não afetados ....	72

Tabela 17: Diferenças étnicas, de sexo e de idade entre a amostra de hansenianos de Gomes et al (148) e a do presente estudo .....	76
Tabela 18: Frequências alélicas dos marcadores no gene <i>BCHE</i> observadas em algumas populações comparando-as com as do presente estudo.....	79
Tabela 18: Perfil epidemiológico da hanseníase em algumas regiões do Brasil em diferentes períodos.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2q	Braço longo do cromossomo 2
3q	Braço longo do cromossomo 3
$\alpha 7$ nAChR	Receptor nicotínico $\alpha 7$ da acetilcolina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADH	Desidrogenase alcoólica
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ALDH	Desidrogenase aldeídica
anti-PGL-1	Anti-glicolípido fenólico-1
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacillus Colmet-Guérin
<i>BCHE</i>	Butirilcolinesterase (gene)
BChE ou BuChE	Butirilcolinesterase (proteína – enzima)
CAP	Via colinérgica anti-inflamatória (Cholinergic Antiinflammatory Pathway)
CEU	Descendentes de europeus de Utah
ChAT	Colina acetil transferase
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DAC	Doença Arterial Coronariana
DL	Desequilíbrio de ligação
DM2	Diabetes melitus do tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOCs	Doenças pulmonares obstrutivas crônicas
E.C	Enzyme Comission
ENH	Eritema nodoso hansênico
ERC	Ethics Research Committee
fam	Frequência alélica mínima
FBAT	Family Based Association Teste (Teste de associação baseado em família)

G6PD	Glicose-6 fosfato desidrogenase
GHSR	Receptor secretagogo do horônio do crescimento (GH)
GWLA	Genome Wide Linkage Analysis (Análise de Ligação Pangenômico)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IFN	Interferon
I-kB	Inibidor de kappa B
IKK	Quinase do inibidor kappa
IL	Interleucina
M/F	Razão entre o número de homens e mulheres
m1AChR	Receptor muscarínico 1 da acetilcolina
MB	Multibacilar
Mb	Megabases
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFkB	Fator nuclear kappa B
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame (Fase de leitura aberta)
PB	Paucibacilar
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
PDIM	Dimicocerosato de ftiocerol
PGL-1	Glicolípido Fenólico 1
PPD	Purified Protein Derivative (Derivado proteico purificado)
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RR	Reação Reversa
SIDA	Vide AIDS
SINAN	Sistema de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Single Nucleotide Polymorfism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
Tb	Tuberculose

TDT	Transmission Disequilibrium Test (Teste de transmissão de desequilíbrio)
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TLR	Toll Like Receptor (Receptor Tipo ou Semelhante ao Toll)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNAIDS	Joint United Nations Programn HIV/AIDS (Programa das Nações Unidas Sobre HIV/AIDS)
YRI	Yoruba in Ibadan, Nigeria (Yoruba em Ibadan, Nigéria)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1	HANSENÍASE.....	17
1.1.1	Histórico .....	17
1.1.2	<i>Mycobacterium leprae (M. leprae)</i> .....	18
1.1.3	Diagnóstico e Classificação Clínica.....	19
1.1.4	Epidemiologia .....	21
1.1.5	Tratamento .....	26
1.1.6	Estigma e Impacto Psicológico .....	28
1.1.7	Estados Reacionais.....	29
1.2	GENÉTICA DA HANSENÍASE .....	29
1.2.1	Doenças Genéticas Complexas.....	29
1.2.2	Genética de doenças infecciosas .....	30
1.2.2.1	Tuberculose (Tb) .....	31
1.2.2.2	Malária.....	32
1.2.2.3	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA / AIDS.....	38
1.2.3	Genética do <i>M. leprae</i> .....	40
1.2.4	Genes associados/ligados à hanseníase .....	41
1.3	O GENE <i>BCHE</i> .....	48
1.3.1	A enzima Butirilcolinesterase (BChE).....	48
1.3.2	O gene <i>BCHE</i> .....	52
1.3.3	O gene <i>BCHE</i> e sua correlação com doenças .....	54
1.3.4	Associação do gene <i>BCHE</i> com a hanseníase .....	58
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	63
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>64</b>
4.1	POPULAÇÃO ESTUDADA .....	64
4.2	DEFINIÇÃO DOS MARCADORES .....	64
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM.....	65
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
5.1	VARIÁVEIS NÃO GENÉTICAS .....	71

5.1.1	Idade .....	71
5.1.2	Sexo .....	74
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
6.1	ESTUDOS GENÉTICOS .....	75
6.2	IMPACTO DA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE SNPS TESTADOS .....	76
6.2.1	<b>Frequências Alélicas</b> .....	<b>77</b>
6.3	VARIÁVEIS NÃO GENÉTICAS .....	78
6.3.1	Idade .....	78
6.3.2	Sexo .....	81
7	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>82</b>
8	<b>LIMITAÇÕES</b> .....	<b>82</b>
9	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>83</b>
10	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Evidências clínicas e epidemiológicas sugerem que a doença *per se* e/ou suas formas clínicas distintas são controladas por fatores genéticos do hospedeiro, como argumentado por Moraes et al (1): a diversidade genética do agente etiológico é muito baixa e não pode ser usada para explicar as diferentes formas clínicas observadas, e estes fatores são mais importantes que os ambientais, como condições socioeconômicas (2) ou climáticas (3).

A doença, anteriormente conhecida como lepra (4,5), é transmitida por via aérea, através de perdigotos eliminados pelo nariz e/ou pela boca durante contato próximo e frequente (6) com um indivíduo afetado, e manifesta-se principalmente por lesões cutâneas e neurológicas com diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil.

#### 1.1.1 Histórico

Nos capítulos 13 a 14 de *Levítico*, o terceiro livro do *Pentateuco*, do Antigo Testamento da Bíblia Cristã, aparece a palavra hebraica *tzaraat*, que se refere a um conjunto de doenças de pele, entre as quais está a hanseníase. Esta palavra se refere à chamada “*lepra bíblica*” e não se aplicava somente a doenças, pois manchas em roupas e em edifícios mereciam o mesmo termo (7). No Novo Testamento, aparece a palavra *lepra*, esta derivada do latim que significa “pele escamosa” – a palavra *lepra* aparece nesta obra 68 vezes (8). Também há menção à doença nos quatro livros da religião hindu (*Krutha Yuga*, *Tretha Yuga*, *Dwapara Yuga* e *Kali Yuga*), assim como no islamismo: “o profeta disse: não há mal enviado por Alá, que não tenha cura”; um outro ensinamento diz: “fuja de um leproso como fugiria de um leão”(9). Entre 1098 e 1179, Santo Hildegardo, um abade alemão, foi talvez um dos primeiros a descrever três formas clínicas da hanseníase. O abade usou os termos “alba”, “rubra” e “ulcerosa”. Se pensava na época que a forma “rubra” se manifestava em indivíduos alcoólatras e gulosos, enquanto que as formas “ulcerosa” e “alba” eram mais comuns nos libidinosos (7).

A hanseníase teria chegado ao Brasil através de migrações humanas, partindo da África há mais de 100.000 anos em direção à Ásia e, de lá, através do estreito de

Bering, chegando à América do Norte há mais ou menos 30.000 anos em direção sul através da América Central até a América do Sul (10). Os primeiros registros oficiais da doença no Brasil datam de 1600, na cidade do Rio de Janeiro, local de criação do primeiro leprosário (11). Em 1894 foi criado o Laboratório Bacteriológico no Hospital dos Lázaros, no Rio de Janeiro, em uma época em que no país muitos ainda acreditavam na etiologia hereditária da doença (12). Foi um marco importante no desenvolvimento científico em relação à doença, pois o agente etiológico fora descoberto pelo médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873, ou seja, 21 anos antes (13).

Em 1962, através do Decreto 968, de 7 de maio, foram definidas normas técnicas especiais para o combate à hanseníase, que na época ainda era conhecida como lepra. Este decreto, no que se refere à profilaxia, elenca a pesquisa, o preparo de pessoal técnico, inquéritos epidemiológicos, a procura sistemática de doentes, o tratamento, a educação sanitária, a assistência social, a limitação dos movimentos das fontes de contágio e a vigilância sanitária (14). No início da década de 1970 se iniciou uma campanha para que o nome da doença fosse alterado de lepra para hanseníase (15), o que acabou ocorrendo em 1995 através da lei 9010, de 29 de março (16). De acordo com Femina et al (17), a medida contribuiu para a redução do preconceito e do estigma contra a doença.

### **1.1.2 *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*)**

Até 1896, a bactéria conhecida hoje como *M. leprae* pertencia ao gênero *Bacterium*, quando foi reclassificada por Lehmann e Neumann, que criaram o gênero *Mycobacterium* (18). O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (19), reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas (Figura 1), medindo de 1 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, imóvel, microaerófilo, que reproduz-se por divisão binária, não forma esporos, não produz toxinas e nem possui plasmídeos (20). Não cresce em meios artificiais de cultivo; é parasita intracelular obrigatório (21). O primeiro cultivo bem sucedido em laboratório foi feito por Shepard em 1960, através da inoculação do bacilo de uma fonte humana na pata traseira de camundongos (22).

A parede celular do *M. leprae* mede cerca de 20 nm de espessura, e é composta por um peptídeoglicano que possui L-glicina ao invés da L-alanina. O peptídeoglicano está ligado covalentemente a polissacarídeos que servem de suporte aos ácidos micólicos. Estes ácidos possuem alto peso molecular e se concentram na camada

mais externa da parede, associados a lipídeos (micosídeos); os dois lipídeos capsulares mais importantes são o dimicocerosato de ftiocerol (PDIM) e o glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1) (20), este último envolvido na interação do *M. leprae* com a laminina das células de Schwann, sugerindo que o PGL-1 desempenha um importante papel na interação entre o bacilo e o nervo periférico (23).

### 1.1.3 Diagnóstico e Classificação Clínica

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e a suspeita clínica para hanseníase leva em consideração sinais ditos cardeais, como a anestesia em lesões cutâneas, o espessamento de nervos periféricos e a demonstração da presença do *M. leprae* em baciloscopias de material de biópsia de tecidos cutâneos (24).

Para o diagnóstico correto, é necessário entender que a doença em sua evolução clínica produz comprometimento cutaneoneural característico de cada forma clínica. Levando em consideração este conhecimento se aplicam as classificações, que auxiliam tanto no diagnóstico como no prognóstico e norteiam a terapêutica (24).

Em 1953, durante a Sexta Conferência Internacional de Hanseníase, que reuniu pesquisadores da área em Madri, foi proposto um sistema de classificação clínica da doença em três classes: tuberculoide (T), borderline (ou dimórfica, B) e lepromatosa (ou virchowiana, L), utilizando-se critérios clínicos (aspecto das lesões), bacteriológicos (identificação do bacilo), imunológicos (teste da lepromina) e histológicos (natureza do infiltrado e número de bacilos por lesão) (25). Este sistema ainda é utilizado em vários países, incluindo o Brasil (26).

Nos anos 60, Ridley e Jopling propuseram um esquema de classificação da hanseníase de acordo com critérios microbiológicos, imunológicos e clínicos (Figura 2). Segundo esta classificação, as formas clínicas da doença são separadas em 6 classes distintas: duas formas polares – hanseníase tuberculoide (TT) e hanseníase lepromatosa (LL) – e entre estes dois polos, 3 formas intermediárias: tuberculóide borderline (BT); borderline borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL). Nos casos de diagnóstico precoce, que ainda não apresentem características suficientes para classificação em alguma das formas acima, a doença é classificada como indeterminada. O polo tuberculóide é caracterizado por lesões localizadas e bem definidas e ausência de bacilos na pele e nervos periféricos, e está associado a uma resposta imune celular (Th1); o polo oposto, lepromatoso, é caracterizado por múltiplas lesões disseminadas e presença de bacilos na pele e nervos; esta forma é

observada nos pacientes que apresentam resposta imune predominantemente humoral (Th2). As formas intermediárias, a partir da BT até a BL, são caracterizadas por progressiva diminuição da resposta imune celular com aumento da carga bacilar e aumento de anticorpos específicos contra antígenos do *M leprae*, como o PGL-1 (anti-PGL-1), de lesões cutâneas e comprometimento de nervos (27)(28). Na resposta imune humoral (formas clínicas LL, BL ou mesmo BB), as interleucinas mais presentes são: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e na resposta mediada por célula (formas clínicas TT e BT), as citocinas IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 são as mais comuns, podendo ser usadas como marcadores de diagnóstico e classificação da forma clínica (29).

Em 1982, a OMS propôs uma classificação simplificada, para facilitar a orientação do tratamento e acompanhamento da terapia. Segundo esta classificação, a doença é dividida em duas formas: paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), de acordo com o índice baciloscópico (menor que 2+, paucibacilar e maior ou igual a 2+, multibacilar). Em 1988, foram estabelecidos critérios clínicos, considerando como paucibacilares os casos com até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso acometido, e multibacilares os casos com mais de cinco lesões e/ou mais de um tronco nervoso acometido; onde a baciloscopia está disponível, pacientes com resultado positivo são considerados multibacilares independentemente do número de lesões. (30–32).

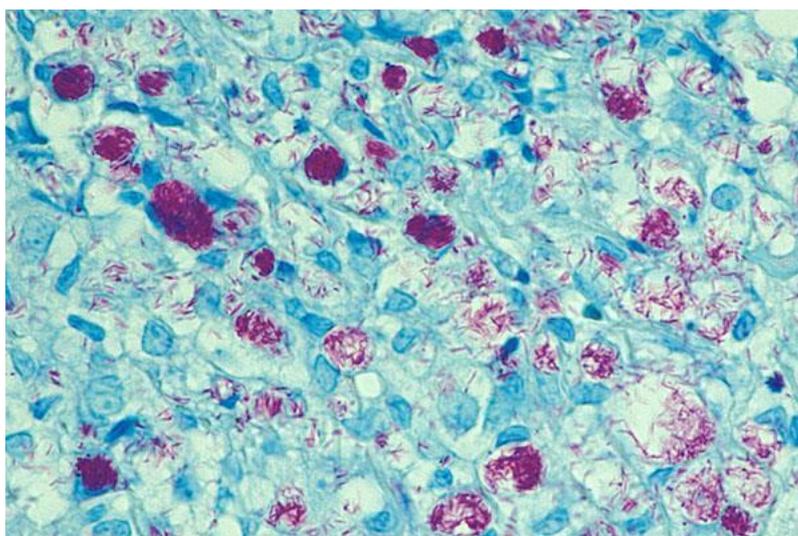


Figura 1: Biópsia de nódulo eritematoso em extremidade de um paciente com hanseníase LL.

Os bacilos estão densamente agrupados dentro dos vacúolos citoplasmáticos de histiócitos. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada por Fite. (disponível em:<https://pathos223.com/en/case/case165.htm>)

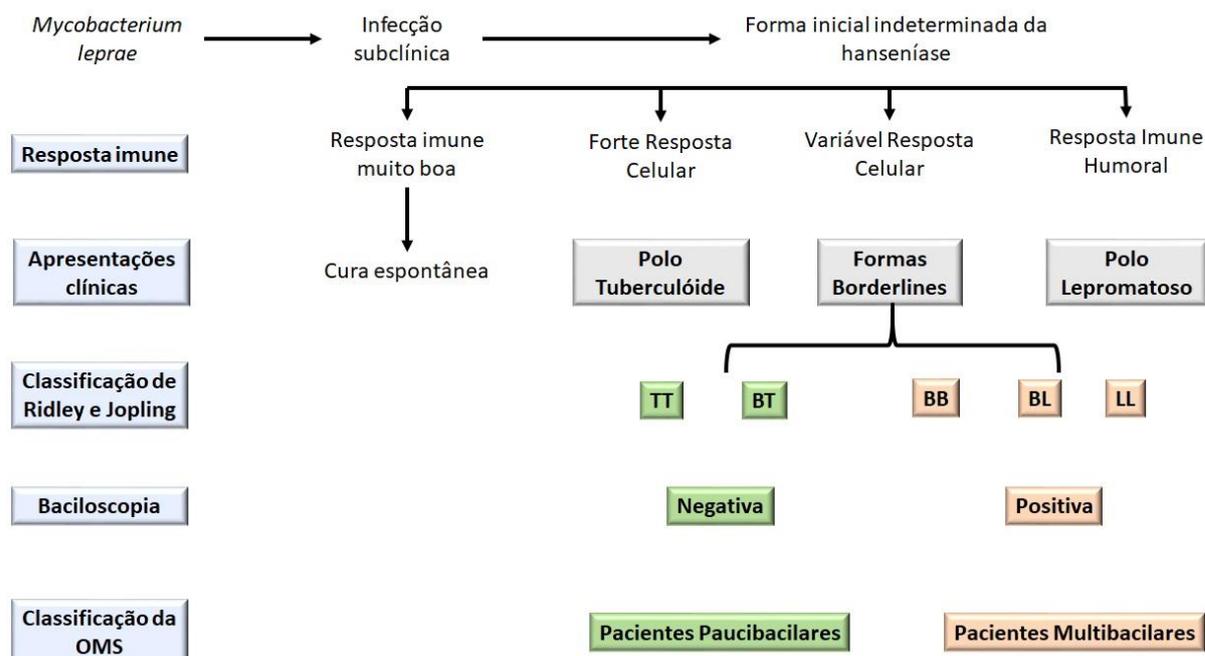


Figura 2: Classificações clínica e terapêutica da hanseníase.

TT = tuberculóide; BT = borderline-tuberculóide; BB = borderline-borderline; BL = borderline-lepromatosa; LL = lepromatosa. Nem sempre a baciloscopia e conseqüentemente a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) corresponde a classificação de Ridley e Jopling tal qual como apresenta-se na figura. Adaptado de Reibel et al (33)

#### 1.1.4 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil é o segundo país em número de casos de hanseníase, atrás da Índia. No período entre 2008 a 2017 o país registrou 319.000 novos casos da doença (34). A tabela 1 mostra a posição do Brasil em relação a outros países onde a incidência é maior que 1.000 novos casos por ano. Neste grupo de países, o Brasil é responsável por 15,20% destes novos casos (34). Neste período, houve uma redução no número de casos novos, entretanto esta redução não foi uniforme em todos os países. Na Índia houve um discreto aumento de 0,97%, enquanto que no Brasil houve uma diminuição de 30,85%; reduções maiores foram observadas na Nigéria (51,02%) e na República Unida da Tanzânia (51,51%).

A tabela 2 mostra a situação da hanseníase nos mesmos países no período compreendido entre dezembro de 2016 e março de 2017. Neste período, nestes países, foram registrados pouco mais que 200.000 novos casos, destes, 117.127 (58,03%) eram da forma multibacilar. No Brasil, neste período, 72,26% dos casos novos foram da forma clínica multibacilar, conforme também observado em estudos independentes (35)(36). Em se tratando de novos casos, o diagnóstico desta forma clínica pode indicar que esse está ocorrendo mais tardiamente (37), e por isso

aumenta o risco do aparecimento de novos casos, considerando que o risco de transmissão da doença para os comunicantes é maior nestes doentes (38).

A maior parte dos novos casos, tanto no Brasil como nos outros países com mais de 1.000 novos casos anuais, é constituída por homens, variando de 55,76% no Brasil a 80% em Madagascar. Isto ocorre provavelmente devido a maior exposição aos fatores de risco de infecção, assim como a diferenças no comportamento sociocultural entre os sexos (36). Nestes países também se observa parcela significativa de crianças entre os casos novos, como é o caso da República Democrática do Congo (11,58%), Indonésia (11,43%) e Etiópia (9,75%). No Brasil, 6,72% dos casos novos são constituídos por crianças (37).

A tabela 3 mostra a situação da hanseníase no Brasil, por região e unidade da federação no ano de 2015. Em números absolutos, a maior incidência é observada na região nordeste, mas a maior taxa de detecção por 100.000 habitantes é na região centro-oeste. Os estados com maior taxa de detecção são: Mato Grosso (92,18/100.000), Tocantins (57,49/100.000), Maranhão (51,19/100.000), Pará (35,03/100.000), Rondônia (32,69/100.000) e Piauí (31,59/100.000). Nestes estados estão municípios que concentram 34% da população brasileira e 56% dos casos novos diagnosticados (39). Em todo o Brasil, a forma clínica mais frequente é a multibacilar. Nas regiões com maior incidência da doença se observa a maior incidência de hanseníase em crianças (10,20% em relação ao total de casos novos). Nestas regiões vive 33% da população com menos de 15 anos de idade, mas se concentram 67% dos casos novos em crianças (39), evidenciando a hiperendemicidade. Paradoxalmente, a maior taxa de incapacidade física, possivelmente relacionada com o diagnóstico tardio, foi observada nas regiões sudeste (9,27%) e sul (9,08%). As deformidades estão relacionadas normalmente a forma clínica multibacilar e ao maior tempo decorrido entre a infecção e o diagnóstico (40–43).

Tabela 1: Incidência em países que registraram mais de 1.000 novos casos anuais, no período de 2007 a 2016.

País	Número de Novos Casos (x 1.000)										Média
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Índia	134,2	133,7	126,8	127,3	134,7	126,9	125,8	127,3	135,5	126,2	129,8
Brasil	38,9	37,6	34,9	33,9	33,3	31,0	31,1	26,4	25,2	26,9	31,9
Indonésia	17,4	17,3	17,0	20,0	19,0	16,8	17,0	17,2	16,8	15,9	17,4
R. D. do Congo*	6,1	5,1	5,0	3,9	3,6	3,7	3,2	4,2	3,7	3,6	4,2
Bangladesh	5,2	5,2	3,8	4,0	3,7	3,1	3,6	4,0	3,0	3,7	3,9
Nigéria	4,9	4,2	3,9	3,6	3,8	3,4	3,0	2,9	1,4	2,4	3,3
Nepal	4,7	4,4	3,1	3,2	3,5	3,2	3,0	2,7	3,0	3,2	3,4
Etiópia	4,2	4,4	4,4	NR	3,8	4,4	3,7	4,0	3,7	3,1	4,0
Mianmar	3,4	3,1	2,9	3,1	3,0	2,9	2,9	2,6	2,6	2,3	2,9
R.U. da Tanzânia°	3,3	2,6	2,3	2,3	2,5	2,0	1,9	2,2	2,0	1,6	2,3
Filipinas	2,4	1,8	2,0	1,8	2,1	1,7	1,6	2,0	1,7	1,9	1,8
Sri Lanka	2,0	1,9	2,0	2,2	2,2	2,0	2,1	2,0	1,8	1,9	2,0
Madagascar	1,8	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,8	1,8	1,6
Moçambique	1,3	1,2	1,2	1,1	0,8	NR	NR	1,3	1,3	1,9	1,3
<b>Total</b>	<b>229,8</b>	<b>224,1</b>	<b>210,8</b>	<b>208,0</b>	<b>217,4</b>	<b>202,7</b>	<b>200,5</b>	<b>199,7</b>	<b>199,9</b>	<b>196,4</b>	<b>209,8</b>
%	11,00	10,73	10,09	9,95	10,40	9,70	9,60	9,56	9,57	9,40	100,00

\*República Democrática do Congo; °República Unida da Tanzânia, NR: Não registrado (adaptado de Global Leprosy Update, 2017(34) .

Tabela 2: Situação da hanseníase nos países que registraram mais de 1.000 novos casos no período de 2007 a 2016.

País	N. de Novos Casos <sup>3</sup>	N. de MB <sup>4</sup> entre os novos casos		N. de mulheres entre os novos casos <sup>5</sup>		N. de crianças entre os novos casos <sup>6</sup>		N. de casos de incapacidade grau 2 entre os novos casos <sup>7</sup>		Prevalência	Taxa de Cura <sup>8</sup> (%)	
		N	%*	N	%*	N	%*	N	%*		MB	PB
Índia	135485	67160	49,57	53072	39,17	11792	8,70	5245	3,87	88166	95,4	91,9
Brasil	25218	18224	72,26	11156	44,24	1696	6,72	1736	6,88	22710	84,2	80,8
Indonésia	16826	14165	84,18	6314	37,52	1923	11,43	1363	8,10	18248	91,9	87,9
R. D. do Congo <sup>1</sup>	3765	2297	61,00	1660	44,09	436	11,58	508	13,49	4218	89,0	81,8
Bangladesh	3000	1315	43,83	1136	37,87	166	5,53	292	9,73	3132	96,8	93,8
Nigéria	1362	1317	96,70	549	40,31	89	6,53	300	22,03	1460	92,0	96,9
Nepal	3054	1678	54,94	1169	38,28	220	7,20	109	3,57	2559	NR	NR
Etiópia	3692	3064	82,99	1019	27,60	360	9,75	419	11,35	3692	87,0	89,1
Mianmar	2609	2020	77,42	801	30,70	88	3,37	358	13,72	2526	78,6	89,7
R.U. da Tanzânia <sup>2</sup>	2047	1793	87,59	781	38,15	61	2,98	267	13,04	1849	79,0	100,0
Moçambique	1289	1057	82,00	542	42,05	118	9,15	276	21,41	1375	NR	NR
Filipinas	1721	1519	88,26	589	34,22	89	5,17	68	3,95	4316	100,0	93,4
Sri Lanka	NR	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR	NR
Madagascar	1780	1518	85,28	356	20,00	136	7,64	337	18,93	2097	92,2	85,0
<b>Total</b>	<b>201848</b>	<b>117127</b>	<b>58,03</b>	<b>79144</b>	<b>39,21</b>	<b>17174</b>	<b>8,51</b>	<b>11278</b>	<b>5,59</b>	<b>156348</b>	<b>89,6</b>	<b>90,0</b>

<sup>1</sup>República Democrática do Congo; <sup>2</sup>República Unida da Tanzânia; <sup>3</sup>Número de casos no ano de 2016; <sup>4</sup>Pode indicar presença de casos avançados e avaliação da magnitude da infecção na comunidade; <sup>5</sup>Pode mostrar a taxa de acesso das mulheres ao serviço de saúde e avaliação indireta da discriminação de mulheres com hanseníase; <sup>6</sup>Indicativo da progressão da doença na comunidade; <sup>7</sup>Indicativo da importância da detecção precoce da doença; <sup>8</sup>Calculado pelo número total de casos com a forma paucibacilar que iniciaram a terapia um ano antes ou número total de casos com a forma multibacilar que iniciaram a terapia dois anos antes; espera-se uma taxa de cura > 85%; \*em relação ao total de casos novos, NR = não registrado (adaptado de Global Leprosy Update, 2016 (44).

Tabela 3: Situação da hanseníase no Brasil, por região e unidade da federação, no ano de 2015.

Unidade da Federação / Região	N. de Casos Novos	Taxa de Det. **	N. de MB*		N. de mulheres*		N. de crianças*		N. de casos de incapacidade de grau 2*		Prevalência	Taxa de Cura (%)
			N	%*	N	%*	N	%*	N	%*		
Rondônia	578	32,69	394	68,17	235	40,66	35	6,05	47	8,13	410	89,8
Acre	129	16,05	102	79,07	43	33,33	12	9,30	2	1,55	96	91,3
Amazonas	508	12,90	298	58,66	179	35,24	61	12,00	39	7,68	343	85,4
Roraima	77	15,23	64	83,12	20	25,97	1	1,30	6	7,79	78	77,8
Pará	2875	35,03	1951	67,86	1100	38,26	322	11,20	155	5,39	1853	80,0
Amapá	109	14,22	78	71,56	37	33,94	13	11,93	17	15,60	80	83,5
Tocantins	871	57,49	560	64,29	349	40,07	81	9,30	54	6,20	631	85,7
<b>Região Norte</b>	<b>5147</b>	<b>29,40</b>	<b>3447</b>	<b>66,97</b>	<b>1963</b>	<b>38,14</b>	<b>525</b>	<b>10,20</b>	<b>320</b>	<b>6,22</b>	<b>3491</b>	<b>82,9</b>
Maranhão	3534	51,19	2642	74,76	1487	42,08	375	10,61	240	6,79	2607	84,3
Piauí	1012	31,59	615	60,77	475	46,94	72	7,11	45	4,45	670	84,0
Ceará	1790	20,10	1166	65,14	759	42,40	93	5,20	129	7,21	1298	84,3
Rio G. do Norte	267	7,76	163	61,05	130	48,69	35	13,11	19	7,12	170	71,3
Paraíba	523	13,17	308	58,89	237	45,31	27	5,16	39	7,46	339	75,5
Pernambuco	2383	25,50	1320	55,39	1179	49,47	240	10,07	101	4,24	1748	80,4
Alagoas	351	10,51	209	59,54	175	49,86	25	7,12	32	9,12	216	78,3
Sergipe	360	16,05	178	49,44	183	50,83	18	5,00	27	7,50	214	88,6
Bahia	2540	16,71	1690	66,53	1263	49,72	224	8,82	131	5,16	1700	79,4
<b>Região Nordeste</b>	<b>12760</b>	<b>22,56</b>	<b>8291</b>	<b>64,98</b>	<b>5888</b>	<b>46,14</b>	<b>1109</b>	<b>8,69</b>	<b>763</b>	<b>5,98</b>	<b>8962</b>	<b>82,0</b>
Minas Gerais	1135	5,44	828	72,95	505	44,49	45	3,96	129	11,36	870	89,4
Espírito Santo	627	15,95	305	48,64	280	44,66	41	6,54	28	4,46	367	95,5
Rio de Janeiro	1048	6,33	647	61,74	477	45,51	46	4,39	106	10,11	676	80,9
São Paulo	1203	2,71	828	68,83	542	45,05	22	1,83	109	9,06	1002	92,2
<b>Região Sudeste</b>	<b>4013</b>	<b>4,68</b>	<b>2608</b>	<b>64,99</b>	<b>1804</b>	<b>44,95</b>	<b>154</b>	<b>3,84</b>	<b>372</b>	<b>9,27</b>	<b>2915</b>	<b>88,7</b>
Paraná	721	6,46	577	80,03	275	38,14	6	0,83	59	8,18	636	89,2
Santa Catarina	171	2,51	130	76,02	76	44,44	4	2,34	17	9,94	109	89,8
Rio Grande do Sul	121	1,08	101	83,47	59	48,76	2	1,65	16	13,22	107	73,2
<b>Região Sul</b>	<b>1013</b>	<b>3,47</b>	<b>808</b>	<b>79,76</b>	<b>410</b>	<b>40,47</b>	<b>12</b>	<b>1,18</b>	<b>92</b>	<b>9,08</b>	<b>852</b>	<b>87,4</b>
Mato Grosso do Sul	705	26,59	599	84,96	324	45,96	31	4,40	71	10,07	614	80,0
Mato Grosso	3010	92,18	2432	80,80	1402	46,58	178	5,91	133	4,42	2538	79,9
Goiás	1689	25,55	1300	76,97	725	42,92	80	4,74	94	5,56	1162	87,2
Distrito Federal	219	7,51	182	83,10	101	46,12	7	3,20	16	7,30	150	88,1
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>5623</b>	<b>36,41</b>	<b>4513</b>	<b>80,26</b>	<b>2552</b>	<b>45,38</b>	<b>296</b>	<b>5,26</b>	<b>314</b>	<b>5,58</b>	<b>4464</b>	<b>82,6</b>
<b>Brasil</b>	<b>28761</b>	<b>14,07</b>	<b>19667</b>	<b>68,38</b>	<b>12617</b>	<b>43,87</b>	<b>2096</b>	<b>7,29</b>	<b>1861</b>	<b>6,47</b>	<b>20684</b>	<b>83,5</b>

\*Em relação ao número total de casos novos, \*\*por 100.000 habitantes (Fonte SINAN (45)).

### 1.1.5 Tratamento

A terapia da hanseníase segue o protocolo padronizado pela OMS e é baseado em poliquimioterapia (PQT), que inclui três fármacos de primeira linha: dapsona, rifampicina e clofazimina. A dapsona tem ação bacteriostática e age inibindo a síntese de folato pelo *M. leprae*. Normalmente é bem tolerada, mas em alguns casos os efeitos adversos podem contribuir com a descontinuação do tratamento. A rifampicina, por sua vez, tem ação bactericida e age inibindo a RNA-polimerase de várias bactérias. Também é bem tolerada pela maioria dos pacientes e o seu uso intermitente (mensal) diminui o risco de aparecimento de efeitos colaterais. A clofazimina tem ação bactericida lenta e sua farmacodinâmica não é totalmente conhecida, sabe-se que se liga ao DNA bacteriano. Sua eficácia é similar a da dapsona e além de possuir um importante efeito anti-inflamatório, é bem tolerado pela maioria dos pacientes. Pode provocar hiperpigmentação e recomenda-se que os pacientes não se exponham ao sol (46). Quando surgem, os efeitos adversos da PQT ocorrem principalmente nos primeiros seis meses de tratamento, geralmente causados pela dapsona (47). De acordo com o Ministério da Saúde (48), os esquemas terapêuticos deverão ser utilizados de acordo com a classificação simplificada da OMS, e estão resumidos na tabela 4.

Estão em tratamento irregular os doentes que deixam de comparecer às consultas médicas e aos atendimentos dos demais profissionais da saúde, bem como os que não garantem o comparecimento dos seus familiares para os exames em comunicantes; nestes casos, pode ocorrer a continuidade da transmissão e o atraso na cura da hanseníase, assim como o aumento da possibilidade de seleção de bactérias resistentes. Em estudo com 33 pacientes em tratamento irregular, Lopes e Rangel (49) observaram que a maior parte destes é do sexo masculino (69,7%), estão na faixa etária entre 26 a 36 anos (33,3%), são solteiros (51,5%), concluíram o ensino fundamental (54,5%), tem um rendimento entre 1 a 2 salários mínimos (51,5%) e não estão inseridos em programas de assistência/benefício (66,7%).

Tabela 4: Esquemas terapêuticos recomendados pelo Ministério da Saúde.

<b>Esquema Terapêutico</b>	
<b>a) Paucibacilar</b>	
Adulto	<b>Rifampicina:</b> dose mensal de 600 mg com administração supervisionada <b>Dapsona:</b> dose mensal de 100 mg com administração supervisionada e dose diária de 100 mg autoadministrada
Criança	<b>Rifampicina:</b> dose mensal de 450 mg com administração supervisionada <b>Dapsona:</b> dose mensal de 50 mg com administração supervisionada e dose diária de 50 mg autoadministrada
Duração do tratamento e alta	6 doses supervisionadas em até 9 meses, na 6ª dose os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, à avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura
<b>b) Multibacilar</b>	
Adulto	<b>Rifampicina:</b> dose mensal de 600 mg com administração supervisionada <b>Dapsona:</b> dose mensal de 100 mg com administração supervisionada e dose diária de 100 mg autoadministrada <b>Clofazimina:</b> dose mensal de 300 mg com administração supervisionada e dose diária de 50 mg autoadministrada
Criança	<b>Rifampicina:</b> dose mensal de 450 mg com administração supervisionada <b>Dapsona:</b> dose mensal de 50 mg com administração supervisionada e dose diária de 50 mg autoadministrada <b>Clofazimina:</b> dose mensal de 150 mg com administração supervisionada e dose de 50 mg autoadministrada em dias alternados
Duração do tratamento e alta	12 doses supervisionadas em até 18 meses, na 12ª dose os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, à avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura

Fonte: Ministério da Saúde (48).

### 1.1.6 Estigma e Impacto Psicológico

Cerca de 20% dos doentes desenvolvem incapacidades com necessidade de algum tipo de apoio ou reabilitação (50). Monteiro et al (51) observaram que 29,4% dos pacientes de Araguaína (TO) apresentavam alguma incapacidade física, que ocorria especialmente naqueles com a forma multibacilar da doença. Muitas destas incapacidades surgiram mesmo após a alta clínica, sendo importante o monitoramento contínuo pós-alta para a prevenção de sequelas e limitações.

O indivíduo afetado por hanseníase não sofre apenas as consequências fisiológicas da infecção pelo *M leprae*, mas também de depressão e ansiedade (52), portanto não basta apenas considerar a terapia da hanseníase em si, pois de acordo com a OMS, “saúde não é apenas a ausência de doença, mas um estado de completo bem estar mental e social” (53). Os doentes logo após o diagnóstico experimentam emoções que podem afetar a qualidade de vida, como por exemplo o medo de perder o emprego, o de ser rejeitado por familiares, amigos ou pela comunidade, culpa pela doença, ou mesmo raiva por estar doente (54).

Nos dias de hoje ainda existe preconceito e estigma relacionados à doença. Possivelmente, parte disso tenha origem religiosa. No capítulo 13 do Levítico se encontra a passagem: “do homem atingido pela lepra terá suas vestes rasgadas e a sua cabeça descoberta. Cobrirá sua barba e clamará: impuro, impuro! Enquanto durar o seu mal, ele será impuro; habitará só, e a sua habitação será fora do acampamento” (55). Ainda, uma possível origem deste estigma é o isolamento e internação compulsórios como medidas profiláticas impostas no início do século XX (56). Este estigma afeta a vida do doente, comprometendo seu casamento, suas relações interpessoais, seu emprego, suas atividades de lazer e seu papel em atividades sociais e religiosas (43). Isso tem impacto negativo no acesso ao diagnóstico, nos resultados do tratamento ou na atenção, além de afetar o funcionamento social. O estigma é uma causa importante de atraso do diagnóstico, o que facilita a transmissão da infecção nas famílias e nas comunidades (57).

Na tentativa de compensar as consequências negativas causadas por governantes e legisladores passados que determinaram, através de leis, a captura dos portadores de hanseníase, obrigando-os a viver em locais isolados (leprosários), privando-os do convívio familiar e da vida em sociedade, em 2007, por meio da lei 11.520, o governo federal concedeu a essas pessoas uma pensão no valor de R\$ 750,00 (setecentos e cinquenta

reais), reajustada anualmente conforme os índices concedidos aos benefícios de valor superior ao piso do Regime Geral de Previdência Social (58).

### **1.1.7 Estados Reacionais**

Os estados reacionais na hanseníase podem ser classificados em dois tipos, ditos “tipo 1” (ou reação reversa – RR) e “tipo 2” (ou eritema nodoso hansênico – ENH). A RR é comum entre pacientes paucibacilares, enquanto o ENH é observado com maior frequência em pacientes multibacilares. Podem ocorrer em todas as formas clínicas, com exceção da indeterminada, e geralmente se seguem a fatores desencadeantes, infecções recorrentes, vacinação, gravidez, puerpério, uso de medicamentos e estresse físico e emocional (59). A RR é resultante de uma súbita resposta imune celular aumentada com intensa inflamação em nervos da pele. O ENH também resulta da exarcebação da resposta humoral e leva a sintomas sistêmicos severos (60)(61). Os estados reacionais podem ocorrer antes, durante ou mesmo após o tratamento da hanseníase, sendo as principais causas atuais de morbidade e danos neurológicos periféricos (62).

A RR envolve a participação ativa de linfócitos T, com produção tecidual de citocinas  $T_{H1}$  (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) e de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , uma das principais citocinas envolvidas na mediação do dano neural. A ENH derivada de reação inflamatória sistêmica relacionada à deposição de imunocomplexos; mecanismos humorais parecem estar envolvidos na patogênese da ENH, associa-se a altas concentrações de TNF- $\alpha$ , infiltração de neutrófilos e ativação do complemento. No soro dos pacientes com ENH tem sido demonstrados altos níveis circulantes de IL-1 e TNF- $\alpha$ , ao mesmo tempo em que ocorre aumento tecidual de RNAm para IL-6, IL-8 e IL-10, indicando resposta mediada por linfócitos  $T_{H2}$  (59).

## **1.2 GENÉTICA DA HANSENÍASE**

### **1.2.1 Doenças Genéticas Complexas**

Doenças genéticas complexas são aquelas cujos fenótipos são causados pelo envolvimento de vários genes, além de contribuição ambiental (63)(64). Dentre as doenças de etiologia complexa mais prevalentes estão as doenças infecciosas – incluindo a hanseníase –, o câncer e a aterosclerose. Dentre os fatores ambientais relacionados a vários tipos de câncer estão o alcoolismo e o tabagismo (65–69). No caso da aterosclerose, a ingestão diária e regular de frutas e verduras é um fator de proteção, diminuindo o risco

de eventos relacionados ao processo aterosclerótico – doenças coronarianas e acidente vascular encefálico isquêmico (70). Por outro lado, a ingestão crônica e excessiva de carboidratos, mas não de gorduras, é um importante fator de risco de morte por estas mesmas doenças cardiovasculares (71). Outras variáveis não-genéticas importantes devem ser consideradas, como a colesterolemia, a trigliceridemia, a homocisteinemia, o índice de massa corporal, a pressão sanguínea, o diabetes do tipo II, o sexo e a idade (72).

Neste cenário, de um papel importante de fatores ambientais, o componente genético das doenças complexas pode ser investigado, geralmente, a partir de estudos observacionais que buscam evidências de participação de genes na definição do fenótipo em estudo. Entre os métodos podem ser citados os estudos com gêmeos, que comparam o nível de concordância da doença entre gêmeos dizigóticos e monozigóticos; e aqueles com maior complexidade, como as análises de segregação complexa, que buscam esclarecer o padrão de herança em uma amostra de famílias. Entretanto, estes estudos não conseguem determinar quais são os genes envolvidos ou as suas localizações. Para tal, outros modelos de análise são necessários, com o envolvimento de marcadores genéticos moleculares, como ocorre nos estudos de ligação e de associação. Os primeiros são usados para encontrar a localização cromossômica do gene em estudo; os de associação comparam frequências alélicas entre afetados e não afetados: se for encontrada diferença estatisticamente significativa, é possível inferir qual alelo está relacionado com a doença, e em que direção, do aumento da suscetibilidade ou da proteção à doença em estudo. Muitas vezes um estudo de ligação precede um outro de associação, assim um completa o outro na busca dos genes envolvidos na etiologia de uma doença complexa (73). A tabela 5 relaciona fatores genéticos associados com algumas destas doenças complexas.

### **1.2.2 Genética de doenças infecciosas**

As doenças infecciosas estão entre os principais problemas de saúde pública no mundo, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil. A cada ano ocorrem milhões de mortes causadas ou relacionadas com estas doenças no mundo, daí a importância do estudo de fatores genéticos do hospedeiro que busquem elucidar os mecanismos moleculares inatos de suscetibilidade ou resistência a estas doenças (74). A contribuição individual relativa dos genes de suscetibilidade ou de proteção pode variar em diferentes populações, então o estudo destes fatores contribui para o esclarecimento de questões epidemiológicas destas doenças (75). Dentre as diversas doenças infecciosas

mais estudadas sob o ponto de vista da genética do hospedeiro estão a tuberculose, a malária e a AIDS.

#### 1.2.2.1 Tuberculose (Tb)

O agente etiológico da Tb é a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, descrita em 1875 pelo microbiologista prussiano Heinrich Hermann Robert Koch (76). No mundo, mais de 10 milhões de pessoas estão afetadas pela Tb; em 2015 foram registrados 142 casos por 100.000 habitantes e em torno de 1.400.000 de mortes pela doença (77).

A tabela 6 apresenta a relação dos 30 países com a maior taxa de detecção de Tb (por 100.000 habitantes) no mundo, a maior parte deles localizada na África e Ásia. O único país localizado nas Américas (América do Sul) desta relação é o Brasil (77); a tabela 7 mostra os casos novos diagnosticados no ano de 2015 no Brasil.

Cerca de 10% a 20% dos indivíduos se tornam infectados após exposição ao agente etiológico da Tb (Figura 3) e, dentre os que são infectados (80% a 90%), apenas uma pequena parcela desenvolve a Tb extrapulmonar (5%), mais comum em crianças. A parcela maior dos que são infectados (95%) desenvolvem Tb latente, e dentre estes, apenas 5% a 10% desenvolvem Tb pulmonar clinicamente detectável (78).

Vários genes parecem estar implicados em cada uma destas etapas (infecção, Tb extrapulmonar; Tb latente e Tb pulmonar), como apresentado por Abel et al. (78) em artigo de revisão. Cobat et al. (79), em estudo de ligação pan-genômico (*GWLA – Genome-Wide Linkage Analysis*) envolvendo 540 comunicantes (pessoas que vivem com indivíduo(s) com tuberculose pulmonar ativa confirmada por baciloscopia e cultura de escarro) com PPD negativo, pertencentes a 155 famílias de Val-de-Marne, um subúrbio de Paris, encontraram um sinal significativo ( $P \cong 2 \times 10^{-5}$ ) na região 11p14-15, onde está localizado o gene *TST1* (locus para ausência de reatividade a tuberculina); nesta região está também presente o gene *TNF1* que controla a produção da fração alfa do fator de necrose tumoral que está relacionado com a resposta contra micobactérias. Dmytro et al (80), através de um estudo caso-controle, observaram que o genótipo GA do SNP (*Single Nucleotide Polymorfism* ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único) rs1800896 no gene *IL10* é mais frequente no grupo de doentes do que no grupo controle, e está relacionado com a produção menor desta interleucina. Em estudo pan-genômico de uma amostra de 193 famílias de Kampala (Uganda) composta por 803 indivíduos, Stein et al (81) encontraram sinais significantes (valores de P entre  $2 \times 10^{-3}$  a  $2 \times 10^{-4}$ ) para as regiões cromossômicas

2q21-2q24 e 5p13-5q22 relacionadas com a infecção e 7q22-7p21 e 20q13 com a Tb pulmonar ativa.

#### 1.2.2.2 Malária

Charles Louis Laveran, médico do exército francês baseado na Argélia, analisando uma amostra de sangue de um soldado com malária, observou pequenos corpúsculos móveis que considerou ser um protozoário parasita. Esta observação foi publicada em 1880 sem chamar a atenção da comunidade científica. Quatro anos mais tarde, dois pesquisadores italianos, Ettore Marchiafava e Angelo Celli, redescobriram a etiologia parasitária da doença e nomearam o parasita de *Plasmodium malariae*. Em 1886, Camillo Golgi descreveu uma outra espécie, o *P. vivax*, e em 1894, Amico Bignami descreveu uma terceira espécie, batizada de *P. falciparum* (82), esta última sendo responsável pela forma mais grave da doença (83). A malária é transmitida por um inseto vetor que na América Latina é o *Anopheles darling* Root, encontrado desde o sul do México até o sul do Brasil, uma espécie antropofílica, ou seja, que preferencialmente se alimenta com sangue humano (84).

Em 2015, foram registrados no mundo todo pouco mais de 210 milhões de casos de malária e 429 mil mortes, a maioria delas ocorrendo na África, onde a população sob risco tem menos acesso a terapia e onde há menos investimento em prevenção (85). Os países endêmicos estão concentrados, em sua maioria, abaixo da linha do Equador (Figura 4), em regiões tropicais e subtropicais; no Brasil a área endêmica é a região Amazônica (Figura 5): sete municípios localizados nos estados do Acre, Amazonas e Pará foram responsáveis por 50% dos registros de malária por *Plasmodium falciparum* (86).

Uma interessante forma de seleção natural tem sido observada na espécie humana, especialmente em áreas endêmicas de malária: o locus *HBB* (cadeia beta da hemoglobina A) possui um alelo tipo selvagem “A” e um alelo “S”, relacionado com a hemoglobinopatia conhecida como anemia falciforme. Os indivíduos heterozigotos (AS) apresentam uma forma branda de anemia (traço falcêmico) e são resistentes à malária; os homozigotos AA são susceptíveis à malária e os homozigotos SS normalmente não chegam à idade adulta

Tabela 5: Exemplos de doenças de etiologia complexa e genes envolvidos com suscetibilidade ou resistência.

<b>Doença</b>	<b>Gene(s)/Cromossomo</b>	<b>Referência</b>
<b>Transtorno por uso de substância</b>		
Alcoolismo	<i>GABRA2</i> / 4 <i>DRD4</i> / 11	(87) (88)
Cocaína	<i>ADH1B</i> / 4 <i>BCHE</i> / 3	(89)(90)
<b>Psiquiátricas</b>		
Anorexia nervosa	<i>KCTD15</i> / 19	(91)
Esquizofrenia	<i>NTNG1</i> / 1	(92)
Transtorno de humor bipolar	<i>CACNA1C</i> / 12 <i>NEK4</i> / 3	(93)
<b>Autoimunes</b>		
Artrite reumatoide	<i>IL2RA</i> / 10 <i>IL2RB</i> / 22	(94)
Diabetes Mellitus do tipo I	<i>DGKB</i> / 7 <i>CDKN2B</i> / 9 <i>HLA-DRB1</i> / 6	(95)(96)(97)
Lupus Eritematoso Sistêmico	<i>GAD</i> / 16 <i>PON1</i> / 7	(98)
<b>Cardiovasculares</b>		
Aterosclerose	<i>BCHE</i> / 3 <i>APOE</i> / 19	(99)
Doença arterial coronariana	<i>CETP</i> / 16	(100)
Hipertensão arterial sistêmica	<i>AGT</i> / 1 <i>SLC4A5</i> / 2	(101)
Acidente vascular encefálico isquêmico	<i>PITX2</i> / 4 <i>ZFH3</i> / 16	(102)
<b>Metabólicas</b>		
Diabetes Melitus do tipo II	<i>SLC30A8</i> / 8	(103)
<b>Geriátricas</b>		
Doença de Alzheimer	<i>APOE</i> / 19 <i>SORL1</i> / 11	(104)(105)
<b>Odontológicas</b>		
Periodontite	<i>IRF5</i> / 7 Região 1q25	(106)(107)
<b>Neoplásicas</b>		
Câncer	<i>CDKN2A</i> / 9 <i>TP53</i> / 17	(108)(109)

*GABRA2*: Subunidade alfa do receptor tipo A do GABA; *DRD4*: Receptor D4 da dopamina; *ADH1B*: Polipeptídeo beta da classe 1 da álcool desidrogenase; *BCHE*: Butirilcolinesterase; *KCTD15*: Domínio de tetramerização do canal de potássio contendo 15; *NTNG1*: Netrina G1; *CACNA1C*: Subunidade alfa 1C do canal de cálcio dependente de voltagem; *NEK4*: Quinase 4 relacionada com senescência replicativa; *IL2RA*: Subunidade alfa do receptor de IL-2; *IL2RB*: Subunidade beta do receptor de IL-2; *DGKB*: Diacilglicerol quinase beta; *CDKN2B*: Inibidor de ciclina dependente de quinase; *CETP*: Proteína de transferência do colesterol éster; *AGT*: Angiotensinogênio; *SLC4A5*: Membro 5 da família 4 de carreadores solúveis; *PITX2*: fator 2 de transcrição do gene da procolágeno lisil hidroxilase; *ZFH3*: fator 3 de transcrição que regula a diferenciação miogênica e neuronal; *SLC30A8*: Membro 8 da família 30 de carreadores solúveis *HLA-DRB1*: MHC de classe 2 DR B1; *GAD*: Glutamato descarboxilase; *PON1*: Paraoxonase 1 *APOE*: Apolipoproteína E, *SORL1*: Receptor 1 relacionado com sortilina; *IRF5*: Fator regulatório 5 do interferon; *CDKN2A*: Inibidor 2A de ciclina dependente de quinase; *TP53*: Gene supressor de tumor.

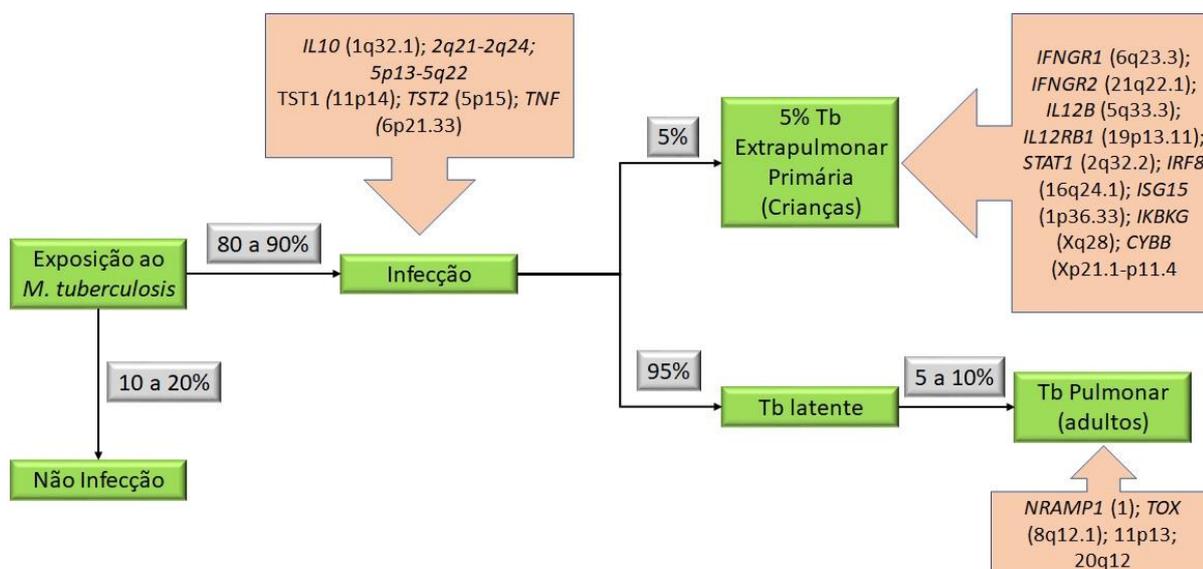


Figura 3: A história natural da infecção humana pelo *M. tuberculosis* e o subsequente desenvolvimento da Tb clínica ou sintomática

Apesar da grande carga bacteriana a que os comunicantes estão expostos, cerca de 10 a 20% destes não são infectados, e por esta razão não desenvolvem a doença. Em torno de 5% dos que são infectados, desenvolvem Tb clínica extrapulmonar dentro de 2 anos após a infecção, esta forma de Tb primária é mais comum em crianças. E dentre os demais que foram infectados (em torno de 95%) desenvolvem Tb latente. Apenas 5% destes desenvolvem a Tb pulmonar, mais comum em pacientes adultos. A Figura também mostra os genes que estão ou parecem estar relacionados ou com suscetibilidade ou proteção em cada um dos pontos desta história natural (adaptado de Abel et al (78))

por conta da anemia falciforme. Assim, em áreas endêmicas, o heterozigoto tem uma vantagem seletiva maior, pois tende a viver mais que os homozigotos (110).

Um estudo pangenômico mostrou associação entre a malária e os genes *ATP2B4* (ATPase transportador 4 de  $\text{Ca}^{++}$ ), que codifica a principal bomba de  $\text{Ca}^{++}$  dos eritrócitos, e *MARVELD3* (Domínio 3 de MARVEL), que codifica uma proteína produzida por células endoteliais e que possivelmente tem um papel importante no dano microvascular causado por eritrócitos parasitados (111). Um outro estudo, realizado em uma população ugandense em área com alta incidência da doença, mostrou que a variante rs1800482 na região promotora (-954C) do gene *NOS2* (Sintetase 2 de óxido nítrico) está relacionado com menor suscetibilidade à malária (112).

A deficiência da glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PD) está relacionada com hemólise intravascular após a administração de alguns fármacos, dentre eles a primaquina e seus derivados, fármacos usados na terapia da malária; paradoxalmente, esta deficiência parece conferir proteção contra a infecção por *Plasmodium sp* (113).

Tabela 6: Taxa de detecção da tuberculose , no ano de 2015, nos 30 países com maior prevalência da doença e relação com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS).

País	Taxa de Detecção	
	Total de casos Por 100.000	Em casos de AIDS/SIDA (Nº Absoluto)
África do Sul	834	(454.000)
Lesoto	788	(17.000)
R.P.D.da Coreia <sup>1</sup>	561	(141.000)
Moçambique	551	(154.000)
Namíbia	489	(12.000)
Papua Nova Guiné	432	(33.000)
Indonésia	395	(1.020.000)
Zâmbia	391	(63.000)
Rep. Centro Africana	391	(19.000)
Camboja	380	(59.000)
Congo	379	(18.000)
Mianmar	365	(197.000)
Angola	370	(93.000)
R.D. do Congo <sup>2</sup>	324	(250.000)
Nigéria	322	(586.000)
Filipinas	322	(324.000)
Libéria	308	(14.000)
Serra Leoa	307	(20.000)
Rep. Unida da Tanzânia	306	(164.000)
Paquistão	270	(510.000)
Zimbábue	242	(38.000)
Quênia	233	(107.000)
Bangladesh	225	(362.000)
Índia	217	(2.840.000)
Etiópia	192	(191.000)
Tailândia	172	(117.000)
Vietnam	137	(128.000)
Rússia	80	(115.000)
Rep. Popular da China	67	(918.000)
Brasil	41	(84.000)
<b>Total</b>	<b>195</b>	<b>(9.050.000)</b>

<sup>1</sup>República Popular Democrática da Coreia (Coreia do Norte); <sup>2</sup>República Democrática do Congo (Fonte: OMS (77)).

Tabela 7: Casos novos de Tuberculose por Unidade da Federação no ano de 2016, com e sem SIDA/AIDS.

<b>Unidade da Federação</b>	<b>Total de Casos</b>	<b>Com SIDA/AIDS</b>
Rondônia	211	21
Acre	138	6
Amazonas	803	59
Roraima	57	7
Pará	668	32
Amapá	94	5
Tocantins	63	1
<b>Região Norte</b>	<b>2034</b>	<b>131</b>
Maranhão	638	50
Piauí	199	13
Ceará	964	70
Rio Grande do Norte	277	19
Paraíba	383	20
Pernambuco	1307	148
Alagoas	259	44
Sergipe	251	11
Bahia	1437	99
<b>Região Nordeste</b>	<b>5715</b>	<b>474</b>
Minas Gerais	985	78
Espírito Santo	375	25
Rio de Janeiro	2890	280
São Paulo	6019	535
<b>Região Sudeste</b>	<b>10269</b>	<b>918</b>
Paraná	651	78
Santa Catarina	675	117
Rio Grande do Sul	1552	337
<b>Região Sul</b>	<b>2878</b>	<b>532</b>
Mato Grosso do Sul	251	14
Mato Grosso	432	20
Goiás	251	22
Distrito Federal	128	20
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>1062</b>	<b>76</b>
<b>Total</b>	<b>21958</b>	<b>2131</b>

(Fonte SINAN (114)).

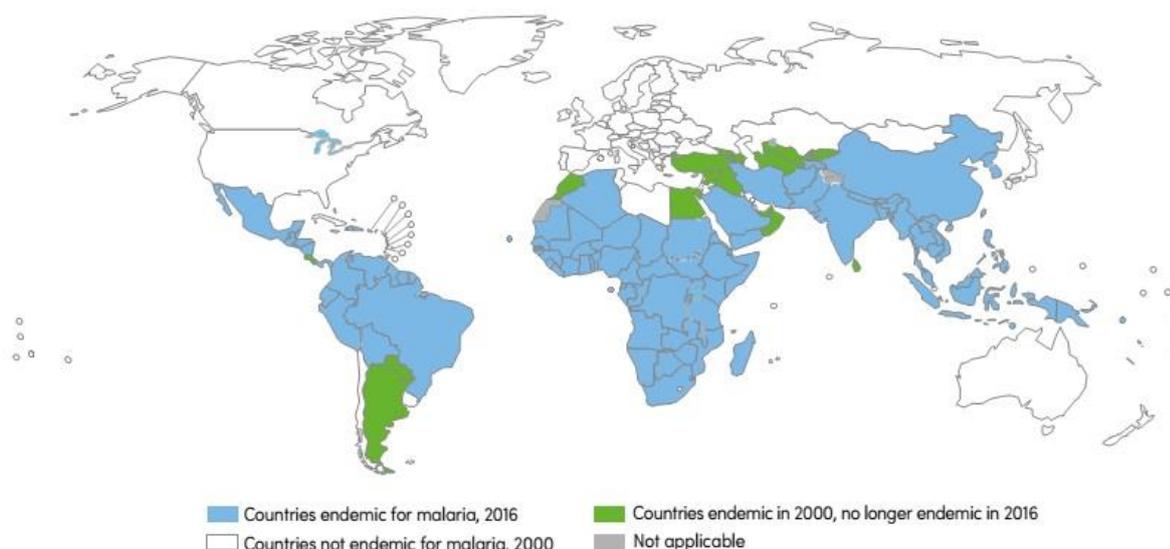


Figura 4: Países endêmicos para malária em 2000 e em 2016. (fonte World Malaria Report, 2016 (85)).

O gene *CD40LG* é um gene localizado no cromossomo X que codifica o ligante de CD40, relacionado com a resposta imune contra vários agentes patogênicos. Uma mutação neste gene (rs3092945) está relacionada com menor risco de malária cerebral ou severa, tanto em homens como em mulheres. Outros sinais fracos de associação (valores de P entre 0,001 e 0,05) foram observados entre a malária severa e os genes *CD36* (proteína CD36 – molécula de adesão de plaquetas), *IL1A* (cadeia alfa da interleucina 1), *CR1* (receptor 1 de C3b/C4b), *IL4* (interleucina 4) com malária cerebral e *IL20RA* (subunidade alfa do receptor de interleucina 20) com anemia severa (115). A Figura 6 ilustra pormenores da genética da suscetibilidade à malária.

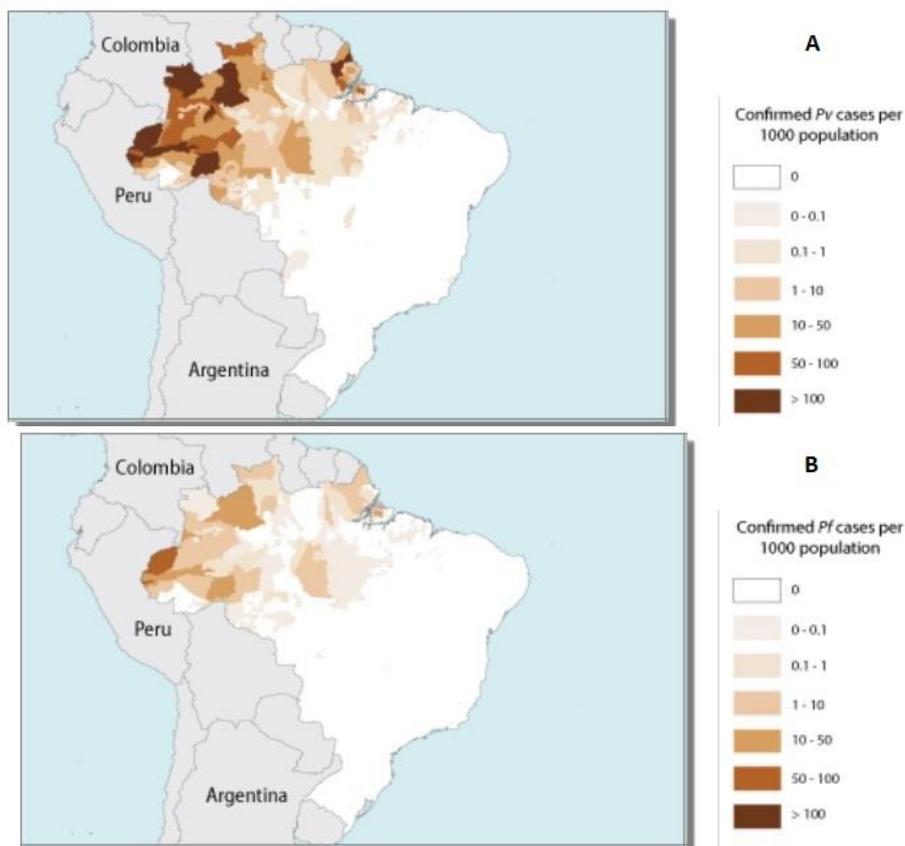


Figura 5: Casos confirmados de malária no Brasil.

A: Casos por *Plasmodium vivax*; B: Casos por *Plasmodium falciparum* (fonte World Malaria Report, 2016 (85)).

### 1.2.2.3 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA / AIDS

No início da década de 1980, quando homens jovens homossexuais, previamente saudáveis, adoeceram e vieram a falecer de causa desconhecida, iniciou-se assim a história da síndrome da imunodeficiência adquirida. Com o aumento no número de mortes neste grupo populacional, a doença ficou conhecida como “praga gay”. Entretanto, quando começaram a surgir casos em outros grupos, como usuários de drogas injetáveis, hemofílicos, mulheres e crianças, ficou claro que a doença não estava relacionada apenas com a orientação sexual dos doentes. Em 1983 foi descoberto o agente causador da doença: o HIV (vírus da imunodeficiência humana) (116).

Em 2016 foram registrados no mundo quase 1,8 milhão de novas infecções pelo HIV, e 36,7 milhões de pessoas vivem com o vírus; destas, 17 milhões em terapia antirretroviral, importante fator de redução no número de mortes que, entre 2010 e 2015, foi de 26% (117). No Brasil, neste mesmo ano, havia 830.000 pessoas vivendo com o HIV e foram registradas 48.000 novas infecções com 14.000 mortes relacionadas com a AIDS (118).

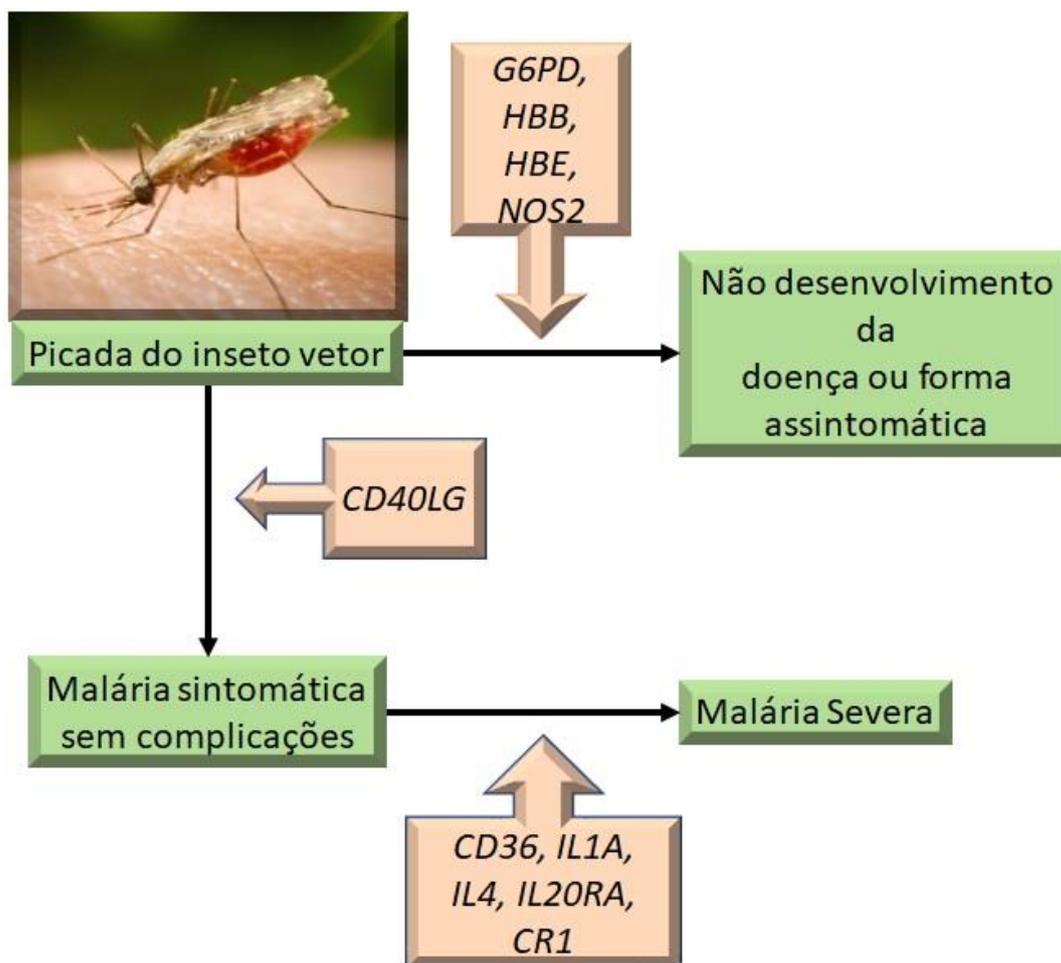


Figura 6: Infecção humana pelo protozoário *Plasmodium falciparum*, e subsequente desenvolvimento ou não da malária sintomática

(Figura elaborada a partir dos dados de Timmann et al (111) Rockett et al (115) Band et al (119), Deng et al (120))

Os receptores do tipo Toll (Toll Like Receptors – TLR) são importantes na detecção de padrões moleculares associados a patógenos, incluindo vírus. Alguns SNPs em genes *TLR*, especialmente em *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR6*, estão associados com proteção ou suscetibilidade à infecção pelo HIV (121). Su et al (122) mostraram que em mulheres soronegativas expostas cronicamente ao HIV, são mais frequentes polimorfismos do gene *IFR1* (fator regulatório-1 de interferon) relacionados com menor expressão do gene, quando comparadas com mulheres soronegativas não cronicamente expostas ao HIV, sugerindo que a menor expressão do gene possa ter um papel na resistência contra a infecção pelo HIV.

O principal receptor para o HIV em células humanas é uma proteína expressa na membrana de macrófagos e de linfócitos T, denominada CCR-5 (receptor-5 de quimocina) (123). Uma menor expressão desta proteína na membrana destas células, assim como a

menor concentração das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , está relacionada com menor risco de infecção pelo vírus (124). Pessoas homozigotas para uma deleção de 32 pb no gene *CCR5* ( $\Delta 32$ *CCR5*/ $\Delta 32$ *CCR5*) são resistentes à infecção pelo HIV (125), e pessoas heterozigotas ( $\Delta 32$ *CCR5*/*CCR5*) têm normalmente uma infecção menos severa e raramente desenvolvem a síndrome da imunodeficiência adquirida (126) ou o fazem mais lentamente (127) (Figura 7).

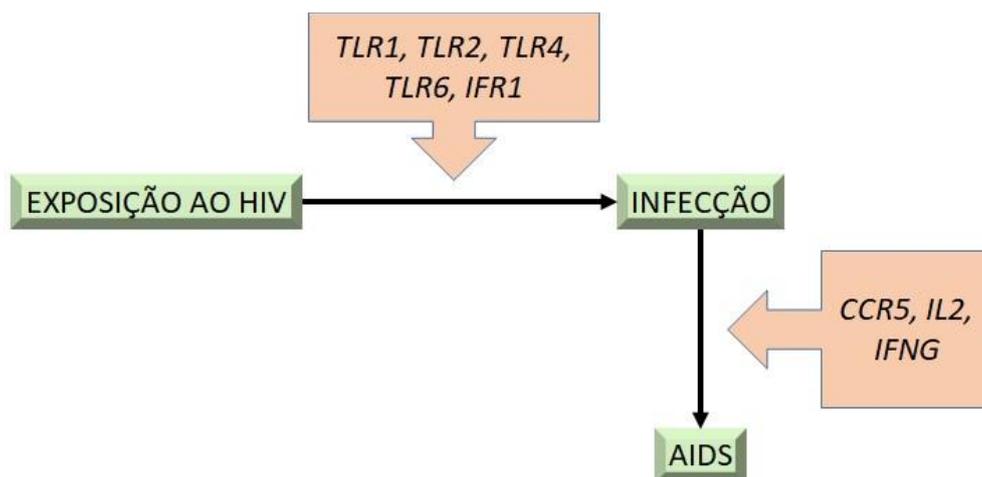


Figura 7: Infecção humana pelo HIV e genes associados com suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento da doença.

Figura elaborada a partir dos dados de Willie et al (121); Su et al (122); Deng et al (123); Jaumdally et al (124); Liu et al (125); Samson et al (126); Levy et al (127)

### 1.2.3 Genética do *M. leprae*

Quando algumas espécies bacterianas fizeram a transição da vida livre ou parasitária eventual ou facultativa para a parasitária obrigatória, houve uma grande perda de genes e consequentemente de DNA. Assim, os genomas bacterianos podem variar bastante, desde 0,5 Mb (megabases) até 10 Mb. No extremo inferior estão as micoplasmas, originalmente consideradas formas primitivas de vida; estudos de sequenciamento completo e filogenéticos demonstraram que estas pequenas bactérias perderam DNA ao longo da evolução, tornando-se parasitas intracelulares obrigatórios (Moran em artigo de revisão (128)).

O que ocorreu com as micoplasmas pode ter ocorrido com o *M. leprae*, que sofreu extensa redução evolutiva com perda de grande número de genes em comparação com outras espécies do gênero *Mycobacterium* (Tabela 8) ao longo do processo evolutivo, desde quando estas espécies divergiram de um ancestral comum (129). Comparando o genoma do *M. leprae* com o de outras bactérias, se observa que esse se parece mais com aquelas que são parasitas intracelulares obrigatórias, como é o caso da *Chlamydia* (130) e

das riquetsias (131,132). Esta redução no número de genes pode explicar porque a bactéria se reproduz tão lentamente na espécie humana, onde o tempo de duplicação é de 14 dias (129), e a razão de ser impossível o seu cultivo em meios artificiais de cultura (133). Além disso, este genoma reduzido é coerente com o parasitismo obrigatório da bactéria, pois quanto menor um genoma, menor a capacidade de vida livre (Figura 8).

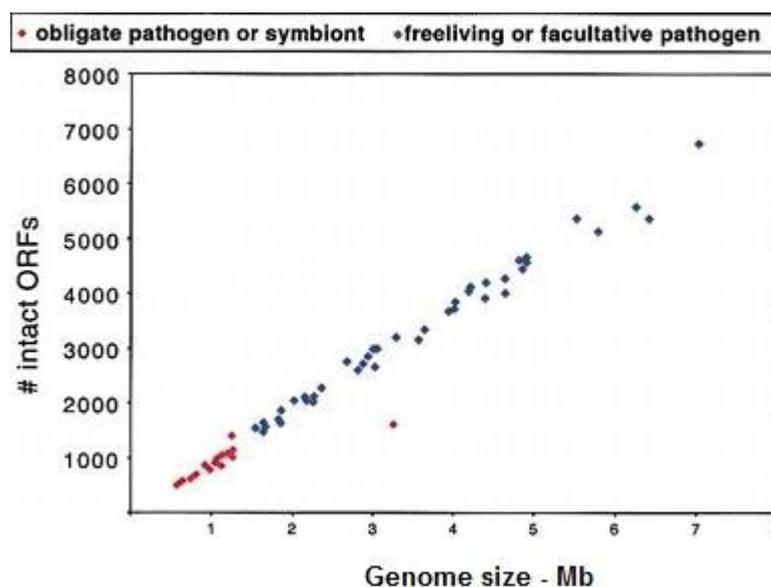


Figura 8: Tamanho dos genomas das eubactérias

Os pontos vermelhos correspondem aos patógenos obrigatórios, representados por uma variedade de espécies não relacionadas. ORF: *Open Reading Frame*. Adaptado de Moran (128)

#### 1.2.4 Genes associados/ligados à hanseníase

A ideia de que a hanseníase é uma doença hereditária não é nova; no século XIII, o monge franciscano Bartolomeu Angélico já postulava que a doença era transmitida dos pais para os filhos. Hoje, se sabe que não se trata de uma doença hereditária clássica, mas de uma doença infecciosa cuja patogênese sofre influência do genoma do hospedeiro, pois a exposição ao *M leprae* é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença (10). Deve existir um forte componente genético que controla a suscetibilidade (ou a resistência) à doença; apesar de se ter avançado bastante ainda não se conhece exatamente o número e identidade dos genes responsáveis por este componente. Hoje, várias regiões cromossômicas e genes candidatos ao controle de fenótipos da hanseníase já foram descritos, muitos deles relacionados com a resposta imune.

Diferentes genes modificam a suscetibilidade do hospedeiro à hanseníase em três momentos diferentes: 1º) a hanseníase *per se*, ou seja, a doença independente da forma

clínica; 2º) a definição da forma clínica da doença; e 3º) risco potencial de desenvolvimento de reações hansênicas (134) (Figura 9). Na tabela 9 são apresentados os genes associados à hanseníase em estudos que produziram pelo menos dois resultados de replicação.

O primeiro estudo pangenômico foi conduzido em 2001 por Siddiqui et al. (135), que ao estudar uma população indiana, encontrou na região 10p13 forte ligação com suscetibilidade à forma paucibacilar da hanseníase. Nesta região é encontrado o gene *MRC1* que codifica o receptor C de manose tipo 1, proteína importante no processo de reconhecimento celular e de fagocitose por macrófagos, que Alter et al. (136) acreditaram estar associado com hanseníase *per se* ou com a forma multibacilar, mas não a paucibacilar.

Em 2004, Jamieson et al (137) genotiparam 16 marcadores ao longo da região 17q11-21 em um estudo realizado em dois conjuntos de famílias recrutadas na região norte do Brasil: a primeira continha 92 famílias com casos de tuberculose (627 indivíduos, dentre eles, 280 afetados) e 72 famílias com casos de hanseníase (372 indivíduos e 208 afetados). Os autores encontraram dois marcadores – D17S250 e D17S1795 – ligados à suscetibilidade à hanseníase. Na região estudada por estes pesquisadores existem genes de proteínas envolvidas na imunidade inata: *NOS2A* (óxido nítrico sintetase 2); *CCL2* (também conhecido como *MCP1* C-C ligante-2 de quimocina); *CCL3* (também conhecido como *MIP1A* C-C ligante-3 de quimocina); *CCL4* (também conhecido como *MIP1B* C-C ligante-4 de quimocina); *CCL5* (também conhecido como *RANTES*, C-C ligante-5 de quimocina); *CCR7* (receptor-7 de quimocina C-C); *STAT3* (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3); *STAT5A* (transdutor de sinal e ativador de transcrição 5A) e *STAT5B* (transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B).

Mira et al em 2003 mostraram a existência de um sinal forte de associação na região 6q25-q27 com a suscetibilidade à hanseníase *per se* em famílias multiplex vietnamitas (138). Nesta mesma região cromossômica, um ano mais tarde, Mira et al (139) demonstraram, nas famílias multiplex vietnamitas, dois marcadores localizados na região 6q26, onde estão os genes *PRKN* (na época conhecido como *PARK2*) e *PACRG*, associados fortemente com a suscetibilidade à doença, e os autores replicaram este resultado em estudos do tipo caso-controle em amostras brasileiras. Três marcadores (alelos G do rs295340, C do rs4880 e A do rs5746136) do gene da superóxido dismutase 2 (*SOD2*), que está localizado na mesma região (6q25-q27), parecem estar associados com a suscetibilidade à hanseníase *per se*, como demonstrado por Ramos et al em 2016 trabalhando com a mesma população do presente estudo (140).

Em 2014, Sales-Marques et al (141) mostraram na mesma amostra populacional usada por Ramos et al (140) que o genótipo AA no SNP rs8057341 (gene *NOD2*, 16q12.1) e o CC no marcador rs4942254 (região 13q14.11 onde estão localizados os genes *CCDC122* e *LACC1*) estão associados com a resistência à doença. Este achado foi corroborado em estudos de replicação em outras quatro amostras brasileiras: Rio de Janeiro (RJ), Rondonópolis (MT), Bauru (SP) e Almendra (MG).

No nucleotídeo 80 do gene *LTA*, um dos alelos, A ou C, pode ser encontrado. Alcaïs et al (142), em um estudo multicêntrico (Vietnam, Índia e Brasil, 2027 indivíduos), observaram que o alelo A está fortemente associado à suscetibilidade à hanseníase, especialmente em pacientes mais jovens.

Uma mutação missense no gene *LRRK2* (12q12) na qual a metionina na posição 2397 da proteína é substituída por uma treonina (M2397T, rs3761863) está associada com maior risco de reação reversa (RR) em pacientes com hanseníase, possivelmente devido ao efeito pró-inflamatório patológico mediado pelo gene com a mutação (143).

A proteína codificada pelo gene *GATA3* é um fator de transcrição importante no desenvolvimento do linfócito T e, portanto, deve estar relacionado com a imunidade e com potencial de poder estar associado com a hanseníase. Medeiros et al em 2016 (144) em um estudo do tipo caso-controle em uma amostra populacional de Rondonópolis (MT, 411 doentes e 357 controles) e em uma segunda amostra para replicação, recrutada em Bauru (SP, 511 casos e 360 controles), observaram que o alelo A no SNP rs10905284, nas duas populações, estava associado com a proteção à hanseníase.

Os receptores “*toll like*” (TLRs) humanos formam uma família de 10 proteínas em macrófagos que reconhecem padrões moleculares em microrganismos patogênicos. Alguns TLRs estão ancorados na membrana citoplasmática destas células e reconhecem lipopeptídeos (TLR1, TLR2 e TLR6) (145). Os TLR1 e TLR2 formam um heterodímero para o reconhecimento do *M leprae*, e estão mais expressos nestas células do polo TT do que no LL (146). Um polimorfismo no gene *TLR1* (n1805 – T > G; p602 – I > S) pode afetar a expressão deste gene em macrófagos; pessoas com o genótipo 1805GG não expressam o receptor. Ao contrário dos indivíduos que são 1805TT, os heterozigotos 1805GT apresentam um TLR1 hiporresponsivo a lipopetídeos, sendo um fator de suscetibilidade a doenças causadas por micobactérias (147). A Figura 8 mostra o papel de genes da resposta imune que estão relacionados com suscetibilidade à hanseníase (148).

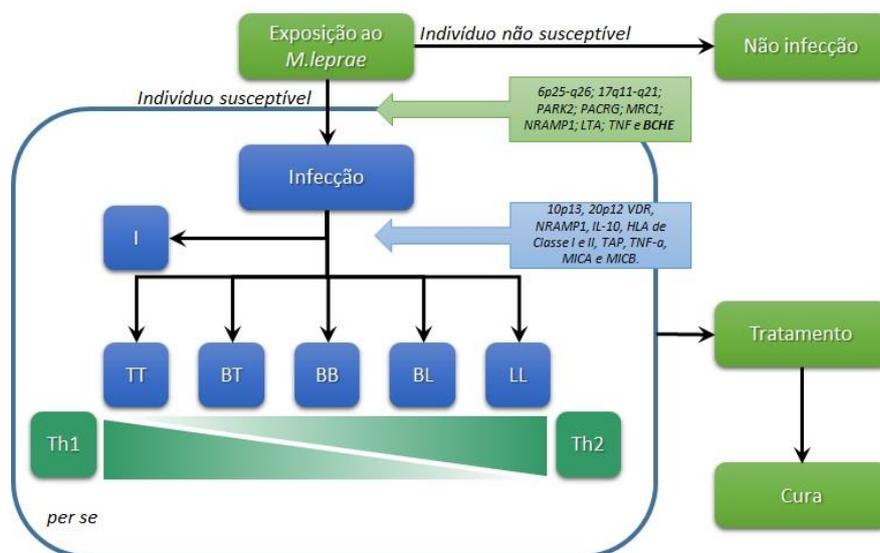


Figura 9: O espectro clínico da hanseníase conta com a participação de vários genes associados com a infecção "per se" ou com a forma clínica.

Adaptado de Sauer et al (134)

Tabela 8: Genomas de algumas bactérias patogênicas e não patogênicas em relação ao *Mycobacterium leprae*.

Bactéria	Doença	Tamanho do genoma (Mb)	Número de genes funcionais	Referência
<i>Chlamydia tracomatis</i>	Tracoma, linfogranuloma venéreo, uretrite e cervicite (DST)	1,0	920	Carlson et al (149)
<i>Escherichia coli</i>	Não patogênica na microbiota intestinal, causa infecções extra intestinais	4,6	4306	Touchon et al (150)
<i>M. aurum</i>	Não patogênico, presente na microbiota normal	6,0	5750	Namouchi et al (151)
<i>M. avium paratuberculosis</i>	Doença de Johne em bovinos	4,8	4305	Li et al (152)
<i>M. bovis</i>	Tuberculose bovina e humana	4,3	3951	Garnier et al (153)
<i>M. kansasii</i>	Infecções oportunistas	6,1	5230	Strapagiel et al (154)
<b><i>M. leprae</i></b>	<b>Hanseníase</b>	<b>3,3</b>	<b>1604</b>	<b>Cole et al (129)</b>
<i>M. marinum</i>	Patogênico para peixes e anfíbios, raras lesões de pele em humanos	6,6	5424	Stinear et al (155)
<i>M. tuberculosis</i>	Tuberculose	4,4	3959	Cole et al (129)
<i>M. ulcerans</i>	Úlcera de Buruli <sup>a</sup>	5,9	5015	Yoshida et al (156)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Uretrite e cervicite	0,6	485	Gibson et al (157)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecções oportunistas	6,3	5570	Stover et al (158)
<i>Rickettsia sp</i>	Febre maculosa	1,2	1202	Sentausa et al (131)
<i>Salmonella Typhi</i>	Febre tifóide	4,8	4545	Deng et al (159)
<i>Shigella flexneri</i>	Disenteria bacilar	4,6	4084	Wei et al (160)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) <sup>b</sup>	Infecção hospitalar	2,9	2671	Holden et al (161)
<i>Yersinia pestis</i>	Peste bubônica	4,6	4198	Deng et al (162)

As espécies de *Mycobacterium* estão em evidência e o *Mycobacterium leprae* está em negrito; <sup>a</sup>Terceira micobacteriose após a hanseníase e a tuberculose, caracterizada por uma grande úlcera nas pernas ou nos braços (163); <sup>b</sup> *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina na sigla em inglês.

Tabela 9: Genes associados a hanseníase demonstrados em pelo menos dois estudos de replicação

Gene	Nome e Localização		Cromossomo <sup>1</sup>	Produto Gênico <sup>1</sup>
	Nome oficial			
<i>HLA-DRB1</i>	Complexo Principal de Histocompatibilidade, classe II, DR beta 1		6p21.32	Essencial na apresentação de antígenos ao linfócito T auxiliar
<i>TNF</i>	Fator de Necrose Tumoral		6p21.33	Citocina pró-inflamatória secretada especialmente por macrófagos
<i>LTA</i>	Linfotoxina alfa		6p21.33	Membro da família TNF, media uma variedade de respostas inflamatórias,
<i>IL10</i>	Interleucina 10		1q32.1	Tem efeitos pleiotrópicos em imunorregulação e inflamação. Citocina produzida por monócitos e linfócitos
<i>PRKN<sup>2</sup></i>	Parquina – E3 ubiquitina proteína ligase		6q26	Proteína que marca com ubiquitina as proteínas que devem ser degradadas pelo proteossomo
<i>NOD2</i>	Domínio de ligante de nucleotídeo para oligomerização contendo 2		16q12.1	Tem um papel importante na resposta imune a LPS bacterianos pelo reconhecimento do muramil dipeptídeo
<i>RIPK2</i>	Receptor serina/treonina quinase 2		8q21.3	Tem atividade na ativação de caspases, é importante tanto na imunidade inata como adaptativa
<i>LACC1</i>	Domínio de laccase contendo 1		13q14.11	É uma oxidoredutase que promove a oxidação de ácidos graxos, com concomitante ativação de produção de espécies reativas de oxigênio dependentes de NADPH oxidase
<i>CCDC122</i>	Domínio de espiral contendo 122		13q.14.11	Contém um domínio espiralado, mutações no gene estão associadas à hanseníase

<sup>1</sup>informações obtidas no sítio <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <sup>2</sup> também identificado como *PARK2*. Demais informações nesta Tabela adaptadas de Sauer et al(134).

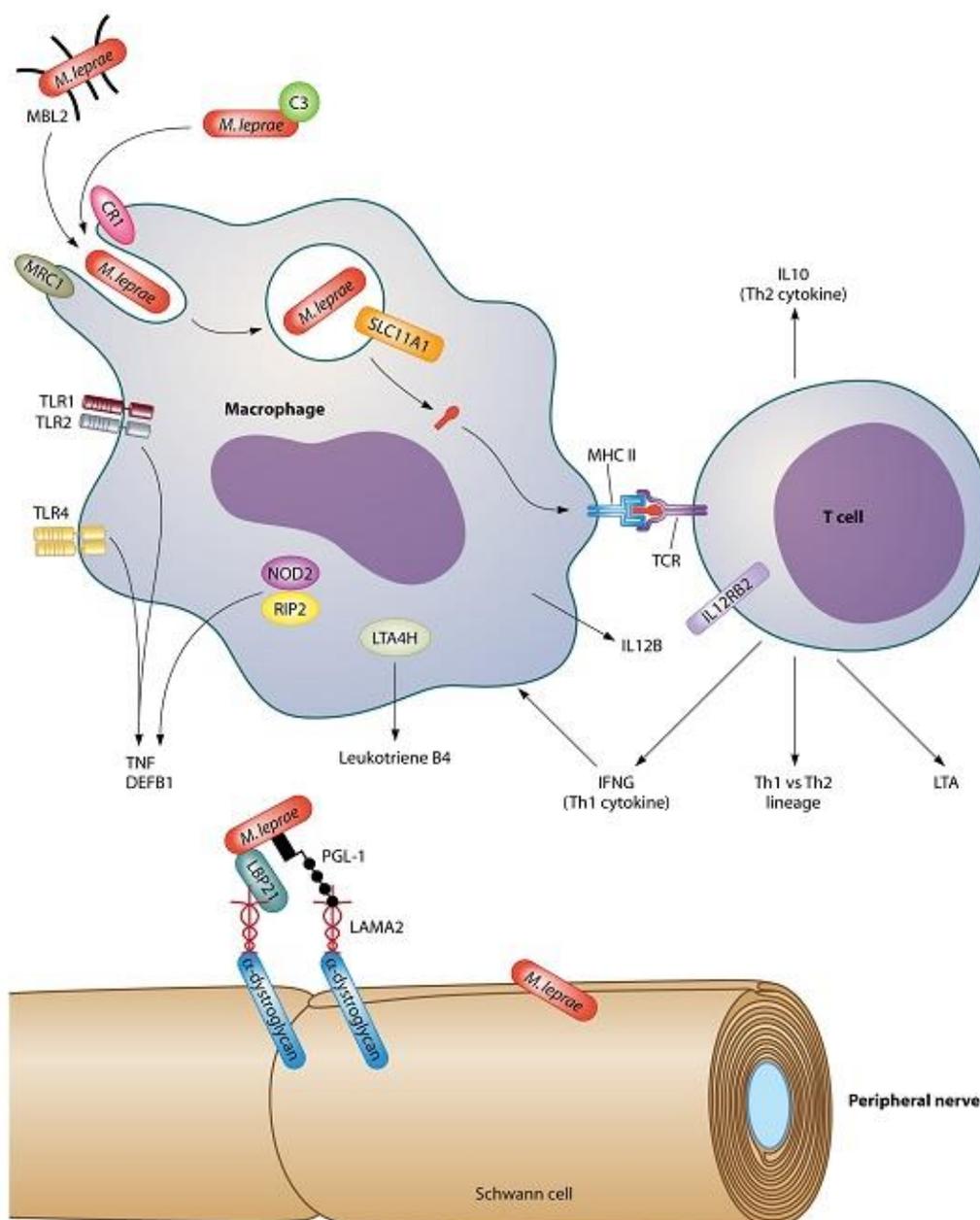


Figura 10: Genes e seus produtos envolvidos na resposta imune contra o *M. leprae*.

As interações moleculares e celulares conhecidas ou postuladas que tenham papel na resposta imune contra a bactéria são retratadas. São genes com evidência de associação com a suscetibilidade à hanseníase e/ou de estudos de genes candidatos envolvidos com a resposta imune, através de análises de ligação ou de associação pangenômicos. A proteína ligante de laminina 21 (LBP21) e o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) na parede celular do *M. leprae* ligam-se à cadeia  $\alpha_2$  da laminina 2 (LAMA2) e à  $\alpha$ -distroglicana na membrana citoplasmática da célula de Schwann. Desta forma a bactéria invade a célula e provoca o conseqüente dano ao nervo periférico. Abreviações: C3: fator 3 do complemento; CR1: receptor 1 do complemento; DEFB1: defensina  $\beta$ 1; IFNG: interferon gama; IL10: interleucina 10; IL12B: subunidade p40 da interleucina 12; IL12RB2: receptor  $\beta$ 2 da interleucina 12; LTA4H: leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolase; LTA:  $\alpha$ -linfotoxina; MHC II: MHC de classe II; MBL2: lectina ligante de manose 2; MRC1: receptor 1 de manose; NOD2: domínio 2 de oligomerização de nucleotídeo; RIP2: quinase de interação com receptor 2; SLC11A1: membro 1 da família 11 de carreadores solúveis (também conhecido como NRAMP); TCR: receptor de célula T; Th1: linfócito T auxiliar tipo 1; Th2: linfócito T auxiliar tipo 2; TLR: receptor tipo Toll; TNF: fator de necrose tumoral. (Misch et al (164)).

## 1.3 O GENE *BCHE*

### 1.3.1 A enzima Butirilcolinesterase (BChE)

A butirilcolinesterase humana (BChE, E.C. 3.1.1.8; OMIM 177400) (165), conhecida anteriormente como pseudocolinesterase ou colinesterase do soro (ou do plasma), é produzida principalmente no fígado e é capaz de hidrolisar tanto ésteres de colina (butirilcolina, acetilcolina) como outros ésteres (aspirina (166), cocaína (167,168) e succinilcolina (169,170)). A BChE é uma glicoproteína tetramérica composta por 574 aminoácidos e nove resíduos de carboidrato (171) e é codificada pelo gene *BCHE* localizado no cromossomo 3q26.1 (172,173). A BChE pertence à família das serina hidrolases, enzimas que catalisam reações de hidrólise e que possuem em seu centro ativo o aminoácido serina (posição 198), além da histidina (posição 438) e o ácido glutâmico (posição 325) (174), como demonstrado na Figura 11. Além do fígado, a enzima é encontrada em vários outros órgãos e tecidos, tais como: plasma sanguíneo, pele, músculo esquelético, intestino delgado, pulmões, estômago, baço, rins, cérebro, coração e tireoide (Lockridge, em artigo de revisão (175); Tabela 10). A Figura 12 mostra a expressão do gene *BCHE* em vários tecidos humanos, e como esperado, há mais RNA no fígado, local onde a enzima é produzida em maior escala.

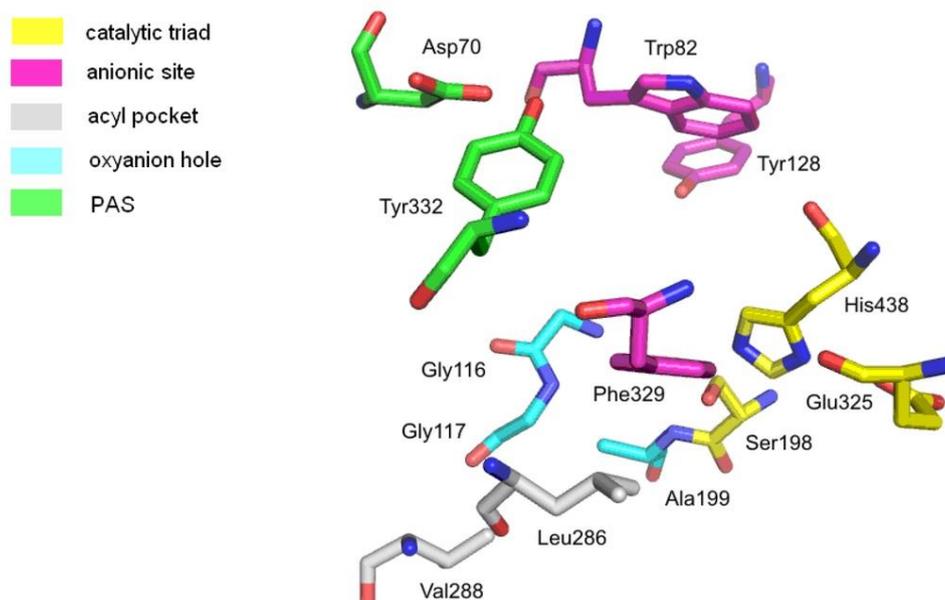


Figura 11: O centro ativo da BChE humana.

A reação de hidrólise tem lugar no centro ativo da BChE, formado pelos sítios esterásico onde se encontram os aminoácidos serina, histidina e ácido glutâmico, e aniônico formado pelos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. Fonte: Bajda et al (176)

Tabela 10: A distribuição da BChE em vários tecidos do organismo adulto

Tecido	BChE		
	Peso do tecido (g)	Massa (mg)	Concentração em $\mu\text{g/g}$ de tecido
Plasma	3500	16	4,57
Fígado	1450*	13	8,96
Pele	4500*	7	1,55
Músculo	3500	6	1,71
Intestino delgado	850*	4	4,70
Pulmões	400	3	7,50
Córtex cerebral	1200	3	2,50
Estômago	300	1,8	6,00
Baço	175*	1	5,71
Rins	145*	1	6,90
Cerebelo	150	0,8	5,33
Coração	300	0,6	2,00
Medula Oblonga	22,5*	0,085	3,78
Tireóide	20	0,0085	0,42

\*Valor médio (adaptada de artigo de revisão de Lockridge (175))

Ainda não se conhece a exata função fisiológica da BChE; uma de suas possíveis funções seria na modulação, por hidrólise, da ação da acetilcolina (ACh) tanto no sistema nervoso central (SNC) como no periférico (SNP) (177). Em geral, este papel tem sido atribuído a acetilcolinesterase (AChE), no entanto, a BChE tem papel importante nesta regulação. Xie et al (178) observaram que camundongos *knock down* para a AChE eram viáveis, portanto, a BChE deveria estar realizando a função da AChE nestes animais. Em animais *knock down* para a BChE ocorre aumento na expressão da AChE (179). Além disso, a enzima é capaz de hidrolisar o 2-araquidonoilglicerol, um neurotransmissor endocanabinóide; portanto, a BChE pode ter como função participar da modulação deste tipo de neurotransmissão (180). Por outro lado, a BChE é inibida pela anandamida, outro neurotransmissor endocanabinóide, tanto no SNC como em outros tecidos (181). Ainda, a BChE é capaz de promover a hidrólise de compostos anticolinesterásicos, portanto uma possível função desta enzima seria a de fazer a proteção da AChE, especialmente a cerebral e do sistema nervoso periférico (182), pois tem sido demonstrado que pessoas portadoras de certos variantes da BChE têm maior risco de neurotoxicidade mediada por compostos organofosforados (183).

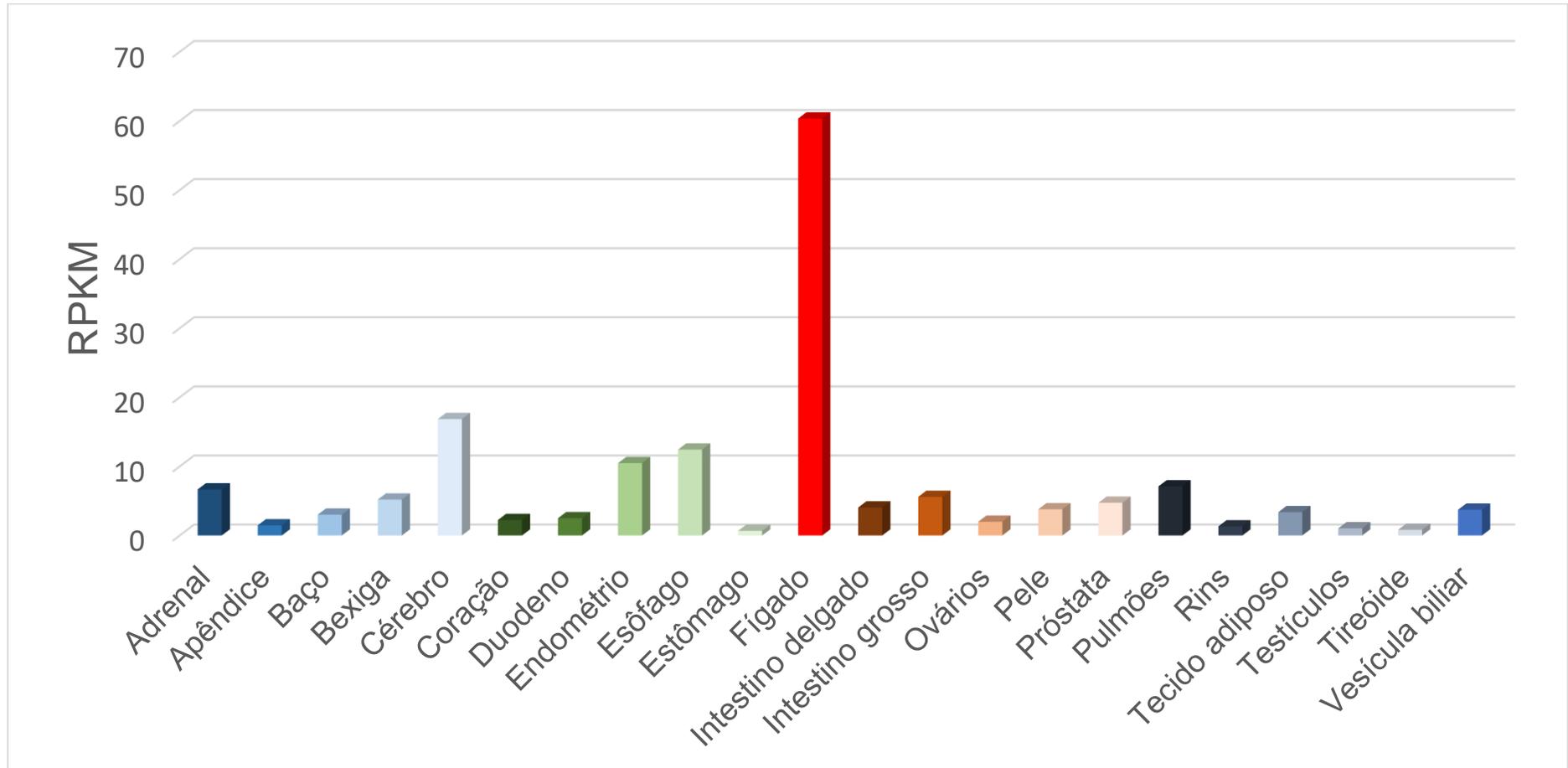


Figura 12: Expressão do gene BChE em termos de RNA em alguns tecidos ou órgãos humanos x Valores expressos RPKM (Reads por milhão de quilobases) (adaptado de NCBI, informações relativas ao gene *BCHE* (184))

Outra possível função da BChE é catalisar a hidrólise da grelina, um peptídeo produzido por certas células do estômago quando vazio e que exerce função sobre o SNC e a hipófise, interagindo com o receptor GHSR (receptor secretagogo do hormônio do crescimento – GH); uma das funções da grelina é promover a sensação de fome, pois é normalmente produzida quando o organismo necessita de fontes de energia. A forma ativa da grelina tem a serina na posição 3 acilada (octanoilizada) (185,186); a BChE promove a desacilação da grelina de modo que esta perde a sua função fisiológica (187). Em indivíduos obesos, Tschop et al (188) observaram que a concentração plasmática de grelina era menor porque, nestes indivíduos, a atividade enzimática da BChE é maior (189). A superexpressão da BChE diminuiu a concentração sérica da grelina em camundongos, o que levou a redução tanto da agressividade como do estresse e consequente aumento do tempo de vida (190).

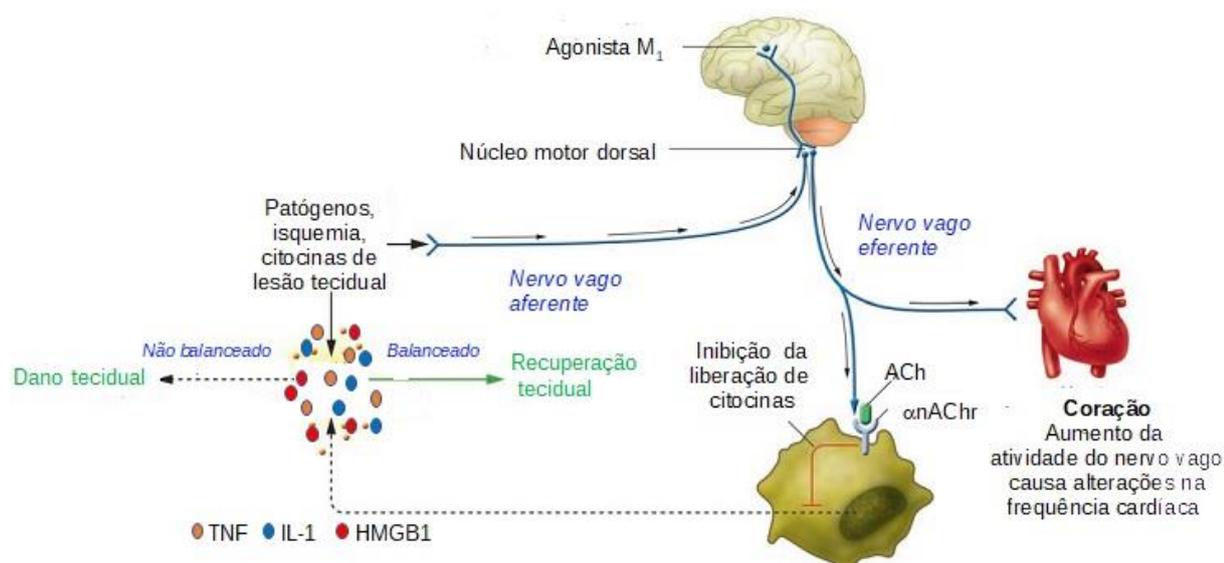
Um dos mecanismos que regulam a resposta inflamatória é a neural, através do sistema nervoso parassimpático, conhecida como via colinérgica antiinflamatória (CAP), em referência ao seu neurotransmissor, a acetilcolina (ACh). Os macrófagos expostos a ACh têm sua função inibida. O nervo vago inerva órgãos vitais, incluindo os que contêm o sistema reticuloendotelial (fígado, pulmões, baço, rins e intestinos), e quando o ramo eferente deste nervo é acionado ocorre a inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios (191).

A via colinérgica anti-inflamatória (CAP) pode atenuar o processo inflamatório mediado por macrófagos ou por outras células do sistema imune que expressam o receptor nicotínico  $\alpha 7$  ( $\alpha 7nAChR$ ). A ACh liberada por estimulação do nervo vago se liga ao  $\alpha 7nAChR$ , o qual ao ser estimulado promove a abertura de canais de íons cálcio ( $Ca^{++}$ ); o aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{++}$  inibe o fator nuclear  $\kappa B$  ( $NF\kappa B$ ), o que resulta na supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios como a fração  $\alpha$  do fator de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ). Esta supressão está relacionada com a inibição da fosforilação catalisada pela quinase do inibidor kappa ( $I\kappa K$ ) e a resultante inibição da fosforilação do inibidor de  $\kappa B$  ( $I-\kappa B\alpha$ ) com consequente redução da ativação do  $NF-\kappa B$  (192); portanto, o  $\alpha 7nAChR$  poderia ser um importante alvo terapêutico na terapia de processos inflamatórios patológicos (193), detalhes na Figura 13.

Quando há dano tecidual, ou por patógenos ou por isquemia, ocorre a produção de citocinas visando a recuperação deste dano. Porém, uma produção de citocinas não balanceada ou excessiva pode exacerbar a doença. Sinais eferentes do nervo vago, que

são controlados por fibras cerebrais, inibem a produção de citocinas através de uma via dependente de receptores  $\alpha 7nAChR$  em macrófagos e outras células. Estes sinais eferentes do nervo vago também causam alterações importantes na frequência cardíaca. Uma rede colinérgica neurológica que é responsiva a agonistas  $M_1$  pode aumentar a atividade da CAP, assim como alterar a frequência cardíaca. Sinais aferentes através do nervo vago podem ativar uma resposta eferente que inibe a liberação de citocinas, responsável pelo reflexo inflamatório (Figura 10)(194). As enzimas que são capazes de hidrolisar a ACh – AChE e BChE – podem, portanto, coibir a estimulação da CAP (195).

Então, uma possível função fisiológica da BChE seria a modulação do papel anti-inflamatório da acetilcolina (ACh) (196). O receptor  $\alpha 7nAChR$  é encontrado em macrófagos, e os receptores muscarínicos  $m_1AChR$  e  $m_3AChR$ , em monócitos e células T e B (197,198). Foi demonstrado que estas células são capazes de produzir ACh, uma vez que expressam a enzima colina acetil transferase (ChAT) necessária para esta síntese (199).



(adaptado de Tracey (194))

Figura 13: O nervo vago e os seus ramos formam a CAP  
A CAP é capaz de controlar a produção e liberação de várias citocinas

### 1.3.2 O gene *BCHE*

O gene *BCHE* está localizado no cromossomo 3, possui quatro exons e três introns (172,200,201) e sua localização molecular está entre 165.772.904 e 165.837.467 pares de base (202) (Figura 14). O interesse pelo estudo deste gene começou a partir de 1951, quando da introdução da succinilcolina e de seu dietil derivado (suxametônio) como miorrelaxante em alguns procedimentos médicos, especialmente cirúrgicos. A droga produzia imediata e completa paralisia muscular (203) e, ao término do procedimento, a

recuperação era rápida (2 a 6 minutos); porém, alguns pacientes permaneciam em apneia por algumas horas (revisões de Folder et al (204) e de Lockridge (205)). A rápida recuperação é devida à hidrólise da succinilcolina em duas substâncias pouco tóxicas: succinato e colina; esta reação ocorre no plasma e é catalisada pela BChE; portanto, a primeira suspeita foi que estes pacientes de recuperação lenta apresentavam atividade enzimática mais baixa (206). Em 1956, Kalow apresentou a hipótese de uma enzima atípica que teria menor afinidade pela succinilcolina e a hidrolisaria muito mais lentamente (207); mais tarde, Kalow e Genest descreveram um método para a identificação deste fenótipo (208), sendo descrito o alelo atípico.

Atualmente são descritas mais de 70 variantes do gene *BCHE* (Tabela 11); as mais conhecidas são: atípico A (*BCHE*\*70G, SNP rs1799807), K (*BCHE*\*539T – SNP rs1803274), relacionada com a proteção à doença de Alzheimer (209,210), e a -116A (*BCHE*\*-116A, SNP rs1126680), relacionada com a atividade mais baixa da variante K (211–213).

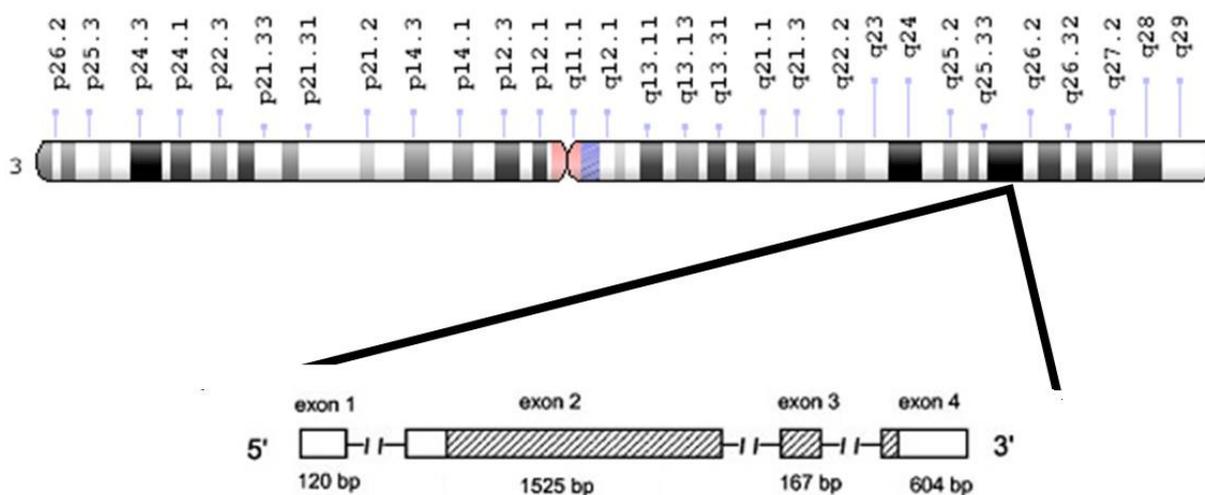


Figura 14: A localização do gene *BCHE* no cromossomo 3 com seus exons e introns. Adaptado de Yen et al (214).

Modificações na atividade enzimática da BChE nem sempre estão relacionadas diretamente com alterações no gene *BCHE*. A arginil aminopeptidase (gene *RNPEP*, 1q32.1) é uma enzima que remove resíduos de arginina da região aminoterminal de proteínas e que parece estar envolvida com modificações pós traducionais da BChE, assim como pela lamelipodina (*RAPH1*, 2q32.2), que tem função na estabilização da estrutura tetramérica da BChE (215). A variante C5+ da BChE humana foi originalmente identificada como uma banda extra da BChE em eletroforese em gel de amido, de poliacrilamida ou de ágar ácido (216,217); a eletroforese de plasma ou soro humano normal em gel mostra

quatro bandas com atividade enzimática: C1, C2, C3 e C4 (218). Alguns indivíduos apresentam uma quinta banda C5 com as mesmas propriedades enzimáticas das outras quatro. Os indivíduos que expressam a banda C5 apresentam atividade enzimática mais elevada (219). Imaginava-se se tratar de um segundo loco da BChE (*CHE2*) (220,221), mas hoje se sabe que esta banda C5 é, na verdade, um fragmento da lamelipodina (gene *RAPH1*, localizado no cromossomo 2) ligado ao tetrâmero da BChE (222).

### 1.3.3 O gene *BCHE* e sua correlação com doenças

A amplificação de genes é um evento observado em células tumorais, podendo ser um dos fatores envolvidos na carcinogenicidade. Em 1997, um estudo em 15 casos de carcinoma escamoso de pulmão mostrou que em 5 pacientes os genes *BCHE* e *SLC2A2* (família 2 de carreadores solúveis) estavam amplificados (223), que também está amplificado em células de adenocarcinoma de pulmão (224). Em pacientes com carcinoma escamoso de boca e de mama (225,226), foi demonstrada atividade enzimática de BChE mais elevada. A maior expressão do gene *BCHE* está associada à menor sobrevida em mulheres com câncer de ovário (227). Por outro lado, a atividade enzimática mais alta está associada à maior sobrevida em pacientes com câncer de próstata tratados com prostactetomia radical (228). No de câncer de estômago, a atividade enzimática pareceu estar mais baixa (229).

A atividade da BChE poderia ser empregada para avaliar o risco de recidiva em pacientes com câncer de próstata e de bexiga após tratamento cirúrgico, sendo um biomarcador sensível, mas não específico. Koie et al (230) mostraram que em pacientes tratados com prostactetomia, a sobrevida no pós-operatório foi significativamente maior entre os que apresentaram atividade enzimática mais elevada. Estes autores observaram que o mesmo ocorria nos pacientes tratados com cistectomia (228). A atividade enzimática menor parece estar correlacionada com um maior risco de metástases (231).

Cerca de 85% das pessoas com hepatite C desenvolvem fibrose hepática, que leva a cirrose e eventualmente ao carcinoma hepatocelular (232). A fibrose hepática parece estar relacionada, em pacientes com a forma crônica da hepatite C, com menor expressão do gene *BCHE*, de modo que a atividade enzimática poderia ser usada para avaliar o risco do desenvolvimento de fibrose hepática e suas potenciais consequências nestes pacientes (233).

A angioplastia coronariana transluminal percutânea é uma importante forma de manejo da cardiopatia isquêmica; uma das limitações desta terapia é a reestenose ou

recorrência, que ocorre em 20% a 40% das obstruções inicialmente dilatadas com sucesso (234). A variante K (rs1803274, alelo A) do *BCHE* está associada a risco aumentado de reestenose, especialmente nos pacientes diabéticos (235).

A presença da variante -116A (rs1126680) parece ter um papel protetor contra a doença de Alzheimer, pois os portadores desta variante apresentam uma atividade enzimática mais baixa, o que poderia contribuir com uma atividade colinérgica maior no cérebro destes indivíduos (209). As variantes -116A (rs1126680) e K (rs1803274) também parecem desempenhar papel protetor contra a obesidade em adolescentes. Chaves et al (212), em um estudo com 270 adolescentes (120 obesos), observaram que as frequências das variantes foram estatisticamente menores no grupo de obesos em comparação ao grupo de não obesos. O mesmo grupo de pesquisa, em estudo com 115 indivíduos adultos (sendo 27 obesos, IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), observou que as frequências da variante -116A não foram diferentes nos grupos de obesos e não obesos, por outro lado, o alelo 1914G (rs3495) foi encontrado com frequência maior no grupo de obesos, podendo estar relacionado com a suscetibilidade à obesidade em adultos (236).

Negrão et al (90), em estudo com uma amostra de 698 pacientes dependentes de cocaína de acordo com a décima revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) e 738 doadores de sangue como grupo controle, demonstraram que a variante K (rs1803274) estava associada com a dependência à cocaína entre os usuários da droga na forma de craque (exposição por via respiratória), mas não naqueles usuários que preferiam a via mucosa (cocaína na forma de cloridrato).

O vitiligo é uma doença em que a BChE parece estar envolvida. Trata-se de uma doença cutânea adquirida, idiopática, caracterizada por máculas branco-nacaradas de diferentes tamanhos e formas, atinge entre 0,5% a 2% da população mundial e está relacionada com diversas doenças autoimunes, tais como tireoidites, anemia perniciosa, doença de Addison, *diabetes melitus*, esclerodermia localizada, *miastenia gravis* e pênfigo vulgar. Muitos pacientes apresentam auto-anticorpos contra melanócitos (revisado em (237)). Portanto, a etiologia do vitiligo parece ser uma combinação de fatores ambientais, genéticos e imunológicos, que ao interagirem-se promovem a destruição, por um mecanismo autoimune, dos melanócitos (238,239).

A atividade da BChE na pele, tanto pigmentada como não pigmentada de pacientes com vitiligo, é mais baixa quando comparada com a medida na pele de pessoas sem a doença (240,241), e se observa na pele dos doentes maior concentração de acetilcolina (242), portanto a enzima realmente pode estar relacionada com esta doença.

Um estudo de nosso grupo de pesquisa (243), através de análise de associação baseada em famílias, testou 10 SNPs intragênicos do gene *BCHE* para associação com o vitiligo, quatro deles mostraram-se associados: os alelos “C” do rs1355535; “T” do rs4680607 e “A” do rs2668209, com a suscetibilidade, enquanto que o alelo “A” do rs1803274 com a proteção à doença. O SNP rs2668209 está em desequilíbrio de ligação moderada com os SNPs rs4680607 ( $r^2 = 0,54$ ) e rs1803274 ( $r^2 = 0,50$ ), então qualquer um dos SNPs em desequilíbrio de ligação podem explicar a associação observada com o vitiligo. Este mesmo estudo demonstrou que os referidos alelos dos SNPs rs1355538 e rs1803274 estão relacionados com co-morbidades autoimunes e a forma clínica não segmentar, ao se replicar estes achados em uma análise de associação do tipo caso-controle, foi observada associação entre o rs1803274 e a doença com o alelo “A” exercendo efeito de proteção.

Em 2002, Suneetha et al (244) coletaram o nervo tibial afetado pela hanseníase de 12 pacientes - cujo diagnóstico foi realizado entre 10 a 12 anos antes - que sofreram amputação de membro inferior devido a carcinoma de célula escamosa no pé; e o nervo não afetado pela doença de 6 pacientes que também foram amputados por causa de carcinoma osteogênico não metastático. Mediram a atividade tanto da AChE como da BChE e observaram que a atividade média da AChE nos nervos afetados e não afetados não foi estatisticamente diferente; mas a da BChE nos nervos afetados e normais foram, respectivamente, de  $17,25 \text{ U/mg} \pm 7,37 \text{ U/mg}$  e  $8,35 \text{ U/mg} \pm 6,25 \text{ U/mg}$  ( $P = 0,0159$ ). Também foi feita análise microscópica dos nervos lesionados e observaram neuropatia com extensa desmielinização e dano axonal. Estes pesquisadores não foram capazes de determinar a exata função da BChE neste processo patológico ou se teria relação com a suscetibilidade ao dano neurológico. Em um estudo posterior, eles mediram a atividade enzimática em 29 pacientes hansenianos e 24 controles normais e em 26 pacientes infectados pelo HIV, e observaram que tanto os doentes como os soropositivos apresentaram atividade enzimática média menor que a do grupo controle (porém não estatisticamente significativa)(245).

Corroborando a existência da CAP, há estudos demonstrando que em doenças autoimunes, como a esclerose múltipla, em especial naqueles pacientes com a forma recidivante na qual o processo inflamatório é mais acentuado, a atividade enzimática das esterases (AChE e BChE) é mais elevada do que em pessoas saudáveis (246,247). Paradoxalmente, a atividade enzimática parece estar diminuída na artrite reumatoide (248).

Em 2017, Sykam et al (249), trabalhando com 88 pacientes hansenianos com neuropatia periférica (52 considerados multibacilares e 26 paucibacilares) e outros 84 pacientes com neuropatia por outras etiologias e um grupo controle formado por 113 indivíduos saudáveis, perceberam que a atividade enzimática estava mais elevada nos pacientes com a forma multibacilar, tanto em relação ao grupo controle como aos doentes paucibacilares, e não foi encontrada diferença na atividade dos doentes paucibacilares e do grupo controle. Estes pesquisadores conjecturaram se a atividade mais elevada da BChE estaria hidrolisando mais rapidamente a ACh afetando a sua função regulatória do processo inflamatório, o que poderia estar aumentando o dano neurológico, e desta forma demonstrando uma possível associação entre a atividade enzimática e a suscetibilidade ao desenvolvimento de complicações neurológicas pelos hansenianos.

Durante a inseminação intrauterina pode ocorrer o desenvolvimento de reação inflamatória, e a intensidade da inflamação é inversamente proporcional ao sucesso do procedimento. A atividade das esterases AChE e BChE mais elevadas estão relacionadas com uma menor chance de gravidez após a inseminação intrauterina por conta do risco aumentado de inflamação (250).

A presença de anticorpos anti-ceramida (ANTI-CER) (glicoesfingolípídeo encontrado na bainha de mielina) está relacionada com o desenvolvimento de neuropatias periféricas; Sykam et al. (249) observaram que tanto a atividade da BChE como os níveis de ANTI-CER eram mais elevados nos pacientes com este problema, especialmente nos pacientes com a forma multibacilar da hanseníase ou com neuropatia diabética. A atividade da BChE está mais elevada em outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (209,251); nesta doença em particular ocorre déficit de ACh em decorrência da perda de neurônios colinérgicos, e a inibição das esterases, tanto a AChE como a BChE, é uma terapia normalmente instituída nestes casos (252).

A terapia de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares, entre elas aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca, além do *diabetes melitus*, câncer, doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson (253), e até mesmo algumas doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia, poderá ser feita com o emprego de fármacos inibidores de esterases, com efeito sobre a AChE e a BChE, promovendo desta forma efeito anti-inflamatório (254,255). Isso ocorre com a rivastigmina e do bambuterol e seus análogos (256), que inibem tanto a AChE como a BChE (257). Na doença de Parkinson a inibição da atividade das enzimas AChE e BChE é mais importante nos pacientes com demência, porque nesses as atividades enzimáticas estão mais

elevadas (253). Por outro lado, há situações em que a atividade enzimática se encontra diminuída, como demonstrado por Sicinska et al (258) em pacientes com doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOCs).

#### 1.3.4 Associação do gene *BCHE* com a hanseníase

Desde 1968, quando Varkey observou que em hansenianos a frequência de apneia prolongada induzida pela succinilcolina era maior que em pessoas normais (observação citada por Thomas et al (259), se tem especulado se a BChE estaria associada com a suscetibilidade à hanseníase.

Em 1972, Thomas e Job (260), em estudo com 390 hansenianos e 343 controles saudáveis recrutados em Karigiri e arredores (sul da Índia), ao usar um método de triagem para identificação do fenótipo atípico (261), obtiveram uma frequência muito maior do variante *BCHE*\*A no grupo de doentes em relação ao grupo controle (0,3436 e 0,0233, respectivamente,  $P < 0,0001$ ). Logo após a publicação deste trabalho, Smith (262) questionou estes resultados ao chamar a atenção para o fato de que a distribuição dos aparentes homozigotos e heterozigotos não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que poderia sugerir seleção, aparentemente em favor do heterozigoto, além disso, ele comentou que outras variantes da BChE poderiam estar presentes e teriam sido classificados erroneamente como *BCHE*\*A.

Thomas, Job e Kurian (259), em 1976, agora com amostra maior de hansenianos da mesma região do estudo de 1972, 721 doentes (720 controles), usando o mesmo método de fenotipagem, encontraram uma frequência do variante *BCHE*\*A no grupo de doentes de 0,2434 e no grupo controle de 0,0139 ( $P < 0,0001$ ). Não ficou muito claro se se tratavam de grupos caso e controle novos ou se apenas houve incremento na amostra do estudo anterior. De qualquer modo, a frequência do *BCHE*\*A nesta segunda amostra foi menor que a observada na primeira ( $P = 0,0084$ ) e muito acima da observada em populações não doentes, 0,017 (263) ( $P < 0,0001$ ), que foi igual a do grupo controle ( $P = 0,5357$ ).

Em hansenianos residentes no Leprosário Dr. Pedro López, nas cercanias da Cidade do México, Navarrete et al (264) observaram frequência estatisticamente maior ( $P = 0,0014$ ) do variante *BCHE*\*A (0,1000) em um grupo de 115 doentes do que em um grupo de 133 pessoas saudáveis (0,0263). Uma limitação deste estudo foi a idade média maior dos doentes (em torno de 55 anos) que a do grupo controle (35 anos). Navarrete e seus colegas não atentaram para o fato de que o risco de desenvolvimento da hanseníase aumenta com

a idade, ou seja, as pessoas saudáveis que fizeram parte do grupo controle naquele momento, em futuro próximo poderiam estar doentes.

Em Harar, na Etiópia, Agarwal et al (265), em amostra constituída de 206 hansenianos e de 150 parentes comunicantes não doentes, ao usar o método de Kalow e Genest (208), não encontraram associação entre o variante *BCHE*\*A e a suscetibilidade à hanseníase, uma vez que as frequências observadas nos grupos de doentes e controle foram, respectivamente, 0,0194 e 0,0300 ( $P = 0,6944$ ). Considerando a amostra deste trabalho, o desenho de estudo não pareceu ser o mais adequado, comprometendo o resultado encontrado.

O método de fenotipagem proposto por Kalow e Genest (208), que empregava a dibucaína, inibidor seletivo da BChE, foi um dos mais usados; quando ocorria inibição maior que 70%, o fenótipo era dito usual (genótipo *BCHE*\*UU), se menor que 40, o fenótipo era atípico (genótipo *BCHE*\*AA), e se entre 40% e 70%, era heterozigoto (genótipo *BCHE*\*UA). Outros inibidores enzimáticos também foram capazes de diferenciar os fenótipos usual e atípico, como o brometo de (2-hidróxi-5-fenilbenzil)trimetilamônio) um composto carbamato identificado como Ro 2-0683 (266), o beta bloqueador propranolol (267), ou ainda a diferença do comportamento enzimático quando se media a atividade na presença de um de dois tampões, tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) 0,1 M ou fosfato (0,2 M), em pH 7,4, quando a atividade era medida em tampão tris apenas a enzima atípica era inibida (268). Harris e Whittaker (269) reconheceram outro fenótipo: o resistente ao fluoreto (*BCHE*\*F) ao usarem fluoreto de sódio como inibidor enzimático, que inibia somente a enzima usual.

Em 1976, Whittaker et al (270), em 580 hansenianos, residentes em Salisbury (Zimbabwe) em sua maioria (500 pacientes) ou recrutados em clínicas nos arredores da cidade; de diversas origens, Zimbabwe (59,65%), Moçambique (20,86%), Malawi (15,34%) e Zambia (4,15%), e 1034 controles saudáveis (não ficou claro onde o grupo foi recrutado e como ele foi construído), foram usados dois métodos de fenotipagem, o de Kalow e Genest (208), para a detecção do fenótipo atípico, e o de Harris e Whittaker (269), para detectar o fenótipo resistente ao fluoreto. Neste trabalho, não foram identificados indivíduos portadores do variante *BCHE*\*A, mas foi encontrada maior frequência do variante *BCHE*\*F na amostra controle do que na de doentes (0,0561 e 0,0302, respectivamente;  $P = 0,0008$ ). Com o desenvolvimento da biologia molecular, o variante fenotípico atípico é reconhecido hoje como *BCHE*\*70G e o antigo *BCHE*\*F é, na verdade, um de dois variantes moleculares,

*BCHE*\*243M ou *BCHE*\*390V (271), então um destes últimos poderia estar produzindo o papel protetor observado.

Os resultados conflitantes dos estudos de fenotipagem do papel da BChE na suscetibilidade à hanseníase merecem uma investigação mais acurada, o que foi feito por Gomes et al (148) em 2012, que através de um estudo de associação do tipo caso-controle procuraram verificar se o gene *BCHE* está ou não relacionado com a suscetibilidade à hanseníase. Eles usaram uma amostra composta por 167 indivíduos, não aparentados, com hanseníase (dos quais 116 com a forma multibacilar) e um grupo controle composto por 150 indivíduos não doentes, expostos ao *M leprae*, todos recrutados no Estado do Paraná. A maioria dos indivíduos nestes dois grupos é caucasóide (76,3% e 68,0%, respectivamente). Os pesquisadores fizeram a cobertura completa do gene, e genotiparam três SNPs intragênicos: rs1126680, rs1799807 e rs1803274 e três extragênicos: rs2863381 e rs4440084 (upstream) e rs4387996 (downstream). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípica ( $P = 0,014$ ) e alélica ( $P = 0,015$ ) no SNP rs1799807, sítio da variante *BCHE*\*70G (o antigo *BCHE*\*A ou fenótipo "atípico"), as frequências do heterozigoto AG nos grupos de doentes e de controles foram 0,0788 e 0,0133, respectivamente, não foram encontrados homozigotos GG, e a frequência do alelo G nestas duas subpopulações foi 0,0394 e 0,0067, respectivamente. Os autores sugerem que esta variante é importante no início da infecção que resulta na hanseníase *per se*, este alelo codifica uma enzima menos eficiente na hidrólise da acetilcolina, o que afetaria o papel da acetilcolina no processo inflamatório; sendo a enzima menos efetiva haveria maior concentração do neurotransmissor e, portanto, um efeito anti-inflamatório maior (193,272,273). Este achado ainda não foi replicado ou validado em estudo independente.

Tabela 11: Os variantes do gene *BCHE*.

Localização <sup>1</sup>	Mutação	Nome Atual	Nome Trivial <sup>2</sup>	Localização <sup>1</sup>	Mutação	Nome Atual	Nome Trivial <sup>2</sup>
<b>Exon 1</b>							
9-11	CATCAT → CAT	14del		596	GCA → GTA	A199V	Silencioso
16	ATT → TT	16fs		601	GCA → ACA	A201T	Silencioso
71	ACG → ATG	T24M	Silencioso	607	TCA → CCA	S203P	Silencioso
82	TTT → ATT	F28I	Silencioso	728	ACG → ATG	T243M	F-1
98	TAT → TGT	Y33C	Silencioso	748	ACT → CCT	T250P	Silencioso
109	CCT → TCT	P37S	Silencioso	765	GAG → GAC	E255D	Neutra
208	GAT → CAT	D70H	Atípico	800	AAA → AGA	K267R	Silencioso
209	GAT → GGT	D70G*	Atípico	811	GAA → TAA	E271X	Silencioso
223	GGC → CGC	G75R	Neutra	943	ACC → AACC	T315fs	Silencioso
270	GAA → GAC	E90D	Silencioso	943	ACC → TCC	T315S	Silencioso
286	AAT → TAT	N96Y	Silencioso	988	TTA → ATA	L330I	F-Japão
297	ATT → ATG	I99M	Neutra	1062-1076		K355insALU	
298	CCA → TCA	P100S		1093	GGA → CGA	G365R	Silencioso
318	AAT → AAAT	N106fs	Silencioso	1156	CGT → TGT	R386C	Silencioso
344	GGT → GAT	G115D	Silencioso	1169	GGT → GTT	G390V	F-2
351	GGT → GGAG	G117fs	Silencioso	1200	TGC → TGA	C400X	Silencioso
355	CAA → TAA	Q119X	Silencioso	1253	TTC → TCC	F418S	Silencioso
375	TTA → TTT	L125F	Silencioso	1270	CGA → TGA	R424X	Silencioso
383	TAT → TGT	Y128C	Silencioso	1273	TCC → CCC	S425P	Silencioso
424	GTG → ATG	V142M	Variante H	1303	GGA → AGA	G435R	
486	GCT → GCC	A162A	Neutra	1336	TTT → GTT	F446V	Silencioso
510	GAT → GAG	D170E	Silencioso	1351	GAA → TAA	E451X	Silencioso
514	CAG → TAG	Q172X	Silencioso	1378	GAG → AAG	E460K	
551	GCC → GTC	A184V	New York	1393	AGA → TGA	R465X	Silencioso
592	AGT → GGT	S198G	Silencioso	1411	TGG → CGG	W471R	Silencioso
<b>Intron 2</b>							
	IVS2-8T→G						
<b>Exon 3</b>							
1490	GAA → GTA	E497V		1543	CGT → TGT	R515C	Silencioso
1500	TAT → TAA	Y500X	Silencioso	1553	CAA → CTA	Q518L	Silencioso
<b>Exon 4</b>							
1615	GCA → ACA	A539T*	K	1914	A → G		

<sup>1</sup>Exon ou intron e nucleotídeo; <sup>2</sup>variantes silenciosos: atividade enzimática igual a zero ou muito próximo de zero. Adaptado de Souza et al (274) e Lockridge (175).

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Estudos anteriores têm mostrado que a hanseníase é uma doença de etiologia complexa cuja patogênese depende de fatores genéticos e não genéticos. Um dos genes que parece estar envolvido no controle da suscetibilidade à hanseníase é o *BCHE*, como demonstrado por uma pesquisa realizada em uma amostra recrutada no Estado do Paraná: uma estratégia de análise de associação caso-controle mostrou que o alelo *BCHE\*70G* está associado com aumento da suscetibilidade à hanseníase naquela amostra. Nossa hipótese é que o sinal de associação observado em amostra populacional do sul do Brasil está presente em outras regiões do país, não estando, portanto, restrito a um determinado grupo étnico. Além disso, é necessária a validação do achado original em estudo independente e de desenho distinto a fim de consolidar o gene *BCHE* como um novo candidato a participar do controle da suscetibilidade do hospedeiro à hanseníase.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta pesquisa é avançar na investigação do papel das variantes do gene *BCHE* no controle da suscetibilidade à hanseníase.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Genotipar os marcadores rs1799807, rs1355538, rs1803274 e rs1126680 do gene *BCHE* em uma amostra populacional baseada em famílias recrutadas na Colônia de Santo Antônio do Prata, Estado do Pará;
2. Testar os alelos dos marcadores genotipados para associação com suscetibilidade à hanseníase na amostra populacional estudada;
3. Investigar o impacto das variáveis não genéticas idade e sexo sobre eventuais efeitos de associação genética observados
4. Investigar o impacto das variáveis não genéticas idade e sexo no controle da susceptibilidade à hanseníase *per se* ou nas suas formas clínicas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostra populacional investigada neste estudo é formada por uma coleção de famílias simplex e multiplex (mais de um indivíduo afetado) multigeracionais, compostas por indivíduos hansenianos e seus parentes, recrutados na Colônia do Santo Antônio do Prata, Pará. Estas famílias foram recrutadas em um contexto de projeto maior, denominado “Estudo de Fatores de Risco Genéticos de Suscetibilidade à Hanseníase”, amplamente financiado e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e no Comitê de Ética em Pesquisa (“Ethics Research Committee” - ERC) da OMS.

A Colônia do Prata é uma antiga colônia de hansenianos, hoje com pouco mais de 3.500 habitantes, localizada no município de Igarapé-Açú, a 150 km de Belém, Pará. As características de isolamento, homogeneidade de variáveis ambientais e alta prevalência da hanseníase na Colônia fazem desta população uma oportunidade única para estudos genéticos-epidemiológicos em vários níveis. Uma parceria com o Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (UFPA) já resultou no recrutamento e caracterização clínica/epidemiológica detalhada de toda a população da Colônia, e na identificação de 257 (12,82%) indivíduos com histórico de hanseníase ou doença ativa. Todas as formas clínicas estavam presentes: forma lepromatosa (40,47%), tuberculóide (20,62%), borderline (20,62%) e indeterminada (18,29%). A idade média do diagnóstico foi 27,2 anos. Destes, 187 indivíduos entre afetados e não afetados, distribuídos em 71 trios (55 independentes), já haviam tido seu DNA coletado, extraído e armazenado para ser utilizado em estudos de associação baseado em famílias (275). A amostra analisada neste estudo é constituída por 219 indivíduos que formam 64 pedigrees. A descrição detalhada da amostra é encontrada na tabela 12.

### 4.2 DEFINIÇÃO DOS MARCADORES

Os marcadores do tipo SNP do gene *BCHE* selecionados para este estudo foram:

- rs1799807, previamente associado com hanseníase em amostra populacional caso-controle (148);
- rs1355538 e rs1803274, previamente associados com suscetibilidade e proteção ao vitiligo (respec.) (243);

- rs1126680, referente à variante -116A, que foi incluído porque quando estiver junto com a variante 539T (rs1803274) a atividade enzimática é mais baixa (211–213)

Tabela 12: Características da amostra analisada

<b>Característica</b>	<b>N*</b>	<b>%</b>
<b>Etnia</b>		
Eurobrasileira	22	10,23
Parda	162	75,35
Negra	31	14,42
Total	215	
<b>Sexo</b>		
Masculino	106	48,40
Feminino	113	51,60
Total	219	
<b>Idade (anos)</b>		
$\bar{x} \pm d.p.$	36,85 $\pm$ 19,19	
<b>Faixa Etária</b>		
2 a 19	49	24,14
20 a 39	57	28,08
40 a 59	72	35,47
60 ou mais	25	12,31
Total	203	
<b>Status quanto a hanseníase per se</b>		
Afetado	142	64,84
Não afetado	77	35,16
Total	219	
<b>Forma Clínica (OMS)</b>		
Paucibacilar	72	74,23
Multibacilar	55	25,77
Total	97	

\*O número total de indivíduos varia porque falta informação para alguns indivíduos a respeito de etnia, idade e forma clínica

### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM

O DNA dos indivíduos recrutados foi obtido a partir de 5 ml de sangue periférico coletado com EDTA como anticoagulante. A amostra foi centrifugada e a camada leucocitária foi utilizada para extração de DNA por salting out (276). O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria conforme implementado no equipamento nanodrop, e em seguida diluído a uma concentração de 20 ng/ $\mu$ l.

As genotipagens utilizando o sistema de discriminação alélica ABI TaqMan plataforma 7500® de PCR em tempo real foram realizadas no Laboratório Experimental Multiusuário do PPGCS – PUCPR.

O sistema TaqMan de discriminação alélica é um ensaio no qual as variantes genômicas são detectadas através de uma PCR *multiplex*, que combina a amplificação e detecção do segmento polimórfico em um único passo. Isso ocorre devido à presença, na reação, de: (I) um par de oligonucleotídeos sonda, específicos para cada variante alélica,

marcados com um fluoróforo diferente (normalmente VIC™ e FAM™) e (II) um *quencher* que captura a fluorescência do fluoróforo que está próximo fisicamente. Quando ocorre hibridização sonda/amplicon, a atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase leva à clivagem da sonda e liberação do fluoróforo, o qual emite fluorescência no comprimento de onda específico, que é detectado com a ajuda de um conjunto de filtros. Os dados da intensidade de fluorescência são acumulados a cada ciclo da reação de PCR e só podem ser obtidos no final do processo, considerado como *end-point*.

As reações foram realizadas em termociclador modelo *ABI Prism 7500* (Applied Biosystems) em um volume final de 5 µL contendo 20 ng de DNA genômico, reagente Assay 40X contendo oligonucleotídeos iniciadores e sondas marcadas com os fluoróforos VIC™ e FAM™ alelo específico em concentrações ideais e TaqMan *Genotyping PCR Master Mix*, o qual contém Gold Taq Polimerase com atividade de 5' DNase, dNTP's e tampão a base MgCl<sub>2</sub>. Todos os reagentes foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems).

O ensaio de discriminação alélica envolve as seguintes etapas:

- 1) Pré-leitura: as reações foram submetidas a uma pré-leitura a 60°C por 1 minuto, a fim de detectar o *background* da fluorescência associada com os oligonucleotídeos iniciadores e sondas antes da amplificação.
- 2) Reação de amplificação: consistia em uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos para inativação da enzima AmpErase® (uracil N-glicosilase) e 95°C durante 10 minutos para a desnaturação inicial. Em seguida, as amostras foram submetidas a 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto, durante o qual ocorre a hibridização dos oligonucleotídeos e a extensão dos fragmentos.
- 3) Pós-leitura: as reações são submetidas a uma pós-leitura a 60°C por 1 minuto, a fim de subtrair o *background* coletado na pré-leitura do valor final obtido na pós-leitura.
- 4) Interpretação dos resultados: nos indivíduos homozigotos, ocorre à hibridização com uma das sondas alelo-específica VIC™ ou FAM™, sendo somente detectada a fluorescência no comprimento de onda de um dos fluoróforos, dependendo para qual alelo o indivíduo é homozigoto. Nos indivíduos heterozigotos, ocorre à hibridização com ambas as sondas aleloespecíficas VIC™ e FAM™, e as sondas apresentam intensidade de fluorescência

equivalentes para os alelos, sendo detectadas em ambos os comprimentos de onda dos fluoróforos em questão.

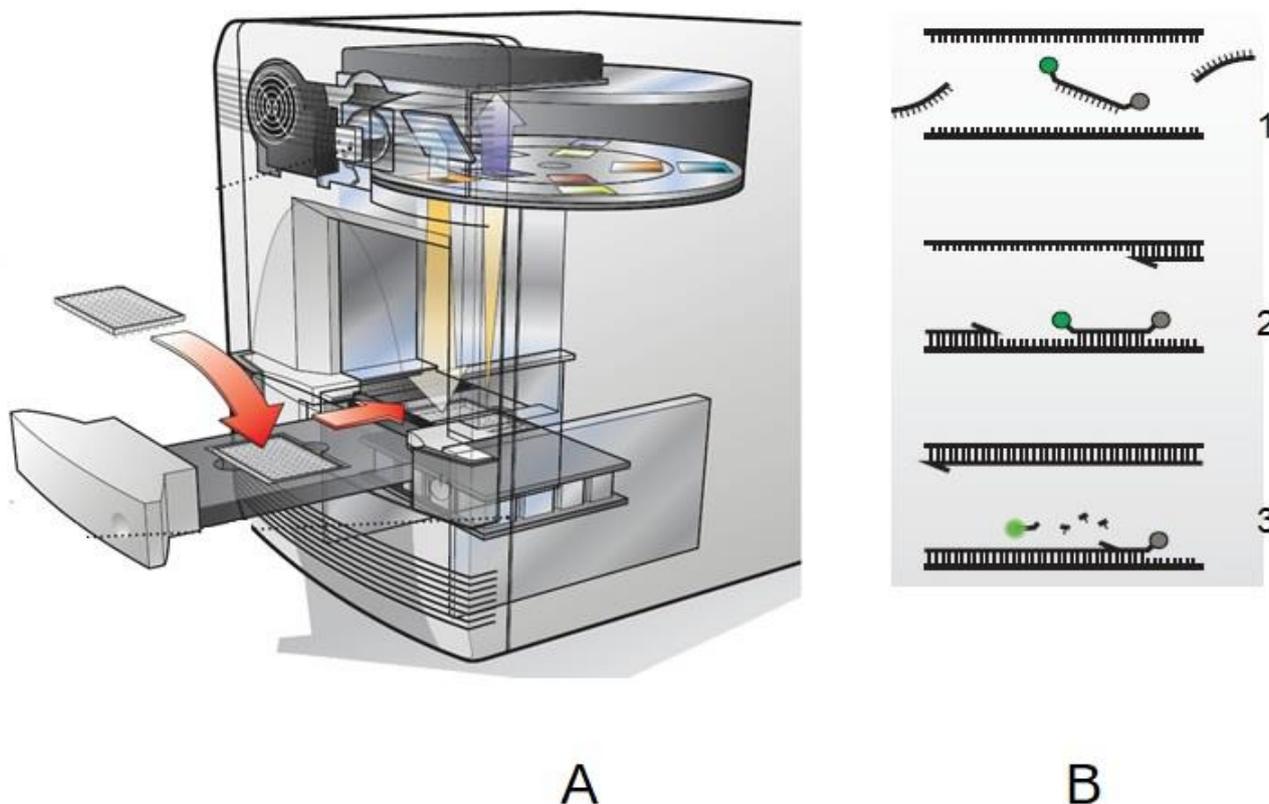


Figura 15: Anatomia do equipamento ABI Prism e princípio do PCR em tempo real  
 A: O equipamento é relativamente simples, um termocilcador; uma lâmpada de halogênio cuja luz passa primeiro por um sistema de filtros antes de excitar o fluoróforo e um detector de fluorescência, este está conectado ao registrador em um computador. B: O oligonucleotídeo sonda, específico para um dos alelos marcado com um fluoróforo (em verde na figura) e próximo a ele há um quencher (em cinza) que captura a fluorescência emitida pelo fluoróforo. Quando ocorre a hibridização a Taq DNA polimerase promove a clivagem da sonda e liberação do fluoróforo, cuja fluorescência é detectada pelo equipamento. Figuras adaptadas de Maher (277)

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inicialmente inseridos em uma planilha Microsoft Excel® para posteriores tratamentos estatísticos. Para se verificar se as frequências alélicas dos SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg o teste foi realizado utilizando o software BioEstat 5.3 (278). A estimativa do desequilíbrio de ligação foi realizada através da determinação do  $r^2$  entre os marcadores testados usando-se o software Haploview (279). Análise de associação genética baseada em famílias entre os marcadores testados e suscetibilidade ou proteção à hanseníase foi realizada através do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) usando o software FBAT (280). Alternativamente, análise de associação

foi realizada criando-se uma amostra controle virtual através do software *Pseudo-Sibs*, com base nas combinações genóticas possíveis observadas para os indivíduos afetados (281,282). Considere o exemplo demonstrado na figura 16, um trio, pai, mãe não afetados e um filho doente. Os pais e o filho são heterozigotos (TC), os pseudosibs apresentam os demais genótipos possíveis (TT, CT e CC) os quais farão parte de um grupo controle virtual.

Para a avaliação da associação entre variáveis qualitativas foram empregados ou o teste  $\chi^2$  ou exato de Fisher, dependendo das características dos dados. Para a análise comparativa de variáveis quantitativas em dois grupos independentes foram usados o teste t de Student ou de Mann-Whitney, dependendo se a distribuição nestes grupos era ou não normal. Estas análises estatísticas foram realizadas usando os softwares SAS University Edition (283) e BioEstat 5.3 (278). Ao se analisar a possível relação entre a idade e a forma clínica (paucibacilar ou multibacilar), verificou-se inicialmente se a distribuição da idade seguia distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. De acordo com esta primeira avaliação foi usado ou o teste paramétrico t de Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney utilizando o software SAS University Edition (283).

A influência dos fatores não genéticos idade e sexo sobre a susceptibilidade para uma das formas clínicas, paucibacilar ou multibacilar, também foi avaliada através de um teste de regressão logística stepwise, estratégia que, além de verificar a influência destes fatores, permite estimar o “odds ratio” (OR) e seu intervalo de confiança (IC), utilizando o software já citado SAS University Edition.

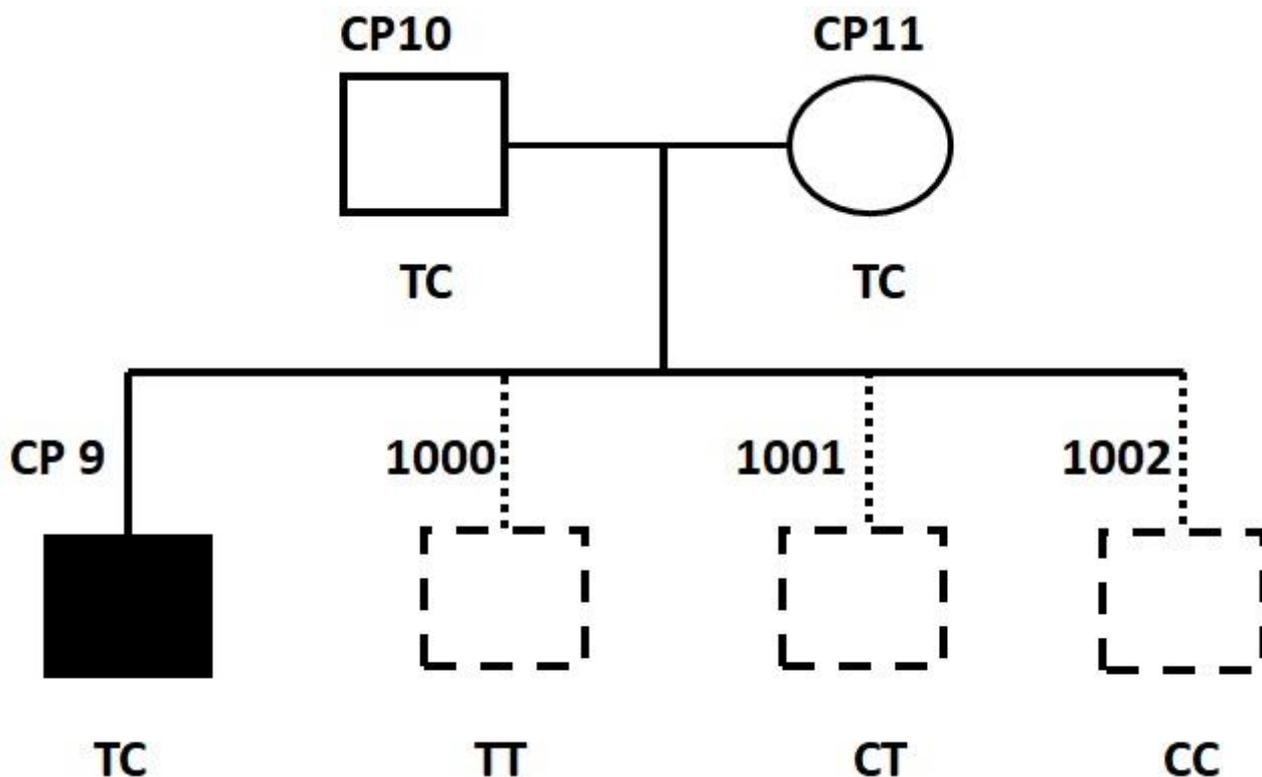


Figura 16: Forma de criação dos *pseudo-sibs* demonstrado por um exemplo real da amostra analisada

CP9 é o indivíduo afetado, CP10 e CP11 são seus pais, 1000, 1001 e 1002 são os pseudo-sibs criados a partir do genótipo dos pais. Os genótipos estão indicados logo abaixo de cada um dos indivíduos representados no pedigree, note que os genótipos dos pseudo-sibs são diferentes do genótipo do afetado. O marcador usado neste exemplo é o SNP rs1355538

## 5 RESULTADOS

Todos os marcadores testados estavam com suas frequências em equilíbrio de Hardy Weinberg. A taxa de sucesso da genotipagem dos SNPs testados foi de 94,06%; 97,72% e 90,41%, respectivamente para os SNPs rs1126680, rs1799807 e rs1803274. Por razões técnicas, próximo de 25% dos indivíduos da amostra não foram testados para o SNP rs1355538, a taxa de sucesso para este SNP foi de 85,18%. A análise de desequilíbrio de ligação (DL) incluindo todos os SNPs testados para este gene revelou que todos são tags independentes, segundo o critério  $r^2 < 0,8$ , conforme demonstrado na figura 17. Há um pequeno grau de DL entre dois marcadores, o rs1803274 apresentou um DL de  $r^2 = 0,30$  com o rs1126680. Os SNPs rs1126680 e rs1799807 não tiveram número suficiente de famílias informativas e foram excluídos da análise. Não houve evidência de associação entre hanseníase *per se* e os dois marcadores informativos testados (Tabela 13). Análise de associação utilizando a técnica do *pseudo-sibs* confirmou a ausência de sinal positivo na amostra analisada (tabela 14).

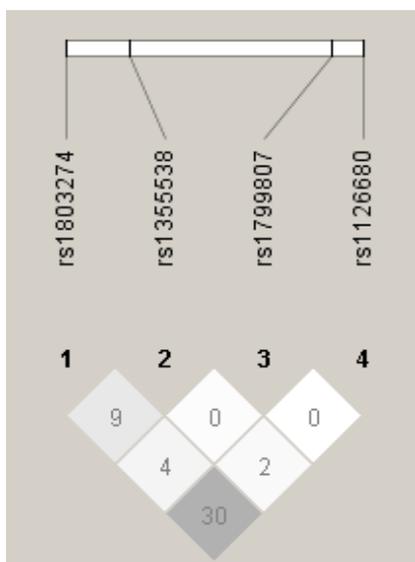


Figura 17: Análise de DL entre os SNPs do gene *BCHE*.

Os números no interior dos losangos indicam a proporção de DL em %, calculado usando o parâmetro  $r^2$ . O código de cores reflete a intensidade do DL entre dois loci: quanto mais escuro for o losango, maior o DL entre os SNPs.

Tabela 13: Estudo de associação entre a hanseníase *per se* e dois SNPs com número suficiente de famílias informativas do gene *BCHE* na amostra analisada.

Marcador	Modelo	Alelo	fam <sup>a</sup>	nfi <sup>b</sup>	Z <sup>c</sup>	FBAT (P) <sup>d</sup>
rs1355538	Aditivo	C	0,411	33	0,140	0,8886
	Recessivo			16	- 0,246	0,8055
rs1803274	Aditivo	G	0,105	13	0,000	1,0000
	Recessivo			13	0,000	1,0000

<sup>a</sup>Frequência alélica mínima; <sup>b</sup>número de famílias informativas; <sup>c</sup>escore Z, <sup>d</sup>teste de associação baseado em famílias, <sup>e</sup>valor de P; os outros dois SNPs (rs1126680 e rs1799807) não tiveram número de famílias informativas suficientes

Uma análise de regressão logística *stepwise* progressiva, em que a variável dependente foi a forma clínica (Tabela 15) e as variáveis independentes foram idade, sexo e os marcadores rs1126680, rs1355538 e rs1803274, demonstrou que um importante fator de risco para a forma clínica multibacilar foi a idade.

Tabela 14: Regressão logística *stepwise* progressiva mostra que a idade é um importante fator de risco para a forma multibacilar,

Variável Independente	E ± EP	Wald	GL	P	OR <sup>1</sup> (IC <sup>2</sup> 95%)
Idade	0,10 ± 0,04	5,00	1	0,0254	1,11 (1,01 – 1,21)
Intercepto	-2,74 ± 0,96	8,12	1	0,0044	-

<sup>1</sup>Odds ratio; <sup>2</sup>Intervalo de Confiança; a forma clínica é a variável dependente e idade, sexo e os marcadores rs1126680, rs1355538 e rs1803274 são as variáveis independentes

## 5.1 VARIÁVEIS NÃO GENÉTICAS

### 5.1.1 Idade

Neste estudo a amostra é composta por famílias, nas quais existem pais e filhos. Considerando o desenho do estudo, as análises a seguir, quando não houver indicação, foram realizadas no grupo de filhos.

Em 86 indivíduos com informação da idade, a média foi de 20,08 anos ± 10,86 anos, amplitude de 44 anos, o mais jovem com 2 anos de idade e o mais velho com 46 anos. Considerando os doentes, a média etária observada foi 20,06 anos ± 10,91 anos (81 indivíduos, amplitude de 44 anos, o mais jovem com 2 e o mais idoso com 46 anos); os não afetados (N = 5) não apresentaram idade média diferente, 20,40 anos ± 10,53 anos (22 anos, 8 a 30 anos) (P = 0,9462). Quando se estratifica a amostra de acordo com a faixa etária, se verifica que entre os afetados predominam os que têm menos de 19 anos de idade (56,79%) e entre os não afetados, 60% têm entre 20 a 39 anos de idade (P = 0,0103; tabela 16).

Ao considerar a subamostra composta pelos pais, a idade média foi de 49,17 anos  $\pm$  13,92 anos (117 indivíduos, 18 a 86 anos), neste grupo existem 59 pessoas afetadas e 58 não afetadas, a idade média das não afetadas (46,24 anos  $\pm$  14,34 anos) foi menor que a das afetadas (52,05  $\pm$  14,34 anos;  $P = 0,0233$ ).

Tabela 15: Estratificação da amostra de acordo com a faixa etária em afetados e não afetados

Faixa Etária	Afetados		Não Afetados		Total	
	N	%	N	%	N	%
Até 19 anos	46	56,79	2	40	48	55,81
De 20 a 39 anos	28	34,57	3	60	31	36,05
De 40 a 59 anos	7	8,64	0	0	7	8,14
Total	81		5		86	

Foi analisada a relação entre a idade e a forma clínica: os pacientes com a forma paucibacilar (44 indivíduos) apresentam idade média de 16,70 anos  $\pm$  9,27 anos (2 a 44 anos), e com a forma multibacilar (23 indivíduos), 19,87 anos  $\pm$  5,14 anos (10 a 28 anos), estas médias são estatisticamente diferentes ( $P = 0,0308$ ). Há diferença no número de indivíduos porque falta a informação da forma clínica para alguns pacientes.

Na subamostra constituída pelos pais há 24 pessoas que foram diagnosticadas com a forma paucibacilar (47,75 anos  $\pm$  12,27 anos, 25 a 76 anos) e com a forma multibacilar há 28 pessoas (53,93  $\pm$  12,71 anos, 28 a 81 anos), estas médias não foram estatisticamente diferentes ( $P = 0,0818$ ).

A idade de diagnóstico foi outra variável que foi considerada, entre os 60 indivíduos em que consta esta informação, a média foi de 14,95 anos  $\pm$  8,94 anos (2 a 45 anos). Na subamostra de paucibacilares, em 42 indivíduos a média foi de 14,88 anos  $\pm$  8,95 anos (2 a 44 anos); e entre os 38 multibacilares (7 a 45 anos), a média foi de 15,50 anos  $\pm$  9,00. O diagnóstico não foi feito mais precocemente entre os paucibacilares do que entre os multibacilares ( $P = 0,7777$ ).

Na subamostra de pais a idade média de diagnóstico em 54 pessoas foi de 28,81 anos  $\pm$  14,39 anos (6 a 75 anos). No grupo de pessoas com informação de idade de diagnóstico e forma clínica, a idade média de diagnóstico dos 23 paucibacilares foi de 28,22 anos  $\pm$  12,76 anos e dos 26 multibacilares foi de 28,11 anos  $\pm$  14 anos, não sendo estatisticamente diferentes ( $P = 0,9789$ ).

Tabela 16: Frequências genóticas e alélicas dos quatro marcadores (SNPs) testados e análise de associação através da técnica de *pseudo sibs*

Genótipo	SNP						P
	Doentes			Pseudosibs			
<b>rs1126680</b>							
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>FA*</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>FA*</b>	
GG	74	97,37	G = 0,9868	191	95,98	G = 0,9799	0,7318
GA	2	2,63	A = 0,0132	8	4,02	A = 0,0201	
AA	0	0		0	0		
Total	76			199			
<b>rs1355538</b>							
TT	16	26,67	T = 0,5500	35	32,71	T = 0,5561	0,4010
TC	34	56,67	C = 0,4500	49	45,79	C = 0,4439	
CC	10	16,66		23	21,50		
Total	60			107			
<b>rs1799807</b>							
AA	73	98,65	A = 0,9932	205	100	A = 1	0,6170
AG	1	1,35	G = 0,0068	0	0	G = 0	
GG	0	0		0	0		
Total	74			205			
<b>rs1803274</b>							
GG	44	80,00	G = 0,9000	79	84,04	G = 0,9202	0,6864
GA	11	20,00	A = 0,1000	15	15,96	A = 0,0798	
AA	0	0		0	0		
Total	55			94			

\*Frequência alélica

### 5.1.2 Sexo

Na amostra analisada há 42 homens, destes, 41 (97,62%) são afetados; e 46 mulheres, destas, 42 (91,30%) são afetadas. Não foi observada diferença quanto ao sexo entre afetados e não afetados ( $P = 0,3631$ ). A razão entre homens e mulheres (M/F) no grupo de afetados foi de 0,98.

Entre os indivíduos com informação quanto a forma clínica há 37 homens e 38 mulheres. Entre os homens, 21 foram classificados como paucibacilares (56,76%) e 16 como multibacilares (43,24%); entre as mulheres há 27 com a forma paucibacilar (71,05%) e 11 com a forma multibacilar (28,95%). Não foi observada diferença significativa entre a forma clínica com o sexo ( $P = 0,2942$ ). A M/F calculada nos doentes com as formas paucibacilar e multibacilar foi de 0,78 e 1,45, respectivamente.

Na subamostra de pais, entre os 60 afetados há 33 homens (55%) e 27 mulheres (45%), e entre os não afetados há 30 homens (44,12%) e 38 mulheres (55,88%), não havendo diferença quanto ao sexo entre afetados e não afetados ( $P = 0,2929$ ). A M/F no grupo de afetados foi de 1,22.

Considerando os pais afetados com informação da forma clínica há 29 homens e 23 mulheres. Nos doentes diagnosticados como paucibacilares há mais mulheres que homens (13; 54,17% e 11; 45,83%, respectivamente) e nos doentes multibacilares há maior número de homens do que de mulheres (18; 64,28% e 10; 35,72, respectivamente), estes números não são estatisticamente diferentes ( $P = 0,2912$ ). A M/F calculada nos doentes com as formas paucibacilar e multibacilar foi de 0,85 e 1,80, respectivamente.

A idade de diagnóstico entre homens e mulheres não foi diferente, em 30 homens a idade de diagnóstico foi de 14,90 anos  $\pm$  9,34 anos e entre 33 mulheres foi de 15,21 anos  $\pm$  8,38 anos ( $P = 0,5679$ ). A diferença no total de indivíduos de acordo com o sexo se dá porque para alguns indivíduos não há informação da idade de diagnóstico.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ESTUDOS GENÉTICOS

Estudos de replicação na área de genética epidemiológica são importantes para corroborar, confirmar ou refutar a possível associação ou influência de um ou mais *loci* com a suscetibilidade ou com a proteção às doenças de etiologia complexa. Em muitas situações, o primeiro estudo mostra associação significativa, mas estudos independentes posteriores mostram associação de naturezas distintas ou simplesmente não a demonstram (284,285). No presente caso, nossa análise não resultou na validação do achado original observado por Gomes et al. (148). Diversas são as causas possíveis para a não validação de achados genéticos de associação. Por exemplo, diferentes resultados podem ser observados em diferentes grupos étnicos, um achado que sugere um efeito étnico-específico identificado no estudo original. Na presente investigação, a amostra populacional estudada foi recrutada em região geográfica muito distinta da utilizada no estudo original (Paraná vs. Pará); a amostra do sul era composta por 76,31% de indivíduos eurobrasileiros, enquanto que a amostra do norte era formada por 75,35% de pardos; esta discordância de etnia pode ser um dos fatores determinantes do resultado divergente observado (286), já que doenças de etiologia complexa podem apresentar mecanismos genéticos distintos em populações diferentes (287). Esta diferença étnica já era conhecida pelo nosso grupo, tendo em mente o risco de não se encontrar associação, e ao mesmo tempo conscientes de que o determinante étnico nem sempre é decisivo. A tabela 17 mostra as diferenças observadas entre as amostras de Gomes et al. (148) e a do presente estudo: além da etnia, a média de idade nas duas amostras é diferente, com a amostra de doentes recrutada no Estado do Pará sendo mais jovem que a dos doentes do Paraná ( $P < 0,0001$ ).

Importante ressaltar que a ausência de validação de um achado genético de associação pode indicar associação espúria, ao acaso, detectada no estudo original. Neste sentido, estudos adicionais envolvendo novas amostras populacionais são necessários para criar um corpo de evidência consistente. Uma forma de se evitar associações espúrias é a utilização de controles familiares e a avaliação da associação se faz através do Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) (280,287), metodologia adotada neste trabalho.

No caso da BChE, vale notar que estudos pangenômicos de associação com hanseníase não têm identificado associação entre a doença e o gene *BCHE* (135,137,288–291); estes estudos foram realizados em grupos étnicos distintos, como amostras populacionais brasileira (137), chinesa (288,289,291), vietnamita (290) e indiana (135).

Ainda, a amostra populacional brasileira foi recrutada em Belém, distante pouco mais de 100 km do local onde a amostra usada no presente estudo foi recrutada (137). Deve-se ressaltar que estes tipos de estudo são importantes geradores de hipóteses e os seus resultados devem ser corroborados por estudos independentes.

Tabela 17: Diferenças étnicas, de sexo e de idade entre a amostra de hansenianos de Gomes et al (148) e a do presente estudo

Característica	Gomes et al		Presente Estudo		P
<b>Etnia</b>	N*	%	N*	%	
Eurobrasileiro	116	76,31	12	8,63	
Negro	27	17,76	20	14,39	< 0,0001
Pardo	8	5,26	107	76,98	
Asiático	1	0,67	0	0	
Total	152		139		
<b>Idade</b>	(N)	$\bar{x} \pm d.p$	(140)	$33,54 \pm 19,75$	< 0,0001
<b>Genero</b>					
Masculino	96	57,48	73	51,41	0,3397
Feminino	71	42,52	69	48,59	
Total	167				

\*Diferenças nos números são devidas a falta de informação de alguns pacientes

## 6.2 IMPACTO DA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE SNPS TESTADOS

A estratégia mais robusta de seleção de marcadores para um estudo de associação de gene candidato é a seleção, sem viés funcional, de todas as variantes necessárias para a cobertura física completa do gene em análise. No nosso estudo, optou-se por estratégia alternativa de se utilizar apenas marcadores já identificados em associação em estudos anteriores: a variante *BCHE\*70G* (SNP rs1799807), identificado por Gomes et al (148) como associado com a suscetibilidade à hanseníase; e os SNPs rs1355538 e rs1803274 associados, respectivamente, com a suscetibilidade e proteção ao vitiligo (243) em estudos do nosso grupo de pesquisa. O principal efeito positivo desta estratégia de seleção – e o objetivo que embasou a decisão – é a redução do número de marcadores testados, diminuindo-se assim o erro tipo “alfa” (ou falso-positivo), inflacionado na medida em que se aumenta o número de variantes testadas. Como efeito negativo da seleção de um número menor de marcadores, insuficiente para a cobertura completa do gene candidato, há o risco de algum sinal de associação passar indetectado. Neste sentido, a futura inclusão de novos marcadores na análise, de forma a se atingir a cobertura física completa do gene, tende a resolver o problema.

Importante, o SNP rs1803274 é o sítio do variante *BCHE*\*539T (variante K), que está associado com redução na atividade enzimática (292) quando na presença da variante -116A (rs1126680) (209), que é encontrada em cis com o *BCHE*\*539T (211) e, por esta razão, também foi avaliado no presente estudo. A Figura 18 mostra a localização, no gene, dos quatro SNPs testados neste estudo.

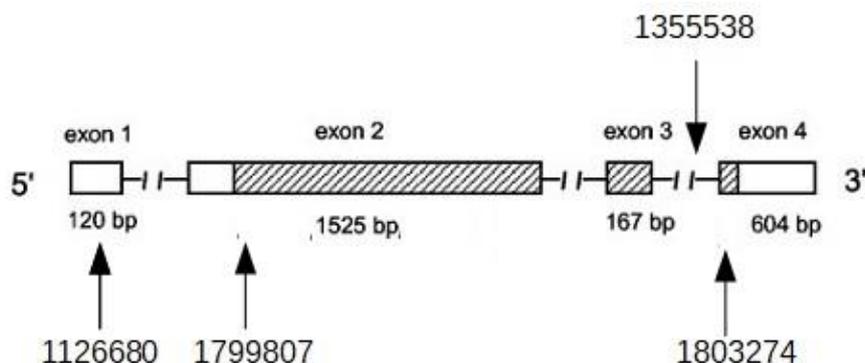


Figura adaptada de Yen et al (214)

Figura 18: Localização no gene *BCHE* dos quatro SNPs testados neste estudo

Foi omitida a sigla "rs". A porção hachurada indica a região codificante do DNA. O tamanho de cada exon é indicado abaixo de cada um deles

### 6.2.1 Frequências Alélicas

As frequências observadas dos alelos de referência de cada um dos SNPs entre as pessoas doentes foram: A = 0,0132 (rs1126680), C = 0,45 (rs1355538); G = 0,0068 (rs1799807) e A = 0,1 (rs1803274). As frequências alélicas mínimas (FAM) globais para os quatro SNPs testados de acordo com o NCBI (293), foram, respectivamente, para os marcadores rs1126680, rs1355538, rs1799807 e rs1803274, (fam/N), 0,0349/175; 0,4399/2203; 0,0121/1463 e 0,1585/794; estas frequências não foram estatisticamente diferentes das encontradas no presente estudo ( $P = 0,2368$ ;  $0,8138$ ;  $0,7922$  e  $0,1907$ , respectivamente). Gomes et al (148), em 163 hansenianos, encontraram para o alelo A do SNP rs1126680 a frequência de 0,0675, que aqui foi 5,11 vezes menor (0,0132;  $P = 0,0126$ ), esta diferença pode ter sido resultante da diferença étnica entre as duas amostras.

Um pouco mais que 91% dos indivíduos que participaram do presente estudo são pardos ou negros e a frequência do alelo A do SNP rs1803274 foi 0,0961, não diferente das encontradas por Souza et al (294) em 82 afrodescendentes (0,171;  $P = 0,4240$ ) e em 95 eurobrasileiros (0,184;  $P = 0,1374$ ) doadores de sangue de Curitiba. Este resultado pode ser uma evidência de que este SNP não está associado com a suscetibilidade à hanseníase. A Tabela 18 mostra as frequências alélicas observadas em outros estudos, realizados em populações distintas saudáveis ou de estudos de associação com outras

patologias, as diferenças observadas em algumas frequências podem estar relacionadas com as patologias estudadas nas pesquisas citadas.

Foi observado um pequeno DL ( $r^2 = 0,30$ ) entre os SNPs rs1126680 e rs1803274, valor muito próximo do encontrado por Gomes et al ( $r^2 = 0,26$ ) (148) locais dos variantes -116A e do 539T, respectivamente, que têm sido observados, como já mencionado, ligados preferencialmente em cis (211) e que quando presentes diminuem a atividade enzimática. Infelizmente nós não possuímos o plasma das pessoas que fazem parte da amostra analisada, e portanto, a atividade da BChE não pôde ser medida.

Nenhum dos SNPs averiguados neste trabalho parece estar associado com a forma clínica (paucibacilar ou multibacilar). Gomes et al (148) observaram que o alelo G do SNP rs1799807 foi mais encontrado no grupo de doentes (0,0394) do que no grupo controle (0,0067), mas não encontraram associação com a forma clínica. No presente estudo haviam duas pessoas heterozigotos (mãe e filho), uma delas com a forma paucibacilar e a outra com a multibacilar, portanto não foi possível determinar se o alelo *BCHE\*70G* está ou não associado com a hanseníase *per se* ou com a forma clínica.

Deve-se ponderar que neste estudo foi usada uma amostra etnicamente diferente, o que poderia explicar o resultado encontrado: é possível que, ao menos nesta população, o marcador rs1799807 e o seu alelo G não estejam realmente associados com a suscetibilidade à esta doença, possivelmente por conta da baixa heterozigose.

## 6.3 VARIÁVEIS NÃO GENÉTICAS

### 6.3.1 Idade

No presente estudo os doentes são em média mais jovens que os não doentes (33,54 anos  $\pm$  19,75 anos e 44,19 anos  $\pm$  15,67 anos;  $P = 0,0002$ , respectivamente). Quando se estratifica a amostra em pais e filhos, se observa que os pais doentes apresentam uma idade média maior que a dos não doentes ( $P = 0,0233$ ); mas em seus filhos doentes não se observa diferença na média de idade entre doentes e seus irmãos virtuais não doentes. Em um estudo com 1.867 indivíduos (225 hansenianos),

Lázaro et al (275) observaram, na mesma região em que a nossa amostra é originária, que a frequência da doença aumenta com a idade, possivelmente porque quanto maior o tempo de vida maior é o tempo de exposição ao *M leprae* e maior a chance de desenvolver a doença. Então, é muito possível que as pessoas que hoje são saudáveis, em algum momento próximo podem deixar de sê-lo.

Tabela 18: Frequências alélicas dos marcadores no gene *BCHE* observadas em algumas populações comparando-as com as do presente estudo.

Origem / Amostra	N	Marcador / Frequência Alélica	P	Referência
Sul do Brasil / População miscigenada saudável		rs1803274		
Afrodescendentes	82	A = 0,171	0,2423	(294)
Eurobrasileiros	95	A = 0,184	0,1355	
Sul do Brasil / Hansenianos		rs1126680		
	165	A = 0,0675	<b>0,0126</b>	
		rs1799807		
		G = 0,0394	0,0509	(148)
		rs1803274		
		A = 0,1779	0,0883	
Colômbia / Adultos saudáveis	397	rs1803274		
		A = 0,088	0,4211	(295)
Sudeste do Brasil / Idosos com doença de Alzheimer	81	rs1126680		
		A = 0,056	0,0610	(209)
		rs1803274		
		A = 0,218	<b>0,0181</b>	
Sudeste do Brasil / Usuários de cocaína	698	rs1803274		
		A = 0,1753	0,5559	(90)
Irã / Portadores de DAC <sup>1</sup>	110	rs1803274		
		A = 0,2636	<b>0,0001</b>	
DAC e DM2 <sup>2</sup>	103	A = 0,3738	0,1233	(99)
DM2	80	A = 0,2562	<b>0,0021</b>	
Sul do Brasil / Índios Guarani M'Byá	54	rs1803274		
		A = 0,1482	0,3459	(296)
Kaingang	57	A = 0,0351	0,0820	
Austrália / Amostra de Militares		rs1126680		
	51	A = 0,0588	0,0546	
		rs1799807		
		G = 0,0196	0,5608	(297)
		rs1803274		
		A = 0,2255	<b>0,0121</b>	
Sul do Brasil / Mulheres Diabetes Gestacional	150	rs1126680		
		A = 0,0769	<b>0,0075</b>	(298)
		rs1803274		
		A = 0,1713	0,1553	

<sup>1</sup>Doença Arterial Coronariana; <sup>2</sup>Diabetes melitus do tipo 2; a maior parte destes estudos não usaram amostras constituídas por hansenianos

Foi observada diferença significativa na idade média entre os que apresentavam a forma paucibacilar e aqueles com a forma multibacilar ( $P = 0,0308$ ), a idade foi menor no grupo paucibacilar, além disso, uma análise de regressão demonstrou associação entre a idade mais elevada e a forma multibacilar. Tem sido reportado que o período de incubação

em média gira em torno de 5 anos, independentemente da forma clínica, variando entre 2 e 12 anos, podendo chegar a 20 anos ou mais (299), e que a idade menor observada no grupo de paucibacilares poderia ser atribuída ao menor tempo de incubação desta forma clínica quando comparada com a da forma multibacilar (300).

É importante ressaltar que entre os doentes existem 27 crianças (menores de 15 anos) e 21 delas apresentam a forma paucibacilar, o que ajuda a explicar a menor média de idade observada nesta forma clínica. Crianças hansenianas não são muito comuns, a não ser em regiões superendêmicas, como é o caso da população de estudo (301).

A idade de diagnóstico também foi avaliada. Este parâmetro nem sempre reflete o tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico propriamente dito, sendo uma aproximação. A idade de diagnóstico não foi diferente entre as formas paucibacilar e multibacilar, apesar de esta última poder estar relacionada com o diagnóstico mais tardio (302)(303). Independentemente da forma clínica, na subamostra de pais o diagnóstico foi feito mais tarde que em seus filhos, pois como estes são naturalmente mais jovens, a idade de diagnóstico deve ser numericamente menor. Por outro lado, se imagina que todos vivam no mesmo ambiente e expostos ao *M leprae* da mesma forma; pode-se explicar esta diferença porque nos pais o diagnóstico pode ser de uma recorrência e não o da primeira infecção. Em uma área superendêmica, como a Colônia do Prata (275), é de se esperar que o diagnóstico fosse feito mais precocemente, mas por desconhecimento, receio do estigma ou outras razões, não ocorreu desta forma. Muitos doentes precisam procurar atendimento médico mais de uma vez para fechar ou confirmar o diagnóstico, 2,7 vezes em média, e dependendo do nível socioeconômico o atendimento pode ocorrer em Unidade Básica de Saúde (UBS) ou consultório particular, além disso, o doente nem sempre procura atendimento inicial especializado. Arantes et al (304), em estudo realizado no Município de São José do Rio Preto, observaram que a maior parte dos diagnósticos ocorrem em UBS, seguidos de ambulatório de especialidade, serviço privado de saúde, hospital e outros, tais como outros ambulatórios, farmácia, médico militar e benzedeira. Outros motivos podem estar relacionados com o atraso do diagnóstico, como a dificuldade no transporte até o local de atendimento, fila de espera, custo, dentre outros (304). Quanto menor for o tempo para fazer o diagnóstico menores são os riscos de complicações neurológicas, este tempo varia entre 2 a 3 anos (303,305)

### 6.3.2 Sexo

Não foi observada diferença no número de homens e mulheres doentes, considerando ou não a forma clínica. Ao se calcular a M/F verificou-se que nos paucibacilares foi de 0,78 e entre os multibacilares de 1,45. Na subamostra pais, esta relação foi de 1,22 e na dos filhos de 0,98. Aparentemente este parâmetro está aumentando com a idade e é maior na forma multibacilar. Um estudo de nosso grupo de pesquisa, na mesma região em que a amostra deste estudo foi recrutada, demonstrou que nos afetados há mais homens que mulheres ( $P = 0,0039$ ) e foi calculada uma M/F de 1,38 (306). No Brasil a M/F é maior que 1, mostrando que há mais homens que mulheres doentes (307–310), o mesmo que em outras partes do mundo (44). Nos países com mais de 1.000 novos casos registrados no período entre dezembro de 2016 e março de 2017, a maior M/F foi observada em Madagascar (4,00) e a menor no Brasil (1,26), e a M/F menor que 1 é raramente encontrada (311). Em homens a doença além de ser mais comum tende a ser mais grave, e é mais comum a forma multibacilar, assim como a frequência maior de deformidades.

Em estudo realizado a partir de dados do Ministério da Saúde, no período de 2006 a 2010, Guerra-Silveira e Abad-Franch (312) observaram que a relação M/F é em torno de 1 para as duas formas clínicas na faixa etária de 1 a 4 anos e a partir dos 5 anos a M/F é maior nos casos multibaculares, permanecendo constante muito próxima de 1 nos paucibacilares.

Uma possível explicação é que, além das possíveis diferenças fisiológicas que possam estar afetando a incidência (312), as mulheres prestam mais atenção aos sinais e sintomas e tendem a procurar auxílio médico mais rapidamente (em média em 11,8 meses) que os homens (14 meses) (313). Por razões ocupacionais os homens tendem a se expor com mais frequência a fatores de risco, como a exposição a certos animais que podem estar infectados com o *M leprae* e funcionem como reservatórios do bacilo (314).

Assim como já haviam demonstrado que a idade é um fator de risco importante, Lázaro et al (275) mostraram, através de análise de regressão logística multivariada, que a variável não genética “sexo” está fortemente associada com a suscetibilidade à doença ( $P = 0,002$ ) o que, estatisticamente, não foi demonstrado no presente estudo.

A Tabela 19 mostra o perfil epidemiológico da doença em algumas regiões do país, onde se pode perceber que, de um modo geral, nas localidades onde se observou maior prevalência da forma multibacilar a M/F foi maior que 1, com exceção de duas (Manaus e

Araçatuba). Em Manaus haviam mais casos paucibacilares e a  $M/F \cong 1,0$  e em Araçatuba, praticamente 2/3 dos casos eram multibacilares e a  $M/F$  foi menor que 1,0 (0,90).

## 7 PERSPECTIVAS

Sugere-se que o gene *BCHE* ainda possa ser considerado como um dos possíveis genes menores envolvidos com a suscetibilidade genética, e que este estudo possa ser refeito em um futuro próximo, com a cobertura completa do gene, nesta e em outras populações etnicamente distintas, apesar do enorme hiato entre os estudos de associação realizados nas décadas de 1970 e 1990 (de fenotipagem) e o de Gomes et al (148) em 2012 (de genotipagem) ser um forte argumento a favor da não existência de associação entre este gene e a suscetibilidade à hanseníase.

Tabela 19: Perfil epidemiológico da hanseníase em algumas regiões do Brasil em diferentes períodos

Localidade ou Região	Período	N	Forma Clínica*		Relação M/F	Ref
			P	M		
Manaus (AM)	1998 – 2005	474	70,7	29,3	1,01	(307)
Vale do Jequitinhonha (MG)	1998 - 2006	1347	27,8	72,2	1,05	(308)
Fortaleza (CE)	2001 - 2012	8981	35,0	65,0	1,02	(309)
Microrregião de Tucuruí, Amazônia	2010 - 2014	1786	31,9	68,1	1,59	(310)
Araçatuba	2015	434	32,7	67,3	0,90	(311)
Brasil	2016	25218	27,7	72,3	1,26	(44)

\*Forma clínica: P = paucibacilar; M = multibacilar M/F = razão entre homens e mulheres afetados

## 8 LIMITAÇÕES

A principal limitação deste estudo pode ter sido a não realização da cobertura completa do gene *BCHE*, também podem ser consideradas como limitações a falta de algumas informações de algumas pessoas que fizeram parte da pesquisa, tais como idade, idade de diagnóstico e a forma clínica. Além destas, se pode considerar também a taxa de insucesso na genotipagem dos SNPs estudados, a do rs1126680 foi de 5,94%; a do rs1799807 foi de 2,28% e a do rs1803274 foi de 9,59%. O marcador rs1355538, devido a um problema técnico, não pôde ser testado em 25,11% da amostra.

Outra limitação deste estudo foi a falta de análise funcional da BChE pois não existem amostras de soro ou plasma dos participantes da amostra, na época da coleta e processamento das amostras a prioridade era o DNA.

## 9 CONCLUSÕES

O objetivo geral do presente estudo foi o de aprofundar a investigação do papel dos variantes do gene *BCHE* no controle da suscetibilidade à hanseníase, em especial o variante *BCHE\*70G* (rs17999807). Os outros 3 SNPs (rs1126680, rs 1355538 e rs1803274) foram genotipados; nenhum sinal estatisticamente significativo de associação foi encontrado. O alelo G do SNP rs1799807 que Gomes et al (148) demonstraram estar associado com a hanseníase *per se* e que aqui não foi demonstrada tal associação.

Demonstrou-se que a idade é um fator de risco não genético para forma multibacilar, assim como outros pesquisadores já haviam demonstrado.

## 10 REFERÊNCIAS

1. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborgh PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006;77(3):189–202.
2. Kerr-Pontes LRS, Montenegro ACD, Barreto ML, Werneck GL, Feldmeier H. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: An ecological study. *Int J Epidemiol.* 2004;33(2):262–9.
3. Dhimal M, Karki KB. The hidden burden of Neglected Tropical Diseases : a call for inter-sectoral collaboration in Nepal. *J Nepal Heal Res Counc.* 2014;12(3):3–6.
4. Neiva RJ. Perspectivas históricas do diagnóstico e tratamento da hanseníase. *Saúde Transform Soc.* 2016;7(1):88–97.
5. Vendrama C. *A Cura dos Doentes na Bíblia.* 1st ed. São Paulo: Edições Loyola; 2001. 23 p.
6. WHO (World Health Organisation). Media Centre - Leprosy Fact Sheet [Internet]. World Health Organization. 2018 [acesso em 2018 Jan 29]. p. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>
7. Cunha AZS. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. *Cien Saude Colet.* 2002;7(2):235–42.
8. Grzybowski A, Nita M. Leprosy in the Bible. *Clin Dermatol.* 2016;34(1):3–7.
9. Hanumanthayya K, G MK, M A, Nida, Minakshi B. History of Leprosy. *J Evid Based Med Healthc.* 2016;3(8):250–2.
10. 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.* 2009 Dec;41(12):1282–9.

11. Eidt LM. Breve história da hanseníase : sua expansão do mundo para as Américas , o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Soc.* 2004;13(2):76–88.
12. Faria, Lina; Santos LAC. A hanseníase e sua história no Brasil: a história de um “flagelo nacional.” *História, Ciências, Saúde - Manguinhos.* 2015. p. 1491–5.
13. Santos LAC, Faria L, Menezes RF. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil : cenários de estigma e confinamento \*. *R Bras Est Pop.* 2008;25(1):167–90.
14. BRASIL. DECRETO Nº 968, de 7 de maio de 1962 - Baixa Normas Técnicas Especiais para o Combate à Lepra no País e outras Providências [Internet]. Brasília, DF; 1962. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/historiadahanseníase/media/Decreto968.pdf>
15. Junqueira, Thais Botelho; Oliveira HP. Lepra/Hanseníase – Passado – Presente. *Ciência, Cuid e Saúde.* 2002;1(2):263–6.
16. BRASIL. Lei 9010/95. 1995 p. D.O.U, 30 de março de 1995.
17. Femina LL, Soler ACP, Nardi SMT, Del’Arco Paschoal V. Lepra para Hanseníase : A visão do Portador sobre a Mudança de Terminologia. *Hansen Int.* 2007;32(1):37–48.
18. Wildner LM, Nogueira CL, Silva Souza B da, Senna SG, Silva RM da, Bazzo ML. Micobactérias: Epidemiologia e Diagnóstico. *Rev Patol Trop.* 2011;40(3):207–29.
19. WHO. Leprosy elimination - Microbiology of *M . leprae* [Internet]. World Health Organisation Weekly epidemiological record. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/lep/microbiology/en/>
20. Diório SM. Aspectos microbiológicos e molecularares do *Mycobacterium leprae*. In: Alves ED, Ferreira TL, Ferreira IN, editors. *Hanseníase: Avanços e Desafios.* Brasília, DF: NESPROM/ Universidade de Brasília; 2014. p. 67–80.
21. Pfyffer G. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology.* 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 536–69.
22. Shepard C. The Experimental Disease that Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice. *J Exp Med* [Internet]. 1960;112(3):445–54. Disponível em: <http://jem.rupress.org/content/112/3/445>
23. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cellw.* 2000;103(3):511–24.

24. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina (B Aires)*. 1997;30:325–34.
25. Wade HW. The Technical Resolution on Classification at the 6th International Congress of Leprosy. *Int J Lepr*. 1953;51:504–16.
26. Bandeira SS, Pires CA, Quaresma JAS. Nerve Damage in Young Patients with Leprosy Diagnosed in an Endemic Area of the Brazilian Amazon: A Cross-Sectional Study. *J Pediatr*. 2017;185:143–8.
27. Yamamura, M; Uvemura, K; Deans, RJ; Weinberg, K; Rea, TH; Bloom, BR; Modlin R. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1992 Jan 3;254(5029):277–9.
28. Pardillo FEF, Fajardo TT, Abalos RM, Scollard D, Gelber RH. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. *Clin Infect Dis*. 2007 Apr 15;44(8):1096–9.
29. de Souza VNB, Iyer AM, Lammas DA, Naafs B, Das PK. Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. *Clin Dermatol*. 2016;34(1):82–95.
30. Prasad PVS, Kaviarasan PK. Leprosy therapy, past and present: can we hope to eliminate it? *Indian J Dermatol*. 2010;55(4):316–24.
31. WHO, editor. WHO EXPERT COMMITTEE ON LEPROSY - 7th REPORT [Internet]. Geneva, Switzerland; 1998. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42060/1/WHO\\_TRS\\_874.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42060/1/WHO_TRS_874.pdf?ua=1)
32. Lastória JC, Morgado de Abreu MAM. Hanseníase: Diagnóstico e Tratamento. *Diagn Trat*. 2012;17(4):173–82.
33. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect*. Elsevier Masson SAS; 2015;45(9):383–93.
34. WHO (World Health Organisation). Global Leprosy Update, 2017: Reducing the Disease Burden due to Leprosy. *Wkly Epidemiol Rec*. 2018;35(93):445–56.
35. Crespo MJI, Gonçalves A, Padovani CR. Hanseníase: pauci e multibacilares estão sendo diferentes? *Med (Ribeirão Preto)*. 2014;47(1):43–50.
36. Reis BM, Fernandes LFRM, Castro SS. Limitation of activity and restriction of social participation in relation to age range, gender, and education in people with leprosy. *An Bras Dermatol*. 2017;92(3):335–9.
37. WHO. Global Leprosy update, 2015: time for action accountability and inclusion. *Wkly Epidemiol Rec* [Internet]. 2016;91(35):405–20. Disponível em:

- <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/249601/1/WER9135.pdf?ua=1>
38. de Matos HJ, Duppre N, Alvim MF, MachadoVieira LM, Sarno EN, Struchiner CJ. Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987-1991). *CadSaude Publica*. 1999;15(0102–311X):533–42.
  39. Brasil M da S. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública 2011-2015 [Internet]. Ministerio da Saude do Brazil, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, DF; 2013. 1-104 p. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_integrado\\_acoes\\_estrategicas\\_2011\\_2015.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_2011_2015.pdf)
  40. Finez MA, Salotti SRA. Identificação do grau de incapacidades em pacientes portadores de hanseníase através da avaliação neurológica simplificada Identification of the degree of impairment in leprosy patients through a simplified neurological evaluation. *J Heal Sci Inst*. 2011;29(3):171–5.
  41. Patel NR, Modi KR. A Cross Sectional Study of Deformities in Patients of Leprosy at a Tertiary Care Center of Western India. *Indian J Lepr*. 2016;88:209–15.
  42. Senior K. Stigma, chemoprophylaxis, and leprosy control. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2009 Jan [acesso em 2012 Apr 29];9(1):10. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309908702937>
  43. Rafferty J. Curing the stigma of leprosy. *Lepr Rev* [Internet]. 2005 [acesso em 2012 May 4];76:119–26. Disponível em: [http://www.kit.nl/-/INS/24155/\(57698\)-ILS/KIT-ILS-Dossiers.pdf](http://www.kit.nl/-/INS/24155/(57698)-ILS/KIT-ILS-Dossiers.pdf)
  44. WHO (World Health Organisation). Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. *Wkly Epidemiol Rec* [Internet]. 2017;92(35):501–20. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2017/wer9235/en/>
  45. BRASIL. Ministério da Saúde, HANSENÍASE - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net [Internet]. 2012. Disponível em: [http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/hanseniaze/bases/Han\\_sbrnet.def](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/hanseniaze/bases/Han_sbrnet.def)
  46. Cruz RCS, Buhner-Sékula S, Penna MLF, Penna GO, Talhari S. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *An Bras Dermatol*. 2017;92(6):761–73.
  47. Goulart IMB, Arbex GL, Carneiro MH, Rodrigues MS, Gadia R. Efeitos adversos da

- poliquimioterapia em pacientes com hanseníase : um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia Adverse effects of multidrug therapy in leprosy patients : a five-year survey at a Health Center. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(5):453–60.
48. Brasil. Hanseníase - Tratamento [Internet]. Ministério da Saúde. 2014 [acesso em 2018 Jul 11]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniaze/11299-tratamento>
  49. Lopes VAS, Rangel EM. Hanseníase e vulnerabilidade social: uma análise do perfil socioeconômico de usuários em tratamento irregular. *Saúde em Debate.* 2014;38(103):817–29.
  50. Deepak S. Answering the rehabilitation Needs of Leprosy Affected Persons in Integrated Setting through Primary Health Care Services and Community-based Rehabilitation. *Indian J Lepr.* 2003;75:127–42.
  51. Monteiro LD, Alencar CHM de, Barbosa JC, Braga KP, Castro MD, Heukelbach J. Incapacidades físicas em pessoas acometidas pela hanseníase no período pós-alta da poliquimioterapia em um município no Norte do Brasil. *Cad Saude Publica.* 2013;29(5):909–20.
  52. Santos K da S, Fortuna CM, Santana FR, Gonçalves MFC, Marciano FM, Matumoto S. Meaning of leprosy for people who have experienced treatment during the sulfonic and multidrug therapy periods. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2015;23(4):620–7.
  53. World Health Organization. Constitution of the world health organization [Internet]. New York; 2005 p. 1–19. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/bd/PDF/bd47/EN/constitution-en.pdf?ua=1>
  54. Scott J. The psychosocial needs of leprosy patients. *Lepr Rev* [Internet]. 2000 [acesso em 2012 May 4];71:486–91. Disponível em: [http://www.leprahealthinaction.org/lr/Dec00/lep486\\_491.pdf](http://www.leprahealthinaction.org/lr/Dec00/lep486_491.pdf)
  55. Bíblia online - Versão Católica - Português - Levítico 13 [Internet]. [acesso em 2017 Jun 30]. Disponível em: <https://www.bibliaonline.com.br/vc/lv/13>
  56. Sánchez AIM, Bertolozzi MR. Pode o conceito de vulnerabilidade apoiar a construção do conhecimento em Saúde Coletiva? *Ciência e Saúde Coletiva.* 2007;12(2):319–24.
  57. OMS. Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020 [Internet]. Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020. 2016. 23 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208824/8/9789290225201-Portuguese.pdf>
  58. BRASIL. Lei 11.520, de 18 de setembro de 2007, dispõe sobre a concessão de

pensão especial às pessoas atingidas pela hanseníase que foram submetidas a isolamento e internação compulsórios. 2007.

59. Mendonça VA, Eustáquio G, Alvim B, Teixeira AL, Costa RD, Antunes CM. Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol*. 2008;83(4):343–50.
60. Fu X, Liu H, Zhang F. Images in clinical tropical medicine: Borderline lepromatous leprosy with type 1 (Reversal) reactions in a Chinese man. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(2):207–9.
61. Vieira AP, Trindade MÂB, Pagliari C, Avancini J, Sakai-Valente NY, Da Silva Duarte AJ, et al. Development of type 2, but not type 1, leprosy reactions is associated with a severe reduction of circulating and in situ regulatory T-cells. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(4):721–7.
62. Bernardes Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(4):365–75.
63. Risch N. Linkage Strategies for Genetically Complex Traits. 1. Multilocus Models. *Am J Hum Genet*. 1990;46:222–8.
64. Stessman HA, Bernier R, Eichler EE. A genotype-first approach to defining the subtypes of a complex disease. *Cell*. Elsevier Inc.; 2014;156(5):872–7.
65. Poschl G, Seitz HK. Alcohol and Cancer. *Alcohol Alcohol*. 2004;39(3):155–65.
66. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and Cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7:149–56.
67. Jelski W, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin Chim Acta*. 2008;395(1–2):1–5.
68. Higenbottam T, Shipley MJ, Rose G. Cigarettes, lung cancer, and coronary heart disease: the effects of inhalation and tar yield. *J Epidemiol Community Health* [Internet]. 1982;36(2):113–7. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1052907&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Cummings KM, Dresler CM, Field JK, Fox J, Gritz ER, Hanna NH, et al. E-cigarettes and cancer patients. *J Thorac Oncol*. International Association for the Study of Lung Cancer; 2014;9(4):438–41.
70. Miller V, Mente A, Dehghan M, Rangarajan S, Zhang X, Swaminathan S, et al. Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): A prospective cohort study. *Lancet*. 2017;390:2037–49.
71. Dehghan M, Mente A, Zhang X, Swaminathan S, Li W, Mohan V, et al. Associations

- of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): A prospective cohort study. *Lancet*. 2017;390:2050–62.
72. Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:189–218.
  73. Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: Uma Doença Genética? *An Bras Dermatol*. 2007 Feb;82(5):451–9.
  74. Frodsham AJ, Hill AVS. Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet*. 2004;13(REV. ISS. 2):187–94.
  75. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011;12(3):167–78.
  76. Lakhakia R. The legacy of Robert Koch. *Sultan Qabooj Univ Med J [Internet]*. 2014;14(1):e37–41. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916274/pdf/squmj1401-e37-41.pdf>
  77. WHO. Global Tuberculosis Report 2016. *Annu Reports [Internet]*. 2016;(Global TB Report 2016):214. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
  78. Abel L, El-baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova J, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *PhilTransRSocB [Internet]*. 2015;369:20130428. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0428>
  79. Cobat A, Poirier C, Hoal E, Boland-Auge A, De La Rocque F, Corrad F, et al. Tuberculin skin test negativity is under tight genetic control of chromosomal region 11p14-15 in settings with different tuberculosis endemicities. *J Infect Dis*. 2015;211(2):317–21.
  80. Dmytro B, Mykhailo K, Tetyana B. Interleukin-10 gene polymorphism is associated with multi-drug resistant tuberculosis during the intensive phase of standard chemotherapy. *Int J Mycobacteriology*. 2016;5:S152–3.
  81. Stein CM, Zalwango S, Malone LL, Won S, Mayanja-Kizza H, Mugerwa RD, et al. Genome scan of *M. tuberculosis* infection and disease in Ugandans. *PLoS One [Internet]*. 2008;3(12):1–10. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0004094&type=printable>
  82. Power HJ. *History of Malaria [Internet]*. London: John Wiley & Sons; 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0003575>

83. Gomes AP, Vitorino RR, Costa AP, Mendonça EG, Oliveira MGA, Siqueira-Batista R. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(3):358–69.
84. Martins R, Monteiro GF, Costa FM da, Antonini Y. First Record of *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae) in the Volta Grande Environmental Reserve, Conceição das Alagoas Municipality, Minas Gerais, Brazil. *EntomoBrasilis* [Internet]. 2015;8(1):82–4. Disponível em: <http://www.periodico.ebras.bio.br/ojs/index.php/ebras/article/view/ebrasilis.v8i1.474>
85. WHO (World Health Organisation). World malaria report 2016. 2016. 186 p.
86. Martin O, Lapouble M, Carolina A, Santelli S, Muniz-Junqueira MI. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira , 2003 a 2012. *Rev Panam Salud Publica*. 2015;38(4):300–6.
87. Dick DM, Agrawal A, Schuckit MA, Bierut L, Hinrichs A, Fox L, et al. Marital status, alcohol dependence, and GABRA2: evidence for gene-environment correlation and interaction. *J Stud Alcohol Drugs*. 2006;67(2):185–94.
88. Dick DM, Wang JC, Plunkett J, Aliev F, Hinrichs A, Bertelsen S, et al. Family-based association analyses of alcohol dependence phenotypes across DRD2 and neighboring gene ANKK1. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(10):1645–53.
89. Aliev F, Wetherill L, Bierut L, Bucholz KK, Edenberg H, Foroud T, et al. Genes Associated With Alcohol Outcomes Show Enrichment of Effects With Broad Externalizing and Impulsivity Phenotypes in an Independent Sample. *J Stud Alcohol Drugs* [Internet]. 2014;76(1):38–46. Disponível em: [http://search.proquest.com/docview/1718068010?accountid=10218%5Cnhttp://www.ub.uni-koeln.de/openurl?url\\_ver=Z39.88-2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:socabs shell&atitle=Genes+Associated+With+Alcohol+Outcomes+Show+Enr](http://search.proquest.com/docview/1718068010?accountid=10218%5Cnhttp://www.ub.uni-koeln.de/openurl?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:socabs shell&atitle=Genes+Associated+With+Alcohol+Outcomes+Show+Enr)
90. Negrão AB, Pereira AC, Guindalini C, Santos HC, Messas GP, Laranjeira R, et al. Butyrylcholinesterase genetic variants: association with cocaine dependence and related phenotypes. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [acesso em 2014 Feb 28];8(11):e80505. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0080505&representation=PDF>
91. Gamero-Villaruel C, González LM, Rodríguez-López R, Albuquerque D, Carrillo JA, García-Herráiz A, et al. Influence of TFAP2B and KCTD15 genetic variability on personality dimensions in anorexia and bulimia nervosa. *Brain Behav* [Internet].

- 2017;e00784(January):1–10. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/brb3.784>
92. Wilcox JA, Quadri S. Replication of NTNG1 association in schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2014;24(6):266–8.
  93. Sklar P, Ripke S, Scott LJ, Andreassen OA, Cichon S, Craddock N, et al. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat Genet.* 2011;43(10):977–83.
  94. Ruysse-Witrand A, Lukas C, Nigon D, Dawidowicz K, Morel J, Sibilia J, et al. Association of IL-2RA and IL-2RB genes with erosive status in early rheumatoid arthritis patients (ESPOIR and RMP cohorts). *Jt Bone Spine.* 2014;81(3):228–34.
  95. Gaulton KJ, Ferreira T, Lee Y, Raimondo A, Magi R, Reschen ME, et al. Genetic fine-mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Net Genet.* 2015;47(12):1415–25.
  96. Li Q, Qiao ZR, Liu DB, Zeng JT, Zhang J, Bo Y, et al. Relationship between serum GAD-Ab and the genetic polymorphisms of GAD2 and type 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):3002–9.
  97. Urrutia I, Martínez R, López-Euba T, Velayos T, Martínez de LaPiscina I, Bilbao JR, et al. Lower Frequency of HLA-DRB1 Type 1 Diabetes Risk Alleles in Pediatric Patients with MODY. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(1):e0169389. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0169389>
  98. Bahrehmand F, Rahimi Z, Ahmadi R, Kiani A, Tavilani H. Synergistic effects of BuChE non-UU phenotype and paraoxonase ( PON1 ) 55 M allele on the risk of systemic lupus erythematosus : influence on lipid and lipoprotein metabolism and oxidative stress , preliminary report. *Lupus.* 2014;23:263–72.
  99. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Pourmotabbed T. Butyrylcholinesterase K variant and the APOE-epsilon 4 allele work in synergy to increase the risk of coronary artery disease especially in diabetic patients. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2010 Apr [acesso em 2013 Jan 21];37(4):2083–91. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19685167>
  100. Bu X, Niu D, Wu J, Yuan Y, Song J, Wang J. Elevated levels of pre $\beta$ 1-high-density lipoprotein are associated with cholesterol ester transfer protein, the presence and severity of coronary artery disease. *Lipids Health Dis.* *Lipids in Health and Disease;* 2017;16(1):4.
  101. Padmanabhan S, Caulfield M, Dominiczak AF. Genetic and Molecular Aspects of Hypertension. *Circ Res.* 2015;116(6):937–59.

102. Hauer AJ, Pulit SL, van den Berg LH, de Bakker PIW, Veldink JH, Ruigrok YM. A replication study of genetic risk loci for ischemic stroke in a Dutch population: a case-control study. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):12175. Disponible em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-07404-4>
103. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich T, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton K, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016;536(7614):41–7.
104. Vilatela A, López-López M, Yescas-Gómez P. Genetics of Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2012;43(8):622–31.
105. Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med*. 2016;18(5):421–30.
106. Schaefer AS, Jochens A, Dommisch H, Graetz C, Jockel-Schneider Y, Harks I, et al. A large candidate-gene association study suggests genetic variants at IRF5 and PRDM1 to be associated with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(12):1122–31.
107. Li Y, Xu L, Hasturk H, Kantarci A, DePalma SR, Van Dyke TE. Localized aggressive periodontitis is linked to human chromosome 1q25. *Hum Genet*. 2004;114(3):291–7.
108. Spitzwieser M, Entfellner E, Werner B, Pulverer W, Pfeiler G, Hacker S, et al. Hypermethylation of CDKN2A exon 2 in tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. *BMC Cancer*; 2017;17(1):260. Disponible em: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3244-2>
109. Huo X, Xiao X, Zhan S, Zhou D, Chen Z. Association of Intron Microsatellite Instability and Exon Mutational Profile of TP53 in Human Gastric Cancers . *Anticancer Res*. 2017;37(8):4507–14.
110. Karlsson EK, Kwiatkowski DP, Sabeti PC. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2014;15(6):379–93. Disponible em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg3734>
111. Timmann C, Thye T, Vens M, Evans J, May J, Ehmen C, et al. Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature* [Internet]. 2012;489(7416):443–6. Disponible em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature11334>
112. Lwanira CN, Kironde F, Kaddumukasa M, Swedberg G. Prevalence of polymorphisms in glucose-6-phosphate dehydrogenase, sickle haemoglobin and nitric oxide synthase

- genes and their relationship with incidence of uncomplicated malaria in Iganga, Uganda. *Malar J. BioMed Central*; 2017;16(1):322.
113. Grigg MJ, Cox J, William T, Jelip J, Fornace KM, Brock PM, et al. Individual-level factors associated with the risk of acquiring human *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia: a case-control study. *Lancet Planet Heal [Internet]*. 2017;1(3):e97–104. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2542519617300311>
114. Brasil M da S. Tuberculose - Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação [Internet]. Ministério da Saúde, DATASUS, SVS, SINAN Net. 2016 [acesso em 2017 Aug 29]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/malabr.def>
115. Rockett KA, Clarke GM, Fitzpatrick K, Hubbart C, Jeffreys AE, Rowlands K, et al. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nat Genet [Internet]*. 2014;46(11):1197–204. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.3107>
116. Smith JH, Whiteside A. The history of AIDS exceptionalism. *J Int AIDS Soc [Internet]*. 2010;13(1):1–8. Disponível em: <https://www.biomedcentral.com/1758-2652/content/13/1/47/>
117. WHO (World Health Organisation). Global AIDS Update 2016 [Internet]. United Nations Programme on HIV/AIDS - UNAIDS. 2016 [acesso em 2017 Sep 13]. p. 422. Disponível em: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_Gap\\_report\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Gap_report_en.pdf)
118. OMS. UNAIDS BRASIL - Estatísticas [Internet]. Organização Mundial da Saúde, UNAIDS Brasil. 2017. Disponível em: <http://unaids.org.br/estatisticas/>
119. Band G, Kwiatkowski DP, Rockett KA, Spencer CCA, Clarke GM, Kivinen K, et al. A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. *Nature*. 2015;526(7572):253–7.
120. Deng Z, Yang F, Bai Y, He L, Li Q, Wu Y, et al. Co-inheritance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations and hemoglobin E in a Kachin population in a malaria-endemic region of Southeast Asia. *PLoS One [Internet]*. 2017;12(5):1–12. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177917>
121. Willie B, Hall NB, Stein CM, Jurevic RJ, Mehlotra RK, Zimmerman PA. Association of toll-like receptor polymorphisms with HIV status in North Americans. *Genes Immun*. 2014;15(8):569–77.

122. Su R-C, Plesniarski A, Ao Z, Kimani J, Sivro A, Jaoko W, et al. Reducing IRF-1 to Levels Observed in HESN Subjects Limits HIV Replication, But Not the Extent of Host Immune Activation. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy; 2015;4(10):e259. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881757/>
123. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661–81.
124. Jaumdally SZ, Picton A, Tiemessen CT, Paximadis M, Jaspan HB, Gamielien H, et al. CCR5 expression, haplotype and immune activation in protection from infection in HIV-exposed uninfected individuals in HIV-serodiscordant relationships. *Immunology* [Internet]. 2017;151(4):464–73. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.12743>
125. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367–77.
126. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber M, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382(6593):722–6.
127. Levy JA, Sassi GM, Martinez AM de, Paulitsch FS. DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO CCR5 E DELEÇÃO delta -32 EM MÃES E FILHOS HIV-1 INFECTADOS DA CIDADE DO RIO GRANDE. *Vittale*. 2003;15(1):31–52.
128. Moran NA. Microbial minimalism: Genome reduction in bacterial pathogens. *Cell*. 2002;108(5):583–6.
129. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(22):1007–11.
130. Hadfield J, Harris SR, Seth-Smith HMB, Parmar S, Andersson P, Giffard PM, et al. Comprehensive global genome dynamics of *Chlamydia trachomatis* show ancient diversification followed by contemporary mixing and recent lineage expansion. *Genome Res* [Internet]. 2017;27:1220–9. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/content/27/7/1220>
131. Sentausa E, Karkouri K El, Robert C, Raoult D, Fournier PE. Genome sequence of *Rickettsia conorii* subsp. *indica*, the agent of Indian tick typhus. *J Bacteriol*. 2012;194(12):3288–9.
132. Rao Q, Wang S, Zhu DT, Wang XW, Liu SS. Draft genome sequence of *Rickettsia* sp.

- strain MEAM1, isolated from the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Bacteriol.* 2012;194(17):4741–2.
133. Shepard CBC. The Experimental Disease that Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice. *JEM* [Internet]. 1960;112(3):445–54. Disponível em: <http://jem.rupress.org/content/112/3/445>
  134. Sauer MED, Salomão H, Ramos GB, D’Espindula HRS, Rodrigues RSA, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: Expected-and unexpected-developments and perspectives. *Clin Dermatol.* Elsevier Inc.; 2016;34(1):96–104.
  135. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet* [Internet]. 2001;27(4):439–41. Disponível em: [https://www.nature.com/articles/ng0401\\_439](https://www.nature.com/articles/ng0401_439)
  136. Alter A, De Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet.* 2010;127(3):337–48.
  137. Miller EN, Jamieson SE, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, Cordell HJ, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004;5(1):63–7.
  138. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet.* 2003;33(3):412–5.
  139. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc H, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VI, et al. Susceptibility to Leprosy is Associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004;427(6975):636–40.
  140. Ramos GB, Salomão H, Francio AS, Fava VM, Werneck RI, Mira MT. Association Analysis Suggests SOD2 as a Newly Identified Candidate Gene Associated with Leprosy Susceptibility. *J Infect Dis.* 2016;214(3):475–8.
  141. Sales-Marques C, Salomão H, Fava VM, Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Cardoso CC, et al. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum Genet.* 2014;133(12):1525–32.
  142. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* [Internet]. 2007;39(4):517–22. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17353895>
  143. Fava VM, Manry J, Cobat A, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. A Missense LRRK2

Variant Is a Risk Factor for Excessive Inflammatory Responses in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):1–14.

144. Medeiros P, da Silva WL, Gimenez BB de O, Vallezi KB, Moraes MO, Souza VNB de, et al. The GATA3 gene is involved in leprosy susceptibility in Brazilian patients. *Infect Genet Evol*. 2016;39:194–200.
145. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 2006;442(7098):39–44.
146. 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. *Nat Med* [Internet]. 2003;9(5):525–32. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm864>
147. Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, Thwaites GE, Lan NTN, Quy HT, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol*. 2007;37(8):2280–9.
148. Gomes HJP, Souza RLR, Prevedello FC, Mira MT, Chautard-Freire-Maia EA. Investigation of Association between Susceptibility to Leprosy and SNPs inside and near the BCHE Gene of Butyrylcholinesterase. *J Trop Med* [Internet]. 2012 Jan [acesso em 2013 Jan 25];2012:184819. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/184819/abs/>
149. Carlson JH, Porcella SF, McClarty G, Caldwell HD. Comparative Genomic Analysis of *Chlamydia trachomatis* Oculotropic and Genitotropic Strains. *Infect Immun*. 2005;73(10):6407–18.
150. Touchon M, Hoede C, Tenailon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* [Internet]. 2009;5(1):1–25. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000344>
151. Namouchi A, Cimino M, Favre-Rochex S, Charles P, Gicquel B. Phenotypic and genomic comparison of *Mycobacterium aurum* and surrogate model species to *Mycobacterium tuberculosis*: implications for drug discovery. *BMC Genomics* [Internet]. *BMC Genomics*; 2017;18(1):530. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3924-y>
152. Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2005;102(35):12344–9. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/102/35/12344.full.pdf>

153. Garnier T, Eiglmeier K, Camus J-C, Medina N, Mansoor H, Pryor M, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7877–82.
154. Strapagiel D, Borówka P, Marciniak B, Bakula Z, van Ingen J, Safianowska A, et al. Draft genome sequences of *Mycobacterium kansasii* strains 1010001454, 1010001458, 1010001468, 1010001493, 1010001495, and 1010001469, isolated from environmental sources. *Genome Announc* [Internet]. 2016;4(3):e00456-16. Disponível em: <http://genomea.asm.org/content/4/3/e00456-16.full.pdf>
155. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin G a, Davies JK, Johnson PDR, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*. 2008;18:729–41.
156. Yoshida M, Nakanaga K, Ogura Y, Toyoda A, Ooka T, Kazumi Y, et al. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*. *Genome Announc* [Internet]. 2016;4(5):e1050-16. Disponível em: <http://genomea.asm.org/content/4/5/e01050-16.full.pdf>
157. Gibson DG, Benders G a, Andrews-Pfannkoch C, Denisova E a, Baden-Tillson H, Zaveri J, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 2008;319(5867):1215–20.
158. Stover CK, Pham XQ, Erwin a L, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959–64.
159. Deng W, Liou S, Iii GP, George F, Rose DJ, Burland V, et al. Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18 †. *J Bacteriol*. 2003;185(7):2330–7.
160. Wei J, Goldberg MB, Burland V, Venkateson MM, Deng W, Fournier G, et al. Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of *Shigella flexneri* 2a Strain 2457T. *Infect Immun*. 2003;71(5):2775–86.
161. Holden MTG, Feil EJ, Lindsay J a, Peacock SJ, Day NPJ, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004;101(26):9786–91. Disponível em:

<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402521101>

162. Deng W, Burland V, Iii G, Boutin A, Mayhew G, Liss P, et al. Genome Sequence of *Yersinia pestis* KIM Genome Sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol.* 2002;184(16):4601–11.
163. Boleira M, Lupi O, Lehman L, Asiedu KB, Kiszewski AE. Úlcera de Buruli. *An Bras Dermatol.* 2010;85(3):281–301.
164. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the Human Genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(4):589–620.
165. McKusick VA, Bocchin CA. OMIM,+177400 BUTYRYLCHOLINESTERASE; BCHE [Internet]. 2013 [acesso em 2016 Feb 2]. Disponível em: <http://omim.org/entry/177400>
166. Zhou G, Marathe GK, Hartiala J, Hazen SL, Allayee H, Wilson Tang WH, et al. Aspirin hydrolysis in plasma is a variable function of butyrylcholinesterase and platelet-activating factor acetylhydrolase 1b2 (PAFAH1b2). *J Biol Chem.* 2013;288(17):11940–8.
167. Grasing K, Mathur D, DeSouza C, Newton TF, Moody DE, Sturgill M. Cocaine Cardiovascular Effects and Pharmacokinetics After Treatment With the Acetylcholinesterase Inhibitor Donepezil. *Am J Addict.* 2016;25:392–9.
168. Xue L, Hou S, Yang W, Fang L, Zheng F, Zhan C-G. Catalytic activities of a cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase against (+)- and (-)-cocaine. *Chem Biol Interact.* 2013;203(1):57–62.
169. Dell DD, Kehoe C. Plasma cholinesterase deficiency. *J Perianesth Nurs.* 1996;11(5):304–8.
170. Geyer BC, Larrimore KE, Kilbourne J, Kannan L, Mor TS. Reversal of Succinylcholine Induced Apnea with an Organophosphate Scavenging Recombinant Butyrylcholinesterase. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(3):1–7. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371/journal.pone.0059159.PDF>
171. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* [Internet]. 1987 Jan 15;262(2):549–57. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542989>
172. Allderdice PW, Gardner H a, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics.* 1991 Oct;11(2):452–4.
173. NCBI. NCBI Map Viewer - Chromosome 3 [Internet]. 2016 [acesso em 2017 Jun 21]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>

174. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Oct 17 [acesso em 2012 Nov 2];278(42):41141–7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869558>
175. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;148:34–46. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.011>
176. Bajda M, Więckowska A, Hebda M, Guzior N, Sotriiffer CA, Malawska B. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):5608–32.
177. Reid GA, Chilukuri N, Darvesh S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience*. 2013;234:53–68.
178. Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, et al. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;293(3):896–902.
179. Layer PG, Allebrandt K, Andermann P, Bodur E, Boopathy R, Bytyqi AH, et al. On the multifunctionality of cholinesterases. *Chem Biol Interact*. 2005;157–158(December):37–41.
180. Barricklow J, Blatnik M. 2-Arachidonoylglycerol is a substrate for butyrylcholinesterase: A potential mechanism for extracellular endocannabinoid regulation. *Arch Biochem Biophys*. Elsevier Inc.; 2013;536(1):1–5.
181. Romani R, Galeazzi R, Rosi G, Fiorini R, Pirisinu I, Ambrosini A, et al. Anandamide and its congeners inhibit human plasma butyrylcholinesterase. Possible new roles for these endocannabinoids? *Biochimie* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2011;93(9):1584–91. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.024>
182. Rosenberg YJ, Gearhart J, Mao L, Jiang X, Hernandez-Abanto S. Protection against paraoxon toxicity by an intravenous pretreatment with polyethylene-glycol-conjugated recombinant butyrylcholinesterase in macaques. *Chem Biol Interact*. 2014;210:20–5.
183. Lockridge O, Masson P. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*. 2000;21(1–2):113–26.
184. BCHE butyrylcholinesterase [ Homo sapiens] [Internet]. National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, National Institute of

- Health. 2018 [acesso em 2018 Jan 22]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/590>
185. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656–60.
  186. Chen P, Gao Y, Geng L, Ping V, Gao Y, Geng L, et al. Plasma butyrylcholinesterase regulates ghrelin to control aggression. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(12):201503913.
  187. De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: Identification of the cleavage sites. *Endocrinology*. 2004;145(11):4997–5005.
  188. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in obesity. *Diabetes*. 2001;50(Table 1):707–9.
  189. Alcântara VM, Oliveira LC, Réa RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Dec;27(12):1557–64.
  190. Brimijoin S, Chen VP, Pang Y-P, Geng L, Gao Y. Physiological Roles for Butyrylcholinesterase: A BChE-Ghrelin Axis. *Chem Biol Interact*. 2016;259:271–5.
  191. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002;420(19/26):853–9.
  192. Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-KB phosphorylation and nuclear factor-KB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$ . *Clin Exp Immunol*. 2006;146(1):116–23.
  193. Pohanka M.  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):2219–38.
  194. Tracey KJ. Physiology and Immunology of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway. *J Clin Invest*. 2007;117(2):289–96.
  195. Pohanka M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int J Mol Sci*. 2014;15:9809–25.
  196. Hoover DB. Pharmacology & Therapeutics Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.002>
  197. Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin.

- Nature. 2000;405(6785):458–62.
198. Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F, et al. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett*. 1999;266(1):17–20.
  199. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci*. Elsevier Ltd; 2017;134(1):1–21.
  200. Primo-Parmo SL, Chautard-Freire-Maia EA. Absence of Linkage Between the Serum Cholinesterase ( CHE1 ) and Rhesus ( RH ) Loci. *Hum Hered*. 1982;60:284–6.
  201. Gaughan G, Park H, Priddle J, Craig I, Craig S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics*. 1991;11(2):455–8.
  202. BCHE. Genetics Home Reference [Internet]. US National Library of Medicine, US Department of Health and Human Services. 2012 [acesso em 2017 Aug 10]. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCHE#location>
  203. Castillo JC, Beer EJ. The neuromuscular blocking action of succinylcholine (Diacetylcholine). *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1950;99(4):458–64. Disponível em: <http://jpet.aspetjournals.org/content/jpet/99/4/458.full.pdf>
  204. Birch JH, Foldes FF, Rendell-Baker L, Rendell-Baker MB, Birch JH. Causes and prevention of prolonged apnea with succinylcholine. *Anesth Analg*. 1956;35(6):609–33.
  205. Lockridge O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther* [Internet]. 1990;47(1):35–60. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163725890900443>
  206. Evans F, Gray P, Lehmann H, Silk E. Sensivity to succinylcholine in relation to serum cholinesterase. *Lancet*. 1952;259(6721):1229–30.
  207. Kalow W. The relation of plasma cholinesterases to response to clinical doses of succinylcholine. *Can Anaesth Soc J* [Internet]. 1956;3(1):22–30. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03016739>
  208. Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol* [Internet]. 1957 Jun;35(6):339–46. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13437188>

209. Simão-Silva D, Bertolucci P, Labio R, Payão S, Furtado-Alle L, Souza R. Association analysis between K and - 116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer ' s disease in a Brazilian population. *Chem Biol Interact.* 2013;203:358–60.
210. Sridhar GR, Thota H, Allam AR, Suresh Babu C, Siva Prasad A, Divakar C. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: the cholinesterase connection? *Lipids Health Dis.* 2006 Jan;5:28–32.
211. Bartels CF, Spek AFL Van Der, La Du BN. Two polymorphisms in the non- coding regions of the BCHE gene. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(20):6171.
212. Chaves T, Leite N, Milano G, Milano G, Souza R, Chautard-Freire-Maia EA, et al. - 116A and K BCHE gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. *Chem Biol Interact.* 2013;203:341–3.
213. Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Interact.* 2008;175(1–3):115–8.
214. Yen T, Nightingale BN, Burns JC, Sullivan DR, Stewart PM. Butyrylcholinesterase (BCHE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. *Clin Chem.* 2003;49(8):1297–308.
215. Benyamin B, Middelberg RP, Lind PA, Valle AM, Gordon S, Nyholt DR, et al. GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Hum Mol Genet.* 2011;20(22):4504–14.
216. HARRIS H, HOPKINSON DA, ROBSON EB, WHITTAKER M. Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. *Ann Hum Genet.* 1963;26(4):359–82.
217. Souza RLR, Furtado L, Diniz ACP, Silva ACD, Kaiss J, Petzl-Erler ML, et al. Studies on a heterologous complex formed by human butyrylcholinesterase. *Biochem Genet.* 2003;41(5–6):141–50.
218. Masson P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol.* 1989;998(3):258–66.
219. Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G, Lourenço MAC, Vieira MM. The C5 Isozyme of Serum Cholinesterase and Adult Weight. *Hum Hered.* 1991;41:330–9.
220. Alcântara VM, De Lourenço MA, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Coimbra CE, Santos R

- V, et al. Butyrylcholinesterase polymorphisms (BCHE and CHE2 loci) in Brazilian Indian and admixed populations. *Hum Biol.* 1995;67(5):717–26.
221. De Andrade FA, Batistela MS, Amaral SDC, Dos Santos W, Mikami LR, Chautard-Freire-Maia EA, et al. Association between RAPH1 Gene Haplotypes and CHE2 Locus Phenotypes. *Ann Hum Genet.* 2016;80(4):203–9.
222. Schopfer L, Delacour H, Masson P, Leroy J, Krejci E, Lockridge O. The C5 Variant of the Butyrylcholinesterase Tetramer Includes a Noncovalently Bound 60 kDa Lamellipodin Fragment. *Molecules* [Internet]. 2017;22(7):1083. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/7/1083>
223. Brass N, Racz A, Heckel D, Remberger K, Sybrecht GW, Meese EU. Amplification of the genes *bche* and *slc2a2* in 40-percent of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 1997;57(11):2290–4.
224. Li Y-W, Bai L, Dai L-X, He X, Zhou X-P. Chromosomal and Genetic Analysis of a Human Lung Adenocarcinoma Cell Line OM. *Chin Med J (Engl).* 2016;129(4):405–9.
225. Prabhu K, Naik D, Ray S, Vadiraj, Rao A, Kamath A. Significance of serum butyrylcholinesterase levels in oral cancer. *Australas Med J.* 2011;4(7):374–8.
226. Kumar R, Razab S, Prabhu K, Ray S, Prakash B. Serum butyrylcholinesterase and zinc in breast cancer. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2017;13(2):367–70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28643762>
227. Gao Y, Liu X, Li T, Wei L, Yang A, Lu Y, et al. Cross-validation of genes potentially associated with overall survival and drug resistance in ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2017;37(5):3084–92.
228. Koie T, Ohyama C, Yamamoto H, Hatakeyama S, Imai A, Yoneyama T, et al. Significance of Preoperative Butyrylcholinesterase As an Independent Predictor of Survival in Patients With Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated With Radical Cystectomy. *J Urol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;193(4):e723. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534715024556>
229. Gu S-Z, Zhao X-H, Ping Q, Li S-B, Pan B-R. Alterations of serum cholinesterase in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2005;11(29):4604–6.
230. Koie T, Ohyama C, Hatakeyama S, Imai A, Yoneyama TT, Hashimoto Y, et al. Significance of preoperative butyrylcholinesterase as an independent predictor of biochemical recurrence-free survival in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Int J Clin Oncol.* Springer Japan; 2016;21(2):379–83.
231. Iwamura H, Koie T, Mikami J, Fujita N, Sato T, Kojima Y, et al. Preoperative

- butyrylcholinesterase level as an independent predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma patients treated with nephrectomy. *Eur Urol Suppl* [Internet]. 2015;14(2):e203. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=71831165>
232. Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis*. 2005;9(3):383–98.
233. Munshaw S, Hwang HS, Torbenson M, Quinn J, Hansen KD, Astemborski J, et al. Laser captured hepatocytes show association of butyrylcholinesterase gene loss and fibrosis progression in hepatitis C-infected drug users. *Hepatology*. 2012;56(2):544–54.
234. De Freitas LZ, Feres F, Costa JR, Abizaid A, Staico R, Costa R, et al. Tratamento de reestenose intrastent com o novo stent farmacológico Firebird(TM), liberador de sirolimus - Resultados angiográficos e ultrassonográficos de um ano de evolução. *Rev Bras Cardiol Invasiva*. 2010;18(4):379–86.
235. Pleva L, Kovarova P, Faldynova L, Plevova P, Hilscherova S, Zapletalova J, et al. The rs1803274 polymorphism of the BCHE gene is associated with an increased risk of coronary in-stent restenosis. *BMC Cardiovasc Disord* [Internet]. *BMC Cardiovascular Disorders*; 2015;15(1):1–9. Disponível em: <https://bmccardiovascdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12872-015-0128-8>
236. Lima JK, Leite N, Turek LV, Souza RLR, da Silva Timossi L, Osiecki ACV, et al. 1914G variant of BCHE gene associated with enzyme activity, obesity and triglyceride levels. *Gene*. Elsevier B.V.; 2013;532(1):24–6.
237. Steiner D, Villas RT, Bedin V, Steiner T, Moraes MB. Vitiligo. *An Bras Dermatologia bras dermatol*. 2004;79(3):335–51.
238. Spritz R. The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *J Dermatol Sci*. 2006;41:3–10.
239. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 $\beta$  processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Feb 19 [acesso em 2016 Oct 13];110(8):2952–6. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/110/8/2952>
240. Schallreuter KU, Gibbons NCJ, Zothner C, Elwary SM, Rokos H, Wood JM. Butyrylcholinesterase is present in the human epidermis and is regulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: More evidence for oxidative stress in vitiligo. *BBRC*. 2006;349(3):931–8.

241. Schallreuter KU. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Vitiligo. *Syst Biol Free Radicals Antioxidants*. 2014;(May):3697–736.
242. Guerra L, Dellambra E, Brescia S, Raskovic D. Vitiligo: pathogenetic hypotheses and targets for current therapies. *Curr Drug Metab*. 2010;11(5):451–67.
243. Nascimento L, Castro C, Fava V, Werneck R, Mira M. Genetic and biochemical evidence implicates the butyrylcholinesterase gene BCHE in vitiligo pathogenesis. *Exp Dermatol*. 2015;24(12):976–8.
244. Suneetha LM, Bahumathy CD, Solomon SS, Suneetha S, Korula RJ, Balasubramanian AS. Cholinesterase in leprosy nerves: a preliminary report. *Int J Lepr other Mycobact Dis*. 2002;70(3):208–10.
245. Suneetha LM, Karunakar V, Mehervani BS, Kaurna MS, Reddy RG, Suneetha S. Serum butyrylcholinesterase activity in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004;72(3):324–6.
246. Polachini CRN, Spanevello RM, Casali EA, Zanini D, Pereira LB, Martins CC, et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience [Internet]*. IBRO; 2014;266:266–74. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.048>
247. Di Bari M, Reale M, Di Nicola M, Orlando V, Galizia S, Porfilio I, et al. Dysregulated homeostasis of acetylcholine levels in immune cells of RR-multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1–12.
248. Shahmohamadnejad S, Vaisi-Raygani A, Shakiba Y, Kiani A, Rahimi Z, Bahrehmand F, et al. Association between butyrylcholinesterase activity and phenotypes, paraoxonase192 rs662 gene polymorphism and their enzymatic activity with severity of rheumatoid arthritis: Correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress, preliminary . *Clin Biochem*. The Canadian Society of Clinical Chemists; 2015;48(1–2):63–9.
249. Sykam A, Gutlapalli VR, Tenali SP, Meena AK, Chandran P, Suneetha S, et al. Anticeramide antibody and butyrylcholinesterase in peripheral neuropathies. *J Clin Neurosci*. 2017;42:204–8.
250. Haghazari L, Vaisi-Raygani A, Keshvarzi F, Ferdowsi F, Goodarzi M, Rahimi Z, et al. Effect of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase on intrauterine insemination, contribution to inflammations, Oxidative stress and antioxidant status; a preliminary report. *J Reprod Infertil*. 2016;17(3):157–62.

251. Darreh-Shori T, Soininen H. Effects of Cholinesterase Inhibitors on the Activities and Protein Levels of Cholinesterases in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease: A Review of Recent Clinical Studies. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2010 Feb 1 [acesso em 2012 Nov 3];7(1):67–73. Disponível em: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1567-2050&volume=7&issue=1&spage=67>
252. Greig NH, Utsuki T, Yu QS, Zhu XX, Holloway HW, Perry T, et al. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin*. 2001;17(3):159–65.
253. Ruberg M, Rieger F, Villageois A, Bonnet AM, Agid Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. *Brain Res*. 1986;362(1):83–91.
254. Solecka J, Gušpiel A, Postek M, Ziemka J, Kawęcki R, Łęczycka K, et al. New derivatives of 3,4-dihydroisoquinoline-3-carboxylic acid with free-radical scavenging, d-amino acid oxidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Molecules* [Internet]. 2014;19(10):15866–90. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/10/15866/htm>
255. Kamal MA, Shakil S, Nawas MS, Yu Q, Holloway HW, Tan Y, et al. Inhibition of Butyrylcholinesterase with Fluorobenzylcymserine , an experimental Alzheimer ' s drug candidate : validation of enzoinformatics results by classical and innovative enzyme kinetic analyses . *CNS Neurol Disord Drug Targets* [Internet]. 2017;Epub ahead. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/149874/article>
256. Wu J, Tian Y, Wang S, Pistolozzi M, Jin Y, Zhou T, et al. Design, synthesis and biological evaluation of bambuterol analogues as novel inhibitors of butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem*. 2017;126(January):61–71.
257. Kandiah N, Pai M-C, Senanarong V, Looi I, Ampil E, Park KW, et al. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging*. 2017;Volume 12:697–707.
258. Sicinska P, Bukowska B, Pajak A, Koceva-Chyla A, Pietras T, Nizinkowski P, et al. Decreased activity of butyrylcholinesterase in blood plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Med Sci*. 2017;13(3).
259. Thomas M, Job CK, Kurian P V. Susceptibility to leprosy and serum atypical pseudo-cholinesterase. *Int J Lepr other Mycobact Dis*. 1976;44(3):315–8.

260. Thomas M, Job CK. Serum Atypical Pseudocholinesterase and Genetic Factors in Leprosy. *Br Med J*. 1972;3(August):390–1.
261. Steinitz K, Eichhorn F, Zelmanowski S. Screening Tests for the "Atypical" and "Intermediate" Serum-Cholinesterase Types. *Lancet*. 1963;282(7313):883–4.
262. Smith S. Atypical pseudocholinesterase in leprosy. *Br Med J* [Internet]. 1972 Dec;4:827–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/528104>
263. La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Hajra A, Lightstone H, van der Spek A, et al. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin Biochem*. 1990;23(5):423–31.
264. Navarrete JI, Lisker R, Pérez-Briceño R. Serum atypical pseudocholinesterase and leprosy. *Int J Dermatol*. 1979 Dec;18(10):822–3.
265. Agarwal DP, Goedde HW, Schloot W, Flatz G, Rohde R. A Note on Atypical Serum Cholinesterase and Genetic Factors in Leprosy. *Hum Hered* [Internet]. 1973 [acesso em 2013 Jan 21];23(4):370–3. Disponível em: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000152599>
266. Morrow AC, Motulsky AG. Rapid screening method for the common atypical pseudocholinesterase variant ☆. *J Lab Clin Med*. 1968;71(2):350–6.
267. Whittaker M, Britten JJ, Wicks RJ. Inhibition of Plasma Cholinesterase Variants by Propranolol. *Br J Anaesth*. 1981;53:511–6.
268. Garry PJ. A Manual and Automated Procedure for Measuring Serum Cholinesterase Activity and Identifying Enzyme Variants Differentiation by Means of Tris and Phosphate Buffers. *Clin Chem*. 1971;17(3):192–8.
269. Harris H, Whittaker M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature*. 1961;29(191):496–8.
270. Whittaker M, Lowe RF, Ellis BPB. Serum Cholinesterase Variants in African Leprosy Patients Resident in Rhodesia. *Hum Hered* [Internet]. 1976 [acesso em 2013 Jan 25];26(5):372–9. Disponível em: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000152829>
271. La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Arpagaus M, Lockridge O. Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cell Mol Neurobiol*. 1991 Feb;11(1):79–89.
272. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* [Internet]. 2011;334(6052):98–101. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/sci/334/6052/98.full.pdf>

273. Thangaraj G, Manakov V, Cucu A, Fournier C, Layer PG. Inflammatory effects of TNFalpha are counteracted by X-ray irradiation and AChE inhibition in mouse micromass cultures. *Chem Biol Interact* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;1–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.027>
274. Souza RLR, Mikami LR, Maegawa ROB, Chautard-Freire-Maia EA. Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metab*. 2005;84(4):349–53.
275. Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CCO, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A Major Gene Controls Leprosy Susceptibility in a Hyperendemic Isolated Population from North of Brazil. *J Infect Dis*. 2010;201(10):1598–605.
276. John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(2):408.
277. Maher B. How it Works: Real Time PCR [Internet]. *The Scientist*. [acesso em 2019 Apr 28]. Disponível em: <https://www.the-scientist.com/uncategorized/how-it-works-real-time-pcr-46975>
278. Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres D, Santos A dos. *BioEstat - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas* [Internet]. Belém, PA: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; 2007. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53/>
279. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* [Internet]. 2005;21(2):263–5. Disponível em: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/21/2/263.full.pdf+html>
280. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(4):301–6.
281. Self SG, Longton G, Kopecky KJ, Liang K-Y. On Estimating HLA/Disease Association with Application to a Study of Aplastic Anemia. *Biometrics*. 1991;47:53–61.
282. Siegmund KD, Gauderman WJ, Thomas DC. Association Tests Using Unaffected-Sibling Versus Pseudo-Sibling Controls. *Genet Epidemiol*. 1999;17(Suppl 1):S731–6.
283. SAS University Edition [Internet]. SAS Institute Inc. [acesso em 2017 Jul 16]. Disponível em: [https://www.sas.com/pt\\_br/software/university-edition.html](https://www.sas.com/pt_br/software/university-edition.html)
284. Ioannidis JPA, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication Validity of Genetic Association Studies. *Nat Genet*. 2001;29:306–9.
285. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of Reported Genetic

- Risk Factors for Acute Coronary Syndrome in a Large-Scale Replication Study. *Jama*. 2007;297(14):1551.
286. Ikari K, Kuwahara M, Nakamura T, Momohara S, Hara M, Yamanaka H, et al. Association between PADI4 and Rheumatoid Arthritis: A replication study. *Arthritis Rheum*. 2005;52(10):3054–7.
287. Feitosa MF, Krieger H. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. *Cien Saude Colet*. 2002;7(1):73–83.
288. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;361(27):2609–18. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0903753>
289. Zhang F, Liu H, Chen S, Low H, Sun L, Cui Y, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet* [Internet]. 2011;43(12):1247–51. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.973>
290. Grant A V., Alter A, Huong NT, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. Crohn's Disease Susceptibility Genes are Associated With Leprosy in the Vietnamese Population. *J Infect Dis* [Internet]. 2012;206(11):1763–7. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jis588>
291. Liu H, Irwanto A, Fu X, Yu G, Yu Y, Sun Y, et al. Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects in leprosy. *Nat Genet*. 2015;47(3):267–71.
292. Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T. E1k, Another Quantitative Variant at Cholinesterase Locus I. *J Med Genet*. 1978;15:27–9.
293. NCBI. dbSNP [Internet]. National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, National Institute of Health. [acesso em 2018 Feb 6]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
294. Souza RLR, Castro RM V, Pereira L, Freund AA, Culpi L, Chautard-Freire-Maia EA. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of european and african origin. *Hum Biol*. 1998;70(5):965–70.
295. Sánchez L, Medina O, Gómez G, González C, Flórez-Vargas Ó. Laboratory genetic-based reference values for cholinesterase activity in a Colombian population: A step forward in personalized diagnostics. *Biomédica*. 2015;35:20–9.
296. Silva-Alves H, Petzl-Erlar ML, Chautard-Freire-Maia EA, Souza RLR. Variability of the BCHE gene in Amerindians from Paraná, Brazil. *Am J Hum Biol*. 2011;23(4):556–9.
297. Shields K, Lewis J. The Identification of Butyrylcholinesterase (BCHE) Polymorphisms in a Small Australian Defence Force Cohort [Internet]. *Human Protection and*

- Performance Division, DSTO - Defence Science and Technology Organisation, Australia. 2011 [acesso em 2018 Feb 6]. Disponível em: <http://dspace.dsto.defence.gov.au/dspace/bitstream/1947/10114/1/DSTO-TR-2503PR.pdf>
298. Guimarães LO, De Andrade FA, Bono GF, Setoguchi TE, Brandão MB, Chautard-Freire-Maia EA, et al. Gestational diabetes mellitus (GDM) decreases butyrylcholinesterase (BChE) activity and changes its relationship with lipids. *Genet Mol Biol*. 2014;37(1):1–6.
299. Schreuder PAMM, Noto S, Richardus JH. Epidemiologic trends of leprosy for the 21st century. *Clin Dermatol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;34(1):24–31. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2015.11.001>
300. Gaschignard J, Grant AV, Thuc N Van, Orlova M, Cobat A, Huong NT, et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016;10(5):1–20. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004345>
301. Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;11(6):464–70. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70006-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70006-8)
302. Corrêa RGCF, Aquino DMC de, Caldas AJM, Amaral DKCR, França FS, Mesquita ERBP-L. Epidemiological , clinical , and operational aspects of leprosy patients assisted at a referral service in the state of Maranhão , Brazil. *Rev Bras Med Trop*. 2012;45(1):89–94.
303. Deps PD, Guedes BVS, Bucker Filho J, Andreatta MK, Marcari RS, Rodrigues LC. Delay in the diagnosis of leprosy in the Metropolitan Region of Vitória, Brazil. *Lepr Rev*. 2006;090(77):41–7.
304. Arantes CK, Garcia MLR, Filipe MS, Nardi SMT, Paschoal VD. Avaliação dos serviços de saúde em relação ao diagnóstico precoce da hanseníase. *Epidemiol Serv Saúde*. 2010;19(2):155–64.
305. Lockwood DN, Reid AJ. The Diagnosis of Leprosy is Delayed in the United Kingdom. *Q J Med*. 2001;94(4):207–12.
306. Mackert CCO, Mira MT, Xavier MB. Estudo de base populacional de fatores epidemiológicos de risco em hanseníase. 2008.
307. Elsia Belo I, José Camilo H-G, Luiza G, Antônio L, Maria da Graça C, Valderiza P. Perfil epidemiológico da hanseníase em menores de quinze anos de idade, Manaus

- (AM), 1998-2005 / Epidemiological profile of leprosy in children under 15 in Manaus (Northern Brazil), 1998-2005 / Perfil epidemiológico de la hanseníasis en menores de quince. *Rev Saude Publica*. 2008;42(6):1021–6.
308. Lana FCF, Amaral EP, Lanza FM, Lima PL, Carvalho APN de, Diniz LG. Hanseníase em menores de 15 anos no Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Enferm*. 2007;60(6):696–700.
309. Brito AL, Monteiro LD, Ramos Junior AN, Heukelbach J, Alencar CH. Tendência temporal da hanseníase em uma capital do Nordeste do Brasil: epidemiologia e análise por pontos de inflexão, 2001 a 2012. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2016;19(1):194–204. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-790X2016000100194&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2016000100194&lng=pt&tlng=pt)
310. Costa LA, Borba-Pinheiro CJ, Reis JH dos, Reis SH dos. Análise epidemiológica da hanseníase na Microrregião de Tucuruí, Amazônia brasileira, com alto percentual de incapacidade física e de casos entre jovens. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2017;8(3):9–17. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v8n3/2176-6223-rpas-8-03-00009.pdf>
311. Martins RJ, Carloni MEOG, Moimaz SAS, Garbin CAS, Garbin AJÍ. Sociodemographic and epidemiological profile of leprosy patients in an endemic region in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(6):777–80.
312. Guerra-Silveira F, Abad-Franch F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(4):1–13. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062390>
313. Varkevisser CM, Lever P, Alubo O, Burathoki K, Idawani C, Moreira TMA, et al. Gender and leprosy: case studies in Indonesia, Nigeria, Nepal and Brazil. *Lepr Rev*. 2009;80:65–76.
314. Lane JE, Meyers WM, Walsh DS. Armadillos as a source of leprosy infection in the southeast. *South Med J*. 2009;102(1):113–4.