

Instituto Lauro de Souza Lima

**“Estudo de associação do SNP1058240 no gene
GATA3 com a hanseníase”**

Rodrigo Mendes de Camargo

Bauru

2016

Rodrigo Mendes de Camargo

**“Estudo de associação do SNP1058240 no gene
GATA3 com a hanseníase”**

Monografia apresentada ao Programa de
Aprimoramento Profissional em Análises
Clínicas da Secretaria de Estado da Saúde do
Instituto Lauro de Souza Lima.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carla Pereira Latini

Bauru

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO
INSTITUTO "LAURO DE SOUZA LIMA"

C14e CAMARGO, Rodrigo Mendes de.

Estudo de associação do SNP1058240 no gene GATA3 com a hanseníase / Rodrigo Mendes de Camargo, Bauru, 2016.
31f.: il.

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional em Análises Clínicas/ Laboratório de Saúde Pública da Secretaria de Estado da Saúde do Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Dra. Ana Carla Pereira Latini.

1. Hanseníase. 2. SNP. 3. GATA3. 4. Estudo de Associação. 5. rs1059240. I. Latini, Ana Carla Pereira. II. Título.

WC335

RESUMO

A hanseníase é uma patologia causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo que infecta macrófagos e células de Schwann, gerando lesões cutâneas e comprometendo nervos periféricos. Ocupa importante papel nas ações do Ministério da Saúde, uma vez que o Brasil está em segundo lugar no ranking mundial em número de casos da doença. Estudos prévios indicaram associação da região cromossômica 10p13 com a hanseníase paucibacilar. O gene *GATA3*, localizado na região 10p15, é assim um candidato posicional e funcional para a associação com a hanseníase, já que induz a resposta Th2 que é permissiva para a replicação do *M. leprae*. O polimorfismo genético rs10905284 no gene *GATA3*, já associado à hanseníase *per se* na população brasileira, está localizado em um intron próximo à região 3'UTR e a apenas 1220pb do polimorfismo rs1058240, que está em um sítio de ligação de microRNA. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a associação do SNP rs1058240 no gene *GATA3* com a hanseníase *per se* aplicando um estudo de associação baseado em população. Para tanto, 1.785 indivíduos de duas amostras caso-controle foram incluídas no desenho do estudo: 835 indivíduos de Rondonópolis-MT e 950 do Estado de São Paulo. A análise de regressão logística univariada, com e sem ajuste para as co-variáveis sexo e etnia, demonstrou que o alelo rs1058240 não está associado à hanseníase *per se* ou suas formas clínicas na população de Rondonópolis. Respeitando o desenho proposto inicialmente, a investigação da população do estado de São Paulo não foi realizada. A análise de desequilíbrio de ligação (LD) demonstrou que o polimorfismo rs1058240 não está em LD com o previamente associado à hanseníase (rs10905284). Assim, concluímos que o polimorfismo rs1058240 no gene *GATA3* não está associado à hanseníase, e que o efeito observado para o rs10905284 é independente do polimorfismo avaliado neste estudo.

Palavras chave: hanseníase, polimorfismo genético, *GATA3*, estudo de associação, rs1058240.

ABSTRACT

Leprosy is a disease caused by *Mycobacterium leprae* that infects macrophages and Schwann cells that leads to cutaneous injuries and compromises peripheral nerves. It plays an important role in the Brazilian Health Ministry actions, since Brazil ranks second in the worldwide rank in numbers of cases. Ligation studies have indicated an association of chromosomal region 10p13 to clinical forms of leprosy. The *GATA3* gene at chromosomal region 10p15 is a functional and positional candidate gene for leprosy susceptibility. It induces Th2 immune response, which favors *M. leprae* replication. The rs10905284 genetic polymorphism, located in an intron of *GATA3* and close to the 3'UTR region was associated to leprosy *per se*. It is 1,220bp from another polymorphism, rs1058240, which is in a microRNA binding site. Thus, our aim was to investigate if the rs1058240 polymorphism is associated to leprosy *per se* through a population-based association study. Therefore, 1,785 individuals from two case-control samples were included in the design: 835 individuals from Rondonópolis-MT and 950 from São Paulo state. The logistic regression models analysis did not point association between rs1058240 polymorphism and leprosy. The linkage disequilibrium (LD) analysis demonstrated that these markers are not in LD. We conclude that rs1058240 polymorphism is not associated to leprosy and that the effect of rs10905284 is independent.

Keywords: leprosy, genetic polymorphism, *GATA3*, association studies, rs1058240.

INTRODUÇÃO

Histórico

A hanseníase é uma doença cujos relatos históricos remontam há milênios, sendo desde o início uma moléstia estigmatizada, na maioria das vezes vinculada às crendices religiosas, tais como castigos e punições divinas, o que acarretava aos portadores da doença um fator de exclusão social, em decorrência da falta de conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença (PREVEDELLO & MIRA, 2007). Todavia, tais relatos revelam-se imprecisos, uma vez que a doença era freqüentemente confundida com outras dermatoses devido a certas similaridades nos sinais clínicos (EIDT, 2004).

Os avanços no entendimento da doença começaram no século XIX, quando os médicos Daniel C. Daniellssen e Carl W. Boeck, que defendiam a teoria do caráter hereditário da doença, entraram em conflito com o trabalho de Hansen demonstrando que a hanseníase seria causada pelo *Mycobacterium leprae* (ARAUJO, 2003). Como o contágio e o tratamento eram desconhecidos, a tentativa de contenção da doença era feita por meio da reclusão dos pacientes hansenianos, dando origem aos leprosários. Este modelo isolacionista foi incorporado à política de saúde pública brasileira de contenção da doença na década de 30, dando origem aos asilos-colônias que, com o tempo, mostraram-se ineficientes quanto ao seu propósito e, por volta da década de 50, deixaram de ser uma medida recomendada (MARZLIAK et al., 2008).

Mesmo com os atuais avanços, tanto no diagnóstico como no tratamento da hanseníase, a procura por assistência médica por parte dos portadores da doença ainda é um fator limitante para a sua erradicação, uma vez que permanece vinculada aos preconceitos populares, o que contribui para os índices epidemiológicos elevados no Brasil (COSTA, 2008).

Epidemiologia

A hanseníase ocupa um papel de destaque nas ações prioritárias do Ministério da Saúde, uma vez que o Brasil está em segundo lugar em números de

casos da doença, ficando atrás apenas da Índia, e apresentando 31.064 novos casos de hanseníase no ano de 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os fatores que determinam a manifestação da hanseníase são de caráter múltiplo e complexo, estando concomitantemente relacionados ao hospedeiro, patógeno e ambiente. A associação destes fatores corrobora para a manutenção destes índices elevados (MENDONÇA et al., 2008).

Mycobacterium leprae

Identificado em 1873 pelo médico Gerard Henrik Armaeur Hansen como o agente causador da lepra, o *Mycobacterium leprae* apresenta-se como bacilo Gram positivo, reto ou ligeiramente encurvado, com as extremidades arredondadas, medindo de 1 a 8 µm de comprimento por 0,3 µm de diâmetro. Também apresenta replicação lenta, em torno de 13 dias (MENESES, 2013).

Este bacilo pertence a ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae*, sendo classificado como álcool-ácido resistente (BAAR) devido à elevada concentração de lipídeos presente em sua parede celular, revelada por meio da coloração de Ziehl-Neelsen, onde a fucsina se associa fortemente aos lipídeos, não sendo removida pela descoloração feita com a solução de álcool-ácido (REZENDE, 2012).

Uma de suas características mais marcantes é o não crescimento em meios de cultura artificiais, o que acarreta aos pesquisadores a necessidade de cultivar o bacilo por meio de técnicas de inoculação em mamíferos, como camundongos e tatus. Isso tem representado uma dificuldade no avanço dos estudos da doença, devido às intempéries da técnica, como por exemplo, o longo tempo necessário para a obtenção de microrganismos viáveis após a inoculação no animal (TRUMAN; KRAHENBUHL, 2001).

O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório que infecta macrófagos e as células de Schwann, tendo preferência por regiões do corpo com temperaturas ligeiramente inferiores a 37°C, como mucosas, pele e nervos periféricos. Por infectar as células de Schwann, constituintes da bainha de mielina, provoca o espessamento dos nervos, bem como o bloqueio da transmissão do impulso elétrico

através do mesmo, que leva a parestesia no local da lesão (MENDONÇA et al., 2008).

O seqüenciamento genômico do *M. leprae*, realizado entre 1993 e 2000, revelou um genoma com variabilidade genética reduzida quando comparada com outras espécies do gênero *Mycobacterium*, como o *M. tuberculosis*, o que representa uma possível explicação para a dificuldade em cultivar o bacilo *in vitro*, ou mesmo a alta especificidade com as células do hospedeiro. Compreende-se que o genoma do bacilo sofreu uma evolução reductiva, o que levou às restrições em seu metabolismo (STEFANI, 2008). A partir do seqüenciamento do *M. leprae*, também se tornou possível o uso da biologia molecular no diagnóstico da hanseníase, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se seqüências específicas do bacilo para a identificação da presença do mesmo (STEFANI, 2008).

Estudos recentes revelaram a existência de variações em sete cepas de *M. leprae* obtidas de diversas regiões do globo terrestre, incluindo uma variedade proveniente do Brasil. Para esta análise foram utilizados polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs). Quando estas cepas foram comparadas observou-se a reduzida variabilidade genética do bacilo, que apresenta um DNA altamente conservado. Este estudo também revelou uma ligação entre a região onde o paciente se encontra e o perfil genômico da cepa que o infecta. Com estas informações se tornou possível uma melhor compreensão da rota de transmissão da doença ao redor do mundo, sendo plausível a hipótese de que a hanseníase tenha se originado na Ásia e se disseminado pela Europa com as tropas de Alexandre o Grande, sendo mais tarde levada as demais áreas do planeta por meio do mercado de escravos (MONOT et al., 2005). Assim, são fortes os indícios de que a doença tenha chegado às Américas com os colonizadores por volta do século XVI (OPROMOLLA, 2000).

Clínica

A classificação clínica mais utilizada atualmente por pesquisadores e centros especializados em hanseníase divide a doença em um espectro de dois pólos, tuberculóide (TT) e virchowiano (VV), e três formas intermediárias, que são as formas dimorfas (DT, DD e DV), incluindo ainda a hanseníase indeterminada, que

caracteriza uma fase inicial da doença. Esta classificação foi proposta em 1966 por Ridley e Jopling, sendo ainda hoje a mais utilizada por abranger a doença de uma maneira mais completa, levando em consideração aspectos clínicos, imunológicos, microbiológicos e histológicos (SOUZA, 1997).

No polo tuberculóide TT existe predomínio da resposta imunológica do tipo Th1, onde a resposta celular leva a maior contenção do bacilo. As lesões aparecem de forma mais reduzida ou mesmo isoladas. O paciente apresenta teste da reação de Mitsuda positivo, índice baciloscópico negativo e apresenta comprometimento dos nervos periféricos (PREVEDELLO et al., 2007).

A manifestação clínica oposta, polo virchowiano VV, caracteriza-se pelo predomínio da resposta imunológica Th2, e a contenção do bacilo é reduzida devido à ineficácia desta resposta humoral. O paciente apresenta resultado negativo frente à reação de Mitsuda e a baciloscopia é altamente positiva. Nesta forma, as lesões são mais amplas e distribuídas simetricamente pelo corpo, envolvendo diversos troncos nervosos, áreas difusas de tegumento e até outros órgãos (MENDONÇA et al., 2008).

Na região central do espectro da doença se encontram as formas dimorfas, sendo classificadas como dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) ou dimorfo-virchowiano (DV), sendo utilizada como critério para a classificação a proximidade das características com as descritas para as formas polares. Alguns autores caracterizam estas formas com uma instabilidade imunológica, podendo evoluir da forma DT para DV na ausência de tratamento (ARAUJO, 2003).

A hanseníase indeterminada (HI) é a fase inicial da doença, onde a resposta imunológica ainda não é definida, podendo evoluir para a cura espontânea, desenvolver-se de maneira lenta e gradativa, ou mesmo regredir, vindo a ressurgir posteriormente. São comumente observadas áreas hipocrômicas e discretamente eritematosas delimitadas ou não, com perda de sensibilidade, e leve ressecamento quando comparadas com áreas adjacentes (ARAUJO, 2003).

Como esta classificação implica em algumas intempéries operacionais, já que se fazem necessários exames laboratoriais, a Organização Mundial da Saúde (OMS), visando o tratamento, classifica a hanseníase baseando-se no número de lesões, onde pacientes com até cinco lesões são classificados como paucibacilares (PB), e pacientes com mais de cinco lesões como multibacilares (MB)

(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).O Ministério da Saúde (portaria conjunta 125: 26.03.2015) segue a classificação proposta pela OMS, incluindo no diagnóstico a baciloscopia quando disponível. Nessa classificação pacientes paucibacilares são aqueles que apresentam baciloscopia negativa, enquanto os multibacilares os que apresentam baciloscopia positiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Diagnóstico

A ferramenta de maior relevância no diagnóstico da hanseníase é o exame clínico do paciente, onde é realizado a análise dermatológica e neurológica, com intuito de localizar áreas hipocrômicas com perda de sensibilidade e comprometimento de nervos periféricos, com ou sem espessamento. A baciloscopia auxilia no diagnóstico, entretanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção pelo bacilo (MENESES, 2013).

A reação de Mitsuda é uma ferramenta de diagnóstico que fornece informações sobre a resposta do hospedeiro frente à inoculação intradérmica de antígenos isolados do bacilo. No entanto, este teste também possui uma grande relevância para o prognóstico de forma clínica da doença (GOULART, 2008). Do ponto de vista imunológico, uma reação de Mitsuda positiva reflete a capacidade dos macrófagos em lisar o *M. leprae* (resposta celular), conferindo ao indivíduo resistência ao bacilo, enquanto que um teste negativo demonstra um quadro de susceptibilidade à hanseníase devido ao predomínio da resposta humoral do indivíduo (SOUZA, 1997). Assim, de forma os pacientes próximos do polo tuberculóide apresentam teste de Mitsuda positivo e os pacientes virchowianos reação negativa.

Como já mencionado, o seqüenciamento genômico do *M. leprae* gerou novas possibilidades de diagnóstico por meio de técnicas de PCR, que são específicas para a detecção do DNA do bacilo. Apesar de se apresentar como uma ferramenta promissora no diagnóstico, esta metodologia permanece restrita aos centros de pesquisa, uma vez que demanda um custo elevado em decorrência de técnicas e equipamentos específicos, bem como uma baixa sensibilidade em pacientes paucibacilares (STEFANI, 2008).

Esquemas terapêuticos

O esquema de tratamento constitui-se de uma poliquimioterapia (PQT), composta por rifampicina, dapsona e clofazimina. O médico utiliza a classificação proposta pela OMS para administrar a terapêutica. Pacientes paucibacilares recebem uma dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina e 100 mg de dapsona durante seis meses, juntamente com uma dose diária de 100 mg de dapsona auto-administrada durante o mesmo período. Indivíduos multibacilares recebem o mesmo tratamento por um ano, acrescido do fármaco clofazimina administrada em dose mensal supervisionada de 300 mg e dose diária de 50 mg auto-administrada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Imunologia

A manifestação da forma clínica da hanseníase está diretamente relacionada com a resposta imunológica que este apresenta frente ao patógeno. Sendo o *M. leprae* um parasita intracelular obrigatório, a resposta imunológica celular do tipo Th1 é a eficaz na eliminação do bacilo (MENDONÇA et al., 2008).

Acredita-se que a maior parte da população seja intrinsecamente resistente ao *M. leprae*, sendo que, uma imunidade inata efetiva associada a uma baixa virulência do bacilo estaria relacionada com a contenção do mesmo. A linha inicial de interação entre o bacilo e o hospedeiro é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), ativando macrófagos e células dendríticas (DC) para o reconhecimento e fagocitose destes microrganismos (MENDONÇA et al., 2008).

As DC, principais células apresentadoras de antígenos, após fagocitarem o bacilo migram para os linfonodos, onde fazem a apresentação dos antígenos processados, ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Durante a migração sofrem processo de maturação e, chegando aos linfonodos, ativam linfócitos TCD4+ e estimulam sua diferenciação no perfil de resposta Th1 ou Th2. A IL-12 produzida pela DC desencadeia o perfil Th1, com subsequente produção de IL-2 e IFN- γ , culminando na ativação de macrófagos. Na ausência de IL-2, ou na presença de IL-4, a polarização passa para o perfil Th2, onde ocorre a produção de

IL-10, estimulando a produção de anticorpos e inibindo a função macrófaga (MACHADO, 2004). Portanto, o tipo de resposta imunológica que o paciente irá desenvolver estará diretamente relacionado com as citocinas que estarão presentes em maior ou menor quantidade no sítio de infecção (FOSS, 1997).

Micobactérias possuem mecanismos altamente específicos de sobrevivência no interior das células que parasitam, liberando mediadores que modulam o maquinário celular. Como exemplo, o *M. tuberculosis* inibe a apoptose celular e previne a maturação do fagossomo através da secreção de lipoarabinomanana (LAM) e fosatidilinositol. Nessa mesma linha, o *M. leprae* interfere na modulação de genes envolvidos na apoptose, regulando negativamente genes pró-apoptóticos (*BadeBak*) e induzindo genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 (PINTO, 2013). Estudos demonstraram também a capacidade do *M. leprae* de induzir a liberação de IGF-I, hormônio que contribui para a sobrevivência da célula de Schwann, mecanismo importante para uma bactéria intracelular de crescimento lento (RODRIGUES et al., 2010).

O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) é componente estrutural específico da parede celular do *M. leprae*, facilita a fagocitose do bacilo por macrófagos e DC, concomitantemente inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de marcadores de maturação em DC (TABOURET et al., 2010). Uma vez fagocitado, o bacilo libera mediadores que inibem a junção dos lisossomos com o fagossomo em que se encontra, evitando que as enzimas do macrófago o degradem, além de ser capaz de deixar o fagossomo e viver no citosol (TABOURAT et al., 2010). O antígeno PGL-1 pode ser encontrado no soro e nos tecidos de pacientes infectados e, assim, tem sido empregado como ferramenta de diagnóstico e de avaliação da resposta terapêutica. Os níveis de anticorpos anti-PGL-1 são quantificados por meio de reação imunoenzimática (ELISA) e apresentam correlação direta com a carga bacilar (STEFANI, 2008).

O paciente hanseniano pode ainda apresentar reações imunológicas exacerbadas durante a evolução da doença, ao longo ou após o tratamento. Tais estados reacionais são classificados como tipo 1 e tipo 2 (SOUZA, 1997).

Na reação tipo 1, mais frequentemente observada em pacientes paucibacilares, existe um aumento repentino da resposta imune celular com o reaparecimento de lesões antigas e surgimento de novas lesões. Ocorre uma

elevação na resposta linfocitária frente aos antígenos bacilares, bem como um aumento de linfócitos TCD4+ nas lesões, em quantidade absoluta e relativa. Observa-se também uma elevação de citocinas pró-inflamatórias e redução nas citocinas do perfil Th2 (MENDONÇA et al., 2008).

Em pacientes VV e DV predomina a reação tipo 2, também conhecida como eritema nodoso hansênico (ENH), caracterizada como uma reação inflamatória sistêmica, onde a resposta humoral gera nódulos inflamatórios e lesões máculo-papulares (MENDONÇA et al., 2008).

EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA

Por volta do século XIX a hanseníase era considerada uma moléstia de caráter hereditário e, após a descoberta do bacilo *M. leprae* em 1873 por Hansen, foi tida como exclusivamente infecciosa por alguns pesquisadores (CUNHA, 2002). Atualmente a hanseníase é compreendida como uma doença complexa, onde diversas variáveis atuam em conjunto para o desenvolvimento da doença, desde a hanseníase *per se* até as diversas formas clínicas e complicações da infecção. Fatores pertinentes ao bacilo, ao ambiente e ao indivíduo determinarão o curso que a doença irá seguir. Partindo desta premissa, as pesquisas científicas se voltaram ao mapeamento dos genomas do paciente e do bacilo, onde a relação genótipo/fenótipo passou a ser mais estudada, confirmando a idéia de que o contato com o bacilo é indispensável para que ocorra a manifestação da doença, mas não é suficiente (PREVEDELLO, 2007).

Desenhos de estudos

Analisando a hanseníase do ponto de vista genético, percebe-se que esta apresenta um caráter de doença complexa, e não segue o padrão de herança mendeliano, monogênico com alta penetrância do genótipo. O caráter genético da hanseníase é multigênico, visto que diversos são os genes que atuam em conjunto para o desenvolvimento da doença, e multifatorial, já que fatores ambientais e do patógeno também participam (PREVEDELLO, 2007) (MARQUES, 2010).

A participação da genética no desenvolvimento de uma doença parte da constatação de evidências que comprovem a correlação de componentes genéticos com a ocorrência desta. As abordagens que permitem essas constatações vêm de estudos epidemiológicos que comprovam agregação familiar da doença, comparações de taxas de ocorrências entre gêmeos mono e dizigóticos, estudos de adoção e análises de segregação complexa. Todavia, tais estudos não são suficientes para a elucidação de genes e marcadores moleculares, fazendo-se necessário para tanto o uso de metodologias que envolvam a genética molecular. Estas análises englobam os estudos de ligação e de associação (BEIGUELMAN, 2002).

Estudos de ligação objetivam identificar intervalos cromossômicos em pacientes portadores da patologia de interesse que estejam associados à doença, utilizando-se marcadores conhecidos, obtendo como resultado regiões candidatas a abrigar o gene que está vinculado à susceptibilidade para a doença (SMITH, 1999).

As análises de associação baseiam-se principalmente no modelo caso-controle, onde se compara a frequência de determinado marcador em indivíduos afetados (casos) com indivíduos não afetados (controles). Estudos de associação podem ser utilizados como seqüência aos estudos de ligação uma vez que, a partir da pesquisa em regiões candidatas, é possível que se chegue aos genes e marcadores responsáveis pelo desfecho alvo do estudo. No caso do marcador apresentar-se em maior frequência no grupo de pacientes, o mesmo está associado com susceptibilidade à doença, e quando se apresenta em maior frequência no grupo controle, está associado com a resistência (LOPEZ, 2008).

Outra forma de estruturar os estudos de associação é tomar por base o modelo familiar, onde se elimina a influencia da estratificação populacional, sendo possível um controle genético interno. Neste tipo de estudo, utiliza-se como princípio o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), onde é avaliado o desvio da transmissão alélica aos filhos afetados em relação ao esperado, tendo como controle o alelo não transmitido. A dificuldade apresentada neste modelo de estudo, principalmente na hanseníase, doença que na maioria das vezes se manifesta tardiamente, é a formação do trio informativo, que se constitui de pelo menos um filho afetado e pais heterozigotos (MARQUES, 2010).

Quanto à distribuição dos marcadores, o ponto de partida pode ser a escolha de genes candidatos, presentes em regiões previamente associadas à doença de interesse ou aqueles funcionalmente relevantes para o desfecho da doença, ou então uma distribuição sem nenhuma premissa, onde se faz uso de uma grande quantidade de marcadores moleculares, abrangendo extensas áreas de DNA. Este segundo modelo de estudo é conhecido como *genome wide*(GW), sendo considerado como gerador de hipóteses (PREVEDELLO & MIRA, 2007).

Marcadores genéticos

Nas últimas décadas as técnicas que empregam ferramentas moleculares e de bioinformática foram sendo aprimoradas, de modo a se tornar importantes aliadas em pesquisas que envolvam variabilidade genética. Entre os marcadores moleculares mais utilizados, encontram-se os polimorfismos de base única (SNPs – *single nucleotide polymorphism*) (COSTA, 2007).

Estes polimorfismos caracterizam-se pela substituição de apenas uma base nucleotídica que ocorrem na população em frequência maior do que 1%. O efeito que decorre desta alteração está diretamente relacionado com a localização no genoma. Ocorrendo dentro de um exon, pode ser classificado como SNP não sinônimo, onde se observa a substituição de aminoácidos na tradução do RNAm. As substituições de aminoácidos podem ser conservativas, quando não se observa alteração funcional da proteína sintetizada, ou não conservativas, onde a proteína produzida apresenta alterações em seu desempenho. SNPs sinônimos, apesar de não serem responsáveis pela substituição de aminoácidos, podem afetar quantitativamente a proteína produzida, uma vez que modifica o RNAm (PADUAM, 2008). Os SNPs podem ocorrer ainda em regiões regulatórias, como regiões promotoras e 3'UTR, afetando a ligação de fatores de transcrição ou a estabilidade do transcrito, por exemplo (YANG et al., 2014). Quando se encontra em um intron, o efeito associado ao SNP pode ser reflexo de outro polimorfismo que se encontre em desequilíbrio de ligação (LD) com o mesmo, mantendo assim a sua utilidade como marcador na elucidação de associações de genes com as características alvo da pesquisa (MOREIRA, 2014).

Assim, os SNPs são marcadores muito viáveis em estudos de associação, já que são os maiores responsáveis pela variação genética inter individual.

Genética em Hanseníase

Como já mencionado, a hanseníase é uma doença complexa do ponto de vista genético, onde além do envolvimento de fatores externos, existe a participação do componente genético no desenvolvimento da doença e suas formas clínicas, estando envolvidos diversos genes neste processo (PREVEDELLO & MIRA, 2007). Análises de segregação complexa demonstraram que a hanseníase segue o modelo de herança *major gene* (ABEL & DEMENAI, 1988; LÁZARO et al. 2010).

Estudos de ligação com varredura do genoma, isto é, *genome-wide*, apontaram ligação das regiões cromossômicas 10p13 (SIDDIQUI, 2001; MIRA et al., 2003), 6p21 (MIRA et al. 2003; MILLER et al., 2004), 6q25-26 (MIRA et al., 2003) e 17q22 (JAMIESON et al., 2004) com a hanseníase. Assim, estas regiões devem abrigar possíveis genes candidatos a estarem envolvidos no desenvolvimento da doença em questão.

Um estudo subsequente ao trabalho de Mira et al., 2003, envolvendo 43 genes da região 6q25-26 encontrou em populações brasileiras e vietnamitas marcadores associados à hanseníase no gene *PARK2*, conhecidamente envolvido com o desenvolvimento da doença de Parkinson (MIRA et al., 2004).

Localizado na região 6q21 encontram-se os genes do complexo HLA, que controlam os perfis de resposta imunológica Th1 e Th2, diretamente envolvidos nas formas clínicas da hanseníase (KLEIN & SATO, 2000; NAIK et al., 2003). Dentre eles, os genes *TNF* e *LTA* possuem marcadores com dados replicados associados à hanseníase (ROY et al., 1997; SHAW et al., 2001; FITNESS et al., 2004; ALCAIS et al., 2007; SAPKOTA et al., 2010; WONG et al., 2010; CARDOSO et al., 2011; ALI et al., 2012). Localizado na região promotora do *TNF* encontra-se o polimorfismo mais bem estudado deste gene, o -308A>G que, apesar da associação confirmada com a hanseníase e suas formas clínicas em diversos estudos, tem a questão susceptibilidade/resistência ainda controversa, uma vez que na população brasileira o alelo -308A está associado à resistência, e em outras populações com susceptibilidade (ROY et al., 1997; SAPKOTA et al., 2010). Quanto ao *LTA*, o

polimorfismo *LTA*+80 foi associado com a hanseníase, mas de forma dependente da idade de manifestação da doença, na população vietnamita, indiana e brasileira (ALCAIS et al., 2007). Os genes do HLA de classe II DR e DQ também apresentam forte associação para suscetibilidade à hanseníase e suas formas clínicas, que pôde ser inclusive confirmada em estudos de estratégia GW em populações distintas (ZHANG et al., 2009; WONG et al., 2010).

Um estudo do tipo *genome wide* de associação (GWAS) realizado em 2009 numa população da china encontrou marcadores associados à hanseníase nos seguintes genes: *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR*, *RIPK2* e *LRRK2* (ZHANG et al., 2009). A validação da associação do gene *NOD2*, envolvido na codificação de receptores que reconhecem componentes da parede micobacteriana, com a hanseníase, já foi confirmada em diversos estudos, como no trabalho realizado no Nepal que confirmou associação do gene *NOD2*, com a hanseníase, sendo esta associação com a hanseníase *per se* e estados reacionais da doença (BERRINGTON et al., 2010), e no Brasil, o trabalho de Sales-Marques et al., 2014 encontrou associação deste gene em cinco amostras populacionais distintas (SALES-MARQUES et al., 2014). Os genes *CCDC122* e *LACC1* tiveram associação replicada em estudo com populações da África (WHONG et al., 2010) e no Brasil (SALES-MARQUES et al., 2014). Na população vietnamita, um estudo de associação confirmou estes dados para os genes *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *HLA-DR* e *RIPK2* (GRANT et al., 2012). A partir destes estudos, observa-se concordância entre os riscos genéticos para a hanseníase, ligados ao cromossomo 13, e o desenvolvimento da doença de Crohn, corroborando com a discussão de que micobactérias podem estar envolvidas no desenvolvimento desta doença autoimune (SCHURR & GROS, 2009; CASANOVA & ABEL, 2009).

O gene *TLR1*, envolvido na síntese de um receptor do tipo *Toll*-like que participa no reconhecimento de lipopetídeos bacterianos, possui um polimorfismo com efeito na produção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) frente à estimulação com *M. leprae*, o I602S (T1805G) (CARDOSO et al., 2010). Este marcador foi associado à hanseníase em diferentes populações (JOHNSON et al., 2007; BOCHUD et al., 2008), com dados replicados em um estudo do tipo *genome wide* (WONG et al., 2010). Neste mesmo gene, outro

marcador, o N248S, foi associado com a hanseníase *per se* e com estados reacionais da doença em uma população de Bangladesh (SCHURING et al, 2009).

Estudos também apontaram associação de SNPs presentes na região promotora do gene *IL10* com a hanseníase em população do Vietnã (MIRA et al., 2003), do Brasil (SANTOS et al., 2002; PEREIRA et al., 2009; FRANCESCHI et al., 2009), e da Índia (WONG et al., 2010), sendo este gene codificante da citocina IL-10, que é anti-inflamatória, cuja baixas concentrações estão ligadas à progressão da hanseníase (LIMA et al., 2004).

Dentre os genes supracitados, alguns possuem dados replicados e confirmados em populações distintas, todavia, existem genes associados que ainda carecem de maiores investigações. As variações nos desenhos dos estudos, bem como variações intrínsecas de cada população alvo, explicam parcialmente as discordâncias entre os dados gerados. Sendo a hanseníase uma doença complexa, onde se observa a participação de diversos genes, é importante uma continuidade nas pesquisas afim de que se obtenham dados mais robustos sobre os marcadores associados à doença.

GATA-3

Como já mencionado, estudos de ligação prévios indicaram um pico de ligação para a hanseníase na região cromossômica 10p13. O primeiro, realizado na Índia, apontou a ligação desta região com a hanseníase *per se* (SIDDIQUI, 2001). Posteriormente, o trabalho de Mira et al., feito em uma população vietnamita, encontrou associação da região 10p13 com a forma paucibacilar da doença. Este último, ao reavaliar os dados obtidos por Siddiqui et al., confirmaram a associação desta região cromossômica com a forma clínica da doença (MIRA et al., 2003).

Nesta região encontram-se genes que desempenham papéis relevantes na resposta imunológica do indivíduo frente ao bacilo, como é o caso do *MCR1*, codificante de um receptor de reconhecimento de manose da imunidade inata, cujo produto de expressão auxilia macrófagos e DC no reconhecimento de microrganismos. Este gene já possui SNPs associados à hanseníase *per se* e formas clínicas em brasileiros, vietnamitas e chineses (ALTER et al., 2010; WANG et al., 2012).

Ainda nesta região, os genes *CUBN* (cubulina) e *NEBL* (nebulete) foram associados com a forma multibacilar da doença (GRANT et al., 2014). Esta associação genética não é ainda explicada do ponto de vista funcional, mas, provavelmente trará elucidacões sobre novas vias de interaçao entre o *M. leprae* e o hospedeiro.

Localizado próximo a esta região genômica, na região cromossômica 10p15, encontra-se o gene *GATA3*, que é um gene candidato, uma vez que induz a resposta imune para o perfil Th2, sendo este perfil o relacionado com um quadro de susceptibilidade ao *M. leprae* (YANG et al., 2014).

Os genes da família GATA desempenham papeis importantes no desenvolvimento embrionário, estando envolvidos na formação de glândulas mamárias, sistema nervoso simpático, glândula paratireóide, rins, ouvido interno, pele e linhagens de células T (YANG et al., 2014).

Voltando-se especificamente ao sistema imune, a proteína GATA-3 é um fator de transcriçao que atua diretamente na polarizacão da resposta imunológica Th2 por mediar a produçao das interleucinas IL-4, IL-5 e IL13, responsáveis pela ativacão dos linfócitos B, com subsequente produçao de anticorpos, levando à resposta imune humoral, e concomitantemente inibindo a funçao dos macrófagos (DIAZ et al., 2010).

Tendo o GATA-3 uma notável participacão na estimulacão da resposta Th2 (LANTELME et al., 2001), grandes são as possibilidades de este gene estar vinculado à susceptibilidade à hanseníase, considerando que inibicão da resposta Th1 paralela à efetivacão da resposta Th2 proporciona um quadro onde se torna viável a replicacão do bacilo (MACHADO et al., 2004).

Em um estudo que relacionou o gene *GATA3* ao câncer de mama, observou-se que a expressao desse gene apresentou forte correlaçao negativa com algumas citocinas como TNF e IFN-gama, sendo a primeira responsável pela apoptose de células tumorais e estimulacão pró-inflamatória, e a segunda participa da ativacão de macrófagos e linfócitos TCD8+ (YANG et al., 2014).

Desta forma, sabendo-se que a expressao do *GATA3* está relacionada com atuacão de interleucinas que irão estimular o desenvolvimento da resposta imune humoral (DIAZ et al., 2010; YANG et al., 2014), e que o predomínio de resposta Th2 caracteriza um quadro de susceptibilidade ao *M. leprae* (MENDONÇA

et al., 2008), pode ser sugerida uma correlação entre o GATA-3 e o desenvolvimento da hanseníase, fazendo-se necessário a busca de novas informações sobre a expressão deste gene, para que o mecanismo imunológico envolvido na resposta ao mal de Hansen e outras patologias causadas por bactérias intracelulares possa ser progressivamente elucidado.

Estudos do nosso grupo realizados com duas amostras de regiões distintas do Brasil, envolvendo 922 pacientes e 737 controles, apontaram associação do SNP rs10905284 no gene *GATA3*, com a hanseníase *per se*, e demonstrou-se que este polimorfismo está envolvido na expressão de GATA-3 em linfócitos T CD4+(MEDEIROS et al. 2016). No entanto, este SNP é intrônico, o que diminui as chances de ser o verdadeiro causador desta associação, como já explicado anteriormente. Porém, está a apenas 1200pb do marcador rs1058240, localizado na região 3'UTR do *GATA3*, em um sítio de ligação de microRNA (YANG et al., 2014). Yang et al. (2014), demonstraram uma forte correlação entre rs1058240 e os níveis de expressão de *GATA3*, sugerindo um papel relevante deste SNP na regulação pós-transcricional deste gene. Como estes SNPs se encontram próximos, por efeito de desequilíbrio de ligação, seria plausível a suposição de que a associação que relatamos entre o marcador rs10905284 e a hanseníase seja reflexo da associação do marcador rs1058240. A fim de elucidar esta questão, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um estudo de associação de base populacional do tipo caso-controle em hanseníase testando o SNP rs1058240 no gene *GATA3*.

OBJETIVOS

Investigar a associação do SNP rs1058240 no gene *GATA3* com a hanseníase *per se* por meio de um estudo de associação baseado em população com amostras caso-controle de Rondonópolis-MT e do estado de São Paulo.

Investigar se a associação entre o marcador rs10905284 e a hanseníase reflete efeito de desequilíbrio de ligação entre este e o marcador aqui testado, rs1058240.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

As amostras caso controle deste estudo são frutos de estudos anteriores, e a utilização destas nesta proposta tem a anuência do CEP do Instituto Lauro de Souza Lima.

O DNA genômico foi obtido a partir de células do sangue periférico por meio da técnica de *salting out*.

A estratégia deste trabalho está baseada em duas etapas: investigar o marcador proposto em amostra caso-controle proveniente de Rondonópolis-MT e testar a replicação do dado, se positivo, em uma amostra caso-controle de confirmação, proveniente do estado de São Paulo.

- **Amostra caso-controle de Rondonópolis – MT:**

O município de Rondonópolis constitui região de alta endemia para hanseníase, onde a prevalência da doença é de 10,19 casos a cada 10.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Os indivíduos participantes foram selecionados em um projeto colaborativo do edital de Doenças Negligenciadas do CNPq/MS/DECIT (Edital 034/2008), sob a coordenação do Dr. Marcos Lopes da Cunha Virmond do Instituto Lauro de Souza Lima.

Este painel caso-controle está formado por 835 indivíduos: 411 casos de hanseníase e 424 controles. Os casos tiveram a confirmação da doença por meio de exames clínico-laboratoriais no serviço de atendimento ambulatorial dos postos de saúde familiar (PSFs) de Rondonópolis. Para a composição do grupo de controles, foram selecionados indivíduos através de mutirão para a detecção da doença em locais públicos no município. Como critério de inclusão, considerou-se apto para o grupo de controles indivíduos sadios e sem histórico da doença, após a aplicação de um questionário e exame clínico. As proporções relativas às variáveis etnia, idade e sexo encontradas no grupo de casos foram mantidas no grupo de controles. A descrição das características gerais desta amostra segue na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características dos grupos de casos e controles selecionados no município de Rondonópolis - MT.

Característica	Categorias	Casos (n=411)	Controles (n=424)
Idade (média±DP)		42,02±16,14	42,03±24,5
Etnia	Caucasoide		
	Pardo	147 (35,8%)	141 (33,3%)
	Negro	247 (60,1%)	265 (62,5%)
		17 (4,1%)	18 (4,2%)
Sexo	Masculino	250 (60,8%)	256 (60,4%)
	Feminino	161 (39,2%)	168 (39,6%)
Forma clínica (OMS)	Paucibacilar	96 (23,4%)	
	Multibacilar	310 (75,4%)	
	S/ Classificação	5 (1,2%)	
Forma clínica (segundo &Jopling, 1966)	Ridley MHV		
	MHDV	21 (5,1%)	
	MHDD	63 (15,3%)	
	MHDT	79 (19,2%)	
	MHT	159 (38,7%)	
	MHI	60 (14,6%)	
	S/ Classificação	27 (6,6%)	
		2 (0,5%)	

DP – desvio padrão; MHV – hanseníase virchowiana; MHDV - hanseníase dimorfavirchowiana; MHDD – hanseníase dimorfadimorfa; MHDT – hanseníase dimorfatuberculóide; MHT – hanseníase tuberculóide; MHI – hanseníase indeterminada.

- **Amostra de caso-controle do estado de São Paulo:**

Esta amostra está atualmente composta de 950 indivíduos. São 570 casos de hanseníase do estado de São Paulo atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru-SP) e 380 controles, selecionados após entrevista para exclusão da doença, entre doadores de sangue do Hemonúcleo de Bauru. Segue abaixo a descrição das características gerais do grupo de caso-controle do estado de São Paulo na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características dos grupos de casos e controles de São Paulo - SP.

Característica	Categorias	Casos (n=570)	Controles (n=380)
Idade (média±DP)		42 ± 18,01	36 ± 10,81
Etnia	Caucasoide	456 (80%)	238 (62,6%)
	Pardo	55 (9,6%)	104 (27,4%)
	Negro	32 (5,6%)	24 (6,3%)
	Amarelo	1 (0,2%)	
	S/ Classificação	26 (4,6%)	14 (3,7%)

Sexo	Masculino	385 (67,5%)	253 (66,6%)
	Feminino	185 (32,5%)	127 (33,4%)
Forma clínica (OMS)	Paucibacilar	108 (18,9%)	
	Multibacilar	434 (76,1%)	
	S/ Classificação	28 (4,9%)	
Forma clínica (segundo &Jopling, 1966)	Ridley	MHV	112 (19,6%)
		MHDV	147 (25,8%)
		MHDD	142 (24,9%)
		MHDT	59 (10,3%)
		MHT	72 (12,6%)
		HNP	1 (0,2%)
		MHI	3 (0,5%)
		Sem Classificação	34 (6,0%)

DP – desvio padrão; MHV – hanseníase virchowiana; MHDV - hanseníase dimorfavirchowiana; MHDD – hanseníase dimorfadimorfa; MHDT – hanseníase dimorfatuberculóide; MHT – hanseníase tuberculóide; HNP – hanseníase neural pura; MHI – hanseníase indeterminada

Seleção do marcador

O SNP alvo deste estudo foi selecionado com base nos dados funcionais descritos por Yang et al. (2014) e nos dados de Medeiros et al. (2015).

Genotipagem

Para a genotipagem do marcador foi empregado ensaio de discriminação alélica em equipamento de PCR em tempo real Step One Plus (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), baseada na tecnologia TaqMan® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).

Análise de dados

A comparação entre as freqüência de alelos, genótipos e carreadores foi realizada a partir do modelo de regressão logística univariada, com e sem ajuste para as co-variáveis sexo e etnia, usando o software estatístico R para Windows, versão 2.5.1, utilizando os pacotes “genetics”, “desing”, “hmisc” e “haplo.states”. Adotou-se o nível de significância estatística de $p\text{-valor} < 0,05$.

O calculo de LD foi realizado com auxilio do Software Haploview (versão 4.2).

Como controle de qualidade dos dados, as frequências dos genótipos foram analisadas quanto ao enquadramento no equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste do qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A genotipagem realizada no grupo caso-controle de Rondonópolis foi bem sucedida em 86 % das amostras.

As frequências dos genótipos observadas quando comparadas às esperadas, segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, pelo teste do qui-quadrado, forneceu um valor de $p=0,68$. Assim, este marcador se encontra dentro do equilíbrio.

Quando conduzida a análise de LD, entre o marcador aqui analisado e o previamente associado por Medeiros et al.(2015) em nossa população, constatou-se que estes não se encontram em LD (Figura 1) já que o valor de r^2 foi de 0,1.

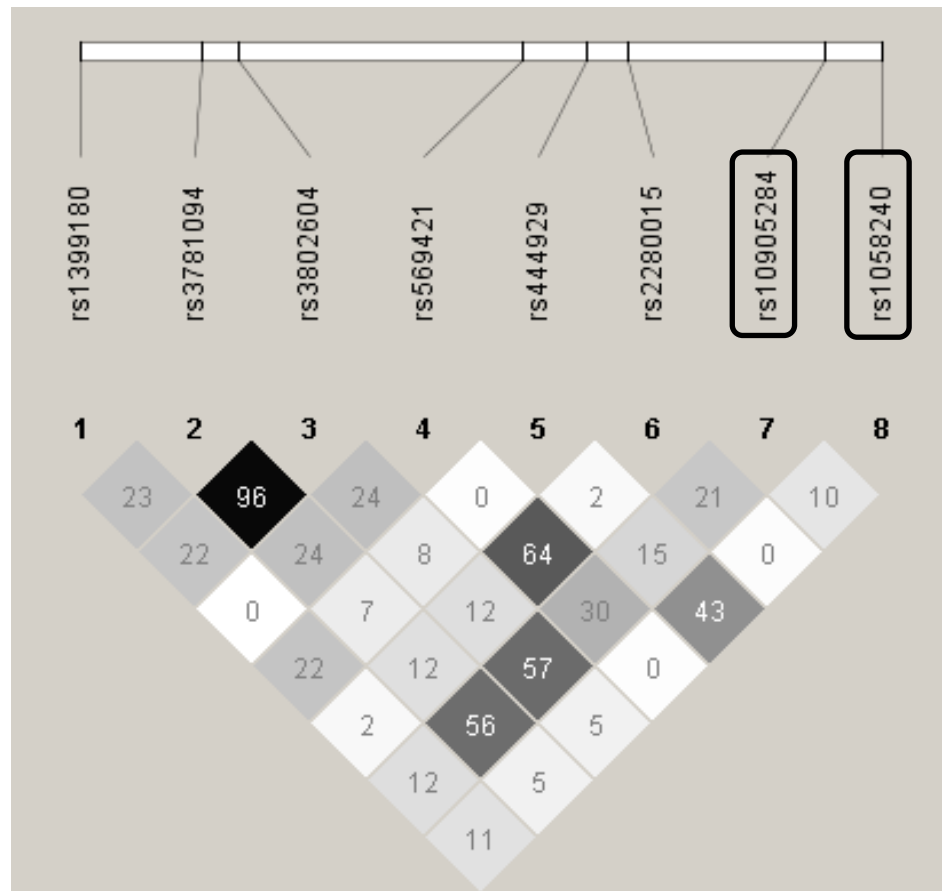


Figura 1. Mapa de Desequilíbrio de Ligação (LD) de tagsSNPs do *GATA3*. Os valores representam os valores de r^2 , calculados pelo software Haploview.

Feita a análise de regressão logística univariada, com e sem ajuste para as co-variáveis sexo e etnia, observou-se que o alelo rs1058240 não apresentou dados de associação com significância estatística, tanto para a hanseníase *per se* como para as formas clínicas da doença (pauci e multibacilar). Os resultados obtidos estão descritos nas **Tabelas 3 e 4**, a seguir.

Tabela 3: Freqüência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs1058240 no gene *GATA3* nos grupos caso e controle e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas freqüências sem e com correção, para o desfecho hanseníase *per se*.

SNP	Alelos ou Genótipos	Freqüência em controles	Freqüência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs1058240	A	0.85	0.83	*	*
	G	0.15	0.17	1.12 (0.58)	1.13 (0.55)
	AA	248 (0.73)	262 (0.69)	*	*
	AG	84 (0.25)	104 (0.28)	1.17 (0.35)	1.17 (0.34)
	GG	10 (0.03)	11 (0.03)	1.04 (0.92)	1.08 (0.86)
	Carrier G			1.16 (0.37)	1.17 (0.35)
			n= 342	n= 377	

*categoria referência

** valores calculados com correção para as co-variáveis etnia e sexo.

Tabela 4: Freqüência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs1058240 no gene *GATA3* nos grupos de casos de dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas freqüências sem e com correção, para formas clínicas da hanseníase.

SNP	Alelos ou Genótipos	Freqüência em Paucibacilares	Freqüência em Multibacilares	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs1058240	A	0.84	0.83	*	*
	G	0.17	0.17	0.92 (0.78)	0.82 (0.55)
	AA	64 (0.70)	195 (0.70)	*	*
	AG	27 (0.29)	75 (0.27)	1.10 (0.73)	1.00 (0.99)
	GG	1 (0.01)	10 (0.04)	0.30 (0.26)	0.23 (0.16)
	Carrier G			1.00 (0.99)	0.90 (0.69)
		n=92	n=280		

*categoria referência

** valores calculados com correção para as co-variáveis etnia e sexo.

Como os resultados obtidos não apresentaram significância estatística, a genotipagem da amostra de confirmação proveniente de São Paulo não foi realizada.

Duas razões apontam o gene *GATA3* como um forte candidato para estudos de associação genética com a hanseníase. A posição que este gene ocupa no genoma, próximo da região 10p13, que foi previamente associada à hanseníase por estudos de ligação, como já mencionado (SIDDIQUI, 2001; MIRA et al., 2003). A função do fator de transcrição que este gene codifica exerce na resposta imunológica, polarizando-a para o perfil de resposta Th2 ao atuar diretamente nos genes envolvidos na produção de IL-4, IL-5 e IL-13, o que compactua com um quadro de replicação do bacilo e, conseqüentemente, de susceptibilidade a doença (LANTELME et al., 2001; MACHADO et al., 2004; DIAZ et al., 2010). No entanto, além deste efeito clássico sobre o perfil Th2, por se tratar de um fator de transcrição, esta molécula atua no controle de células T regulatórias e na expressão de FoxP3, bem como na proliferação de linfócitos T CD8+ e subpopulações de células *Natural Killer* (NK) (TINDEMANS et al., 2014).

O envolvimento deste gene com a hanseníase já pode ser comprovado pelo nosso grupo que demonstrou a associação do alelo A, no marcador rs10905284, com resistência a doença em duas populações distintas. Além disso, um efeito funcional deste marcador pôde ser sugerido, já que um notável aumento na expressão do fator de transcrição GATA-3 foi registrado em indivíduos com genótipo AA, quando as células destes foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) (MEDEIROS et al. 2016). Este trabalho foi o primeiro a relatar associação do *GATA3* com uma doença infecciosa, tendo em vista que este gene possuía associação apenas com asma, alergia e câncer (GUTHIKONDA et al., 2014; PYKALAINEN et al., 2005; GLUBB et al., 2015; COOK et al., 2014; ANDREW et al., 2012; PEREZ-ANDREU et al., 2015; CHANG et al., 2010; ARSHAD et al., 2008; WANG et al., 2008).

Como já referido, o polimorfismo rs10905284 se encontra a apenas 1.200 pares de bases do SNP alvo do presente trabalho (rs1058240), que foi demonstrado no trabalho de Yang et al. estar envolvido nos níveis de expressão de *GATA3* (YANG et al., 2014). Assim, o presente estudo foi conduzido para esclarecer um possível efeito de desequilíbrio de ligação entre estes dois marcadores, ou seja, se a

associação descrita por Medeiros et al.(2015) para o marcador rs10905284 seria reflexo do efeito de rs1058240. No entanto, a análise pelo software Haploview demonstrou que estes SNPs não estão em LD, sendo o efeito descrito por Medeiros et al.(2015) independente do marcador aqui avaliado. Ademais, a análise de regressão logística não apontou associação significativa do rs1058240 com a hanseníase *per se* ou forma clínica. Assim, conclui-se que a associação do rs10905284 com a hanseníase é independente do SNP alvo deste estudo, mas não exclui a possibilidade de que seu efeito seja reflexo de algum outro polimorfismo.

É importante que os estudos de associação com foco no gene *GATA3* continuem sendo realizados utilizando novos marcadores, bem como em outras populações, já que o único estudo publicado foi o conduzido com a população brasileira por Medeiros et al. (2015).

CONCLUSÕES

O polimorfismo rs1058240 não está associado à hanseníase *per se* e com suas formas clínicas.

A associação observada entre o polimorfismo rs10905284 e a hanseníase é independente do marcador rs1058240.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. DEMENASIS F. Detection of MGs for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade Island. **Am J Hum Genet.**, v.42, p256-266, 1988.

ALCAIS, A. et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. **Nat Genet.**, v.39, p.517-522, 2007.

ALI, S. et al. Association of variants in BAT1-LTA-TNF-BTNL2 genes within 6p21.3 region show graded risk to leprosy in unrelated cohorts of Indian population. **Hum Genet.**, v.131, p.703-716, 2012.

ALTER A., et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. **Hum Genet.**, v.127, p.337–48, 2010.

ANDREW, A. S., et al. HSD3B and gene–gene interactions in a pathway-based analysis of genetic susceptibility to bladder cancer. **PLoSOne.**, v.7, p. ,2012. .

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v.3, p. 373-382, 2003.

ARSHAD, S.H. et al. Polymorphisms in the interleukin 13 and GATA binding protein 3 genes and the development of eczema during childhood. **Br. J. Dermatol.**, v.158, p. 1315–1322, 2008.

BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, p.117-128, 2002.

BERRINGTON, W. R. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. **J Infect Dis.**, v. 201, P. 1422-1435, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria conjunta nº125, de 26 março de 2009. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/poc0125_26_03_2009.html

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. Portaria nº3.125, de 7 de outubro de 2010. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125_07_10_2010.html

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **R. Bras. Zootec.**, v.38, p. 67-71, 2009.

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

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

CHANG, J. S. et al. Genetic polymorphisms in adaptive immunity genes and childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Epidemiol. Biomark Prev.**, v. 19, p. 2152–2163, 2010.

COOK, M. B. A genomewide association study of prostate cancer in West African men. **Hum. Genet.**, v.133, p.509 – 521, 2014.

COSTA, A. P. P. et al. Estudos de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento. **Cadernos de Pós-graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v.7, p. 112-131, 2007.

CUNHA, A. Z. S. Hanseníase: aspectos de evolução do diagnóstico, tratamento e controle. **Ciência e Saúde Coletiva**.v.7, p. 235-242, 2002.

DÍAZ, Y. R. et al. T-bet, GATA-3, and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with *Leishmania (Viannia)* species. **The Journal of Infectious Diseases**, v.3, p.406-415, 2010.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e sociedade.**, v.13, p.76-88, 2004.

FILHO, J. C. M. R., KIMURA, E. T. MicroRNAs: Nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.50, p.1102-1107, 2006.

FITNESS, J. et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of Northern Malawi. **Am J Trop Med Hyg.**, v.71, p.330-340, 2004.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto.**, v.30, p.335-339, 1997.

GOULART, I. M. B., CUNHA, G., PENNA, G. O. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical.**, v.4. p.365- 375, 2002.

GLUBB, D. M. et al. Fine-scale mapping of the 5q11.2 breast cancer locus reveals at least three independent risk variants regulating MAP3K1. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 96, p. 5–20, 2015.

GRANT A V. et al. CUBN and NEBL common variants in the chromosome 10p13 linkage region are associated with multibacillary leprosy in Vietnam. **Hum Genet [Internet].**v.133, n.7, p.833–93, 2014.

GUTHIHKONDA, K. et al. Oral contraceptives modify the effect of GATA3 polymorphisms on the risk of asthma at the age of 18 years via DNA methylation. **Clin. Epigenetics.**, v. 6, p.17, 2014.

JAMIESON, S. E. et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. **Genes Immun.**, v.5, p 46-57, 2004.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system, First of two parts. **The New England J Medicine.**, v.343, p. 702-709, 2000.

KUBOTA, R. M. M. et al. Efeitos adversos da poliquimioterapia para hanseníase: utilização de doses alternativas e avaliação pós alta. **Hansen Int.**,v.39, p. 8-21, 2014.

LANTELME, E. et al. Kinetics of GATA-3 gene expression in early polarizing na committed human T cells. **Immunology.**, v.102, p.123-130, 2001.

LAZARO, F. P. et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. **J Infect Dis.**, v.201, p. 598-1605, 2010.

LOPEZ, I. M. et al. Aspectos genéticos da obesidade. **Rev. Nutri.**, v.17,p.327-338, 2004.

MACHADO, P. L. R. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anbrasdermatol.**, v.6, p.647-664, 2004.

MARQUES, C. S. **Estudo de associação do Gene VDR e a Hanseníase.** 2010. 102 f. Dissertação (Mestre em ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro. 2010.

MARQUES, D. M. **Classificação operacional da hanseníase baseada no número de lesões cutâneas (OMS) x classificação clínico-baciloscópica – Validação para alocação do paciente na poliquimioterapia.** 2006. 87 f. Dissertação (Mestre em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

MARZLIAK, M. L. C. et al. Breve histórico sobre os rumos do controle da hanseníase no Brasil e no estado de São Paulo. **Hansen Int.**, v.2, p.39-44, 2008.

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

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Na BrasDermatol.**, v.4, p.342-350, 2008.

MENESES, G. C. **Relação entre marcadores tradicionais de função renal e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) urinária em pacientes com hanseníase.** 2013. 82 f. Dissertação (Mestre em Psicologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2014. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/27/Dados-2014---final.pdf> (acessado em 20/MAI/2015).

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Mobilização reforça combate à hanseníase em Mato Grosso, 2015. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/19350-mobilizacao-reforca-combate-a-hansenia-em-mato-grosso>

MILLER, E. N. et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in brazilians. **Genes Immun.**, v.5, p.63-67, 2004.

MIRA, M. T. et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Naturegenetics.**, v. 33, p.412-415, 2003.

MIRA, M. T. et al. Host genetics and susceptibility to leprosy. **Salud(i) Ciencia.**, v.18, p.138-141, 2011.

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science.**, v. 308, p.1040–1042, 2005.

MOREIRA, G. C. M. **Identificação de polimorfismos em região de cromossomo 3 da galinha associado ao desempenho de deposição de gordura.** 2014. 84f. Dissertação (Mestrado). Ciência animal e pastagens, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2013.

NAIK, S. The human HLA system. **J Indian Rheumatol Assoc.**, v.11, p.79-83, 2003.

PADUAM, K. S. **Desenvolvimento de marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para estudos populacionais do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil.** 2008. 122f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008.

PEREZ-ANDREU, V. et al. A genome-wide association study of susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Blood.**, v. 125, p. 680–686, 2015.

PINTO, T. G. T. **Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos.** 2013. 122f. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz, Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro. 2013.

PYKALAINEN, M. et al. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.115, P. 80–87, 2005.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Na Bras Dermatol.**, v.5, p.451-459, 2007.

REZENDE, D. S. **Determinação da variabilidade genética entre cepas do *Mycobacterium leprae* através de VNTR e SNP em Rondônia.** Dissertação (Mestre em biologia experimental) Rondônia: Universidade Federal de Rondônia, Programa de pós-graduação. 2012 ; 52 f.

ROY, S. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J Infect Dis.**, v.176, p.530-532, 1997.

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** . v.133, p.1525–32, 2014.

SAPKOTA, B. R. et al. Association of the TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Hum Immunol.**, v.71, p.992-998, 2010.

SHAW, M. A. et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes Immun.**, v.2, p.196-204, 2001.

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.**, v.27, p.439–41, 2001.

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **RevBras Psiquiatr.**, v.21, p.3 -7, 1999.

SOUZA, C. S. Hanseníase: Formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeiro Preto.**, v.30, p.325-334, 1997.

SCHURING, R. P. et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **J Infect Dis.**, v.199, p.1816-1819, 2009.

STEFANI, M. M. A. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v.41, p.89-94, 2008.

TABOURET G. et al. Mycobacterium leprae phenolglycolipid-1 expressed by engineered M. bovis BCG modulates early interaction with human phagocytes. **PLoS Pathog.**, 6(10):e1001159, 2010.

TINDEMANS, I., SERAFINI, N., DI SANTO, J.P., HENDRIKS, R.W., 2014. GATA-3 function in innate and adaptive immunity. **Immunity.**, v.41, p. 191–206, 2014.

TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. **International journal of leprosy.**, v.69, p.1 – 12, 2001.

YANG, F. et al. Genetic variant RS 1058240 at the microRNA-binding site in the GATA3 gene may regulate its mRNA expression. **Biomedical reports.**, v.2, p.404-407, 2014.

WANG D, et al. Genetic variants of the MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. **Hum Genet.**, v.131, p.1251–60, março de 2012.

WANG D, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. **Hum Genet.**, v.127, p.337–48, 2010.

WANG, X.-D. et al. Association of single nucleotide polymorphisms of GATA3 with allergic rhinitis phenotypes in Chinese. **Zhonghua Er Bi Yan HouTouJingWaiKeZaZhi.**, v.43, p.494–498, 2008.

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

World Health Organization, 1998. WHO Model Prescribing Information Drugs Used in Leprosy.

ZHANG, F. et al. Genome wide association study of leprosy. **N. Engl. J. Med.**, v.361, p. 2609-2618, 2009.