

# 10<sup>o</sup>

# FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA  
EXTENSÃO • GESTÃO  
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE  
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): DESIRÉE SANT ANA HAIKAL, ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA, DANILO CANGUSSU MENDES, EMILLY RITHIELY, CAMILA SANTOS PEREIRA, OTÁVIO CARDOSO FILHO, RAQUEL JÚNIA DA CRUZ OLIVEIRA

## **A susceptibilidade e o comportamento clínico da Hanseníase não são influenciados pelo polimorfismo de nucleotídeo único dos genes TNF- $\alpha$ (-308 G/A) e CXCL12 (-801 G/A)**

### **Introdução**

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo parasita intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae* que apresenta predileção em parasitar células cutâneas e nervos periféricos. A doença manifesta-se com alterações dermatológicas, neurológicas e deformantes. O tratamento adequado da hanseníase compreende abordagem quimioterápica específica para prevenção de incapacidades físicas e psicossociais (Scollard *et al.*, 2006; Singh e Cole, 2011). No entanto, a doença representa um grande desafio para a saúde pública devido à complexidade de sua patogenia que pode determinar diferenças quanto ao comportamento clínico da doença e resposta ao tratamento dos indivíduos acometidos pela hanseníase. Alterações genéticas associadas a Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em citocinas e outros genes associados à resposta imune podem desempenhar um papel importante na susceptibilidade dos indivíduos e na evolução clínica de doenças infecciosas (Mira, 2006; Alter *et al.*, 2011; Rodrigues e Lockwood, 2011).

No presente estudo, foi investigada a distribuição polimórfica das variantes (-308G/A) do gene TNF- $\alpha$  e da variante polimórfica (-801G/A) do gene CXCL12 em amostras de indivíduos assintomáticos, indivíduos com hanseníase e indivíduos contatos domiciliares. Além disso, foi investigada a associação desses polimorfismos em relação aos aspectos clínicos da doença.

### **Material e métodos**

#### *A. Aspectos éticos*

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa da Unimontes/CEP-1114/2008.

#### *B. Desenho do estudo e obtenção dos dados.*

Trata-se de um estudo caso-controle. Foi realizado um levantamento de informações sócio demográficas e clínicas em uma população hiperendêmica para hanseníase na região do vale do Jequitinhonha e Mucuri-MG. As informações sócio-demográficas e clínicas foram coletadas a partir de um banco de dados de saúde pública do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAM). O estudo analisou amostras de controles saudáveis (n = 52), contatos domiciliares (n = 42) e indivíduos com hanseníase (n = 47).

#### *C. Análise dos polimorfismos genéticos.*

Os polimorfismos dos genes TNF- $\alpha$  (-308 G/A) e CXCL12 (-801 G/A) foram avaliados pela técnica RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição). Foi realizada a coleta de células a partir de raspagens da mucosa bucal e língua dos indivíduos. A extração de DNA foi efetuada seguindo protocolo padrão. A amplificação dos genes TNF- $\alpha$  e CXCL12 foram realizadas utilizando primers específicos por meio de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando um termociclador (Gradiente da Eppendorf Mastercycler). Os produtos da amplificação da PCR foram submetidos à digestão por enzimas específicas (New England Biolabs®) para verificar a presença do polimorfismo nos genes TNF- $\alpha$  e CXCL12. Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (6,5%) e coloração pelo nitrato de prata.

#### *D. Análise Estatística*

Os dados foram analisados por meio de teste estatístico de regressão logística univariada. As comparações foram consideradas significativas se p valor for menor que 0.05 (p < 0.05). Todos os procedimentos estatísticos foram feitos no programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* 20.0 para Windows.

# 10<sup>o</sup>

# FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA  
EXTENSÃO • GESTÃO  
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE  
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

## Resultados e discussão

Os resultados desse estudo não apresentaram nenhuma associação significativa entre as variáveis clínicas da hanseníase, genótipos alélicos e genotípicos do TNF- $\alpha$  (-308G/A) e CXCL12 (-801G/A). No entanto, observou-se uma tendência entre a presença de alelo G para o gene TNF- $\alpha$  (-308G/A) e a positividade da carga bacteriana (OR = 0,460, p = 0,083) (Tabela 1). Quanto ao CXCL12 (801G/A), não houve tendência significativa de associação entre as variáveis clínicas investigadas no estudo (Tabela 2). Em relação aos fatores genéticos, algumas variantes polimórficas como (-308G/A) TNF- $\alpha$  e (-801G/A) CXCL12 têm sido apontadas como os moduladores importantes da susceptibilidade sobre aspectos clínicos de Hanseníase (Pacheco e Moraes, 2009; Prado Montes De Oca, 2011). Notavelmente, alguns estudos relataram a presença de associações de polimorfismos de nucleotídeos únicos na região promotora do TNF- $\alpha$  (-308G/A) e susceptibilidade ao *M. leprae* em diferentes populações (Santos *et al.*, 2000). Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado a participação do polimorfismo do gene CXCL12 (-801G/A) em modular a susceptibilidade à imunodeficiência humana do tipo 1 do vírus (HIV-1) (Klein e Rubin, 2004; Kaslow *et al.*, 2005). Nesse trabalho, os indivíduos com hanseníase que apresentaram a variante genotípica AA do gene CXCL12 (801G/A) apresentaram lesões mais agressivas durante a infecção *M. leprae* devido a perturbações nas vias moleculares responsáveis pela atração de fagócitos mononucleares e outras células do sistema imunológico para a pele afetada. Este estudo sugere que as diferentes frequências alélicas e genotípicas dos genes TNF- $\alpha$  (-308G/A) e CXCL12 (801G/A) parecem não contribuir para a susceptibilidade à infecção pela bactéria *M. leprae* como também as manifestações clínicas da doença. São necessários mais estudos moleculares para compreensão da etiopatogênese e comportamento clínico da hanseníase.

## Conclusão

Os nossos dados sugerem que o polimorfismo dos genes TNF- $\alpha$  (-308G/A) e CXCL12 (-801G/A) parecem não contribuir para a susceptibilidade e agressividade clínica da hanseníase.

## Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio. Agradecemos também a Diretoria Acadêmica do Hospital Universitário Clemente de Faria pelo suporte a esse projeto de pesquisa, e por fim agradecemos sinceramente a todos os indivíduos que participaram deste estudo.

## Referências

- ALTER, A. et al. Leprosy as a genetic disease. **Mamm Genome**, v. 22, n. 1-2, p. 19-31, Feb 2011. ISSN 1432-1777
- KASLOW, R. A.; DORAK, T.; TANG, J. J. Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. **J Infect Dis**, v. 191 Suppl 1, p. S68-77, Feb 1 2005. ISSN 0022-1899
- KLEIN, R. S.; RUBIN, J. B. Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 6, p. 306-14, Jun 2004. ISSN 1471-4906
- MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes Infect**, v. 8, n. 4, p. 1124-31, Apr 2006. ISSN 1286-4579
- PACHECO, A. G.; MORAES, M. O. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. **Dis Markers**, v. 27, n. 3, p. 173-86, 2009. ISSN 1875-8630
- PRADO MONTES DE OCA, E. Human polymorphisms as clinical predictors in leprosy. **J Trop Med**, v. 2011, p. 923943, 2011. ISSN 1687-9694 (Electronic) 1687-9686
- RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 6, p. 464-70, Jun 2011. ISSN 1474-4457
- SANTOS, A. R. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 68, n. 3, p. 325-7, Sep 2000. ISSN 0148-916
- SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338-81, Apr 2006. ISSN 0893-8512
- SINGH, P.; COLE, S. T. Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 57-71, Jan 2011. ISSN 1746-0921

**Tabela 1.** Associações entre variáveis clínicas e morfológicas e os achados moleculares do polimorfismo do gene TNF- $\alpha$  (-308G/A).

Variáveis	(G308A) TNF- $\alpha$ SNP										
	Genótipos					Portador Alelo A					
	GG	GA	AA	OR	IC95%	p	GG	AA/AG	OR	IC95%	p
<b>OMS classificação clínica</b>											
Paucibacilar (n=15)	7	6	2	Referência			7	8	Referência		
Multibacilar (n=32)	14	14	4	1.079	0.330-3.529	0.900	14	18	1.125	0.328-3.855	0.549
<b>OMS classificação incapacidade</b>											
Ausente (n=18)	9	8	1	Referência			9	9	Referência		
Presente (n=29)	12	12	05	1.653	0.559-4.887	0.364	12	17	1.417	0.434-4.625	0.391
<b>Carga bacteriana</b>											
Negativa (n=25)	9	11	5	Referência			9	16	Referência		
Positiva (n=32)	12	9	1	0.402	0.134-1.203	0.103	12	10	0.469	0.145-1.512	0.163
<b>Lesões Cutâneas</b>											
Nenhuma (n=5)	3	2	0	Referência			3	2	Referência		
≤5 lesões (n=28)	13	10	5	2.187	0.389-12.307	0.375	13	15	1.731	0.249-12.011	0.617
>5 lesões (n=14)	5	8	1	2.434	0.423-14.013	0.319	5	9	2.700	0.332-21.977	0.353

**Tabela 2.** Associações entre variáveis clínicas e morfológicas e os achados moleculares do polimorfismo do gene CXCL12 (801G/A).

Variáveis	(G8018A) CXCL12 SNP										
	Genótipos					Portador Alelo A					
	GG	GA	AA	OR	IC95%	p	GG	AA/AG	OR	IC95%	p
<b>OMS classificação clínica</b>											
Paucibacilar (n=13)	4	7	4	Referência			4	11	Referência		
Multibacilar (n=32)	9	17	6	0.778	0.230-2.627	0.685	9	23	0.929	0.234-3.693	0.604
<b>OMS classificação de incapacidade</b>											
Ausente (n=18)	6	9	3	Referência			6	12	Referência		
Presente (n=29)	7	15	7	1.579	0.514-4.851	0.425	7	22	1.571	0.429-5.752	0.360
<b>Carga Bacteriana</b>											
Negativa (n=25)	6	12	7	Referência			6	19	Referência		
Positiva (n=22)	7	12	3	0.549	0.184-1.638	0.282	7	15	0.677	0.187-2.442	0.392
<b>Lesões Cutâneas</b>											
Nenhuma (n=5)	3	0	2	Referência			3	2	Referência		
≤5 lesão (n=28)	7	14	7	2.245	0.071-70.861	0.646	7	21	4.500	0.619-32.695	0.137
>5 lesões (n=14)	3	10	1	1.591	0.052-48.372	0.790	3	11	5.500	0.611-49.535	0.128