

Nathali da Silva Araújo¹, Heloisa de Almeida Freitas², Susana Paiva Oliveira³, Vanderson Ferreira Lima⁴,
Kamila Pereira dos Santos⁵

Professora Orientadora: Carolinne Sales-Marques⁶

Resumo

A hanseníase é uma doença contagiosa causada pela *Mycobacterium leprae*. Evidências demonstraram que fatores de susceptibilidade genética influenciam no desenvolvimento da doença. Os SNPs no gene *IRGM* são candidatos a associação a doença, no entanto, essa investigação ainda não havia sido feita na população de Alagoas. O objetivo deste estudo foi investigar a associação do rs13361189-*IRGM* e a hanseníase na população do agreste alagoano. Foi realizado um estudo do tipo caso-controle, incluindo indivíduos sem hanseníase (controle) e indivíduos com hanseníase (casos), cujo material biológico coletado foi de sangue total periférico que foi submetido a procedimentos laboratoriais. Ao comparar as frequências do genótipo CC entre os grupos, observa-se a frequência de 4% nos casos e de 3% nos controles, resultando em valores de OR que indicam ausência de associação do SNP estudado com a hanseníase (OR= 1,37 e p-valor= 0,68). Em todos os modelos genéticos, as análises demonstraram ausência de associação do referido SNP com a hanseníase. O estudo fornece informações que contribuem para o conhecimento a respeito dos marcadores genéticos associados com a hanseníase no Brasil.

Palavras-chave: Genética Humana; Genótipo; Caso-controle; Imunologia; Polimorfismo.

Introdução

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa negligenciada causada pelo *Mycobacterium leprae* que apresenta mais de 200 mil novos casos a cada ano no mundo, com o Brasil ocupando o segundo lugar em número absoluto de casos da doença (WHO, 2022). Em 2021, o Brasil foi responsável, juntamente com a Índia e a Indonésia, por 74,5% dos novos casos de hanseníase no mundo. Entre os anos de 2017 e 2022, foram notificados no Brasil 154.169 casos de hanseníase, tendo a região do Nordeste ocupado o primeiro lugar de frequência de notificações com 65.543 casos, calculando uma média de 13 mil casos/ano.

Em Arapiraca, no período de 2017 a 2022 apresentou um número total de notificação de 235 casos, do qual identificou-se que 29,36% dos pacientes exibiam algum

¹ Acadêmica de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, nathali.araujo@arapiraca.ufal.br

² Bióloga licenciada e Mestranda em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde, heloisaaalmeida044@gmail.com

³ Bióloga licenciada e Mestra em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde, paivasusana19@gmail.com

⁴ Biólogo licenciado, Universidade Federal de Alagoas, vandersonufal@gmail.com

⁵ Acadêmica de Biologia, Universidade Federal de Alagoas, kamila.santos@arapiraca.ufal.br

⁶ Docente e pesquisadora PhD em Genética Humana, Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, carolinne.marques@icbs.ufal.br

grau de incapacidade física instalada, o que pode indicar diagnóstico tardio ou dificuldades no manejo da doença (BRASIL, 2023). Sabe-se que dentre os indivíduos expostos ao bacilo apenas 0,1-1% desenvolvem a doença, indicando a existência de uma susceptibilidade que pode ser explicada não apenas por fatores de risco ambientais, mas também por marcadores genéticos (ALTER *et al*, 2008; CARDOSO *et al*, 2011). Os fatores genéticos também influenciam na ocorrência dos episódios reacionais hansênicos, como inflamações graves que possuem alta associação com a ocorrência das incapacidades físicas (FAVA, *et al*, 2017; SALES-MARQUES *et al*, 2017). Dessa forma, os marcadores genéticos, em combinação com outros fatores de risco, são bons candidatos a compor um modelo de predisposição para a hanseníase e incapacidades, que poderia auxiliar na decisão clínica, assim como já é feito para outras doenças (NOVOA; BURNHAM, 2011). Dentre as estratégias nacionais prioritárias para o enfrentamento da hanseníase estão as ações para diagnóstico precoce, redução de novos casos e de incapacidades (BRASIL, 2019).

Assim, este estudo, realizado de forma inédita no estado de Alagoas, possibilita a identificação de fatores que influenciam ou não no elevado número de casos de hanseníase no estado, apontando grupos de maior susceptibilidade para adoecimento e agravamento, e contribuindo para estratégias de intervenção e melhoria dos indicadores de saúde no município. Dentre os genes candidatos a associação com a hanseníase, encontram-se o *IRGM* que está relacionado a vias de autofagia, metabolismo lipídico e inflamação, que são centrais na fisiopatologia da hanseníase e na definição do perfil clínico a ser estabelecido pela doença (YANG *et al*, 2014; WANG *et al*, 2018). Esse gene já teve polimorfismos de nucleotídeo único ou simples (SNPs) associados com a hanseníase em algumas populações distintas (YANG *et al*, 2014; WANG *et al*, 2018; WANG *et al*, 2015), porém ainda não foi investigado na população brasileira. Com isso, esse estudo tem por finalidade investigar a associação do rs13361189-*IRGM* e a hanseníase na população do agreste alagoano.

Metodologia

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle. Foram convidados a participar do estudo indivíduos sem hanseníase (controles) e indivíduos com hanseníase (casos), pertencentes aos municípios de Arapiraca, Santana do Ipanema e Penedo, estado de Alagoas, Brasil. Para compor o grupo de casos, sendo estes recrutados em UBSs e Centro de Referência. Para compor o grupo de controles, foram recrutados indivíduos no “*Extensão em Debate*” - ISSN Eletrônico 2236-5842 – QUALIS B1 - Maceió – AL – Revista da Pró-Reitoria de Extensão da Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Edição Especial n°. 14. Vol.12, ano 2023.

Hemocentro de Alagoas - Sede Arapiraca (HEMOAL). Do recrutamento de casos foram excluídos do estudo pacientes com grau de parentesco, grávidas e HIV positivos; já para controles foram excluídos indivíduos que possuíam relato de alguma doença infecciosa (ou constatada a doença através da triagem realizada pelo HEMOAL) e indivíduos aparentados. Por fim, foi realizada a coleta do material biológico por punção venosa de sangue total periférico. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, parecer nº 4.439.041.

A extração de DNA foi realizada através do método de *salting-out*, ou método de precipitação do DNA por NaCl/Etanol/Proteinase k. Foi realizada a quantificação do DNA extraído através do *NanoDrop™ OneC (Thermo Scientific™)*, utilizando os parâmetros 280/260 e 260/230 para inferir a qualidade/pureza do DNA.

A genotipagem do SNP rs13361189-*IRGM* foi realizada por discriminação alélica através do *PCR Real Time* e seguiu o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*), utilizando sondas do tipo *TaqMan* e DNA previamente extraído e diluído em concentrações de 10 a 50 ng/uL. Os resultados foram obtidos através do *software* de discriminação alélica da *StepOnePlus/Applied Biosystems*, e exportados para planilhas do Excel, onde as informações dos genótipos foram organizadas em um banco de dados.

Em seguida, foram realizadas as análises estatísticas com as frequências genotípicas, alélicas, e de carreadores dos alelos, as quais foram comparadas entre casos e controles. Os SNPs foram avaliados quanto ao desvio do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. A associação genética foi estimada através do cálculo de OR, 95% de intervalo de confiança e valores de p, os quais a variável sexo foi utilizada como covariável para ajuste. As análises foram realizadas através do *SNPStats* (<https://www.snpstats.net/preproc.php>), uma ferramenta online para análise de associação de SNPs, os quais foram utilizados os modelos genéticos de regressão logística: dominante, codominante, recessivo e sobredominante e log aditivo.

Apoio Financeiro: Esse projeto conta com apoio de fomento do Edital Fapeal 06/2020 – PPSUS (Programa Pesquisa para o SUS, Decit-SCTIE-MS/CNPq/ Fapeal/ Sesau-AL), CNPQ e UFAL.

Resultados e Discussão

“Extensão em Debate” - ISSN Eletrônico 2236-5842 – QUALIS B1 - Maceió – AL – Revista da Pró-Reitoria de Extensão da Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Edição Especial nº. 14. Vol.12, ano 2023.

Foram incluídas 176 amostras de pacientes, sendo 61% do sexo masculino (N=108) e 39% feminino (N=68), com média de idade de 49 anos. Para compor o grupo controle, foram incluídos 264 indivíduos saudáveis, sendo 64% do sexo masculino (N=168) e 36% feminino (N=96), com média de idade de 33 anos, o que totaliza 440 indivíduos no tamanho amostral.

Nos controles, o SNP rs13361189-*IRGM* apresentou o genótipo TT (67%, N=176) como o mais frequente, seguido pelo genótipo CT (30%, N=79) e o menos frequente o genótipo CC (3%, N=8). De maneira similar, no grupo de casos, o genótipo mais frequente foi o TT (63%, N=111), seguido pelo CT (33%, N=58), e CC (4%, N=7). A caracterização de frequência dos genótipos do SNP estudados está representada na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Frequência dos genótipos do SNP rs13361189-*IRGM* em casos de hanseníase e em controles da população de Alagoas.

| Genótipos do rs13361189- <i>IRGM</i> | N (Frequência %) | |
|---|-------------------|-----------------------|
| | Casos (N= 176) | Controles (N= 264) |
| TT | 111 (63%) | 176 (67%) |
| CT | 58 (33%) | 79 (30%) |
| CC | 7 (4%) | 8 (3%) |
| N/A | 0 | 1 |
| EHW | p= 0,88 | |

N/A: Não disponível

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Em relação ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, foi encontrado o valor de $p= 0,88$, no grupo controles, indicando que a distribuição dos genótipos obedeceu às proporções esperadas pelas premissas genéticas desse equilíbrio. O alelo mais frequente do SNP rs13361189-*IRGM* nos grupos foi o T, a qual mostrou uma frequência de 82% em controles e de 80% nos casos, enquanto o alelo C teve uma frequência de 18% nos controles e de 20% nos casos, que o indica como o alelo polimórfico do presente estudo, como pode ser observado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Frequência alélica do SNP rs13361189-*IRGM* nos casos e controles em Alagoas.

| Alelos | N (Frequência %) | |
|--------|------------------|-----------|
| | Casos | Controles |
| T | 280 (80%) | 431 (82%) |
| C | 72 (20%) | 95 (18%) |

Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Ao comparar as frequências dos genótipos entre casos e controles, observa-se que as frequências dos genótipos foram similares entre os grupos, refletindo em valores de OR que indicam a ausência de associação com a hanseníase em todos os modelos genéticos analisados. No modelo log aditivo, o valor de OR foi 1,17 (P=0,38). No modelo codominante, por sua vez, o valor de OR foi de 1,00 (P= 0,68) para TT, 1,16 (P= 0,68) para CT e 1,37 (P= 0,68) para CC; nesse mesmo modelo, a frequência de TT em controles foi de 66,9% vs 63,1% em casos; a frequência de CT em controles foi de 30% vs 33% em casos (sugestivo de risco); por fim, a frequência de CC em controles foi de 3% vs 4% em casos. O genótipo CT foi mais frequente nos casos do que nos controles (33% vs 30%) refletindo em um valor de OR sugestivo de associação com risco a hanseníase, que, no entanto, não foi estatisticamente significativo (OR= 1,16; p= 0,68), como exposto na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Frequência do SNP rs13361189-*IRGM* em casos e controles e sua associação com a hanseníase.

| <i>IRGM</i> rs13361189 | | N (frequência %) | | OR sem ajuste (IC a 95%*) | p-valor | OR c/ ajuste ** (IC 95%) | p-valor |
|------------------------|----|------------------|------------|---------------------------------|---------|--------------------------------|---------|
| | | Controles | Casos | | | | |
| Codominante | TT | 176 (66,9%) | 111(63,1%) | 1,00 | | 1,00 | |
| | CT | 79 (30%) | 58 (33%) | 1,16 (0,77-1,76) | 0,67 | 1,16 (0,77-1,76) | 0,68 |
| | CC | 8 (3%) | 7 (4%) | 1,39 (0,49-3,93) | | 1,37 (0,48-3,89) | |

| | | | | | | | |
|----------------|-------|-------------|-------------|---------------------|------|---------------------|------|
| Dominante | TT | 176 (66,9%) | 111 (63,1%) | 1,00 | | 1,00 | |
| | CT/CC | 87 (33,1%) | 65 (36,9%) | 1,18 (0,79-1,77) | 0,41 | 1,18 (0,79-1,76) | 0,41 |
| Recessivo | TT/TC | 255 (97%) | 169 (96%) | 1,00 | | 1,00 | |
| | CC | 8 (3%) | 7 (4%) | 1,32 (0,47-3,71) | 0,60 | 1,30 (0,46-3,67) | 0,62 |
| Sobredominante | TT/CC | 184 (70%) | 118 (67%) | 1,00 | | 1,00 | |
| | CT | 79 (30%) | 58 (33%) | 1,14 (0,76-1,73) | 0,52 | 1,15 (0,76-1,73) | 0,52 |
| Log-aditivo | *** | *** | *** | 1,17 (0,83-1,65) | 0,37 | 1,17 (0,83-1,64) | 0,38 |

Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Ao comparar nossos achados com outros estudos encontrados na literatura, um estudo realizado com a população chinesa apresentou o genótipo CC como o de menor frequência com 18,7% em casos e 10,3% em controles, enquanto o CT mostrou maior frequência com 58% em casos e 56% em controles. Enquanto em nosso estudo com a população do agreste alagoano, o genótipo CC apresentou 4% em casos e 3% em controles, sendo o menos frequente; já o TT apresentou maior frequência com 63% em casos e 67% em controles, resultado diferente entre os da presente pesquisa e o estudo realizado na China por Yang e colaboradores (2014).

Yang e colaboradores (2014) indicaram que o polimorfismo rs13361189-*IRGM* foi associado ao aumento do risco de hanseníase e mostraram afetar as citocinas inflamatórias. Mais importante, o rs13361189 parece ter respostas específicas à infecção por *M. leprae* por regulação positiva expressão de citocinas, sugerindo um potencial mecanismo de patogênese da hanseníase. Diferentemente dos nossos resultados, não mostraram associação do SNP rs13361189-*IRGM* com a hanseníase. A disparidade entre os diferentes estudos pode ser devido a diferentes perfis genéticos de ancestralidade ou refletir uma associação que seja população-específica. Diante disso, espera-se contribuir para a conclusão a respeito da associação genética do SNP no gene *IRGM* com a hanseníase na população do agreste alagoano, através da expansão do N experimental. E contribuir para compor o painel de marcadores genéticos para a doença na população brasileira.

Conclusões

Em vista dos aspectos apresentados, foi possível observar que o SNP rs13361189-*IRGM* não foi associado com a hanseníase, ou seja, não há influência do SNP estudado na predisposição da população alagoana a maior risco ou proteção à doença. Esse estudo contribui para o desenvolvimento de um futuro painel de SNPs associados ou não à hanseníase na região, fornecendo informações que contribuem com a identificação de marcadores de susceptibilidade para a hanseníase no Brasil.

Referências

- ALTER, A. *et al.* Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Human genetics**, v. 123, p. 227-235, 2008.
- BRASIL. Caracterização da situação epidemiológica da hanseníase e diferenças por sexo, Brasil, 2012-2016. **Bol epidemiológico** [Internet]. 2018;49(4):0–11.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde - DATASUS. Informações de Saúde, Acompanhamento dos dados de hanseníase - Brasil (2017-2022). **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**, 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde - DATASUS. Informações de Saúde, Acompanhamento dos dados de hanseníase - Alagoas (2017-2022). **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**, 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. **Banco de dados do programa: 2017(SINAN Nacional)**. Brasília (DF), 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2019. xx p. : il.
- CARDOSO, C. C. *et al.* Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 533-549, 2011.

- FAVA, V. M. *et al.* Age-dependent association of *TNFSF15/TNFSF8* variants and leprosy type 1 reaction. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 155, 2017.
- NOVOA, M. C.; BURNHAM, T. F. Desafios para a universalização da genética clínica: o caso brasileiro. **Revista Panamericana de saúde pública**, v. 29, n. 1, p. 61-68, 2011.
- SALES-MARQUES, C. *et al.* Genetic polymorphisms of the *IL6* and *NOD2* genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005754, 2017.
- WANG, D. *et al.* A pleiotropic effect of the *APOE* gene: association of *APOE* polymorphisms with multibacillary leprosy in Han Chinese from Southwest China. **British Journal of Dermatology**, v. 178, n. 4, p. 931-939, 2018.
- WANG, D. *et al.* Association of the *LRRK2* genetic polymorphisms with leprosy in Han Chinese from Southwest China. **Genes & Immunity**, v. 16, n. 2, p. 112-119, 2015
- WHO, World Health Organization. Weekly epidemiological record: Global leprosy update, 2021. **World Health Organization**, n.36, 9 september, 2022.
- YANG, D. *et al.* Autophagy gene polymorphism is associated with susceptibility to leprosy by affecting inflammatory cytokines. **Inflammation**, v. 37, p. 593-598, 2014.