



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Carla Renata Graça

**Estudo dos polimorfismos dos genes *GSTT1*,
GSTM1 e *NINJURIN1* em indivíduos com
Hanseníase**

**São José do Rio Preto
2011**

Carla Renata Graça

**Estudo dos polimorfismos dos genes *GSTT1*,
GSTM1 e *NINJURIN1* em indivíduos com
Hanseníase**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de
Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Regina de Souza Baptista

Co-orientador: Prof. Dr. João Aris Kouyoumdjian

São José do Rio Preto
2011

Graça, Carla Renata

Estudos dos polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *NINJURIN1* em indivíduos com Hanseníase

São José do Rio Preto, 2011.

57 p; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Regina de Souza Baptista

5. Hanseníase; 2. Polimorfismo de nucleotídeo único; 3. *NINJURIN1*; 4. Glutatião S-Transferase; 5. Reação em cadeia da polimerase; 6. *Mycobacterium leprae*.

Carla Renata Graça

**Estudo dos polimorfismos dos genes *GSTT1*,
GSTM1 e *NINJURIN1* em indivíduos com
Hanseníase**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE

Presidente: Reinaldo Azoubel

1º Examinador: Mariângela Torreglosa Ruiz

2º Examinador: Vânia Del'Arco Paschoal

1º Suplente: Érika Cristina Pavarino

2º Suplente: Lilian Gastiglione

São José do Rio Preto, 26/07/2011.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	vi
Lista de Quadros e Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	02
Hanseníase: Uma abordagem geral	02
Agente etiológico.....	02
Epidemiologia.....	03
Classificação clínica.....	04
Interação <i>M.leprae</i> versus hospedeiro.....	05
Episódios reacionais.....	06
Interação do <i>M.leprae</i> com as células de Schwann e lesões neurais.....	07
Grau de incapacidade.....	08
Aspectos genéticos na hanseníase.....	09
Glutação S-transferases.....	10
Ninjurin1.....	11
Objetivos.....	12
2. Artigos Científicos.....	14
Artigo 1. Is Glutathione S-transferase genes GSTT1 and GSTM1 nullity protective against leprosy?.....	15
Artigo 2. NINJURIN 1 single nucleotide polymorphism and nerve damage in leprosy.....	29

3. Conclusões.....	44
4. Referências Bibliográficas.....	46
5. Anexos.....	54
Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	55
Anexo 2. Submissão do artigo científico 1.....	56
Anexo 3. Submissão do artigo científico 2.....	57

*Aos meus pais **Sonia M. Zago Graça** e
Carlos A. dos Santos Graça (in memoriam)*

Que sempre me propiciaram uma vida digna na qual eu pudesse crescer acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos e íntegros de caráter, tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas, e que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá de nossa vontade.

Agradecimentos

A Deus, que iluminou o meu caminho durante essa caminhada.

À minha mãe Sonia M. Zago Graça,

A pessoa mais importante da minha vida, quem eu mais confio e mais amo nesse mundo. Agradeço por todo seu amor, seu carinho, sua dedicação e sua confiança. Por tudo que me ensinou durante esses anos, sempre com uma paciência infinita. Por ter sempre confiado e acreditado em mim, em todos os momentos e em todas as decisões da minha vida. Por ter sido sempre meu exemplo de mãe, amiga, mulher e ser humano. Obrigada por tudo.

Ao meu pai Carlos A. dos Santos Graça,

Que partiu cedo demais, antes que esse momento chegasse. Sinto sua falta, mas sei que você está aqui, comigo. Sei que estamos compartilhando a alegria dessa conquista, pois você faz parte de mim, está em meu coração. Em meus pensamentos, posso te ver me dando força e coragem para lutar por meus sonhos, e encaminhando-me para essa nova fase da minha jornada.

Aos meus queridos irmãos Flávia Ap. Graça e César H. Graça,

Que mesmo distantes fizeram-se presentes em todos os momentos, por terem sido o meu exemplo e pelo constante amor e carinho. A lembrança afetuosa de vocês e o abraço amoroso a cada re-encontro fizeram com que eu chegasse até aqui. Eu amo vocês.

Ao Denelson Caires,

Pelo apoio cúmplice e incondicional, por sempre acreditar em mim e por apoiar meus sonhos e minhas idéias.

Ao Gianni M. Zuanazzi,

Pela sua dedicação, atenção e preocupação em ajudar e fazer o melhor para isso.

A todos os meus familiares,

Em especial a tia Ana Paula Zago, Angela Zanardi Zago, Tânia Mara Zago, Clara M. S. Saravalli Zago, Dolores Capelin Zago e a minha madrinha Célia R. Zago Gagliardi, por todo o amor, carinho e dedicação durante toda minha vida.

Ao Prof. Dr. João Aris Kouyoumdjian,

Pela orientação, amizade e incentivo seguro e constante durante todo caminhar.

À Profa. Dra. Andréa Regina Baptista,

Agradeço pela orientação e confiança depositada em mim.

A minha grande amiga Heloisa Cristina Caldas,

Pelos incansáveis momentos dedicados a essa pesquisa, por estar presente em distintos e importantes momentos de minha vida e tornar-se uma irmã.

A todos os integrantes do Centro de Investigação de Micro-organismo (CIM),

Por manterem sempre a amizade e o profissionalismo, em especial à Luciana Moran Conceição, Valéria Daltibari Fraga, Prof. Dr. Ricardo Luis Dantas Machado e Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini, por permitirem a utilização do CIM para a realização de parte desse trabalho.

Às minhas eternas amigas Patrícia C. B. Caldeira e Zélia C. Regis,

Pelos momentos de descontração e amizade valiosa.

À Celso Pereira Reis Filhos, Fábio de Oliveira e Mariângela Torreglosa Ruiz,
Pela amizade, atenção, e paciência, sempre dispostos a auxiliar e a ensinar.

**À Profa. Dra. Vânia Del'Arco Paschoal, Profa. Susilene Maria Tonelli Nardi,
Profa. Dra. Rosa Maria Cordeiro Soubhia e Camila G. Ravazzi,**
*Pela dedicação, colaboração e disponibilidade indispensáveis para a elaboração
desse trabalho.*

À Profa. Dra. Eny M. Goloni Bertollo e Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino,
*Por terem aceitado-me em seu laboratório, por tudo que me ensinaram durante
anos e por tudo o mais que resultou em meu amadurecimento científico e pessoal.*

Aos colegas do Bloco U-6,
*Gloria Elisa Floriano, Marcela A. Pinhel, Greiciane M. da Silva Florim,
Alessandro Catelan, Camila Mazeti, Gustavo C. Capatti, Marcus T. Belotto,
Juarez E. Santos Jr. e Ana Lívía S. Galbiatti, que estiveram presentes durante
todo esse tempo. Obrigada por tudo que me ensinaram, pela camaradagem e por
estarem sempre dispostos a ajudar.*

**Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braille, Diretor-adjunto do Programa de Pós-
graduação da FAMERP,**
*Pelo empreendedorismo e dinâmica contagiante, promotora do desenvolvimento
desse curso.*

**À Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
(FUNFARME),**
*Nas pessoas do Diretor Administrativo Dr. Jorge Fares e do Diretor Executivo
Dr. Horácio José Ramalho, pela cooperação.*

Aos órgãos de fomento CNPq-BAP e Fundação Paulista Contra a Hanseníase,
Pelo apoio financeiro.

Aos profissionais e pacientes

Que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização desse trabalho.

*"A ciência serve para nos dar uma idéia de quão extensa é a nossa
ignorância." (Félicité Robert de Lamennais)*

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1. Classificação do grau de incapacidade (GI)..... 10

ARTIGO 1

Table 1. General characteristics of patient groups..... 26

Table 2. Sociodemographic and clinical characteristics of leprosy patients (n=218) and healthy subjects (n=244)..... 27

Table 3. Prevalence of glutathione S-transferase T1 and M1 genes in patients and controls..... 28

ARTIGO 2

Table 1. Demographic, clinical classification and disability grade (DG) of leprosy patients group..... 41

Table 2. Frequency of asp110ala polymorphism in leprosy patients according to disability grade (DG)..... 42

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	- Porcentagem
μl	- Microlitro
A	- Nucleotídio Adenina
Ala	- Alanina
Asp	- Asparagina
BAAR	- Bacilo álcool ácido resistente
BAP	- Bolsa de auxílio à pesquisa
BB	- Boderline boderline
BL	- Boderline lepromatoso
Bp	- Pares de bases
BT	- Boderline tuberculóide
C	- Nucleotídio Citosina
CIM	- Centro de investigação de microorganismo
CNPq	- Conselho nacional de pesquisa
DG	- <i>Disability grade</i>
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
DNTP	- Desoxirribonucleotídeos trifosfato (N=A,C,G ou T)
ENH	- Eritema Nodoso Hanseníco
ENL	- <i>Erythema nodoson lepromatous</i>
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
GI	- Grau de incapacidade
GSTs	- Glutatião S-Transferases
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano
HWE	- <i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>

IB	- Índice baciloscópio
IC	- Intervalo de confiança
IFN	- Inteferon
II	- Forma indeterminada da hanseníase
IL	- <i>Interleucina</i>
LHGDA	- Laboratório de hemoglobinas e genética das doenças hematológicas
LIN	- Laboratório de investigação neuromuscular
LL	- Lepromatoso
<i>M. leprae</i>	- <i>Mycobacterium leprae</i>
MB	- Multibacilar
MDT	- <i>Multidrug therapy</i>
MgCl	- Cloreto de magnésio
Min	- Minuto
mM	- Milimolar
Ng	- Nanograma
NGA	- Núcleo de gestão assistencial
NINJ	- Gene que codifica a proteína Ninjurin
NINJURIN	- Nerve injury-induced protein
NRAMP	- Proteína associada à resistência natural dos macrófagos
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OR	- <i>Odds ratio</i>
PACRG	- Gene co-regulado com parquina
PARK2	- Região reguladora do gene parkinsonismo juvenil autossômico
PB	- Paucibacilar
PCR	- Reação em cadeia da polimerase

PGL	- Glicolípido fenólico
PQT	- Poliquimioterapia
RFLP	- <i>Restriction fragment length polymorphisms</i>
RNI	- Espécies intermediária de nitrogênio
ROI	- Reativos intermediários de oxigênio
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
RR	- Reação Reversa
S	- Segundo
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeos únicos
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i>
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
TT	- Tuberculóide
U	- Unidade
UFF	- Universidade Federal Fluminense
UNESP	- Universidade do estado de São Paulo
WHO	- <i>World Health Organization</i>
α	- Alpha
β	- Beta
γ	- Gamma
μM	- Micromolar

Resumo

Introdução. A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo álcool-ácido resistente *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), patógeno intracelular obrigatório, que afeta a pele e o sistema nervoso periférico. A expressão dessa doença resulta da interação entre o bacilo e o sistema imunológico; a maioria das pessoas infectadas desenvolve resposta imune eficaz contra *M. leprae*, sem sintomas da doença; outras exibem um espectro de manifestações clínicas ligado ao padrão da resposta imunológica do hospedeiro ao patógeno. Entre os mecanismos de defesa do hospedeiro estão as citocinas com atividades imunorreguladoras específicas representadas pelas populações de linfócitos Th1 e Th2 e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são elementos fundamentais para destruição bacilar intramacrofágica. Nesse contexto, inúmeras regiões genômicas têm sido implicadas na suscetibilidade e na severidade geneticamente controlada à hanseníase. Os Glutatião S-transferase são enzimas que eliminam as espécies reativas de oxigênio, os genes mais estudados são: *GSTT1* e *GSTM1*. O *NINJURIN1* é uma molécula de adesão celular que fornece substratos apropriados para reparação das células de Schwann após lesão no nervo periférico. O polimorfismo de nucleotídeo único *NINJI* codificado pela proteína *NINJURIN1*, é resultado de uma transversão polimórfica do nucleotídeo adenina para citocina (A→C), responsável pela troca de um aminoácido asparagina para alanina na posição 110 da proteína (asp110ala). **Objetivos.** 1) avaliar os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* na modulação da suscetibilidade genética à hanseníase e/ou à evolução dessa doença em seus pólos maligno ou benigno; 2) investigar a correlação entre o polimorfismo de nucleotídeo único *NINJURIN1* e o grau de comprometimento do nervo periférico. **Materiais e Métodos.** A amostra foi composta de 218 pacientes

com hanseníase (pacientes) e 244 indivíduos sem hanseníase (controles). O DNA genômico foi obtido de sangue periférico, a análise dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise do gene *NINJ1* foi realizada através da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP), utilizando a enzima HAE III. A frequência de genótipos e alelos foi analisada pelo teste do qui-quadrado e por modelos de regressão logística com ou sem correção para idade e sexo. **Resultados.** A frequência dos genótipos nulos *GSTT1/GSTM1* foi significativamente maior nos controles que nos pacientes ($P = 0,01$). A frequência do genótipo *GSTT1* foi significativamente maior nos pacientes em relação aos controles ($P = 0,01$). A frequência do polimorfismo *NINJ1* asp110ala foi significativamente maior em pacientes com comprometimento do nervo ($p = 0,0198$). Além disso, pacientes com o alelo CC (ala / ala) apresentaram risco maior de desenvolver lesão no nervo quando comparado ao alelo AA (asp / asp) ($p = 0,0143$). **Conclusão.** Os resultados demonstraram: (1) há associação do genótipo *GSTT1* positivo para o desenvolvimento da hanseníase. Os achados sugerem que a ausência de GSTs, com conseqüente permanência de ROS intracelular, pode contribuir para a eliminação do *M. leprae* e, dessa forma, reduzir o risco da doença; (2) o polimorfismo no gene *NINJ1* oferece menos proteção ao nervo na hanseníase. Esse achado indica que a *NINJURIN1* é uma molécula de adesão importante e pode ser uma potencial ferramenta terapêutica em muitas doenças.

Palavras-chave: 1. Hanseníase; 2. Polimorfismo de nucleotídeos únicos; 3. *NINJURIN1*; 4. Glutathione S-Transferase; 5. Suscetibilidade genética.

Abstract

Introduction. Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), an obligate intracellular acid-fast bacillus, which affects the skin and peripheral nervous system. The disease's expression results from the interaction between the bacillus and the immune system; most infected subjects develop an effective immune response against *M. leprae*, without disease; others exhibit a spectrum of clinical manifestations closely linked to the pattern of host immune response to the pathogen. Among the host defense mechanisms are immunoregulatory cytokines with activities represented by specific populations of Th1 and Th2 lymphocytes and the production of reactive oxygen species (ROS), which are key elements for bacterial destruction intramacrophagically. In this context, several genomic regions have been implicated in susceptibility and severity in genetically controlled leprosy. The glutathione S-transferase are enzymes that eliminate reactive oxygen species, are the most studied genes: *GSTM1* and *GSTT1*. The *NINJURIN1* is a cell adhesion molecule that provides suitable substrates for repair of Schwann cells after peripheral nerve injury. The single nucleotide polymorphism *NINJ1*, encoded by the protein *NINJURIN1*, is the result of a transversion to adenine nucleotide polymorphic cytokine (A→C), responsible for an amino acid exchange of asparagine for alanine at position 110 of the protein (asp110ala). **Objectives.** 1) Investigate if the presence of polymorphism in the *GSTT1* and *GSTM1* genes could affect the course of leprosy; 2) Investigate if the presence of polymorphism in the *NINJ1* gene could be relevant for neural impairment. **Material and Methods.** A cohort of 218 leprosy patients (patients) and 244 subjects without leprosy (controls) was studied. The genomic DNA was obtained from peripheral blood, *GSTT1* and *GSTM1* polymorphism screening was performed using polymerase chain

reaction and *NINJI* gene analysis was performed using the technique of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using the enzyme Hae III. The genotype and allele frequency were measured by Chi-square and logistic regression models with or without correction for age and gender. **Results.** The frequency of the GSTT1/GSTM1 null genotypes was significantly higher in controls when compared to patients ($P = 0.01$). The GSTT1 genotype frequency was significantly increased in patients when compared to controls ($P=0.01$). The frequency of the *NINJI* asp110ala was significantly increased in patients with nerve impairment ($p = 0.0198$). Also, patients with the CC (ala/ala) allele had a higher risk of developing disability when compared the allele AA (asp/asp) ($p = 0.0143$). **Conclusion.** The results demonstrated: (1) there is an association of *GSTT1* positive genotype for development of leprosy disease. The data found suggested that the absence of GSTs, with a consequent permanence of intracellular ROS, can contribute to *M. leprae* destruction and, therefore, reduce the disease risk; (2) polymorphism in *NINJI* gene offers less nerve protection in leprosy patients. This finding indicates that NINJURIN1 is an important adhesion molecule and can be a potential therapeutic tool in many diseases.

Keywords: 1. NINJURIN; 2. Single nucleotide polymorphism; 3. Glutathione S-Transferase; 4. Genetic Predisposition to Disease.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Hanseníase: Uma abordagem geral

A hanseníase é uma doença infecciosa granulomatosa, de curso crônico, causada pelo bacilo álcool-ácido (BAAR) resistente. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*, infecta principalmente macrófagos da pele e células de *Schwann* nos nervos. Dessa forma, a hanseníase pode ser vista como duas doenças combinadas: uma caracterizada por uma infecção crônica dependente da capacidade de resposta imunológica do hospedeiro, e a outra por neuropatia periférica que se inicia durante a infecção, porém com sequelas que podem estender-se por muitos anos após a cura. ^(1,2)

Fatores ambientais e genéticos desempenham um papel importante na hanseníase. Estima-se que aproximadamente 90% da população desenvolvam imunidade protetora na infecção, portanto não adoecendo; ^(3,4) outros indivíduos, no entanto exibem um espectro de manifestações clínicas ligadas à variação da resposta imune do hospedeiro ao patógeno. Dados observados em várias populações mostram que parte dos fatores relacionados à evolução da infecção para doença é devido a fatores geneticamente determinados do indivíduo infectado. ⁽⁵⁾

Agente etiológico

O *M. leprae* foi o primeiro agente etiológico causador de doença no ser humano a ser identificado por microscopia. ⁽⁶⁾ É um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com solução álcool-ácida pelo método Ziehl-Nielsen. ⁽⁷⁾ A morfologia do *M. leprae* é de um bastonete reto ou levemente curvado, medindo aproximadamente de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. Resiste cerca de 36 horas em temperatura ambiente, seu

tempo de multiplicação, no indivíduo infectado, é considerado lento, podendo levar de 11 a 16 dias. ⁽⁸⁾ À microscopia eletrônica, verifica-se que o *M. leprae* consiste de um envoltório celular composto por membrana plasmática, parede celular, e uma camada mais externa rica em lipídios complexos. A sobrevivência do bacilo dentro da célula hospedeira está relacionada à estrutura característica da parede celular. O glicolipídio fenólico 1 (PGL-1) é o lipídio que confere especificidade imunológica ao *M. leprae*. Além disso, a parede celular é responsável pela baixa permeabilidade e, conseqüentemente, resistência a agente terapêutico. ⁽⁹⁾

Epidemiologia

A hanseníase ainda permanece como problema de saúde pública afetando aproximadamente 250.000 novos indivíduos por ano em todo o mundo, com a maioria dos casos concentrada em países subdesenvolvidos. ⁽¹⁰⁾ O Brasil ocupa o segundo lugar em números de casos novos e é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como país com alta endemicidade. Com relação à prevalência, o Brasil ocupa o primeiro lugar no mundo com taxa de 2,2 doentes/10.000 habitantes. ⁽¹¹⁾ Após a implementação da poliquimioterapia (PQT), em 1981, houve uma diminuição na prevalência, ou seja, diminuiu o número de casos da doença na população, porém não acompanhado por diminuição na taxa de detecção de novos casos. ⁽¹²⁾ Um dos problemas encontrados para a redução da incidência é o diagnóstico tardio e a conseqüente transmissão ativa da doença.

Classificação clínica

Em hanseníase, as formas clínicas estão diretamente relacionadas à efetividade da resposta imune do hospedeiro. Essa diversidade clínica originou numerosas classificações, sendo a mais utilizada aquela proposta por Ridley e Jopling em 1966,⁽¹³⁾ que se baseia nos critérios clínicos, na resposta imune ao *M. leprae* (medida pelo teste cutâneo de lepromina – Mitsuda) e na avaliação histopatológica e bacteriológica.⁽¹³⁾ Desse modo, em um pólo do espectro está a hanseníase **tuberculóide (TT)**, caracterizada por lesões tipo máculas e eritematosa, pequeno número de bacilos, avaliação bacteriológica raramente positiva e reação positiva ao teste de Mitsuda (lepromina). A produção local de citocinas nesse pólo da doença é do tipo 1 (Th1), incluindo o interferon-gama (IFN- γ) e as interleucinas IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18, típicas da resposta imune celular específica preservada.⁽¹⁴⁾ No outro extremo, encontra-se a forma **lepromatosa (LL)**, caracterizada por lesões altamente bacilíferas, muitas lesões cutâneas do tipo lepromas e reação negativa ao teste de Mitsuda.⁽¹⁵⁾ Ocorre, nessa forma, comprometimento importante da imunidade celular específica, com a produção de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-10), de modo que os indivíduos afetados são anérgicos ao *M. leprae* e possuem titulação elevada de anticorpos específicos circulantes. Esses pacientes são aqueles que possuem elevado potencial para transmissão da doença.⁽¹⁶⁾

Os casos designados como **borderline (BB)** compartilham sinais clínicos, histológicos e imunológicos com as duas formas polares da hanseníase (TT e LL). Esse estado pode ser instável devido a alterações imunológicas durante a fase de progressão ativa da doença. Os indivíduos inicialmente infectados frequentemente apresentam-se com resposta imunológica **indeterminada (II)** e lesões cutâneas clássicas ou perda de

sensibilidade, porém com resposta inflamatória mínima e baixa contagem bacilar. A partir dessa fase, na ausência de terapia antimicrobiana, pode haver cura espontânea ou progressão para qualquer um dos dois pólos. ⁽¹³⁾

Em 1982, a OMS estabeleceu uma classificação simplificada, para fins operacionais terapêuticos, baseada no número de lesões de acordo com os seguintes critérios: os pacientes com índice baciloscópio (IB) positivo (indivíduos BB, BL e LL) foram considerados **multibacilares (MB)**, enquanto os pacientes com IB negativo (formas TT e BT) foram classificados no grupo **paucibacilar (PB)**. ⁽¹⁷⁾

Interação *M. leprae* versus hospedeiro

Entre os mecanismos de defesa do hospedeiro estão as citocinas com atividades imunorreguladoras específicas representadas pelas populações de linfócitos Th1 e Th2 e a geração de radicais livres (espécies reativas de oxigênio - ROS). As células T do tipo Th1 produzem as citocinas IL-2, INF- γ e fator de necrose tumoral- β (TNF- β), responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. O INF- γ ativa os macrófagos e a IL-2 estimulando o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em uma doença mais branda ou cura. ⁽¹⁸⁾

Por outro lado, as células T do tipo Th2 produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, que são supressoras da atividade macrófágica, aumentando a resposta humoral que, por sua vez, é incapaz de controlar a multiplicação de patógenos intracelulares, resultando em infecção progressiva. Já o INF- γ aumenta a produção de reativos intermediários de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) por macrófagos, estimulando-os a destruir ou restringir a proliferação de microbactérias intracelulares. ⁽¹⁹⁾

A morte da micobactéria por meio de macrófago está associada com o “burst” (estouro) da atividade respiratória que leva a produção de várias moléculas e ROS. ⁽²⁰⁾ Os radicais livres são produzidos dentro das células por reações endógenas, geralmente oxidativas, que ocorrem em processos metabólicos normais e também em condições anormais como na inflamação causada por doenças infecciosas. ^(21,22) A ROS tem sido implicada como um dos principais mecanismos de função efetora antimicrobiana do hospedeiro contra o *M. leprae*.

De fato, a resistência à infecção pelo *M. leprae* está relacionada à presença de TNF- α e à produção de ROS, elemento fundamental para destruição bacilar intramacrofágica. ^(18,23) **A interação entre ROS e as citocinas tem o potencial para destruição do bacilo, mas elas são contidas pela defesa antioxidante do hospedeiro.** O organismo do hospedeiro possui vários sistemas de defesas antioxidantes que atuam na detoxificação das ROS de forma diferenciada. Dentre eles, o sistema enzimático antioxidante parece ser o principal meio de remoção das ROS formadas durante o metabolismo intracelular. ^(20,23)

Episódios reacionais

Durante o curso da hanseníase, os pacientes podem desenvolver episódios reacionais, que são caracterizados por reativação da resposta imunológica do hospedeiro contra o bacilo, ocasionando o surgimento de novas lesões na pele, reaparecimento de lesões antigas e agravamento dos sintomas neurológicos. Tais reações hansênicas preocupam, pois são a causa maior de lesões de nervos e incapacidades em hanseníase, e podem ocorrer antes, durante ou após a poliquimioterapia (PQT). ⁽²⁴⁾

Existem dois tipos de episódios reacionais: a reação tipo I ou Reação Reversa (RR) e a reação tipo II ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH).⁽²⁸⁾ As RR resultam de uma súbita reativação da resposta imune celular, caracterizada clinicamente por inflamação das lesões cutâneas, dos troncos nervosos e, conseqüentemente, alteração sensorial e motora,⁽¹³⁾ acometendo, na maioria das vezes, pacientes classificados como borderline (BT, BB, BL). Já o ENH é mediado por anticorpos e ocorre com maior frequência em pacientes MB (LL e BL).⁽²⁶⁾

Interação do *M.leprae* com as células de Schwann e lesões neurais

O *M. leprae* tem uma afinidade específica pelos nervos periféricos, acumulando-se no interior das células de Schwann, o que resulta em degeneração do axônio, perda da mielina e inflamação neural. O resultado de tal destruição acarreta perda da sensibilidade protetora que, com o passar do tempo, leva a deformações físicas e sequelas irreversíveis.⁽²⁷⁾

As células de Schwann são envoltas por uma lâmina basal, composta de moléculas da matriz extracelular, incluindo as lamininas α , β e γ . O *M. leprae* contém em sua parede celular um glicolípido fenólico (PGL-1) específico, que se liga à α -dístroglicana (subunidade protéica responsável pela interação entre as células de Schwann e a lâmina basal) na superfície da célula de Schwann durante o processo de infecção; essa interação é provavelmente relevante para o fato de o *M. leprae* ser a única bactéria a invadir os nervos periféricos.⁽²⁸⁾ Desse modo, a ligação do *M. leprae* à α -dístroglicana induz à internalização do bacilo e ao estabelecimento da infecção. O efeito inicial do *M. leprae* nas células de Schwann é a rápida desmielinização que, por sua vez, contribui com a multiplicação do bacilo e impede a resposta imune do

hospedeiro. Sobretudo, fornece um local favorável à sobrevivência desse bacilo no sistema nervoso periférico. ⁽²⁹⁾

As lesões neurais são precoces, de intensidade variável, e ocorrem em todas as formas da hanseníase. Na forma TT, os nervos sensoriais e motores da pele são afetados, levando à perda da sensibilidade; na forma LL, os danos ocorrem em nervos cutâneos mais profundos, podendo levar à perda da função muscular e à paralisia. Na hanseníase, há também o acometimento de fibras autonômicas; entre as manifestações destaca-se a perda da sudorese, resultando em pele ressecada. O principal fator que agrava as lesões neurais é a ocorrência de estados reacionais durante o curso do tratamento, e, nesse caso, a maioria dos pacientes apresenta episódios de neurite aguda. ⁽³⁰⁾ Acredita-se que cerca de 20 a 30% dos pacientes desenvolvem algum tipo de inflamação no nervo (neurite), que pode evoluir para uma incapacidade motora. A neurite pode ser um passo crucial na via que conduz a danos permanentes no nervo. ⁽³¹⁾

Grau de incapacidade

O grau de incapacidade física (GI) é o sistema mais frequente, padronizado pelo Ministério de Saúde, para graduar as deficiências dos pacientes com hanseníase (Quadro 1). O preenchimento desse sistema é baseado nos dados da avaliação neurológica no momento do diagnóstico e na alta do paciente. Os pacientes podem ser classificados como: GI 0 (zero), sem deficiência causada pela doença; GI 1(um), paciente com comprometimento do nervo sensorial (perda da sensibilidade protetora nas mãos e/ou pés); e GI 2 (dois), com envolvimento do nervo motor (portadores de deformidades: garras, paralisias, mãos e/ou pés caídos e reabsorção óssea). ⁽³²⁾

Quadro 1. Classificação do grau de incapacidade (GI).

Grau de incapacidade	Olhos	Mãos	Pés
0	Nenhum problema com os olhos devido à hanseníase.	Nenhum problema com as mãos devido à hanseníase.	Nenhum problema com os pés devido à hanseníase.
1	Diminuição ou perda da sensibilidade da córnea.	Diminuição ou perda da sensibilidade.	Diminuição ou perda da sensibilidade.
2	Logoftalmo, ectrópico, triquíase, opacidade corneana central, acuidade visual menos que 0,1.	Lesões tróficas / traumáticas, garras, reabsorção, mão caída.	Lesões tróficas/ traumáticas, garras, reabsorção, pé caldo, contratura de tornozelo.

Fonte: Ministério da Saúde, 2002

Aspectos genéticos na Hanseníase

Foi demonstrado, por meio de estudos de investigação da participação da hereditariedade no risco de desenvolver a hanseníase, que: há um aumento na frequência de doentes em famílias com casamentos consaguíneos; contatos intradomiciliares que possuem relação de parentesco exibem maior risco de desenvolver a doença ⁽³³⁾; e, por fim, grupos étnicos distintos, vivendo em uma mesma área endêmica, exibem diferentes taxas de prevalência. ⁽³⁴⁾ Todas essas evidências demonstram um papel do componente genético na suscetibilidade à hanseníase. Desse

modo, muitos genes já foram sugeridos como candidatos, e as associações mais consistentes até hoje relatadas foram observadas entre os subtipos da hanseníase e certos alelos dos genes que codificam os antígenos leucocitários humanos (HLA).^(35, 36,37) Contudo, tais genes provavelmente constituem apenas uma parcela dos muitos outros fatores genéticos envolvidos na complexa interação intergênica ou mesmo de regulação gênica do hospedeiro que conduz à doença.⁽³⁸⁾

Inúmeras regiões genômicas têm sido implicadas na suscetibilidade e na severidade geneticamente determinadas à hanseníase.^(39,40) Entre essas, está a já descrita associação entre a região 6q25,⁽⁴¹⁾ que contém a região reguladora do gene do parkinsonismo juvenil autossômico recessivo, denominado Parquína (*PARK2*), e do gene co-regulado com a parquína (*PACRG*) e a suscetibilidade à doença.⁽⁴²⁾ Outras associações já relatadas incluem alterações específicas do gene para a proteína 1 dos macrófagos associados à resistência natural (*NRAMP1*),^(43,44) – e também um polimorfismo no gene para o receptor da vitamina D.⁽⁴⁵⁾ Ainda, foram investigadas as alterações polimórficas em regiões promotoras dos genes codificadores das citocinas, em especial de interleucina-10 (IL-10) e de IL-12, além do fator de necrose tumoral- α (TNF- α),^(38,46,47,48) e sua correlação com a suscetibilidade diferencial à hanseníase, às suas formas, ao índice baciloscópico ou ainda a resposta ao teste de Mitsuda.^(46,49)

Glutatião S-transferases - GSTs

Um grande número de evidências tem revelado que genes polimórficos estão envolvidos nas reações de ativação e detoxificação de drogas e de compostos químicos ambientais.^(50,51) Nesse contexto, estão as enzimas de Fase II detoxificantes, sendo das mais relevantes as glutatião S-transferases (GSTs).⁽⁵²⁾ A família das GSTs é composta

por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que podem conjugar-se com moléculas eletrofílicas para torná-las menos tóxicas, já que catalisam o ataque nucleofílico da glutationa. ^(52,53) Dentre os genes que codificam as enzimas GSTs, os mais estudados são o *GSTM1* e o *GSTT1*. O gene *GSTM1*, que codifica a primeira, está localizado no cromossomo 1, e é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais (*GSTM1**A e *GSTM1**B) e um alelo com atividade nula (*GSTM1**0), sendo que aqueles funcionais têm a mesma eficácia metabólica. Assim como o gene *GSTM1*, o *GSTT1* também é polimórfico na população humana, podendo apresentar fenótipo nulo por deleção. A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em taxas que variam entre 20 e 70% nas diferentes populações investigadas, enquanto para o *GSTT1* essa taxa é descrita como sendo de 11 a 38%. ⁽⁵⁴⁾

A ausência das GSTs poderia reduzir a capacidade de um organismo detoxificar a ROS. Diversos estudos têm detectado uma frequência elevada do fenótipo nulo desses genes em indivíduos portadores de diferentes neoplasmas, tais como câncer de pulmão, colorretal e de bexiga. ^(55, 56,57)

Ninjurin1

A proteína Ninjurin foi primeiramente identificada como uma molécula co-reguladora das células de Schwann e neurônios após lesão no nervo periférico. As análises posteriores revelaram que Ninjurin é uma molécula de superfície celular que promove a agregação de células e estimula o crescimento axonal, sugerindo um importante papel na regeneração do nervo. ⁽⁵⁸⁾ O gene *NINJ1*, que codifica essa proteína, está localizado no cromossomo 9q22 e possui uma transversão polimórfica de

A → C em sua sequência, responsável pela substituição do aminoácido asparagina para alanina na posição 110 (asp110ala) da proteína.^(31,59)

1.1- OBJETIVOS

O presente trabalho tem como sujeitos de pesquisa indivíduos portadores de hanseníase e uma população controle, todos residentes no município de São José do Rio Preto e região, Sudeste do Brasil. Tendo por base o acima exposto, tem como objetivo geral investigar a possível modulação da suscetibilidade genética à hanseníase e da gravidade dessa doença por proteínas com ação distinta e codificadas por genes polimórficos.

São objetivos específicos: 1) Avaliar a possível participação dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* na modulação da suscetibilidade genética à hanseníase e/ou na evolução dessa doença em seus pólos LL ou TT; 2) Investigar a possível correlação entre o polimorfismo do gene *NINJ1* e o grau de comprometimento do nervo periférico.

2.ARTIGOS CIENTÍFICOS

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados referentes aos objetivos dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo.

Artigo 1

Título: *Is Glutathione S-transferase genes GSTT1 and GSTM1 nullity protective against leprosy?*

Periódico: *Tropical Medicine and International Health*, submetido a publicação dia 24 de maio de 2011.

Artigo 2

Título: NINJURIN 1 single nucleotide polymorphism and nerve damage in leprosy.

Periódico: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, submetido a publicação dia 11 de março de 2011.

Is Glutathione S-transferase genes *GSTT1* and *GSTM1* nullity protective against leprosy?

Carla R. Graça¹, Camila R. Gauch¹, Rosa M. Cordeiro-Soubhia¹, Susilene M. Tonelli-Nardi^{2,3}, Ricardo Luiz Dantas Machado¹, João A. Kouyoumdjian¹, Vânia DA. Paschoal¹, Andrea R. Baptista Rossit⁴

1 - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São Paulo, Brazil

2 - Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil

3 - Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz - São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

4 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

Financial Support: This study was partially supported by the BAP-FAMERP and Fundação Paulista Contra a Hanseníase grants and by a Scientific Initiation scholarship from FAPESP – IC/FAPESP.

Correspondence address:

Andrea R. Baptista Rossit, Instituto Biomédico Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) Universidade Federal Fluminense

Rua Prof. Hernani Pires de Melo, 101 São Domingos, Niterói –RJ, 24210-130

E-mail address: andrearegina@id.uff.br

Abstract

Leprosy is a slow and progressive infectious disease caused by the *Mycobacterium leprae*. The generation of free radicals called reactive oxygen species (ROS), which promote the bacillus destruction, is an effective defense mechanism developed by the host. The ROS contribute for *M. leprae* destruction within macrophages. In parallel, the glutathione S-transferase (GST) multifamily enzymes constitute an important antioxidant system for ROS detoxification and protection against toxicity and Therefore, *GST* null genotypes could reduce the detoxification of ROS, increasing its effectiveness for *M. leprae* destruction. **Objectives:** Our aim was to evaluate polymorphisms in the *GSTT1* and *GSTM1* genes as human leprosy susceptibility modulators. **Methods:** The genotyping of the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms was performed by using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) in 218 leprosy patients and 244 non-leprosy subjects (control group). **Results:** The occurrence of the *GSTT1/GSTM1* null genotypes was significantly higher among control subjects than among patients ($P = 0.01$). The *GSTT1* genotype frequency was significantly increased in leprosy patients when compared with control subjects ($P=0.01$). **Conclusions:** Our results suggest that *GSTT1/M1* nullity may play an important role in leprosy pathogenesis. **Significance:** Despite these findings further studies will be necessary to ascertain the role of these genes in leprosy and to draw any future prevention measures or contributions to drug therapy.

Keywords: Glutathione S-transferase; Leprosy, Reactive Oxygen Species.

Introduction

Leprosy is a slow and progressive infectious disease caused by the *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), an obligate intracellular bacillus, with broad clinical and immunological spectrum. The tuberculoid form (TT) is characterized by isolated skin lesions without or with rare intracellular bacilli (paucibacillary form) and lymphocyte T helper 1 (Th1) cellular immune response. On the other hand, lepromatous leprosy (LL) is characterized by the presence of profuse bacilli (multibacillary form) in the skin and lymphocyte T helper 2 (Th2) humoral immune response. Three intermediate forms, borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB) and borderline lepromatous (BL) are also observed (Ridley and Jopling, 1966).

The major defense against infection by any microorganisms is the macrophage system. The generation of free radicals produced by phagocytes, called reactive oxygen species (ROS), which promote the destruction of the *M. leprae*, is an effective defense mechanism developed by the host (Jyothi *et al.* 2008). In parallel, cells have a comprehensive system of antioxidant defenses to prevent the free radical formation and the glutathione S-transferase (GST) multifamily enzymes constitute an important antioxidant system for ROS detoxification and protection against toxicity. Therefore, *GST* null genotypes could reduce the detoxification of ROS increasing its effectiveness for microorganism destruction (Mittal *et al.* 2006; Prasad *et al.* 2008). There are four *GST* subclasses (*alpha*, *pi*, *mu*, *theta*); being *theta* (*GSTT1*) and *mu* (*GSTM1*) the most studied. The *GSTT1* gene is located on chromosome 22 (22p 11.2), while *GSTM1* gene is located on chromosome 1 (1p 13.3). The *GSTT1* and *GSTM1* activity deficiency are caused by the inherited homozygous *GSTT1* or *GSTM1* genes absence (*GSTT1* or *GSTM1* null genotype) (Ates *et al.* 2004; Tamer *et al.* 2004; Bathi *et al.* 2009; Sharma

et al. 2010). The purpose of the present study was to evaluate *GSTT1* and *GSTM1* gene polymorphisms in as human leprosy susceptibility and/or severity modulators in a Southeast Brazilian population.

Materials and methods

Subjects

The study population was composed by individuals older than 18 years old, belonging to all ethnical groups, and were invited to participate after signing an informed consent. This study was approved by the Ethical Research Board from the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (3898/2006).

Patients. This study represents a case-control investigation of two-hundred and eighteen leprosy patients (n=218), 103 female and 115 male, recruited from two leprosy treatment reference centers in São José do Rio Preto city, located in the Northwestern region of São Paulo state, Southeast Brazil: the Núcleo de Gestão Assistencial 60 (NGA-60) and the Sanitary Dermatological Service of the Hospital de Base Outpatients Clinic (HB-DAS), FUNFARME Foundation. The Hospital de Base (HB) is a tertiary care hospital catering to a large population from the Northwestern region of São Paulo State, Brazil, representing, along with the NGA 60, the regional center of leprosy diagnosis and treatment. Together, these two centers concentrate leprosy health care in the São Paulo State Health Regional Department XV (DRS XV), which includes 101 municipalities. All patients were invited to participate among those who started leprosy treatment in the municipality from November 2006 until April 2010. Leprosy diagnosis was based on clinical assessment as evaluated by both centers physicians and detection of acid-fast bacilli either in skin-slit smears as well as in skin biopsies. Patients were

classified according to the Ridley Jopling Scale (Ridley and Jopling 1966) and also as paucibacillary (PB) or multibacillary (MB), with subsequent treatment according to World Health Organization (WHO) specifications (WHO 1998). The PB group (BT and TT) was constituted by 86 cases, while the MB group (LL, BL and BB) was constituted by 132 cases. General characteristics of the patient group are summarized in Table 1.

Controls. Two-hundred and forty four (n=244) healthy subjects were selected among blood bank donors from the HB Blood Bank, in the same municipality, and were included as controls matched with leprosy patients by age (± 5 years) and gender. None of them referred disease or were taking continuous medication. Table 2 summarizes the demographics of the study population with regard to age and gender.

DNA extraction and genotyping of *GSTT1* and *GSTM1*

The genomic DNA was obtained from peripheral blood according to Miller *et al.* 1988 with modifications. The genotyping of the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms was performed by using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) with co-amplification of the *CYP1A1* gene as an internal control for successful amplification reaction (Abdel-Rahman *et al.* 1994). Briefly, PCR amplifications were carried out in 50 μ l reactions using 25–100 ng of genomic DNA as template in tubes containing 1.0 U Taq DNA polymerase with 1X of the buffer as supplied by the manufacturer (Invitrogen, CA, USA), 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP and 0.3 μ M of each primer. Amplification cycles included a denaturing step at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles set at 94 °C for 2 min, 62 °C for 1 min and 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were eletrophoresed in 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. DNA from samples positive for *GSTM1*

and *GSTT1* genotypes yielded bands of 215 bp and 480 bp, respectively, while the internal positive control (*CYP1A1*) PCR product corresponded to a 315 bp band.

Allele and genotype frequencies were calculated by direct counting. The associations of the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms in patients and control subjects were carried out by weighted logistic regression models and reaction using the computer program Minitab for Windows (Version 15). Results are shown as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% IC). The significance of the allele frequency difference between the MB and PB groups and *GSTT1*, *GSTM1* genotypes was analyzed using Pearson's Chi-square test. P-values <0.05 were considered statistically significant (program Instat)

Results

The mean ages of patients and controls were 55 years old \pm 14.2 and 51.4 years old \pm 16.6 (mean \pm standard deviation), respectively. The two groups showed no difference in mean ages or gender and there were no statistically significant differences between cases and controls, indicating a well-matched population.

After combining the genotypes obtained for both study groups, we could detect that the presence of both genes, *GSTM1* and *GSTT1* positive genotype, enhanced the risk for leprosy (OR 2.107, 95% CI 1.17–3.78) whereas the frequency of the *GSTT1/GSTM1* null genotypes was significantly higher among control subjects than among patients (P = 0.0178). The *GSTT1* genotype frequency was significantly increased in leprosy patients when compared with control subjects (P = 0.0150), phenomenon that was not observed when the *GSTM1* genotype frequency was

considered ($P = 0.736$). The distribution of *GSTT1* and *GSTM1* alleles in patients and control subjects is shown in Table 2.

There was no difference in the frequency of the *GSTT1/GSTM1* genotypes between leprosy patients and control subjects by adding the variables gender and age in the logistic regression model. Also, no differences were observed in the frequency of the *GSTT1/GSTM1* genotypes between MB and PB groups ($P > 0.05$).

Discussion

Several studies in different populations around the world investigated leprosy susceptibility and disease severity through human genetic susceptibility (Vanderborght *et al.* 2004; Gorodezky *et al.* 2004; Roy *et al.* 1999; da Silva *et al.* 2009; Alter *et al.* 2010). The majority of them aimed at determine the role of proteins and enzymes involved in Th 1 and Th 2 immune responses (Vanderborght *et al.* 2004; Gorodezky *et al.* 2004; da Silva *et al.* 2009; Santos *et al.* 2002; Hagge *et al.* 2009; Kang *et al.* 2004; Alter *et al.* 2010), the vitamin D receptor gene variations (Roy *et al.* 1999; Goulart *et al.* 2006), Parkin (PARK2) and parkin co-regulated genes (PACRG) (Schurr *et al.* 2007; Malhotra *et al.* 2006, Mira *et al.* 2004), and also the Toll like genes polymorphisms (Kang *et al.* 2004) with conflicting results. As far as we know our study is the first to investigate the *GST* gene polymorphisms as possible modulators of susceptibility and/or severity to leprosy disease. Therefore, it is not an easy task to discuss the results here obtained.

In the present investigation, we analyzed the combined genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* to evaluate the possibility of a contribution to the severity of leprosy or to a modulation of the human susceptibility to this disease. The combination of the

GSTM1 and *GSTT1* null genotypes was more common in the control group than in the leprosy group. We also suggest an association of *GSTT1* positive genotype in the development of leprosy disease. Together, these data lead us to the proposition that the absence of GSTs with a consequent maintenance of intracellular ROS can contribute to *M. leprae* elimination and, therefore, reduce the disease risk. On the other hand, we could not establish any statistically significant association of these polymorphisms with clinical subtypes of leprosy. Indeed, if GST nullity plays an important role in bacilli destruction, as suggested, this could be a protective effect which would act before the establishment of a multi or paucibacillary form of the disease.

GST gene polymorphisms were extensively studied in case-control studies which investigated human susceptibility to several types of cancer in different populations with both, positive and negative, associations which were mainly attributed to particularities concerning environmental exposure to carcinogens and population with diverse ethnical composition (Tamer *et al.* 2004; Bathi *et al.* 2009; Kwon *et al.* 2011). While the first do not seem to represent an important issue in the present study, the bias generated in case control study based in polymorphisms investigated in human admixed populations can be of major concern. Therefore, the lack of individual genotyping of ethnicity markers before case-control matching is a limitation of our study that we acknowledge.

Further studies with a large cohort a careful case control match accordingly to ancestry informative markers to control ethnicity will shed additional light on the role of *GSTM1* and *GSTT1* in leprosy.

References

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar NA (1996) A Multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 107(2), 229-33.
- Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N *et al.* (2010) Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet* 127(3), 337-48.
- Ateş NA, Tursen U, Tamer L *et al.* (2004) Glutathione S-transferase polymorphisms in patients with drug eruption. *Arch Dermatol Res.* 295(10), 429-33.
- Bathi RJ, Rao R, Mutalik S (2009) GST null genotype and antioxidants: risk indicators for oral pre-cancer and cancer. *Indian J Dent Res* 20(3), 298-303.
- da Silva SA, Mazini PS, Reis PG *et al.* (2009) HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis* 22, 134.
- Gorodezky C, Alaez C, Munguía A *et al.* (2004) Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis* 84(1-2), 82-92.
- Goulart LR, Ferreira FR, Goulart IM (2006) Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48(1), 91-8.
- Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ *et al.* (2009) Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol* 174(4), 1379-89.

- Jyothi P, Riyaz N, Nandakumar G, Binitha MP (2008) A study of oxidative stress in paucibacillary and multibacillary leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 74(1), 80.
- Kang TJ, Yeum CE, Kim BC *et al.* (2004) Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* 112(4), 674-80.
- Kwon DD, Lee JW, Han DY *et al.* (2011) Relationship between the Glutathione-S-Transferase P1, M1, and T1 Genotypes and Prostate Cancer Risk in Korean Subjects. *Korean J Urol* 52(4), 247-52.
- Malhotra D, Darvishi K, Lohra M *et al.* (2006) Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. *Eur J Hum Genet* 14(4), 438-42.
- Miller SA, Dykes DD, Poleski HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.
- Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT *et al.* (2004) Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427(6975), 636-40.
- Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC (2007) Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol* 22(6), 920-4.
- Prasad CV, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth GB (2008) Erythrocyte glutathione peroxidase, glutathione reductase activities and blood glutathione content in leprosy. *J Infect* 56(6), 469-73.

- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity (1966) A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 34(3), 255-73.
- Roy S, Frodsham A, Saha B *et al.* (1999) Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 179(1), 187-91.
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR *et al.* (2002) Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 186(11), 1687-91.
- Schurr E, Alcais A, Singh M *et al.* (2007) Mycobacterial infections: PARK2 and PACRG associations in leprosy. *Tissue Antigens* 69, 231-3.
- Sharma V, Kumar B, Saxena R (2010) Glutathione S-transferase gene deletions and their effect on iron status in HbE/beta thalassemia patients. *Ann Hematol* 89(4), 411-4.
- Tamer L, Calikoğlu M, Ates NA *et al.* (2004) Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology* 9(4), 493-8.
- Vanderborght PR, Matos HJ, Salles AM *et al.* (2004) Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNFalpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72(2),143-8.
- WHO Expert Committee on Leprosy. Seventh report (1998) *World Health Organ Tech Rep Ser*, 874:20.

Table 1. General characteristics of patient groups.

		Total
		N (%)
Classification used for treatment	Paucibacillary	96 (44.0)
	Multibacillary	122 (56.0)
Clinical forms (Ridley and Jopling)	LL	90 (41.3)
	BL	13 (6.0)
	BB	19 (8.7)
	BT	19 (8.7)
	TT	63 (28.9)
	I	14 (6.4)

LL, lepromatous leprosy; BL, borderline lepromatous; BB, borderline; BT, tuberculoid leprosy; TT, tuberculoid leprosy; I, indeterminate.

Table 2. Demographics characteristics of the study population with regard to age and gender.

		Patients	Controls
		(n=218)	(n=244)
		N (%)	N (%)
Age (mean \pm SD)		55 \pm 14.2	51.4 \pm 16.6
Gender	Male	115 (52.7)	134 (55.0)
	Female	103 (47.3)	110 (45.0)

Table 3. Prevalence of glutathione-S-transferase T1 and M1 genes in patients and controls.

Genotype	Patients	Control	<i>P</i> value
	N (%)	N (%)	
<i>GSTT1/GSTM1</i> null	22 (10%)	48 (20%)	0.01
<i>GSTT1</i>	46 (21%)	77 (31%)	0.01
<i>GSTM1</i>	110 (50%)	128 (52%)	0.73

Comparison is made by χ^2 test
P= < 0.05 is significant

NINJURIN 1 single nucleotide polymorphism and nerve damage in leprosy

C.R. Graça¹, V.D.A. Paschoal¹, R.M. Cordeiro-Soubhia¹, S.M. Tonelli-Nardi^{2,3}, A.R. Baptista-Rossit⁴, J.A. Kouyoumdjian¹

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São Paulo, Brazil

²Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil

³Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz - São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

⁴Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

Financial Support: This study was partially supported by the FAMERP-CNPq/BAP and Fundação Paulista Contra à Hanseníase grants.

Address for correspondence:

C.R. Graça, Laboratório de Investigação Neuromuscular (LIN)

Av. Brigadeiro Faria Lima 5416, 15090-000 São José do Rio Preto SP, Brasil.

Tel +55 17 3201-5911.

E-mail: cgraca@hotmail.com

Abstract

Leprosy, a chronic infectious disease caused by infection caused by *Mycobacterium leprae*, can damage the peripheral nervous system, being one of the leading causes of nontraumatic neuropathy in some developing countries. **Objectives:** The aim of this study was to investigate the importance of the polymorphism in the *NINJ1* gene for neural impairment during leprosy course. **Methods:** A single nucleotide polymorphism (asp110ala) was searched in 218 leprosy patients and 244 non-leprosy subjects using polymerase chain reaction/restriction enzyme digestion. **Results:** Asp110ala in leprosy versus non-leprosy and multibacillary versus paucibacillary clinical forms did not show difference ($p = 0.9715$ and 0.0536 , respectively). In the other hand, asp110ala frequency was significantly increased ($p = 0.0198$) in patients with nerve impairment. Also, leprosy patients with the CC allele had a higher risk of developing disability when compared the allele AA ($p = 0.0143$). **Conclusion:** Our results demonstrated that polymorphism in *NINJ1* gene offers less nerve protection in leprosy patients. **Significance:** Despite these findings further studies will be necessary before any suggestion, either drug or even surgical therapy, can be proposed.

Keywords: Ninjurin; Single nucleotide polymorphism; Leprosy, Disability and Health; Disability Evaluation.

Introduction

Hansen's disease, or leprosy, is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), an obligate intracellular acid-fast bacillus. Leprosy, is one of the leading causes of nontraumatic neuropathy in the developing countries and an example of peripheral nervous system (PNS) infectious neurodegenerative disease (1,2) In spite of the improving results from multidrug therapy (MDT) in last two decades, leprosy still remains an important global health problem (3) mainly because of disabilities and deformities caused by peripheral neuropathy (4).

M. leprae parasite the macrophages and Schwann cells of the peripheral nerves. In addition, *M. leprae* has the capacity to pass over the Schwann cells basal lamina and, after inside it remains secure from antimicrobial drugs. This allows the bacillus to multiply continuously, causing nerve injury (1). The nerve damage affecting sensory, motor, and autonomic fibers and occurs gradually throughout the course of the disease. The affinity of *M. leprae* for Schwann cells is mediated by $\alpha 2$ -laminin, a major component of the basal lamina, which binds α -dystroglican in the cell membrane (5).

Clinically, leprosy is classified according to the number of skin lesions and the number of bacilli found there. Ridley – Jopling classification (6), the most used grading for leprosy, is based on clinical, bacteriological, immunological and histopathological features. Tuberculoid leprosy (TT), is characterized by isolated skin lesions without or rare intracellular bacilli and T helper 1 (Th1) cellular immune responses. Lepromatous leprosy (LL), on opposite to TT, is characterized by the presence of profuse bacilli in the skin and T helper 2 (Th2) humoral immune responses. Three intermediate forms, borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB) and borderline lepromatous (BL), are also observed. Leprosy patients can also develop two types of reaction: type 1

or reversal reaction (RR); type 2 reaction or erythema nodosum leprodatum (ENL). Both are characterized by the reactivation of the host immune response and often exacerbate nerve injury (7).

Studies have demonstrated that the binding of *M. leprae* to Schwann cells can induce both demyelination and axonal damage. Schwann cells from play an important role in regeneration after neuronal damage (8).

The influence of individual genetics factors leading to different immune responses is clearly observed for leprosy susceptibility, as well as for clinical course and type of disease; moreover, specific molecular variants could be important to define increased individual risk for disease after exposition to *M. leprae* (9,10).

Ninjurin (nerve injury-induced protein) is a hemophilic adhesion molecule expressed in Schwann cells and neurons and up-regulated after peripheral nerve injury. *Ninjurin* gene (*NINJI*) is located in chromosome 9q22 and plays an important role in nerve regeneration since it is upregulated during nerve damage, promoting nerve outgrowth. The *NINJI* gene, presents an A–C transversion in their sequence, responsible in an amino acid change at position 110 (asp110ala) of protein (9,11,12).

We hypothesized that the presence of polymorphism in the *NINJI* gene could be relevant for neural impairment during the course of leprosy.

The aim of this study was first, to evaluate the importance of the *NINJI* gene single nucleotide polymorphism (SNP) to modulate leprosy susceptibility and/or to modify its clinical outcome, either PB or MB, in a large cohort of patients, and, second, to study the correlation between this polymorphism and nerve injury.

Materials and methods

Patients. Two-hundred and eighteen leprosy patients, 103 female and 115 male, were included in this study. Patients were recruited from two leprosy treatment reference centers in the municipal, the Núcleo de Gestão Assistencial 60 (NGA-60) and the Sanitary Dermatological Service of Hospital de Base Outpatients Clinic (DAS) of the Medicine School in São José do Rio Preto the outpatient leprosy clinic of Medical School (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil). The population studied was all patients who started treatment in the municipality in the period of November 2006 and April 2010. The leprosy diagnosis was based on clinical assessment and detection of acid-fast bacilli either in skin-slit smears as in skin biopsy. Patients were classified according to the Ridley Jopling Scale (6). The disability grade was done according to World Health Organization (WHO) recommendations as described before (13). Eyes, hands and feet were analyzed and each received a grade ranging from 0 to 2 at diagnosis. Grade 0 have no disability due to leprosy, grade 1 have sensory nerve impairment and grade 2 have also motor nerve involvement (13,14). Either grade 1 or 2 were grouped considered to the disability grade (DG) of the patient. Patients were classified as paucibacillary (PB) or multibacillary (MB) and treated according to WHO specifications. The PB group was constituted by 86 cases as follows: borderline tuberculoid leprosy (BT) and tuberculoid leprosy (TT). The MB group was constituted by 132 cases as follows: lepromatous leprosy (LL), borderline lepromatous leprosy (BL) and borderline (BB) leprosy. Patients were ethnically classified according to morphological characteristics of him/her and other family members, as caucasoid and non-caucasoid. General characteristics of patient groups are summarized in Table 1.

Controls. Two-hundred and forty four healthy subjects, selected from blood blank donators were used as controls. The mean age was of 51.5 ± 16.7 years (19 to 84), 208 were caucasoid (85%) and 36 non-caucasoid (15%). None of them referred disease and previous selection was done as soon as they arrived to blood donor bank. None were taking continuous medication.

The genomic DNA was obtained from peripheral blood according to modified Miller et al. (15) technique. NINJ1 polymorphism screening was performed using PCR amplification followed by restriction enzyme digestion (PCR-RFLP). PCR amplifications were carried out in 20 μ l reactions using 25–100 ng of genomic DNA as template in tubes containing 1.0 U Taq DNA polymerase with 1X of the buffer supplied by the manufacturer (Invitrogen, CA, USA), 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP and 0.3 μ M of each primer. Primers used for genotyping were 5'- CTC TGG GCG ACA AAA CTC ATC C -3' (NINJ1F) and 5'- CCA GGT TGT TGA GGA AGT CCA G -3' (NINJ1R). Amplification cycles included a denaturing step at 94 °C for 10 min followed by 35 cycles set at 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s and 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 7 min. Digestions were carried out in a final volume of 20 μ l containing 3 U of HaeIII, 1X NEB buffer 4 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and 15 μ l of PCR products. Reactions were incubated at 37 °C for 2 hours and digested fragments were separated in 2% ethidium bromide stained agarose gels. A HaeIII cleavage site is generated when the C allele (asp110) is present, in way that the genotypes were clearly ascertained by the size of the fractionated fragments (212 bp for the A allele; 176 bp for the C allele).

Allele frequencies were calculated by direct counting. The differences allelic frequencies of ala110asp SNPs in patients and controls were carried out by weighted

logistic regression models with or without correction for sex, ethnicity and reaction using the computer program Minitab for Windows (Version 15). Results are shown as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% IC). The significance of the allele frequency difference between the MB and PB groups and DG=0 and DG>0 was analyzed using Pearson's Chi-square test. P-value <0.05 was considered statistically significant. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested by chi-square using the BioEstat program.

Ethics. The study was approved by the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, ethic committee and informed consent was obtained from each subject.

Results

The frequency of the asp110ala SNP between leprosy patients and healthy groups, using the variables gender, age and ethnic in the logistic regression model, did not show difference (OR: 0.96; CI 95% 0.59-1.54; p = 0.9715).

Also, no differences were observed in the frequency of the asp110ala SNP between MB and PB groups. (OR: 0.54; CI 95% 0.31-0.97; p = 0.0536).

Finally, the frequency of the genotype asp110ala SNP for the DG (grades 0, 1 and 2, meaning nerve damage) in leprosy patients, using Pearson's Chi-square test (chi-square) was measured. The CC (ala/ala) allele frequency was significantly increased (p= 0.0198) in patients with sensory or motor nerve impairment (DG>0) (Table 2). Furthermore, we noticed that leprosy patients with the CC allele had a higher risk of developing disability when compared the allele AA (p= 0.0143).

Discussion

The *NINJI* gene plays an important role in nerve regeneration. The ninjurin protein is transported down the length of the axon to the site of injury, where it accumulates (16). Therefore, polymorphism in this gene could be related to nerve damage in leprosy patients. In this study we investigated the role of this gene in the interaction of *M. Leprae* with the human host.

Our results did not find any statistically significant association of this SNP to leprosy or with those clinical subtypes. However, we found statistically significant association for leprosy DG: patients with polymorphism in the *NINJI* gene (CC Allele) had more nerve damage compared to cases without polymorphism (p= 0.0143).

Cardoso *et al.* in 2007 (9) were the first to study the *NINJI* gene polymorphism and its relationship with protection in leprosy nerve damage. They also found a significant association between the C-allele and nerve damage in leprosy patients. We could not find any other study related to *NINJI* and leprosy.

As ninjurin is induced by nerve injury by leprosy and have a strong role for neuronal recovery by increasing cell adhesion and Schwann cells regeneration (16), its presence could be relevant for leprosy recovery after nerve damage. *NINJI* is also associated with several diseases, e. g., after spinal cord injury (11), where it is up-regulated in Schwann cells and dorsal root ganglion neurons, acute lymphoblastic leukemia (17) in B cells, and in multiple sclerosis (18,19). Furthermore, *NINJI* could be associated with carcinogenesis by inducing the regulation of cellular senescence program as in liver cancer (20). Also, strong *NINJI* mRNA expression has been detected in liver of hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis related to viral infection, being more abundant in regenerating and tumor samples than in the normal

liver (12). These findings indicate that ninjurin is an important adhesion molecule and can be a potential therapeutic target in many diseases.

One possible fail in our study was the lack of electrophysiological evaluation that could be useful to add more information beyond clinical disability in order to evaluate nerve damage. However, this fact did not strongly modify our results, since nerve damage mostly is clinically evident.

The results of this study confirm that polymorphism in NINJ1 offers less nerve protection in leprosy patients as found before (9). Despite these findings further studies will be necessary before any suggestion, either drug or even surgical therapy can be proposed. Furthermore, the results add more information concerning molecular studies for leprosy.

Acknowledgements

Claúdia R. Bonini-Domingos, PhD, from the Laboratório de Hemoglobinas and Genética das Doenças Hematológicas (LHGDA), IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto for their help in supplying same samples from controls. We are also grateful to Ricardo Dantes Machado, PhD, from the Centro de Investigação de Microorganismos (CIM), Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) for technical assistance.

References

1. Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Prog Neurobiol.* 2010 Jun;91(2):102-7.
2. Ooi WW, Srinivasan J. Leprosy and the peripheral nervous system: basic and clinical aspects. *Muscle Nerve.* 2004 Oct;30(4):393-409.
3. World Health Organization: Leprosy Fact Sheet, 2001, <http://www.who.int/inf-fs/en/fact101.html>.
4. Agrawal A, Pandit L, Dalal M, Shetty JP. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clinical Neurology and Neurosurgery.* 2005; 107: 445-454.
5. Smith WC, Nicholls PG, Das L, Barkataki P, Suneetha S, Suneetha L, Jadhav R, Sundar Rao PS, Wilder-Smith EP, Lockwood DN, van Brakel WH. Predicting neuropathy and reactions in leprosy at diagnosis and before incident events- results from the INFIR cohort study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Aug 11;3(8): e500.
6. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966; 34(3):255-73.
7. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, Kaplan G, Hawn TR. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis.* 2010 May 1;201(9):1422-35.
8. Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Feb;4(1):21-7.

9. Cardoso CC, Martinez AN, Guimarães PE, Mendes CT, Pacheco AG, de Oliveira RB, Teles RM, Illarramendi X, Sampaio EP, Sarno EN, Dias-Neto E, Moraes MO. Ninjurin 1 aspartic acid single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol.* 2007 Oct;190(1-2):131-8.
10. Schurr E, Alcais A, Singh M, Mehra N, Abel L. Mycobacterial infections: PARK2 and PACRG associations in leprosy. *Tissue Antigens.* 2007 Apr;69 Suppl 1:231-3.
11. Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron.* 1996 Aug;17(2):353-61.
12. Kim JW, Moon AR, Kim JH, Yoon SY, Oh GT, Choe YK, Choe IS. Up-Regulation of ninjurin expression in human hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Mol Cells.* 2001 Apr 30;11(2):151-7.
13. Pimentel MI, Nery JA, Borges E, Gonçalves RR, Sarno EN. Impairments in multibacillary leprosy; a study from Brazil. *Lepr Rev.* 2004 Jun;75(2):143-52.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de prevenção de incapacidades. Cadernos de prevenção e reabilitação em hanseníase – 3. ed., rev. e ampl. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.
15. Miller SA, Dykes DD, Poleski HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 1988; 16: 1215.
16. Lee HJ, Ahn BJ, Shin MW, Choi JH, Kim KW. Ninjurin1: a potential adhesion molecule and its role in inflammation and tissue remodeling. *Mol Cells.* 2010 Mar;29(3):223-7.

17. Chen, J.S., Coustan-Smith, E., Suzuki, T., Neale, G.A., Mihara, K., Pui, C.H., Campana, D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):2115-20.
18. Ahn BJ, Lee HJ, Shin MW, Choi JH, Jeong JW, Kim KW. Ninjurin1 is expressed in myeloid cells and mediates endothelium adhesion in the brains of EAE rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 18;387(2):321-5.
19. Tajouri L, Fernandez F, Griffiths LR. Gene expression studies in multiple sclerosis. *Curr Genomics*. 2007 May;8(3):181-9.
20. Toyama T, Sasaki Y, Horimoto M, Iyoda K, Yakushijin T, Ohkawa K, Takehara T, Kasahara A, Araki T, Hori M, Hayashi N. Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatoma cells. *J Hepatol*. 2004 Oct;41(4):637-43.

Table 1. Demographic, clinical classification and disability grade (DG) of leprosy patients group

		Total	DG=0	DG>0
Ethnicity	Caucasoids	186	104	82
	Non-caucasoids	32	18	14
Classification used for treatment	Paucibacillary	86	54	32
	Multibacillary	132	68	64
Clinical forms (Ridley and Jopling)	LL	90	39	51
	BL	13	9	4
	BB	19	13	6
	BT	19	14	5
	TT	63	36	27
	I	14	11	3

LL, lepromatous leprosy; BL, borderline lepromatous; BB, borderline; BT, tuberculoid leprosy; TT, tuberculoid leprosy; I, indeterminate.

Table 2. Frequency of asp110ala polymorphism in leprosy patients according to disability grade (DG)

Genotype	DG=0	DG>0	OR	P-value
AA	78	53	1.43	0.2400
AC	40	31	1.02	0.9300
CC	4	12	0.23	0.0198
A allele	118	84	4.21	0.0161
C allele	44	43	0.69	0.2400

3 .CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões puderam ser obtidas a partir da investigação de portadores de hanseníase e de uma população de controles saudáveis da região Noroeste do Estado de São Paulo:

- A combinação do genótipo nulo para os genes *GSTT1* e *GSTM1* confere proteção contra a hanseníase enquanto a presença do gene *GSTT1* aumenta o risco para a doença.
- Os polimorfismos nos genes *GSTT1* e *GSTM1* não têm efeito modulador na severidade da hanseníase.
- A análise da frequência do polimorfismo asp110ala do gene *NINJ1* não apresentou diferença significativa entre pacientes e controles; no entanto, o genótipo NINJ/CC apresentou relação com o maior desenvolvimento de lesão neural relacionada à infecção pelo *Mycobacterium leprae*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prado-Montes de Oca E, Velarde-Félix JS, Ríos-Tostado JJ, Picos-Cárdenas VJ, Figuera LE. SNP 668C (-44) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy. *Infect Genet Evol.* 2009 Jul;9(4):617-25.
2. Ochoa MT, Teles R, Haas BE, Zaghi D, Li H, Sarno EN, Rea TH, Modlin RL, Lee DJ. A role for interleukin-5 in promoting increased immunoglobulin M at the site of disease in leprosy. *Immunology.* 2010 Nov;131(3):405-14
3. Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, Macedo GM, Eleutério MA, Vilar G, Abel L, Xavier MB, Alcais A, Mira MT. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis.* 2010 May 15;201(10):1598-605.
4. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006; 77:189-202.
5. Young D. Prospects for molecular epidemiology of leprosy. *Lepr Rev.* 2003; 74(1):11-7.
6. Samter M, *Immunological disease.* Little, Brown and Company 1971; 630-39.
7. Fandinho FC, Orsi-Souza AT, Salem JI. A comparison of the Ziehl-Neelsen and Kinyoun methods in staining smears from leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1990 Jun;58(2):389-91.
8. World Health Organization (WHO) A guide for leprosy Control 2nd Edition 1989.
9. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol* 2006; 19(2): 338-381.

10. World Health Organization. Global leprosy situation. *Whly Epidemiol Rec* 2008; 83:293-300.
11. Ministério da Saúde, Informe epidemiológico, Programa nacional de controle de hanseníase, 2008. <http://www.portal.saude.gov.br/>.
12. WHO World Health Organization In. 2005 ed; 2005.
13. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966; 34(3):255-73.
14. Gorodezky C, Alaez C, Munguía A, Cruz R, Vazquez A, Camacho A, Flores O, Rodriguez M, Rodriguez O. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis (Edinb).* 2004;84(1-2):82-92.
15. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol.* 2010 Feb;22(1):48-54.
16. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet.* 2004; 363: 1209-1219.
17. World Health Organization Chemotherapy of leprosy for control programmes. Geneva, 1982. (Technical Report Series, No. 675).
18. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto.* 1997; 30:335-39.
19. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(4):365-75.
20. Jyothi P, Riyaz N, Nandakumar G, Binitha MP. A study of oxidative stress in paucibacillary and multibacillary leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008; 74(1):80.

21. Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC. Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun; 22(6):920-4.
22. Prasad CV, Kodliwadmath MV, Kodliwadmath GB. Erythrocyte glutathione peroxidase, glutathione reductase activities and blood glutathione content in leprosy. *J Infect.* 2008 Jun; 56(6):469-73.
23. Prasad CV, Kodliwadmath MV, Kodliwadmath GB. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and hydrogen peroxide induced lipid peroxidation in leprosy. *Lepr Rev.* 2007; 78(4):391-7.
24. Agrawal A, Pandit L, Dalal M, Shetty JP. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clin Neurol Neurosurg.* 2005 Oct;107(6):445-54.
25. Jopling WH, Manual de lepra. 2ed Rio de Janeiro, 1983, 75-84.
26. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, Kaplan G, Hawn TR. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis.* 2010 May 1;201(9):1422-35.
27. Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Feb;4(1):21-7.
28. Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell.* 1997 Mar 21;88(6):811-21.

29. Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*. 2002 May 3;296(5569):927-31.
30. Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998 Nov-Dec;40(6):363-70.
31. Cardoso CC, Martinez AN, Guimarães PE, Mendes CT, Pacheco AG, de Oliveira RB, Teles RM, Illarramendi X, Sampaio EP, Sarno EN, Dias-Neto E, Moraes MO. *Ninjurin 1* asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol*. 2007;190(1-2):131-8.
32. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o controle da Hanseníase. *Cadernos de Atenção Básica n° 10*. Brasília: 2002.
33. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis*. 2006 Feb 1;193(3):346-53.
34. Lagrange PH, Abel L. The genetic susceptibility to leprosy in humans. *Acta Leprol*. 1996;10(1):11-27.
35. Meyer CG, May J, Stark K. Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends Microbiol*. 1998;6(4):148-54.
36. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Association and linkage of leprosy

- phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001; 2(4):196-204.
37. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581-620.
38. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis.* 2002;186(11):1687-91.
39. Fitness J, Tosh K, Hill AV. Genetics of susceptibility to leprosy. *Genes Immun.* 2002; 3(8):441-53.
40. Jamieson SE, Miller EN, Black GF, Peacock CS, Cordell HJ, Howson JM, Shaw MA, Burgner D, Xu W, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun.* 2004; 5(1):46-57.
41. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Verner A, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet.* 2003; 33(3):412-5.
42. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, Mai CP, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Sarno EN, Alter A, Montpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Doré C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van De Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004; 427(6975):636-40.

43. Abel L, Sánchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, Skamene E, Lagrange PH, Schurr E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998; 177(1):133-45.
44. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AV. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(6):733-5.
45. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis.* 1999 Jan;179(1):187-91.
46. Vanderborght PR, Matos HJ, Salles AM, Vasconcellos SE, Silva-Filho VF, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN, Santos AR, Moraes MO. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNFalpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72(2):143-8.
47. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 2004;5(7):592-5.
48. Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, Naruishi H, Ohira T, Hashimoto K, Liu T, Suzuki M, Uemura Y, Matsushita S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol.* 2005;58(7):740-3.

49. Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JA, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics*. 2001;53(1):45-7.
50. Hirvonen A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 37- 43.
51. Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutation Res* 1999; 436: 227-61.
52. Bathi RJ, Rao R, Mutalik S. GST null genotype and antioxidants: risk indicators for oral pre-cancer and cancer. *Indian J Dent Res*. 2009;20(3):298-303.
53. Rossit AR, Conforti-Froes NDT. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev Soc Bras Cancerol* 2000; 3: 26-30.
54. Rossit AR, Cabral IR, Conforti-Froes, NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genet Mol Biol* 1999a; 22: 23.
55. Brockmuller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphism in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996; 56: 3915-25.
56. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with

- GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996; 17(4): 881-4.
57. Conforti-Froes N, El-Zein R, Abdel-Rahman S, Swischenberger J, Au WW. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutat Res* 1997; 379: 53-9.
58. Araki T, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. Mechanism of homophilic binding mediated by ninjurin, a novel widely expressed adhesion molecule. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22; 272:21373-80.
59. Costa MCR, Silva WA, Holanda AJ, Tojal I, Dias-Neto E, Guimarães, PEM. et al.. Identification of coding single nucleotide polymorphisms (cSNPs) in gene expressed in tumoral cells using the HCGP-ORESTES database. *Am J Hum Gen* 2001; 69:540.

5. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)


Parecer n.º 153/2006

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 3198/2006 sob a responsabilidade de Andréa Regina Baptista Rossit, com o título "Pesquisa da suscetibilidade genética à hanseníase", está de acordo com a Resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 12 de junho de 2006.


Prof. Dr. José Paulo Cipullo
Vice-Coordenador do CEP/FAMERP

Anexo 2. Submissão do artigo científico 1

A European Journal
TM&IH Tropical Medicine & International Health
 Editorial Manager

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: carlagraca

Submissions Being Processed for Author Carla Renata Graça

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
Action Links	TMIH-D-11-00236	Is Glutathione S-transferase genes GSTT1 and GSTM1 nullity protective against leprosy?	24 May 2011	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Anexo 3. Submissão do artigo científico 2



Brazilian Journal
of medical and biological research

[HOME](#) [ABOUT](#) [USER HOME](#)

[Home](#) > [User](#) > [Author](#) > [Submissions](#) > #54257 > [Review](#)

#BJMBR-1195 NINJURIN 1 single nucleotide polymorphism and nerve damage in leprosy

[SUMMARY](#) **[REVIEW](#)** [EDITING](#)

Submission

Authors	Carla Renata Graça, Vânia Del'Arco Paschoal, Rosa Maria Cordeiro-Soubhia, Susilene Tonelli-Nardi, Andrea Regina Baptista-Rossit, João Aris Kouyoumdjian
Title	NINJURIN 1 single nucleotide polymorphism and nerve damage in leprosy
Section	Clinical Investigation
Editor	Journal Office Ischia Cendes

Peer Review

Round 1

Review Version	54257-280662-2-RV.PDF 2011-04-07
Initiated	2011-04-11
Last modified	2011-05-31
Uploaded file	None