

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS RECEPTORES DO TIPO
TOLL NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TALIDOMIDA E
PREDNISONA EM PACIENTES COM ERITEMA NODOSO HANSÊNICO**

Miriã Ferrão Maciel Fiuza

Dissertação de Mestrado
submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Genética e
Biologia Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Porto Alegre, março de 2020

Este trabalho foi realizado no laboratório de Genética Médica e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS e no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com apoio financeiro do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela Capes, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS (PPGBM/UFRGS).

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Fernanda por ter me recebido de forma tão amigável no grupo. Por todo o auxílio, ensinamentos e conhecimento passados, pelo incentivo e apoio em todo o processo de formação. Seu exemplo de dedicação e tranquilidade transmitida me fez desenvolver segurança para desempenhar as atividades propostas. Embora saiba que esse não é o final, já posso me orgulhar do crescimento profissional que obtive com sua contribuição, me orgulhando desde já do resultado do nosso trabalho.

À Julia Gomes e Thayne Kowalski, por toda ajuda na execução de cada uma das etapas, pelas dicas, conselhos e por me atenderem sempre. Foram minhas coorientadoras especiais, obrigada gurias.

Às ICs Eduarda e Laura por serem tão prestativas e me auxiliarem sempre que solicitadas, mesmo sem vínculo direto com o projeto, pela alegria, descontração e amizade na hora do “aperto”.

A amizade e apoio técnico da Mari Furtado que me socorreu por inúmeras vezes.

À Patrícia Boni por me escutar e oferecer ajuda mesmo nos dias em que eu estive mais ranzinza.

Aos colaboradores de todos os centros coparticipantes dessa pesquisa e a todos que aceitaram participar desse estudo.

A Capes, INaGeMP e HCPA pelo apoio financeiro.

Aos colegas do laboratório 113 e do Laboratório de Medicina Genômica, por terem me apresentado o laboratório e me orientado com diversos conselhos sobre as técnicas e rotinas.

Ao Elmo por ser tão prestativo e gentil, sempre buscando a melhor forma de ajudar.

Ao Paulo de Moraes pelas discussões sobre a hanseníase e por toda ajuda com a logística das coletas.

À Perpétua por sempre se disponibilizar em ajudar, por todo auxílio e suporte mesmo de longe.

Agradeço imensamente aos meus familiares por sempre torcerem por mim, em especial ao meu caçula Mykael por acreditar em mim e tornar tudo mais leve, inclusive com seus comentários debochados.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para me ajudar em todos os momentos. De forma especial, agradeço a minha mãe, reconheço e agradeço sua dedicação em fazer o melhor por nós.

Agradeço ao meu marido, Fabiano, por todo incentivo, por confiar em mim e acreditar nas inúmeras vezes em que eu duvidei. Obrigada por entender os momentos de ausência, por ser meu “caixa forte” e porto seguro.

Por fim, agradeço principalmente a Deus pela constante presença e sustento durante essa etapa. Pela graça e sabedoria que me proporcionou para que pudesse superar meus desafios.

Porque Dele, por Ele
Para Ele são todas as coisas.....

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	6
Resumo	8
Abstract	10
CAPÍTULO I	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Hanseníase	13
1.1.1. Classificação da Hanseníase	14
1.1.2. Transmissão da Hanseníase	15
1.1.3. Diagnóstico da Hanseníase	15
1.1.4. Tratamento da Hanseníase	16
1.1.5. Epidemiologia da Hanseníase	18
1.1.6. Episódios Reacionais	19
1.2. Eritema Nodoso Hansênico	20
1.2.1. Tratamento do ENH	21
1.2.2. Talidomida	21
1.2.3. Prednisona.....	23
1.3. Receptores do Tipo Toll	24
1.3.1. TLR1	25
1.3.2. TLR2	25
1.3.3. TLR4	26
1.3.4. TLR6	26
CAPÍTULO II	27
2. JUSTIFICATIVA	28
CAPÍTULO III	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
CAPÍTULO IV	31
ARTIGO	31
CAPÍTULO V	52
5.DISSCUSSÃO	53
CAPÍTULO VI	56
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	57
CAPÍTULO VII	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de Abreviaturas

AAS	Ácido acetilsalicílico
AMR	America
BB	Borderline-borderline
BL	Borderline-lepromatous
BT	Borderline-tuberculóide
BV	Borderline-virchowiana
CE	Ceará
CRBN	Cereblon
DDS	Diaminodifenilsulfona
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
EUA	Estados Unidos da América
ENL	Erythema nodosum leprosum
GEE	Generalized estimating equations method
I	Indeterminada
IB	Índice Baciloscópico
IFN-c	Interferon-c
IL	Interleucina
LL	Leprosy-lepromatous
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Maranhão
MB	Multibacilares
MD2	Fator de diferenciação mieloide 2
MDT	Multidrug therapy
MyD88	Myeloid differentiation factor-dependent signaling
NF-kβ	Fator nuclear-kappa β
NRAMP1	Proteína macrofágica associada à resistência natural
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilares
PQT	Poliquimioterapia
RMP	Rifampicina
RO	Rondônia
RR	Reação Reversa
RS	Rio Grande do Sul
RT1	Reação de tipo I
RT2	Reação de tipo II
RT3	Reação de tipo III
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculosis

TIR	Domínio toll/receptor de IL-1
TLR	Receptores Toll- <i>like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIF	Domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN- β
TT	Tuberculóide
VV	Virchowiana

Resumo

O eritema nodoso hansênico (ENH) é uma complicação inflamatória dolorosa causada por uma resposta imune humoral ao *Mycobacterium leprae*. Acomete especialmente pacientes classificados como multibacilares, com a presença de nódulos eritematosos subcutâneos que podem ulcerar. O tratamento do ENH tem como objetivo principal o controle da inflamação aguda e da neurite, aliviar a dor e o desconforto e, prevenir o desenvolvimento e extensão de lesões. No Brasil, os medicamentos mais utilizados são talidomida e prednisona. Receptores do tipo toll (TLRs) são receptores de membrana que atuam no reconhecimento de microrganismos para ativar eventos de sinalização de resposta imune a jusante. Após o contato com seus ligantes, vias de sinalização intracelular são ativadas, levando a ativação e transcrição de moléculas pró-inflamatórias. Alguns desses receptores foram identificados como capazes de reconhecer o *M. leprae* e, desencadear ampla resposta antimicrobiana e inflamatória. Polimorfismos em genes que codificam as proteínas TLRs, podem ser determinantes no curso da hanseníase e aparecimento de ENH. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de variantes genéticas em genes *TLR* na resposta ao tratamento do ENH com talidomida e prednisona. 130 pacientes com ENH tratados com talidomida e/ou prednisona foram selecionados em Porto Alegre (RS), Fortaleza (CE), Imperatriz (MA), São Luis (MA) e Monte Negro (RO). Foram analisadas até seis consultas previamente registradas no prontuário dos pacientes com a coleta de dados demográficos, histórico de hanseníase e ENH. O DNA dos pacientes foi extraído de amostras de saliva e sangue periférico. Os polimorfismos rs4833095/*TLR1*, rs3804099/*TLR2*, rs1927914/*TLR4* e rs5743810/*TLR6* foram genotipados usando a técnica de PCR em tempo real. O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos. O método das equações de estimativa generalizada (GEE) foi utilizado para avaliar a influência dos polimorfismos na variação da dose de talidomida e prednisona. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o SPSS versão 20. Descobrimos que a dose de talidomida nos genótipos CT e TT de *TLR1*/rs4833095 variou em torno de 48mg entre as regiões Norte e Sul ($p=0.001$). Para *TLR2*/rs3804099, a variação também ocorreu de acordo com a região do paciente. Em todos os genótipos desse SNP (CC, CT e TT), os pacientes da região Sul receberam uma média de 45,3mg a menos de talidomida em comparação à região Norte ($p=0.001$). Na prednisona, o efeito dos genótipos de CT e CC na variação da dose dependiam do tempo ($p=0.018$). Identificamos que o efeito do genótipo na variação da

dose de talidomida nos genótipos AA e AG de *TLR6/rs5743810* também depende do tempo. Durante o tratamento, pudemos observar uma redução de dose apenas para indivíduos com AG e GG. A análise da associação entre as variantes genéticas e a manifestação de efeitos adversos mostrou associação entre o genótipo TT de *TLR1/rs4833095* e edema ($p=0.019$). Além disso, os genótipos TT de *TLR2/rs3804099* ($p=0.016$) foram associados a efeitos dermatológicos adversos, prurido, pele seca e perda de cabelo. Ainda existem muitas lacunas sobre o mecanismo de interação entre os diferentes TLRs e *M. leprae* e, sobre como eles podem interferir no curso e no tratamento da doença. No entanto, este estudo mostra que a avaliação dos TLRs pode auxiliar no entendimento da resposta ao tratamento do ENH com talidomida e prednisona.

Abstract

Erythema nodosum leprosum (ENL) is a painful inflammatory complication caused by a humoral immune response to *Mycobacterium leprae*. It especially affects patients classified as multibacillary, with the presence of subcutaneous erythematous nodules that may ulcerate. The treatment of ENL has the main objective of controlling acute inflammation and neuritis, relieving pain and discomfort and preventing the development and extension of injuries. In Brazil, the most used drugs are thalidomide and prednisone. Toll-type receptors (TLRs) are membrane receptors that act in the recognition of microorganisms to activate signaling events of the downstream immune response. After contact with their ligands, intracellular signaling pathways are activated, leading to the activation and transcription of pro-inflammatory molecules. Some of these receptors have been identified as capable of recognizing *M. leprae* and, triggering a wide antimicrobial and inflammatory response. Polymorphisms in genes that encode TLR proteins may be determinants in the course of leprosy and the appearance of ENL. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of genetic variants on *TLR* genes in the response to treatment of ENL with thalidomide and prednisone. 130 patients with ENL treated with thalidomide and/or prednisone were selected in Porto Alegre (RS), Fortaleza (CE), Imperatriz (MA), São Luis (MA) and Monte Negro (RO). Up to six visits previously recorded in the patients' medical records were analyzed with the collection of demographic data, leprosy history and ENL. The patients' DNA was extracted from saliva and peripheral blood samples. The rs4833095/*TLR1*, rs3804099/*TLR2*, rs1927914/*TLR4* and rs5743810/*TLR6* polymorphisms were genotyped using the real-time PCR technique. The chi-square test was used to assess the Hardy-Weinberg balance for all polymorphisms. The method of generalized estimation equations (GEE) was used to evaluate the influence of polymorphisms on the variation of the dose of thalidomide and prednisone. All statistical analyzes were performed using SPSS version 20. We found that the dose of thalidomide in the CT and TT genotypes of *TLR1*/rs4833095 varied around 48mg between the North and South regions (p=0.001). For *TLR2*/rs3804099, the variation also occurred according to the patient's region. In all genotypes of this SNP (CC, CT and TT), patients in the South region received an average of 45.3mg less thalidomide compared to the North region (p=0.001). In prednisone, the effect of CT and CC genotypes on dose variation depended on time (p=0.018). We identified that the effect of the genotype on the variation of the

thalidomide dose in the AA and AG genotypes of *TLR6*/rs5743810 also depends on time. During treatment, we were able to observe a dose reduction only for individuals with AG and GG. Analysis of the association between genetic variants and the manifestation of adverse effects showed an association between the TT genotype of *TLR1* rs4833095 and edema ($p=0.019$). There are still many gaps about the interaction mechanism between the different TLRs and *M. leprae* and about how they can interfere with the course and treatment of the disease. However, this study shows that the evaluation of TLRs can help in understanding the response to the treatment of ENL with thalidomide and prednisone.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica granulomatosa que afeta a pele e nervos periféricos, podendo envolver os olhos, a mucosa do trato respiratório superior, músculos, ossos e testículos. É causada pelo bacilo intracelular, *Mycobacterium leprae*. Trata-se de uma doença incapacitante que foi descrita inicialmente em 600 a.C em tratados de origem indiana. Entre os séculos XII e XIII foi considerada endêmica e incurável na Europa, embora atualmente esteja praticamente erradicada nessa região (Pinheiro et al., 2018; Reibel et al., 2015). A hanseníase é uma das doenças mais antigas e negligenciadas do mundo, que se propagou ao longo dos séculos pelas várias populações. Os primeiros grandes grupos de hanseníase foram encontrados na Índia, China e Egito. Em humanos, o primeiro indício da doença foi identificado pela paleontologia e utilização da ferramenta de biologia molecular. O DNA do *M. leprae* foi isolado de ossos de um esqueleto humano datado do século I a.C encontrado em Jerusalém (Fischer, 2017; Gurung et al., 2019).

Durante muito tempo, a análise de textos antigos foi o único modo de gerar hipóteses sobre a disseminação do bacilo pelo mundo. A partir dos novos dados de genotipagem, duas teorias têm sido propostas para explicar essa propagação. A primeira sugere que a origem da doença ocorreu na África Oriental espalhando-se de forma simultânea pela Ásia e Europa, antes de chegar à África Ocidental, e segunda que sugere origem na Ásia, espalhando-se progressivamente em direção ao ocidente (Fischer, 2017; Reibel et al., 2015).

Indivíduos que tinham suspeita de hanseníase ou outras doenças crônicas de pele eram exilados em “leprosários”. O isolamento nesses locais interrompia a transmissão e contribuía para o desaparecimento da doença na Europa Central. Entretanto, também colaborou para a estigmatização do paciente, afetando o seu bem-estar físico, psicológico, social e econômico. O estigma social associado à hanseníase permanece em diversas áreas, consistindo em um grande obstáculo ao autorrelato e tratamento precoce (Grzybowski et al., 2016). A sociedade mantém conceitos desfavoráveis em relação a indivíduos com a doença, cooperando para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, que são altamente prevalentes nessa população (Fischer, 2017; Grzybowski et al., 2016; Reibel et al., 2015).

1.1.1. Classificação da Hanseníase

A hanseníase pode ocorrer em uma diversidade de formas clínicas, relacionadas em parte aos padrões de resposta imune do hospedeiro. De acordo com a heterogeneidade da doença, várias classificações foram propostas. O sistema de Ridley-Jopling é o mais utilizado e classifica a doença em seis formas clínicas, baseadas em aspectos clínicos, histopatológicos, imunológicos e baciloscópicos, em forma indeterminada (I), tuberculoide (TT), borderline-tuberculoide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-virchowiana (BV) e virchowiana (VV) (Aarão et al., 2018; Costa et al., 2018; Gurung et al., 2019).

Além desse, de acordo com aspectos clínicos e laboratoriais, a hanseníase pode ser classificada em formas paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Essa classificação foi criada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1982 e, baseia-se em critérios heterogêneos, tendo uma importante relevância no diagnóstico e tratamento. A metodologia considera o número de lesões de pele e troncos nervosos comprometidos. Pacientes PB tem até cinco lesões e/ ou um tronco nervoso comprometido, nesses estão incluídos os indeterminados (I), tuberculoides (TT) e borderline-tuberculoides (BT), conforme a classificação de Ridley-Jopling. Em contrapartida, pacientes MB apresentam mais de cinco lesões e/ou um ou mais troncos nervosos acometidos e incluem borderline-borderline (BB), borderline-virchowiano (BV) e virchowiano (VV) (Ridley et al., 1966). Casos multibacilares podem ser equivocadamente classificados em paucibacilares, por haver divergência entre a carga bacilar e o número de lesões dos pacientes. Em situações de dúvida, o paciente deve receber o tratamento para MB (Gurung et al., 2019).

O estágio inicial da patologia é chamado de forma indeterminada. Na forma tuberculoide, as lesões são granulomatosas e o paciente manifesta uma intensa resposta imune mediada por células T do tipo Th1 que impossibilita a proliferação do bacilo. Ao contrário disso, na forma virchowiana a resposta imune mediada por células é determinada por um perfil de citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2, que auxiliam na multiplicação do bacilo nos fagossomos de macrófagos. Na forma *borderline*, os indivíduos apresentam características imunológicas e histopatológicas que variam entre tuberculoide e virchowiana (Aarão et al., 2018; Gurung et al., 2019).

1.1.2. Transmissão da Hanseníase

A via exata de transmissão do *M. leprae* ainda não é totalmente compreendida. Entretanto, diversos resultados sugerem que o bacilo seja especialmente disperso por via nasal. Apesar de a transmissão por tatus e macacos verdes africanos terem sido relatadas na Louisiana (EUA), o ser humano é considerado o principal reservatório de infecção. A forma mais contagiosa da doença é a hanseníase virchowiana, pois os pacientes geralmente portam um grande número de bacilos (Reibel et al., 2015). Alguns indivíduos podem transportar até sete bilhões de bacilos por grama de tecido. Através de análise por PCR e marcadores antigênicos, em 2013, o *M. leprae* foi identificado na mucosa bucal de 94% dos pacientes com hanseníase multibacilar (De abreu et al., 2014). Dessa forma, o trato respiratório superior parece ser a principal via de transmissão do bacilo (Pinheiro et al., 2018; Reibel et al., 2015).

Os seres humanos infectados são considerados, até o momento, a única fonte de contaminação. Embora as gotículas da mucosa nasal sejam o modo de transmissão mais importante, acredita-se que o contágio após contato direto da pele com nódulos virchowianos não tratados, ulcerados e multibacilares seja possível. Em regiões endêmicas, infecções assintomáticas podem persistir latentes por anos ou até décadas; entretanto, podem também resolver-se espontaneamente a qualquer momento. Quando ocorre manifestação da doença, há o desenvolvimento de uma lesão primária localizada, semelhante à tuberculose. O período médio de incubação nesses casos é de cerca de quatro anos (Fischer, 2017).

1.1.3. Diagnóstico da Hanseníase

A identificação precoce da hanseníase é uma conduta muito importante para o controle da doença. A análise clínica, que frequentemente é suficiente para a maior parte dos casos, é a primeira etapa para o diagnóstico da infecção. Entretanto, profissionais de saúde não qualificados podem não ser capazes de reconhecer sinais precoces da doença. Dessa forma, o maior desafio é presumir a infecção, suspeitando do diagnóstico de hanseníase, principalmente em países desenvolvidos onde já foi praticamente erradicada. Além disso, a correta escolha da lesão que será enviada para análises patológicas e biológicas é fundamental e exige prévio conhecimento clínico das lesões de hanseníase (Gurung et al., 2019; Pinheiro et al., 2018; Reibel et al., 2015).

O histórico médico do paciente é o primeiro indicador da infecção. Lesões cutâneas em que há perda de sensibilidade frequentemente são sinais característicos,

pois teoricamente nenhuma outra condição dermatológica está relacionada a distúrbios sensoriais. A avaliação clínica das lesões e danos nos nervos deve ser executada por um clínico experiente em hanseníase, visto que em 90% dos pacientes os sinais dermatológicos são os indicadores da doença, sendo os 10% restantes associados somente a sinais neurológicos (Pinheiro et al., 2018; Reibel et al., 2015).

Para o diagnóstico bacteriológico, amostras de lesões cutâneas devem ser utilizadas em exames de esfregaço e biópsias, devido ao tropismo do bacilo para a pele. Coletas de mucosa nasal não são aconselhadas, principalmente em pacientes virchowianos, pois suas membranas nasais são frágeis (Fischer, 2017; Gurung et al., 2019). Recomenda-se a biópsia de pele, onde deve ser coletado tecido suficiente para análises microscópicas e moleculares. A pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em microscópio óptico permanece sendo a técnica de diagnóstico padrão. Nesse método, esfregaços de tecidos ou suspensões celulares de biópsias são coradas sobre uma lâmina com a técnica de Ziehl-Neelsen (Pinheiro et al., 2018; Reibel et al., 2015).

O número de bacilos contidos em cada campo microscópico, ou índice baciloscópico (IB), é calculado com o índice de Ridley para esfregaços de pele (lesões no lóbulo da orelha e na pele). A forma tuberculoide é associada a um IB negativo na lesão do lóbulo da orelha e um IB negativo ou igual a “1+” em lesões cutâneas. A forma virchowiana da hanseníase é relacionada a um IB positivo, sempre “2” com o agrupamento de bacilos para formar globias. Um índice bacteriano alto no momento do diagnóstico (\geq “4+”) é associado a um maior risco de transmissão e recidiva (Reibel et al., 2015). O IB deveria ser decrescente no decorrer do tratamento, porém a maioria dos pacientes que apresentam um IB elevado ainda permanece com IB positivo ao final do tratamento, pois a liberação de bacilos residuais não viáveis pode perdurar por anos (Cerroni et al., 2016; Fischer, 2017). Além disso, a análise do *M. leprae* pode ser realizada por PCR a partir de biópsias de lesões cutâneas que apresentam o maior número de bacilos. A sensibilidade dessa técnica permite confirmar o diagnóstico da hanseníase, evidenciando a presença do DNA do bacilo nas lesões (Gurung et al., 2019).

1.1.4. Tratamento da Hanseníase

O primeiro antibiótico eficaz para o tratamento da hanseníase surgiu em 1943, tratava-se de sulfona administrada de forma intravenosa. Logo após, um derivado oral conhecido como dapsona, diaminodifenilsulfona (DDS), tornou-se o tratamento padrão. Entretanto, na década de 1970 foi identificada resistência ao DDS, então o uso de

esquemas combinados com rifampicina (RMP) passou a ser recomendado. Atualmente, o tratamento da hanseníase, padronizado e publicado em 1982 pela OMS, envolve poliquimioterapia (PQT) e os medicamentos de primeira linha são a dapsona, rifampicina e clofazimina (Alemu e Naafs, 2019; Fischer, 2017).

Ao inibir a síntese bacteriana de ácido fólico, a dapsona exerce um efeito bacteriostático sobre *M. leprae*. Os efeitos colaterais desse medicamento incluem hemólise, conforme a dose, e formação de meta-hemoglobina. Além desses, sintomas gastrointestinais, cefaleia e fadiga estão entre os efeitos colaterais comuns. A dose diária é de 100 mg em todas as formas de hanseníase (Fischer, 2017). A rifampicina foi sintetizada inicialmente na Itália a partir de bactérias gram-positivas do solo (*Amycolatopsis rifamycinica*) e tem sido comercializada desde 1965. Ao contrário da dapsona, possui um efeito bactericida sobre as micobactérias por inibição da RNA polimerase bacteriana. Manifestações cutâneas em forma de manchas eritematosas no rosto e couro cabeludo podem ocorrer de 2 a 3 horas após a ingestão do medicamento. Outros efeitos são relacionados ao trato gastrointestinal, como náusea, vômito e diarreia. Além disso, o medicamento também provoca uma coloração vermelho-alaranjada em fluídos corporais (urina, saliva e lágrimas). A dose para adultos é de 600 mg uma vez por mês, e deve ser ingerida junto às refeições (Reibel et al., 2015).

A clofazimina foi utilizada pela primeira vez no tratamento de hanseníase na Nigéria em 1959. Possui, de forma predominante, efeito anti-inflamatório associado a uma ação bactericida. O efeito colateral mais importante associado a esse medicamento é o desenvolvimento de hiperpigmentação marrom-avermelhada em lesões de hanseníase após algumas semanas, especialmente notável em caucasianos. Mais de 75% dos pacientes são afetados, sendo uma causa frequente de interrupção do tratamento em mulheres jovens, o que resulta em recidiva e ocorrência de reações hansênicas (Fischer, 2017). Além das conjuntivas, os líquidos corporais também ficam pigmentados. Essa coloração desaparece de forma muito lenta ao longo de meses ou anos após a interrupção do tratamento. Xerose e sintomas gastrointestinais, atribuídos ao acúmulo de cristais de clofazimina na mucosa do intestino, também são frequentemente associados ao uso do medicamento (Alemu e Naafs, 2019).

Dois regimes de tratamento foram definidos pela OMS de acordo com as classificações clínicas, paucibacilar e multibacilar. Eles diferem em relação à combinação de medicamentos e duração do tratamento. Em todo o mundo os medicamentos são uniformemente comercializados em cartelas de comprimidos (blister)

e dispensados pessoalmente aos pacientes em centros de tratamento. No Brasil, são distribuídos gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) nas unidades de saúde e, todas as doses são para pacientes de, em média, 60 Kg (ANVISA, 2011). Para casos paucibacilares, rifampicina deve ser utilizada supervisionada uma vez ao mês (600 mg) durante seis meses, e dapsona de forma diária (100 mg), de uso domiciliar. Em pacientes multibacilares, sob supervisão e de forma mensal, devem ser utilizadas 600 mg de rifampicina e 300 mg de clofazimina, além de 100 mg de dapsona e 50 mg de clofazimina diariamente, sendo que esses não necessitam de monitoramento podendo ser realizados no domicílio do paciente. A OMS sugere que doze doses supervisionadas devem ser administradas dentro de 18 meses. Muitos médicos não seguem essa recomendação e recomendam 12 doses mensais supervisionadas em 18 meses somente para pacientes com baixo IB e 24 doses mensais supervisionadas em 36 meses para pacientes com um $IB \geq 4$. Todas as doses são para pacientes de, em média, 60 Kg (Alemu e Naafs, 2019; Reibel et al., 2015).

1.1.5. Epidemiologia da Hanseníase

A partir da introdução da terapia multidrogas a prevalência global de hanseníase teve seus níveis diminuídos em mais de 95% em comparação ao período anterior ao tratamento. Entretanto, a doença ainda acomete centenas de milhares de pessoas por todo o mundo, apresentando vários desafios ao tratamento e controle da infecção (Costa et al., 2018; Matos et al., 1997). Na atualidade, são cinco os principais países que abrigam mais de 80% dos novos casos detectados anualmente e estão localizados em regiões subtropicais: Índia, Brasil, Bangladesh, Etiópia e Indonésia (Schreuder et al., 2016)

A hanseníase é frequentemente associada a condições precárias de saúde e desigualdade social. Embora uma relação causal entre pobreza e a infecção sejam difíceis de demonstrar, tem sido sugerido que determinantes socioeconômicos têm uma grande influência na perpetuidade da transmissão da doença. No entanto, o ambiente social inclui diversos fatores como infraestrutura e espaço físico, crenças e práticas culturais, podendo ser bastante específico para determinada região. Dessa forma, uma conclusão definitiva de que fatores ambientais e sociais são determinantes diretos da distribuição da doença não pode ser feita (Fischer, 2017; Schreuder et al., 2016).

Em 31 de dezembro de 2018 um total de 184.212 pacientes de 159 países, que estavam em tratamento para hanseníase foram relatados à OMS (prevalência registrada).

Ao longo do ano de 2018 foram detectados 208.619 novos casos da doença em todo o mundo e a taxa de detecção desses novos casos foi de 2.17 por 100.000 habitantes. A prevalência global registrada diminuiu em relação àquela no final de 2017, quando houve 192.713 casos em tratamento (WHO et al., 2018). Entretanto, apesar dos esforços da OMS e de vários programas de saúde, a transmissão da hanseníase persiste. Além do mais, embora a prevalência tenha diminuído, foram observados aumentos na região da América (AMR), Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental. Durante o mesmo período, a Região do Sudeste Asiático representou 71% dos novos casos da hanseníase no mundo, sendo que Índia e Indonésia contribuíram com 92% dos casos da região. Na AMR, o Brasil contribuiu com 93% dos novos casos, contabilizando um total aproximado de 28.660 novas detecções (Fischer, 2017; WHO et al., 2018).

1.1.6. Episódios Reacionais

O sistema imunológico de alguns pacientes pode desenvolver diversos sinais e sintomas de inflamação decorrentes de hipersensibilidade aguda ou crônica em resposta a antígenos de *Mycobacterium leprae*. Essas respostas agudas graves correspondem a cerca de 30% dos quadros de hanseníase, pertencem ao curso normal da infecção e ocorrem durante ou após o tratamento, sendo que esse pode impedi-las ou antecipá-las (Costa et al., 2018; Fischer, 2017; Pinheiro et al., 2018). Existem três tipos de reações: reação de tipo I (RT1) também chamada reação reversa (RR); reação de hanseníase tipo II (RT2) ou eritema nodoso hansênico (ENH), e reação de tipo III (RT3) ou fenômeno de Lucio (Alemu e Naafs, 2019).

Reação reversa ou do tipo I, é um episódio inflamatório agudo relacionado ao aparecimento ou aumento de imunidade celular contra antígenos de *M. leprae*. Afeta a pele e os nervos e, pode ocorrer em pacientes de todo o espectro clínico, com exceção da forma tuberculoide (TT). Nas lesões de reação reversa há presença de macrófagos epitelioides ativados, organizados ou não como granuloma (Fischer, 2017; Motta et al., 2012). O ENH ocorre em cerca de 50% dos pacientes virchowianos devido a um complexo de interação entre imunidade inata e adaptativa celular (Pinheiro et al., 2018). Apresenta como característica principal um infiltrado de neutrófilos na derme profunda e na hipoderme, geralmente acompanhados de macrófagos. O fenômeno de Lucio é caracterizado por extensas manchas violáceas e infiltrados bolhosos, geralmente afebril, é observado em pacientes virchowianos não tratados. As regiões da pele afetadas podem ulcerar e necrosar. A histopatologia da lesão evidencia extensa vasculite com

proliferação endotelial. As reações hansênicas são provavelmente a principal causa de dano neurológico permanente, resultando em deficiências e deformidades (Alemu e Naafs, 2019; Pinheiro et al., 2018).

1.2. Eritema Nodoso Hansênico

O ENH é uma complicação inflamatória dolorosa observada em cerca de 50% dos pacientes VV e 5 a 10% dos pacientes BV, especialmente após o início do tratamento em casos com um índice bacteriano superior a 4. Em sua apresentação clínica, o ENH é caracterizado pela ocorrência de nódulos cutâneos ou subcutâneos dolorosos, eritematosos de coloração violácea. As lesões são distribuídas por todo o corpo, podendo ulcerar e se tornar necróticas. Entretanto, ocorrem de forma predominante na face e em extremidades, sendo que o tronco também pode ser afetado (Fischer, 2017; Polycarpou et al., 2017). Regiões como o couro cabeludo, axila, inguino-crural, períneo, mucosa e semi-mucosas não são afetadas. Fisiopatologicamente, o ENH constitui uma vasculite do complexo imune que, além de afetar a pele e os nervos, pode se manifestar de forma sistêmica com glomerulonefrite, linfadenite, iridociclite e orquite. Além disso, mialgia, artralgia e dor óssea são sintomas relacionados à reação (Alemu e Naafs, 2019; Costa et al., 2018).

Em geral, a histologia de lesões mostra um infiltrado perivascular de neutrófilos em toda a derme e tecido subcutâneo e vasculite com edema do endotélio, associado à infiltração de granulócitos nas paredes dos vasos sanguíneos (Polycarpou e Walker, 2017). Para prevenir incapacidades neurológicas, é importante o adequado reconhecimento da reação. Sendo que essa se diferencia do eritema nodoso originado de outras causas pela distribuição das lesões para além dos membros inferiores e também devido à quantidade de nódulos (Bruce-Hickman et al., 2018). Os pacientes com ENH geralmente são cronicamente doentes e fatigados, com presença de dor crônica e insônia. Naturalmente a reação tem sua resolução entre uma ou duas semanas, porém vários pacientes podem sofrer recorrências durante meses. Sendo assim, o ENH pode ser classificado em agudo, recorrente e crônico, compreendendo um único episódio com duração inferior a 24 semanas, um segundo episódio ou subsequente dentro de 28 dias ou mais após o final do tratamento e episódios contínuos com duração superior a 24 semanas, respectivamente. Quanto à gravidade, pode ser classificado como leve, moderado ou grave e a classificação se baseia nas manifestações clínicas. Essas

classificações podem ter distintos fatores de risco e requerer diferentes intervenções terapêuticas (Costa et al., 2018; Polycarpou et al., 2017).

1.2.1. Tratamento do ENH

O tratamento do ENH tem como objetivo principal o controle da inflamação aguda e da neurite, aliviar a dor e o desconforto, prevenir o desenvolvimento e extensão de lesões cutâneas, neurais, oculares e alterações viscerais e impedir o aparecimento de novos episódios. A reação é episódica, sendo que 95% dos quadros duram menos de 1 mês (Alemu e Naafs, 2019). O tratamento é difícil e em todos os casos o paciente deve repousar e receber medicação anti-inflamatória. Casos leves podem ser tratados com anti-inflamatórios não esteroides, como ácido acetilsalicílico (AAS), porém todas as intervenções atuais apresentam alguma desvantagem e não são eficazes para todos os pacientes (Costa et al., 2018).

Conforme a gravidade da reação, a talidomida é a primeira escolha para o tratamento no Brasil. Além disso, o uso de corticosteroides sistêmicos também pode ser necessário. Dentro dessa classe, a prednisona é o medicamento de preferência. Os corticoides atuam na inflamação reduzindo o recrutamento e ativação de neutrófilos e macrófagos, além da diminuição da produção de várias citocinas, incluindo TNF- α (Rang et al., 2012). Além desses, há relatos sobre o uso de azatioprina, metotrexato, zinco, anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF-alfa e infliximabe no tratamento da reação. A azatioprina desempenha ação anti-inflamatória por inibir as células T, a proliferação de células B e a produção de anticorpos. Agentes inibidores de TNF- α , como etanercepte, também foram utilizados com êxito em quadros de ENH recorrente em que houve falha de prednisona, talidomida e pentoxifilina. Entretanto, tais medicamentos devem ser empregados com ponderação, pois a imunossupressão aumenta o risco de infecções fúngicas e por *M. tuberculosis* (Chowdhry et al., 2016; Santos et al., 2017).

1.2.2. Talidomida

Na década de 1950 a talidomida foi introduzida no mercado, porém logo após foi banida devido o seu terrível efeito teratogênico. No entanto, pouco depois após ser retirada do mercado mostrou eficácia em pacientes com ENH (Sheskin, 1965). Posteriormente, em virtude de sua comprovada ação antiangiogênica e imunomodulatória, voltou a receber atenção nas áreas da oncologia e doenças

autoimunes. A talidomida apresenta uma função imunossupressora que não apenas suprime, mas também modula a resposta imune regulando as principais moléculas imunomoduladoras, como fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), e citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina (IL) -6, IL-10, IL-12 e cicloxigenase 2. Além disso, é capaz de inibir de forma seletiva células T efetoras entre o total de células T CD4⁺. Tendo seu efeito imunomodulador potencializado com tratamento associado a glicocorticoide (Kim et al., 2017; Kim et al., 2015).

No ENH, o efeito da talidomida foi relatado em pelo menos 1750 pacientes, apresentando rápido efeito de ação com controle dos sintomas entre 24-48 horas (Costa et al., 2018). Possui atividade anti-inflamatória, antiangiogênica e imunomoduladora. Sua ação anti-inflamatória envolve a inibição da expressão gênica de TNF- α e, conseqüentemente, suas funções. Essa inibição parece envolver uma maior taxa de degradação do RNA mensageiro, que é um dos principais fatores responsáveis pela eficácia do medicamento (Moreira et al., 1993; Sampaio et al., 1991). Acredita-se que as múltiplas atividades farmacológicas da talidomida são mediadas pela proteína Cereblon (CRBN), principal alvo da talidomida. A proteína CRBN opera como um receptor de substrato da ubiquitina ligase E3 CRL4, cuja especificidade do substrato é modulada pela talidomida e seus análogos (Asatsuma-Okumura et al., 2019; Kim et al., 2017).

A maior parte dos pacientes acometidos por ENH geralmente apresenta quadros de reação recorrente ou crônica. Sendo assim, o tratamento pode perdurar por meses ou anos. A dose inicial de talidomida varia de 100 a 400 mg por dia, conforme o peso do paciente, sendo ingerida com água por pelo menos 1 hora após uma refeição (Costa et al., 2018). O tratamento deve ser continuado até identificação de melhora clínica e desaparecimento dos sintomas, podendo ser reduzido em 50 mg a cada duas a quatro semanas. Se o quadro requerer manutenção, a dose mais baixa deve ser prescrita e, uma nova redução de dose deve ser tentada a cada 3 ou 6 meses (Rosenbach e Werth, 2007).

Os principais efeitos adversos relacionados à talidomida são a teratogênese, sedação e neuropatia periférica. A utilização do medicamento no primeiro trimestre de gestação pode causar diversas malformações nos embriões expostos, como defeitos nos membros e doenças cardíacas. Dessa forma, o Comitê de Especialistas da OMS recomenda que o medicamento seja administrado somente em homens e mulheres na pós-menopausa dependentes de corticoides. Se os riscos e benefícios forem avaliados

pelo médico e, a paciente e seu parceiro forem adequadamente orientados, o medicamento pode ser prescrito (Polycarpou et al., 2017).

Apesar de ser principalmente utilizada no ENH, no Brasil a talidomida pode ser prescrita em casos de úlceras aftoides idiopáticas em pacientes portadores de HIV, lúpus eritematoso sistêmico, doença enxerto contra hospedeiro e mieloma múltiplo. Devido ao seu efeito teratogênico, a legislação desse país determina que o medicamento deva ser disponibilizado para mulheres em idade fértil somente após avaliação médica excluindo gravidez por método sensível e comprovando o uso de, no mínimo, dois métodos contraceptivos eficazes com ao menos um método de barreira (ANVISA, 2011).

1.2.3. Prednisona

Os corticosteroides atuam no processo inflamatório por meio da redução do recrutamento e ativação de neutrófilos e macrófagos, além da diminuição da produção de diversas citocinas, incluindo TNF- α . Dentro dessa classe de medicamentos, a prednisona é a escolha para pacientes com quadros moderados, graves e ENH recorrentes (Mahajan et al., 2003). Trata-se de um medicamento imunossupressor utilizado no tratamento de doenças crônicas. Atua na inflamação suprimindo ou inibindo a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que regula genes que codificam para diversas citocinas pró-inflamatórias (Costa et al., 2018; Negera et al., 2018).

Devido a presença praticamente habitual de lesão neural, ou em casos de reação ulcerada, deve-se iniciar prednisona com uma dose de 1 mg/kg/dia via oral, no café da manhã (Brasil et al., 2017). A maior parte dos médicos recomenda uma dose inicial de 60 mg. A dose pode ser mantida entre 15 e 30 dias, quando a retirada progressiva deve ser iniciada. De acordo com a resposta, a dose de prednisona deve ser reduzida em 10 mg a cada 15 dias, e após atingir a dose de 20 mg/dia, 5 mg no mesmo intervalo. A partir de 5 mg/dia, a dose deve ser mantida por 15 dias contínuos e depois em dias alternados por mais 15 dias (Darlong et al., 2016). A maior parte dos pacientes necessita de regimes múltiplos ou prolongados de prednisona. Pacientes com ENH recorrente podem ter sua dose aumentada ou mantida por um período indeterminado de tempo. Para impedir a recorrência da reação, uma dose de manutenção de 5 a 10 mg pode ser utilizada por várias semanas. Entretanto, graves efeitos colaterais podem ser associados ao uso prolongado de corticoides, requerendo maior cautela em sua administração. Além do risco de desenvolver infecções oportunistas, o uso crônico pode causar diabetes, osteoporose, gastrite, catarata, entre outros (Costa et al., 2018).

1.3. Receptores do Tipo Toll

Em humanos, receptores Toll-like (TLR) consistem em uma família de 10 proteínas (TLR1-TLR10) que reconhecem padrões específicos de componentes microbianos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A interação entre TLR e PAMPs causa a ativação do sistema imunológico inato, que posteriormente leva a ativação da imunidade adaptativa específica do antígeno (Takeda e Akira, 2015; Anthoney et al., 2018).

TLRs são receptores de membrana integrais do tipo I que dimerizam para ativar eventos de sinalização a jusante. Essa família de receptores é capaz de interagir com diversos tipos de ligantes, como proteínas e lipopolissacarídeos, podendo estar localizados na membrana plasmática ou na membrana de endossomas. Após o contato entre TLRs e seus ligantes, vias de sinalização intracelular são ativadas, levando a ativação e transcrição de moléculas pró-inflamatórias. As vias de sinalização mediadas por esses receptores compreendem a via dependente de MyD88 e a via dependente de TRIF (domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN- β), ambas induzindo a expressão gênica (Anthoney et al., 2018, Tartey e Takeuchim, 2017).

Os receptores recrutam essas moléculas adaptadoras, MyD88 e TRIF, para ativar quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1, fator 6 associada ao receptor de TNF e o inibidor do fator nuclear kappa- β quinase ϵ / TANK quinase 1. Esses, ativam de modo sequencial a via de sinalização de NF- κ B, proteína quinase ativada por mitogênio e c-jun quinase N-terminal, gerando uma sequência de respostas celulares específicas relacionadas à sobrevivência, proliferação e inflamação celular (Takeda e Akira, 2015; Tartey e Takeuchim, 2017).

Estudos têm demonstrado a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de genes da imunidade inata, a proteína macrófágica associada à resistência natural (*NRAMP1*) e *TLR1* com ENH. Um estudo descreveu que as células de Schwann nas lesões de pele de pacientes com hanseníase expressam TLR2 (Oliveira et al., 2003). Nas biópsias de pacientes com neurite, nessas mesmas células, foram identificados TNF- α , receptores de TNF- α e enzima conversora de TNF- α . Presumiu-se que os ligantes de *M. leprae* induzem a morte celular de Schwann por uma via que envolve TLR2 e TNF- α (Oliveira et al., 2003. Oliveira et al., 2005). Dessa forma, é possível que as citocinas pró-inflamatórias possam contribuir para a apoptose dessas células após a interação celular com o bacilo de Hansen, contribuindo para a patogênese do dano

nervoso (Pinheiro et al., 2018). Diversos estudos indicam que o reconhecimento de micobactérias por TLRs representa uma etapa essencial para produzir uma resposta imune qualificada a proteger contra infecção (Krutzik et al., 2003; Oliveira et al., 2003; Mattos et al., 2011; Mattos et al., 2010; Polycarpou et al., 2016).

1.3.1. TLR1

Localizado na superfície celular, o receptor TLR1 reconhece lipopeptídeos bacterianos. Forma heterodímero com TLR2, e ambos cooperam para detectar lipoproteínas triaciladas micobacterianas. O reconhecimento de um ligante ativa o fator de transcrição fator nuclear-kappa B (NF- κ B), aumentando a expressão de genes pró-inflamatórios (Gao e Li, 2017; Niitsuma et al., 2018).

Em vários estudos o polimorfismo rs4833095 tem sido associado à tuberculose, hanseníase e suas reações (Niitsuma et al., 2018; Santana et al., 2017; Schuring et al., 2009). Foram encontradas associações significativas entre o alelo T e ENH ou RR, além disso, observadas diferenças significativas nos níveis de citocinas e quimiocinas quando pacientes foram comparados a controles (Santana et al., 2017; Schuring et al., 2009; Niitsuma et al., 2018).

1.3.2. TLR2

O TLR2 possui capacidade de reconhecer uma ampla gama de ligantes, incluindo lipoproteínas de patógenos, peptídeo glicano, ácido lipoteicoico e lipoarabinomanana de micobactérias. É capaz de formar heterodímeros com TLR1 ou TLR6, característica que capacita ao reconhecimento de grande variedade de componentes microbianos. Os complexos TLR-2-TLR1 ou TLR2-TLR6, definidos como sensores primários, reconhecem componentes da membrana celular e parede das micobactérias. A interação de um ligante com TLR2 resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias (Gao e Li, 2017; Hart e Tapping, 2012; Liu et al., 2014; Mistry et al., 2015; Takeda e Akira, 2015).

O SNP rs3804099 do *TLR2* foi avaliado em estudos envolvendo pacientes com hanseníase. Nesses, o polimorfismo foi capaz de influenciar a susceptibilidade a hanseníase e RR, além dos níveis séricos de citocinas, os quais estavam elevados na presença do alelo T (Bochud et al., 2008; Santana et al., 2017). Além disso, o SNP estava associado à suscetibilidade a tuberculose pulmonar em uma população chinesa (Zhao et al., 2015).

1.3.3. TLR4

O receptor Toll-like 4 reconhece LPS (lipopolissacarídeo) de bactérias gram-negativas. Quando detecta o ligante, inicia uma cascata de respostas imunes reguladas resultando na produção de interferon- β . Entretanto, o TLR4 necessita de um co-receptor, o fator de diferenciação mieloide 2 (MD2), que atribui responsividade ao LPS (Ziakas et al., 2013).

Em um estudo realizado no Brasil, foram observadas diferenças significativas nos níveis de citocinas IL-17 e IL-1 β em pacientes com hanseníase portadores do alelo A no SNP rs1927914 de *TLR4* (Santana et al., 2017). A IL-17 é um importante regulador de neutrófilos (Gaffen et al., 2014). A IL-1 β é fundamental para a amplificação da resposta imune específica de células T e seus níveis tendem a diminuir após terapia multidroga. Essa citocina é produzida em grandes concentrações em pacientes MB (Gaffen et al., 2014; Moubasher et al., 1998; Madan et al., 2011).

1.3.4. TLR6

O TLR6 forma heterodímero com TLR2 em um complexo incluindo CD14, para reconhecer lipoproteínas diaciladas e ácido lipoteicóico. A função específica do TLR6 no reconhecimento dos diversos patógenos é menos compreendida que a de TLR1 e TLR2. No entanto, sabe-se que é fundamental para a síntese de gotículas lipídicas em células infectadas com o bacilo (Noreen e Arshad, 2015; Shey et al., 2010).

Pesquisadores demonstraram que o alelo T do SNP rs5743810 tem um efeito protetor contra o desenvolvimento da tuberculose e associação a infecções complicadas da pele. Além disso, o SNP foi relacionado à secreção alterada de IL-6 e menor sinalização de NF- κ B em resposta ao lisado de *Mycobacterium tuberculosis* (Shey et al., 2010; Schurz et al., 2015; Stappers et al., 2014).

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Os receptores do tipo *Toll* detectam diferentes antígenos e são habilitados para o reconhecimento de uma grande variedade de microrganismos (Abbas et al., 2015; Iwasaki e Medzhitov, 2004). Os TLRs 1, 2,4 e 6 foram identificados como capazes de reconhecer o *M. leprae*, e após interagir com o ligante, desencadeiam ampla resposta antimicrobiana e inflamatória. Polimorfismos nesses receptores foram associados às doenças autoimunes, infecciosas e inflamatórias. Dentre elas estão a hanseníase, tuberculose pulmonar, dermatite atópica e lúpus eritematoso sistêmico (Bochud et al., 2008; Suryadevara et al., 2013; Schurz et al., 2015; Stappers et al., 2014; Dias et al., 2016; Rupasree et al., 2015). Fatores de transcrição ativados pelas vias de sinalização de TLR estimulam a expressão de citocinas como TNF e IL-1, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial (Abbas et al., 2015; Medzhitov e Janeway, 1997).

Os tratamentos mais utilizados para o ENH no Brasil são talidomida e prednisona. Recentemente foi demonstrado que a prednisona atua modulando citocinas pró-inflamatórias diretamente ou através da supressão de células imunológicas que produzem essas citocinas. Estudos revelaram que a talidomida e seus derivados são inibidores eficazes da produção de TNF- α induzida por TLR4, e que o efeito inibitório da talidomida nas citocinas induzidas por TLR e na produção de IFN tipo 1 pode potencialmente colaborar para a eficácia desse composto no tratamento de ENH. Estes achados indicam que o tratamento pode alterar a resposta imunológica induzida por toll-like (Dias et al., 2016; Millrine et al., 2016; Millrine e Kishimoto, 2017; Negera et al., 2018).

Todos os medicamentos empregados no tratamento do ENH apresentam restrições de uso, como risco de dependência para a prednisona, e neuropatia periférica e teratogenicidade para a talidomida. Polimorfismos em genes envolvidos na imunidade inata que se relacionam ao reconhecimento do hospedeiro podem ser determinantes no curso da doença e aparecimento de ENH, e podem também influenciar na manifestação de eventos adversos relacionados ao uso de medicações. Sendo assim, um estudo farmacogenético de variantes nesses genes poderia auxiliar na compreensão dos processos de doença e no manejo do ENH.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência de variantes genéticas de receptores do tipo toll na resposta ao tratamento do eritema nodoso hansênico com talidomida e prednisona.

3.2. Objetivos Específicos

- Em pacientes com ENH que utilizam talidomida e/ou prednisona estudar a frequência de polimorfismos dos genes *TLR1/rs4833095*, *TLR2/rs3804099*, *TLR4/ rs1927914* e *TLR6/rs5743810*.
- Identificar a relação entre o perfil de melhora no tratamento (medido pela redução de dose) com talidomida e/ou prednisona e os polimorfismos em *TLR1/rs4833095*, *TLR2/rs3804099*, *TLR4/rs1927914* e *TLR6/rs5743810*.
- Relacionar o perfil de efeitos adversos com a frequência dos polimorfismos nos genes *TLR1/rs4833095*, *TLR2/rs3804099*, *TLR4/ rs1927914* e *TLR6/rs5743810*.

CAPÍTULO IV

ARTIGO

Association of polymorphisms in Toll-like receptor genes in response to treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide and prednisone

Artigo em preparação

Association of polymorphisms in Toll-like receptor genes in response to treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide and prednisone

Miriã Ferrão Maciel Fiuza^{1,2,4,5}, Perpétua do Socorro Silva Costa³, Thayne Woycinck Kowalski^{1,2,4,5}, Julia Gomes do Amaral^{1,2,4,5}, Lavinia Schuler-Faccini^{1,2}, Renan Rangel Bonamigo⁶, Rodrigo Vetoratto⁷, Letícia Maria Eidt⁸, Paulo Cezar Moraes^{7,8}, Sidia Maria Callegari-Jacques^{7,9}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,4,5}.

1. Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
2. INAGEMP, Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, RS, Brazil
3. Center of Social Sciences, Health and Technology. Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, MA, Brazil
4. Center of Experimental Research, Genomics Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil
5. Laboratory of Immunobiology and Immunogenetics, Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil
6. Pathology Post-Graduate Program, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre (RS), Brazil
7. Postgraduate Program in Medicine, Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
8. Sanitary Dermatology Clinic, Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
9. Statistics Department, Institute of Mathematics. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author: fslvianna@gmail.com

ABSTRACT

Erythema nodosum leprosum (ENL) is a painful inflammatory complication caused by a humoral immune response to *Mycobacterium leprae*. In Brazil, the most used drugs for treatment of ENL are thalidomide and prednisone. Some Toll-like receptors (TLRs), as TLR1, TLR2, TLR4 and TLR6, have been identified as capable of recognizing *M. leprae* and triggering a wide antimicrobial and inflammatory response. Polymorphisms in the genes of these receptors could be determinant in the course of the disease and the appearance of ENL. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of genetic variants of *TLRs* genes in the response to the treatment of ENL with thalidomide and prednisone. A total of 130 ENL patients treated with thalidomide and/or prednisone were recruited from different regions of Brazil and clinical information on leprosy, ENL, treatments and possible adverse effects were collected from medical records. Patient's DNA were extracted and genetic variants in *TLR1* (rs4833095), *TLR2* (rs3804099), *TLR4* (rs1927914), and *TLR6* (rs5743810) were genotyped by TaqMan PCR system. Generalized Estimating Equation (GEE) analyzes were performed to assess the influence of polymorphisms in on the variation of the dose of thalidomide and prednisone over the time. In this sample, 76,2 % were men, 46,2% were in treatment for leprosy and the median dose of prednisone and thalidomide throughout six visits were 40mg/day and 100mg/day, respectively. We found that the dose of thalidomide in the CT and TT genotypes of *TLR1*/rs4833095 varied around 48mg between the North and South regions ($p < 0.0001$). For *TLR2*/rs3804099, the variation also occurred according to the patient's region. In all genotypes of this SNP (CC, CT and TT), patients in the South region received an average of 45.3mg less thalidomide compared to the North region ($p = 0.001$). Regarding to prednisone, we identified that the effect of the CT and CC genotypes on dose variation depended on time ($p = 0.018$). The effect of the genotype on the variation of the thalidomide dose in the AA and AG genotypes of *TLR6*/rs5743810 depends on time. During treatment we could observe a dose reduction only for individuals AG and GG. The analysis of the association between the genetic variants and the manifestation of adverse effects showed an association between the TT genotype of *TLR1*/rs4833095 and edema ($p = 0.019$). In addition, the TT genotypes of *TLR2*/rs3804099 genotypes ($p = 0.016$) were associated with adverse dermatological effects. TLRs have demonstrated importance in the recognition of *M. leprae* and activation of the immune system and, and in this study shows that, although the relationship between dose of medications and response to

treatment is complex, varying throughout treatment, the evaluation of *TLRs* can help to understand the ENL therapy.

Key words: Toll like receptor, thalidomide, prednisone, erythema nodosum leprosum

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. It especially injures the skin and peripheral nervous system, resulting in disabilities and characteristic deformities [1]. The most used classification systems are Ridley-Jopling (based on clinical, pathological, bacilloscopic, and immunological criteria) and the World Health Organization (WHO) (a simplified operational classification to facilitate leprosy treatment). In the Ridley-Jopling, patients are classified as indeterminate, tuberculoid, borderline and lepromatous; In WHO system, patients are classified as paucibacillary (PB) and multibacillary (MB), according to clinical manifestation, being the latter more severe [2,3]. After infection, *M. leprae* bacilli are initially recognized by several innate immune receptors, including Toll-like receptors (TLRs). TLRs are membrane receptors capable of interacting with several types of molecules, such as proteins and lipopolysaccharides [4,5]. Several studies indicate the recognition of mycobacteria by TLRs represents an essential step to produce an immune response qualified to protect against infection. [6-10]. Each receptor recognizes different patterns and specific ligands of microbial components [11,12]. TLRs 1, 2, 4 and 6 have been identified as capable of recognizing *M. leprae*, and after interacting with the ligand they trigger a wide antimicrobial and inflammatory response. The innate immune response influences the type of adaptive immune response induced by the expression of genes which are mostly regulated by interaction of the TLR [13]. Transcription factors activated by TLR signaling pathways stimulate the expression of cytokines such as Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and Interleukin 1 (IL-1), chemokines and endothelial adhesion molecules [14,15].

Interestingly, around 50% of lepromatous leprosy (LL) patients and 5 to 10% of borderline-lepromatous (BL) patients develop an inflammation conditions related do leprosy. One of them, called erythema nodosum leprosum (ENL), is characterized by painful subcutaneous erythematous nodules that can ulcerate, fever, general malaise and systemic inflammation [2,5]. ENL affects patients with poor cellular immune responses but who have preserved humoral responses, an its immunopathological mechanism is not yet fully understood, but high levels of the proinflammatory cytokine TNF- α are associated with the pathogenesis of the reaction [16]. In order to manage the ENL symptoms, thalidomide is one drug used, according to the severity of the reaction. Thalidomide has a rapid action with symptom control within 24-48 hours, mainly due to the its anti-inflammatory action by inhibiting TNF- α production by macrophages [2,

17, 18]. In addition, the use of systemic corticosteroids may be necessary for patients with moderate, severe and recurrent ENL [19]. It acts in inflammation by suppressing or inhibiting the activation of the transcription factor nuclear factor kappa beta (NF- κ B), which regulates genes that encode various pro-inflammatory cytokines [2, 5].

Polymorphisms in TLRs have been associated with autoimmune, infectious and inflammatory diseases. Among them are leprosy, pulmonary tuberculosis, atopic dermatitis and systemic lupus erythematosus [13-16, 20, 21]. The SNP rs4833095 of *TLR1* results in an amino acid change from asparagine to serine. This change is believed to affect the interaction of TLR with the ligand, leading to a decreased immune response [22]. In *TLR4*, the SNP rs1927914 alters the signaling of the receptor, being able to modulate the growth of bacilli, which in turn influence the immune response [23]. SNPs in *TLR2* and *TLR6* were previously associated with leprosy or tuberculosis [20, 24, 25], but their specific roles are less understood. Due to the relevance of TLR in inducing an immune response, in this study we evaluated the influence of polymorphisms in the *TLR1* (rs4833095), *TLR2* (rs3804099), *TLR4* (rs1927914) and *TLR6* (rs5743810) genes in response to the treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide and prednisone.

MATERIAL AND METHODS

Sample

The sample consisted of 130 patients with ENL that were selected in 6 centers: at Hospital de Clínicas of Porto Alegre and at Sanitary Dermatology Clinic, in Porto Alegre (RS) South Brazil, at National Reference Center of Sanitary Dermatology Dona Libania in Fortaleza (CE), at Humanized Reference Center of Sanitary Dermatology in Imperatriz (MA) and Aquiles Lisboa Hospital in São Luís (MA) in Northeast Brazil, and at Dermatology Ambulatory of the University of São Paulo in Monte Negro (RO) in the north of Brazil.

The inclusion criteria were ENL patients between 18 and 85 years-old, treated with thalidomide and/or prednisone and with a follow-up of up to six visits. All participants were informed about the research objectives and signed an informed consent form. This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre under CAAE 8989519.5.0000.5327.

Clinical and demographic data analysis

Up to six visits previously registered in the patient's medical record were analyzed with the collection of demographic data, including: sex, age and place of origin, according to Brazilian political region; history of leprosy (moment of diagnosis and treatment used); and history of ENL (diagnosis, treatment, adverse effects, history of relapse and dose of medications used). ENL was classified as acute, a single episode lasting less than 24 weeks; chronic with a second episode or following episode 28 days or more after the end of treatment and recurrent, with constant episodes for more than 24 weeks [26].

Genetic Analyses

The patient's DNA was extracted from saliva samples with Oragene® kits (DNA Genotek), whilst peripheral blood DNA was obtained with the Flexigene® Blood Kit (Qiagen™) extraction kit, according to manufacturers' instructions.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were chosen based on literature data. The rs4833095 of *TLR1* (C_44103606_10), rs3804099 of *TLR2* (C_22274563_10), rs1927914 of *TLR4* (C_2704048_10) and rs5743810 of *TLR6* (C_1180648_20) SNPs were genotyped using the Real-Time PCR technique, with TaqMan assays (Applied Biosystems USA).

Statistical Analyses

The chi-square test was used to evaluate Hardy-Weinberg equilibrium for all polymorphisms. The generalized estimating equations method (GEE) was used to evaluate the influence of the *TLR* polymorphisms in the dose variation of thalidomide and prednisone. This method is a repeated measures analysis focused on average changes in response over time and on the impact of covariates on these changes. The covariates inserted in the model were: the region of origin of the patient, concomitant use of multidrug therapy (MDT) for leprosy treatment, and the use of other medications and other treatments for ENL.

The evaluation of the effect of *TLR* on the occurrence of adverse effects related to thalidomide treatment was conducted using chi-square test. All statistical analyses were performed with SPSS version 20 (SPSS, www.spss.com, IIBM, USA).

RESULTS

In this study, 130 patients with ENL were included, which 99 (76.2%) were male and 118 (90.8%) had chronic ENL. About 80% (n=102) of the patients presented LL, and 46% (n=60) were using multidrug therapy during the treatment for ENL. The demographic and clinical characteristics of the sample are presented in Table 1.

Table 1: Clinical and demographic characteristics of ENL patients

Chatacteristic	N (%)
Male	99 (76.2)
Concomitant Multidrug therapy for leprosy	60 (46.2)
Other medications	103 (79.2)
Prednisone dose [Median (P ₂₅ /P ₇₅)]	40.00 (30/50)
Thalidomide dose [Median (P ₂₅ /P ₇₅)]	100.00 (100/200)
Patient Origin	
South	23 (17.7)
Northeast	93 (71.5)
North	14 (10.8)
Leprosy:	
Borderline-borderline (BB)	0
Borderline-lepromatous (BL)	28 (21.5)
Lepromatous-leprosy (LL)	102 (78.5)
ENL	
Acute	6 (4.6)
Recurrent	2 (1.5)
Chronic	118 (90.8)
Adverse Effects:	
Neurological ^A	43 (33.1)
Gastrointestinal ^B	25 (19.6)
Musculoskeletal ^C	33 (25.4)
Ocular ^D	22 (16.9)
Edema	24 (18.5)
Dermatological ^E	9 (6.9)
Fever	16 (12.3)

^A. Paresthesias, dizziness, tremor, neuritis, headache; ^B. diarrhea, vomiting, gastric fullness, constipation and inappetence; ^C. myalgia, arthralgia and weakness; ^D. decreased visual acuity and eye irritation; ^E. pruritus, dry skin and hair loss.

Genotype distributions were tested for Hardy-Weinberg equilibrium and the allele and genotype frequencies of the polymorphisms are shown in Table 2. However, *TLR4* (rs1927914) polymorphism was not in Hardy-Weinberg equilibrium, and because of this it was removed from further analysis.

Table 2: Genotype and allele frequency of toll-like receptors

Gene	Polymorphism	Genotype/Allele	Number	Sample Frequency (%)	ABraOM Frequency (%)	P-value
<i>TLR1</i>	rs4833095 (T>C) Missense variant (Asn248Ser)	TT	27	21		0.396
		TC	66	51		
		CC	37	29		
		T	120	46	52	
<i>TLR2</i>	rs3804099 (T>C) Synonymous variant	C	140	54	48	0.776
		TT	38	29		
		TC	60	46		
		CC	32	25		
<i>TLR4</i>	rs1927914 (G>A) Intergenic variant	T	136	52	54	-
		C	124	48	46	
		GG	35	27		
		GA	52	40		
		AA	43	33		
<i>TLR6</i>	rs5743810 (A>G) Missense variant (Ser249Pro)	G	122	47	NA	-
		A	138	53	NA	
		AA	12	9		
		AG	40	31		
		GG	78	60		
		A	64	25	24	
G	196	75	76	0.869		

NA: not available

GEE analyzes were performed to assess the influence of polymorphisms on the variation of the dose of thalidomide and prednisone over the time. We found that the dose of thalidomide in *TLR1*/rs4833095 genotypes varied according to the region of origin of the patients (Table 3). When compared to the South region, patients with genotype CT and TT located in the North region used an average of 47.8mg more thalidomide ($p < 0.0001$). For both drugs, we were unable to identify difference in dose variation between genotypes over time for *TLR1*. For *TLR2*/rs3804099, we also observed that the dose variation of thalidomide occurred according to the region of the patients (Table 4). In all genotypes of this SNP (CC, CT and TT), patients in the South region received an average of 45.3mg less thalidomide when compared to patients located in the Northern region of the country ($p = 0.001$). For prednisone, we identified that the effect of the CT genotype on dose variation depended on time ($p = 0.018$). Despite having started the treatment with a higher average dose, when compared to CC, patients with CT genotype showed a greater dose reduction over time (Figure 1).

Table 3. Analysis of interaction between genotypes of *TLR1* polymorphism (rs4833095) and time related to dose of thalidomide and prednisone estimated using the Generalized Estimates Equation model (GEE)

Drug	Gene	Polymorphism	Interaction	P-value
Thalidomide¹	<i>TLR1</i>	rs4833095	rs4833095	0.738
			Region	0.001
			MDT	0.201
			Time	0.000
			rs4833095*Time	0.909
Prednisone²			rs4833095	0.623
			Region	0.477
			MDT	0.052
			Time	0.001
			rs4833095*Time	0.199

1. Dependent variable: Dose of Thalidomide. Model: Region, MDT, Genotype, Time, Dose of Prednisone, Genotype*Time..

2. Dependent Variable: Dose of Prednisone. Model: Region, MDT, Genotype, Time, Dose of Thalidomide, Genotype*Time.

Table 4. Analysis of interaction between genotypes of *TLR2* polymorphism (rs3804099) and time related to dose of thalidomide and prednisone estimated using the Generalized Estimates Equation model (GEE)

Drug	Gene	Polymorphism	Interaction	P-value
Thalidomide¹	<i>TLR2</i>	rs3804099	rs3804099	0.286
			Region	0.002
			MDT	0.180
			Time	0.000
			rs3804099*Time	0.231
Prednisone²			rs3804099	0.020
			Region	0.425
			MDT	0.036
			Time	0.031
			rs3804099*Time	0.018

1. Dependent variable: Dose of Thalidomide. Model: Region, MDT, Genotype, Time, Dose of Prednisone, Genotype*Time.

2. Dependent Variable: Dose of Prednisone. Model: Region, MDT, Genotype, Time, Dose of Thalidomide, Genotype*Time.

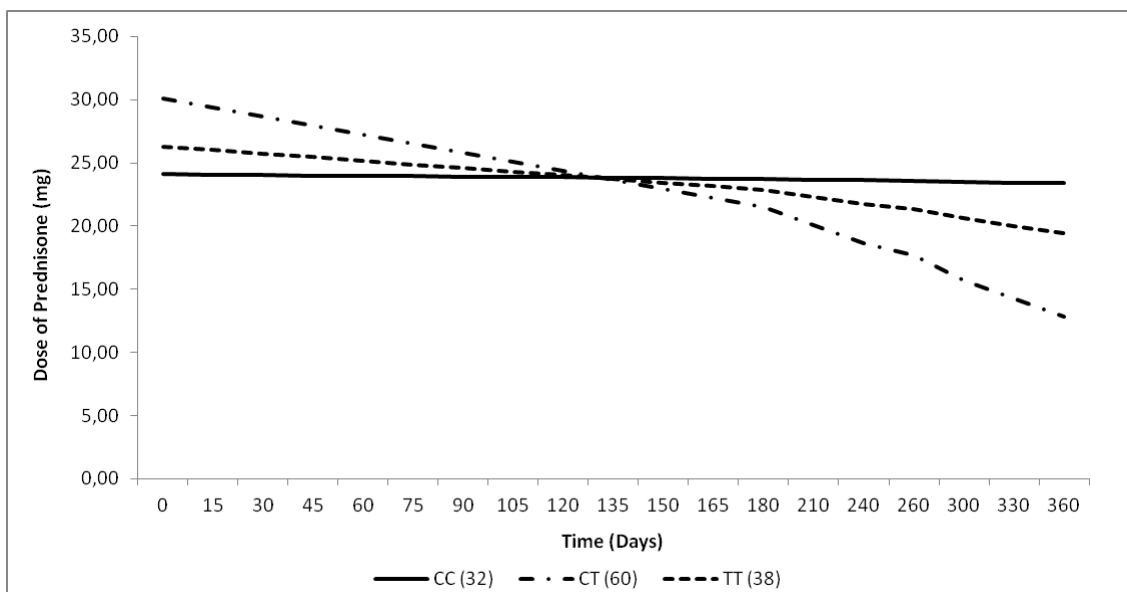


Figure 1. Line chart of the prednisone dose averages with *TLR2/rs3804099* genotypes discriminated by the times evaluated

The effect of the genotype on the variation of the thalidomide dose in the AA and AG genotypes of *TLR6/rs5743810* depends on time (Table 5). When compared, individuals with AA genotype used a higher average dose ($p=0.048$). Individuals of all genotypes (AA, AG and GG) started therapy with a similar dose average. However, during the treatment we could observe a dose reduction for individuals AG and GG. In contrast, in addition to showing an increase, throughout the treatment, AA individuals used an average higher dose of thalidomide (Figure 2).

Table 5. Analisis of interaction between genotypes of *TLRs* and time related to dose of thalidomide and prednisone estimated using the Generalized Estimates Equation model (GEE)

Drug	Gene	Polymorphism	Interaction	P-value
Thalidomide¹	<i>TLR6</i>	rs5743810	rs5743810	0.951
			Region	0.000
			MDT	0.131
			Time	0.046
			rs5743810*Time	0.024
Prednisone²			rs5743810	0.231
			Region	0.417
			MDT	0.089
			Time	0.047
			rs5743810*Time	0.712

1. Dependent variable: Dose of Thalidomide. Model: Region, MDT, Genotype, Time, Dose of Prednisone, Genotype*Time,
 2. Dependent Variable: Dose of Prednisone. Model: Region, MDT, Genotype, Time, Dose of Thalidomide, Genotype*Time,

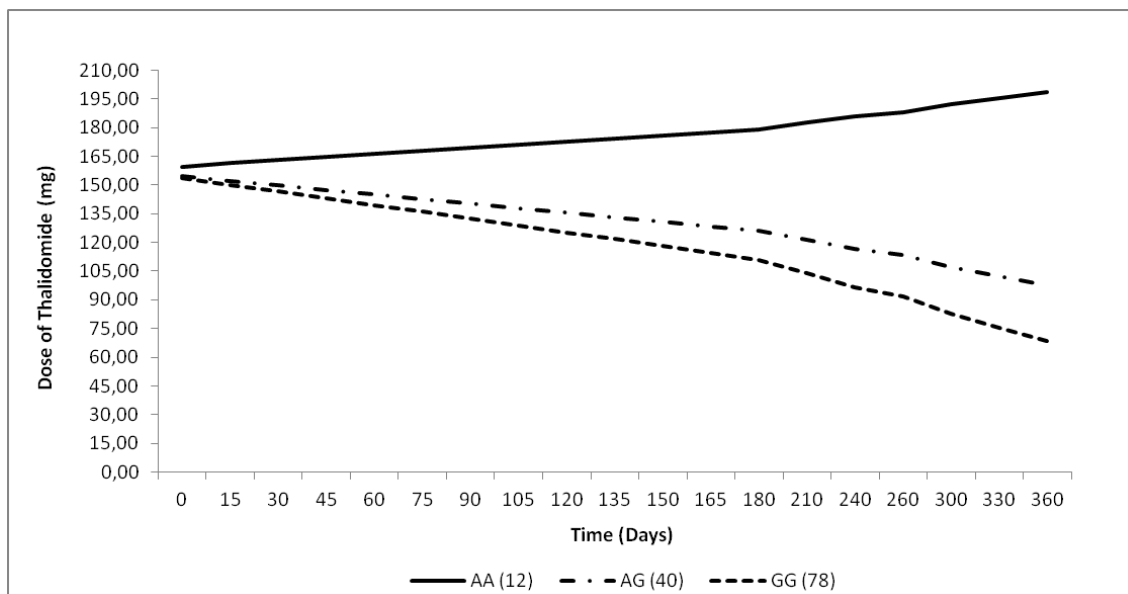


Figure 2. Line chart of the prednisone dose averages with *TLR6/rs5743810* genotypes discriminated by the times evaluated.

Analysis of genetic variants and the manifestation of adverse effects showed an association between the rs4833095/*TLR1* genotypes ($p=0.019$) and edema. These effects were present in 24 (19.2%) patients, and the TT genotype was shown to be associated with the presence of edema, whereas CT and CC were not. The proportion of TT individuals with the presence of edema was 37.5%, in contrast to CT and CC patients, in which there was a greater proportion of those who did not have this adverse effect (82.1%). In addition, the TT genotypes of *TLR2/rs3804099* ($p=0.016$) were associated with adverse dermatological effects, the presence of pruritus, hair loss and xeroderma. In these, the proportion of patients with TT genotype who had dermatological effects was 66.7%, while those with the CT and CC genotype were only 33.3% (Table 6).

Table 6: Frequency of adverse effects of *TLRs*

Polymorphism	Genotype	Absence-N (% within effect)	Presence-N (% within effect)	<i>P</i> -value ^A
<i>TLR1</i> ^B	CC	27 (26.7)	9 (37.5)	0.019
	CT	56 (55.4)	6 (25)	
	TT	18 (17.8)	9 (37.5)	
<i>TLR2</i> ^C	CC	28 (24.1)	2 (22.2)	0.016
	CT	57 (49.1)	1 (11.1)	
	TT	31 (26.7)	6 (66.7)	

A. Fisher's exact test. B. Edema. C. Dermatological adverse effects: pruritus, shedding and xeroderma.

DISCUSSION

This study aimed to evaluate the influence of genetic variants of toll-like receptors in the response to the treatment of ENL with thalidomide and prednisone. We found that the effect of the *TLR2*/rs3804099 polymorphism on the prednisone dose and the effect of the *TLR6*/rs5743810 polymorphism on the thalidomide dose depend on time. In addition, we found an association between *TLR1*/rs4833095 and edema, as well as *TLR2*/rs5743810 adverse dermatological effects.

Different constituents of *M. leprae* have been characterized as potent TLR ligands and stimulators, such as the triacylated lipoproteins that have been indicated as activators of TLR2/TLR1 heterodimers and TLR2 homodimeric cells [27]. Krutzik et al. (2003) showed that the 19 and 33 kDa lipoproteins of the microorganism are capable of activating monocytes and dendritic cells *in vitro* [6]. In addition, lesions of patients with tuberculoid form showed higher expression of TLR2 and TLR1 when compared to the lepromatous form of the disease, which one is more frequent in ENL patients [27].

In this study, the effect of the CT and TT genotype of *TLR1*/rs4833095 on the dose variation of thalidomide differed according to the region of the patients. Individuals CT and TT located in the North region used an average of 221.5mg, while in the South the average was 157mg. The thalidomide tablet contains 100 mg, so the average difference of 64.5 mg between regions could be considered clinically relevant, being equivalent to more than half a tablet. These results may be related to the genetic heterogeneity of the Brazilian population [28]. The allele distribution of this SNP (*TLR1*/rs4833095) varies widely between white and black ethnicities, the T allele in whites has a frequency of 72% and in blacks 12% [29]. However, they also may be related to treatment scheme, since currently there is no standard dosage or indication for discontinuation the thalidomide in the ENL in Brazil, and each center apply different doses and therapies related to these drugs [2,30]. Thus, both the prescribed dosage of thalidomide and the reduction of the medication, remain conditioned to the local medical conduct. Therefore, the findings of this study highlight the need for the institution of guidelines for the prescription and discontinuation of thalidomide.

It is believed that the change in amino acids (Asn248Ser) generated by the T allele in this SNP (*TLR1*/rs4833095) affects the folding mechanism of the TLR1 and its ability to interact with the ligand, as well as hindering its ability to form heterodimers with TLR2. Thus, the generated immune response becomes insufficient [31]. In addition, Uciechowski et al. (2011) suggested that this SNP affects the expression of the

cell surface of TLR1 [32]. Taken together, these data may indicate that individuals homozygous for the T allele of this SNP may show less signaling and inflammatory activity in response to *M. leprae*, resulting in the need for lower doses of anti-inflammatory drugs. However, in this study we were unable to identify dose variation between different genotypes.

Kang and Chae (2001) reported that the TT genotype of the rs3804099/*TLR2* polymorphism could be associated with susceptibility to leprosy. The authors suggested that this variant (T) could affect the signaling function of the receptor, resulting in a deficient immune response [33]. Corroborating with these data, Santana et al. (2017) reported that the T allele of this SNP was positively associated with an increased risk of developing leprosy *per se* in a population in Northeast Brazil. In addition, in the population studied by Santana et al, carriers of the T allele were associated with higher serum levels of IL-17 and greater production of IL-6 [34]. In the present study, we identified that the effect of *TLR2*/rs3804099 genotypes on thalidomide variation also occurred according to the patient's origin. For all genotypes of this SNP, the average dose in the South region was approximately 161mg, while in the North region it was around 220mg. The average difference of 56.7mg in the dose could be equivalent to half a tablet. As for *TLR1*, these findings may be related to the heterogeneity of the Brazilian population. For SNP *TLR2*/rs3804099 there is also a difference in allelic frequency between ethnic groups. In whites, the T allele has a frequency of 56%, while in blacks the frequency of the same allele is 36% [29]. However, we cannot ignore the absence of protocols for discontinuing the medication. In this sample, individuals with the CT genotype used a lower dose of prednisone throughout the treatment, compared to the CC. Prednisone is widely used in the treatment of ENL, acting in the modulation of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and IL-17A, directly or through the suppression of the immune cells that produce these cytokines [5]. The need to administer higher doses of corticosteroids throughout the treatment may indicate that patients homozygous for the C allele have an immune profile with greater inflammatory activity.

Within the leprosy spectrum, Mattos et al. (2011) suggested that TLR6-dependent signaling in interactions between *M. leprae* and Schwann cells plays a critical role in favor of phagocytosis and in signaling to induce lipid droplet biogenesis in infected cells; thus providing mycobacterial survival and persistence of the microorganism in the nerve [8]. The SNP rs5743810 of *TLR6* has been associated with susceptibility to tuberculosis (TB) among ethnic, African, European and Hispanic

groups. It has been proposed that this polymorphism influences the recognition of ligands and reduces cell signaling, with the A allele and the AG and AA genotypes demonstrating to have a protective effect against the development of TB [22]. In this study, the effect of the *TLR6*/rs5743810 polymorphism on the thalidomide dose was time dependent. At the beginning of treatment, all the patients, with different genotypes (AA, AG and GG) used a similar average dose. However, during treatment we could observe a dose reduction only for individuals AG and GG. Less signaling could imply less inflammatory response, resulting in the need to administer lower mean doses of the medication.

The predominant number of male patients found in this study is in accordance to the literature, which reports that proportionally more men than women are diagnosed with leprosy and ENL, in addition to developing severe disabilities more frequently in men [35,36]. Most individuals had lepromatous leprosy, this being the form mainly associated with ENL. In addition, many patients were using concomitant MDT, showing that these reactions occur more commonly during the first year of treatment [5,35]. Together, the findings corroborate the hypothesis that the amount of soluble antigen during treatment, due to bacterial death, causes excessive activation of the immune system, inducing an inflammatory state, especially in those with high bacillary load at the beginning of therapy [2,37].

In this study, we also found an association between the SNP TT genotype rs4833095 (*TLR1*) and edema. We also identified an association between TT genotypes of *TLR2*/rs3804099 with dermatological effects, which include pruritus, shedding and xeroderma. Among these, xeroderma or dry skin was the most common, present in about 7 individuals (5.3%). Edema can be associated with the use of prednisone, while dry skin is an effect known to be associated with the use of thalidomide [2,38,39]. Considering that several patients were using MDT for leprosy, the effects may be related to treatment due to the use of clofazimine. Both MDT and the drugs used to treat ENL can influence the appearance of adverse effects.

We must consider some limitations in our study. We conducted a retrospective study in which the patient's clinical data and treatment conduct were obtained from medical records, thus some important information could be missing in our analyses. The lack of standardization in the description of such information or the absence of reports could not be excluded. Another limitation is related to patient's origin. They were collected in different regions of the country and the heterogeneous genetic background

of the Brazilian population may have been underestimated in the analysis and interpretation of the results. Moreover, we did not find in the literature data showing that the SNP *TLR4*/rs1927914 is in Hardy-Weinberg imbalance. Therefore, further analysis will be carried out to understand the reason for the imbalance.

From the results of this study, we identified some genetic variants in the *TLR* genes that may influence the response to treatment with thalidomide or prednisone. The effects of the genotypes were dependent on time and region of origin of the patient. These results may be related to the lack of standardization of the use and discontinuation of thalidomide in the reaction. ENL is a chronic and difficult to control condition, and most patients remain on treatment for more than a year, often receiving large amounts of anti-inflammatory drugs. Given that TLRs are associated with bacillus recognition and survival in the host, it is suggested that they are related to the response to treatment, due to their role in inducing an immune response. There are still many gaps to be filled in our knowledge of the interaction mechanism between the different TLRs and *M. leprae* and how they can interfere with the course and treatment of the disease. However, this study shows that the evaluation of TLRs can help to understand the response to treatment of ENL with thalidomide and prednisone.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica da População, Bolsa CNPq 573993/2008-4), FIPE/HCPA (GPPG No. 19-0155) and Coordenação Brasileira de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for the support provided for this project. We would also like to thank the collaborators who helped in obtaining the specimens at all the participating centers.

REFERENCES

1. BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. **The Lancet**, v.363, p. 1209-1219, 2004.
2. COSTA, Perpétua do Socorro Silva et al. Erythema Nodosum Leprosum: Update and challenges on the treatment of a neglected condition. **Acta tropica**, v. 183, p. 134-141, 2018.
3. GURUNG, Pema et al. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1315-1327, 2019.
4. ANTHONY, Niki; FOLDI, Istvan; HIDALGO, Alicia. Toll and Toll-like receptor signalling in development. **Development**, v. 145, n. 9, p. dev156018, 2018.
5. TARTEY, Sarang; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. **International reviews of immunology**, v. 36, n. 2, p. 57-73, 2017.
6. KRUTZIK, Stephan R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-532, 2003.
7. OLIVEIRA, Rosane B. et al. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1427-1433, 2003.
8. MATTOS, Katherine A. et al. TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2548-2558, 2011.
9. MATTOS, Katherine A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 3, p. 371-384, 2010.
10. POLYCARPOU, Anastasia et al. Mycobacterium leprae activates toll-like receptor-4 signaling and expression on macrophages depending on previous bacillus Calmette-Guerin vaccination. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 72, 2016.
11. POLYCARPOU, Anastasia; WALKER, Stephen L.; LOCKWOOD, Diana NJ. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 233, 2017.
12. TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors. **Current protocols in immunology**, v. 109, n. 1, p. 14.12. 1-14.12. 10, 2015.
13. BRIGHTBILL, H. D.; MODLIN, R. L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. **Immunology**, v. 101, n. 1, p. 1-10, 2000.

14. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Elsevier, 2015.
15. MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current opinion in immunology**, v. 9, n. 1, p. 4-9, 1997.
16. DE LIMA FONSECA, Adriana Barbosa et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 5, 2017.
17. FISCHER, Marcellus. Leprosy—an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 15, n. 8, p. 801-827, 2017.
18. KIM, Eun Jee et al. Enhanced immune-modulatory effects of thalidomide and dexamethasone co-treatment on T cell subsets. **Immunology**, v. 152, n. 4, p. 628-637, 2017.
19. RUPASREE, Y. et al. Association of *TLR4* (D299G, T399I), *TLR9*– 1486T> C, *TIRAP* S180L and *TNF- α* promoter (– 1031,– 863,– 857) polymorphisms with risk for systemic lupus erythematosus among South Indians. **Lupus**, v. 24, n. 1, p. 50-57, 2015.
20. BOCHUD, P-Y et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 2, p. 253-261, 2008.
21. SURYADEVARA, Naveen Chandra et al. Genetic association of G896A polymorphism of *TLR4* gene in leprosy through family-based and case-control study designs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 12, p. 777-782, 2013.
22. MA, Xin et al. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. **PLoS one**, v. 2, n. 12, 2007.
23. Leandra F, Xiong Y, Chang S et al. A 299 G Polymorphism alters *TLR4* signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF. *J Immunol* 2012;188:4506–15.
24. SANTANA, N. de L. et al. Polymorphisms in genes *TLR1*, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.
25. SHEY, M. S. et al. Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide-and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion. **Genes and immunity**, v. 11, n. 7, p. 561, 2010.
26. WALKER, Stephen L. et al. The mortality associated with erythema nodosum leprosum in Ethiopia: a retrospective hospital-based study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 3, 2014.

27. GELUK, A. Correlates of immune exacerbations in leprosy. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2018.
28. CALLEGARI-JACQUES, Sidia M. et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association**, v. 15, n. 6, p. 824-834, 2003.
29. Ensembl Genome Browser. URL <https://www.ensembl.org/index.html> (Accessed 3.27.20).
30. WALKER, Stephen L. et al. ENLIST 1: an international multi-centre cross-sectional study of the clinical features of erythema nodosum leprosum. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, 2015.
31. UCIECHOWSKI, Peter et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 2, p. 377-388, 2011.
32. KANG, Tae-Jin; CHAE, Gue-Tae. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2001.
33. NOMAN, Abu Shadat M. et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production via down-regulation of MyD88 expression. **Innate immunity**, v. 15, n. 1, p. 33-41, 2009.
34. DIMOPOULOS, Meletios A.; ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU, Vagelis. Adverse effects of thalidomide administration in patients with neoplastic diseases. **The American journal of medicine**, v. 117, n. 7, p. 508-515, 2004.
35. GUERRA, Jackeline Gomes et al. Erythema nodosum leprosum case series report: clinical profile, immunological basis and treatment implemented in health services. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 384-390, 2004.
36. YE, Qiao et al. Thalidomide reduces IL-18, IL-8 and TNF- α release from alveolar macrophages in interstitial lung disease. **European Respiratory Journal**, v. 28, n. 4, p. 824-831, 2006.
37. SCHREUDER, Pieter AM; NOTO, Salvatore; RICHARDUS, Jan Hendrik. Epidemiologic trends of leprosy for the 21st century. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 1, p. 24-31, 2016.
38. NEGERA, Edessa et al. T-cell regulation in Erythema Nodosum Leprosum. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 10, p. e0006001, 2017.
39. MILLRINE, David et al. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4-induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. **International immunology**, v. 28, n. 6, p. 307-315, 2016.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O Brasil é considerado um país endêmico para hanseníase. Somente em 2018, a OMS relatou 28.660 novos casos da doença nesse país, representando um importante problema de saúde pública, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do país (Costa et al., 2018; WHO et al., 2018). O ENH ainda acomete milhares de pessoas, causando limitações físicas. Acometendo frequentemente homens, entre 30 e 60 anos, em idade economicamente ativa que, devido aos efeitos das reações, podem ter sua capacidade de trabalhar limitada, sofrendo dificuldades financeiras (Chandler et al. 2015; *Lastória e Abreu, 2014*). Por ser uma doença tropical negligenciada, a hanseníase recebe poucos investimentos em novas terapias e, pela característica de cronicidade do ENH, os pacientes são submetidos a longos períodos de tratamento, com altas doses de fármacos que podem gerar efeitos adversos. Além disso, os pacientes acometidos sofrem com o estigma social decorrente da doença, que implica em isolamento social e carga psicológica (Costa et al., 2018; Fischer, 2017; Silva et al., 2017).

Nesse trabalho, com o propósito de auxiliar na compreensão dos processos de doença e no manejo do ENH, investigamos a influência de variantes genéticas de receptores do tipo Toll (TLR) na resposta ao tratamento do eritema nodoso hansênico com talidomida e prednisona. Visto que os receptores TLR são capazes de identificar diferentes antígenos microbianos, gerando ampla resposta inflamatória e, com base no fato de que polimorfismos nesses receptores foram associados a diversas doenças, nós nos perguntamos se esses genes poderiam influenciar na variação e redução de dose ao longo do tratamento (Bochud et al., 2008; Schurz et al., 2015; Stappers et al., 2014). Para elucidar essa questão, análises foram realizadas a partir de 130 amostras de pacientes com ENH tratados com talidomida e/ou prednisona. Foram analisados polimorfismos em TLR1/rs4833095, TLR2/rs3804099, TLR4/rs1927914 e TLR6/rs5743810, previamente associados à interação e defesa do hospedeiro contra *M. leprae*.

Os genes foram avaliados em relação ao tratamento com talidomida e prednisona. Identificamos que o efeito do efeito dos genótipos CT e TT de *TLR1/rs4833095* na variação da dose da talidomida diferiu de acordo com a região dos pacientes. Em média, na região Norte indivíduos com esses genótipos receberam uma dose maior do medicamento comparado aos pacientes localizados na região Sul, cerca de 60mg. Essa diferença, equivalente a mais de meio comprimido (50mg), pode estar relacionado à grande miscigenação da população brasileira e sua consequente

heterogeneidade genética (Noman et al., 2009). No entanto, também podem estar relacionada ao esquema de tratamento, uma vez que atualmente não há no Brasil dosagem padrão para uso e descontinuação de talidomida no ENH, sendo que cada centro aplica diferentes doses e terapias relacionadas a esses medicamentos (Costa et al., 2018; Walker et al., 2015). Assim, tanto a dosagem prescrita de talidomida, quanto a redução do medicamento permanecem condicionadas à conduta médica local.

Kang e Chae (2001) sugeriram que a variante T do polimorfismo *TLR2/rs3804099* pode afetar a função de sinalização do receptor, resultando em uma resposta imune deficiente. O alelo T foi associado à susceptibilidade à hanseníase pelos mesmos autores (Kang e Chae, 2001). Em nosso estudo, identificamos que o efeito dos genótipos de *TLR2/rs3804099* na variação da talidomida também ocorreu de acordo com a região do paciente. Todos os indivíduos (CC, CT e TT) localizados na região Sul receberam uma dose equivalente a meio comprimido (56,7 mg) a menos do que os pacientes da região Norte. Assim como para *TLR1*, esses achados podem estar relacionados à heterogeneidade da população brasileira. No entanto, não podemos ignorar a ausência de protocolos para a descontinuação do medicamento. Sendo assim, esses resultados ressaltam a necessidade da instituição de uma diretriz regulamentadora da prescrição e desmame de talidomida, especialmente por seus graves efeitos adversos relacionados. Além disso, nessa pesquisa indivíduos com o genótipo CT utilizaram uma dose mais baixa de prednisona durante todo o tratamento, em comparação ao genótipo CC. A prednisona é amplamente utilizada no tratamento do ENH, atuando na modulação de citocinas pró-inflamatórias, como *IL-1 β* e *IL-17A*, diretamente ou através da supressão das células imunes que produzem essas citocinas [5]. A necessidade de administrar doses mais altas de corticosteroides durante todo o tratamento pode indicar que os pacientes homozigotos para o alelo C têm um perfil imunológico com maior atividade inflamatória.

Nesse estudo, encontramos que o efeito dos genótipos na dose de talidomida foi dependente do tempo para o polimorfismo *rs5743810 (A>G)* de *TLR6*. No início do tratamento, todos os pacientes, com diferentes genótipos (AA, AG e GG), usavam dose média semelhante. No entanto, durante o tratamento, pudemos observar uma redução de dose de talidomida apenas para indivíduos AG e GG. Em estudos anteriores, o alelo A demonstrou ter um efeito protetor contra o desenvolvimento de tuberculose, sendo que a presença do SNP foi associada à redução de sinalização celular (Schurz et al., 2015). Uma menor sinalização poderia implicar em menor resposta inflamatória, resultando em

necessidade de doses médias mais baixas do medicamento. Ao contrário disso, em nosso estudo a presença do alelo A foi relacionada à administração de doses mais altas de talidomida. Uma possível justificativa seria o pequeno número amostral dentro do grupo de indivíduos com genótipo AA.

Através da análise dos polimorfismos, identificamos uma associação entre o genótipo TT de *TLR1/rs4833095* e edema. Além disso, os genótipos *TLR2/rs3804099* foram associados a efeitos dermatológicos adversos. O edema poderia ser associado ao uso de prednisona, enquanto a pele seca é um efeito comumente associado à utilização de talidomida (Costa et al., 2018; Millrine et al., 2016). Considerando que vários pacientes estavam em uso de PQT para hanseníase, os efeitos podem estar relacionados ao tratamento, devido à clofazimina presente no composto. Tanto PQT quanto os medicamentos usados para tratar o ENH podem influenciar no aparecimento de efeitos adversos.

Devemos considerar algumas limitações em nosso estudo. Foi realizada uma análise retrospectiva em que os dados clínicos dos pacientes e a conduta médica foram obtidos de prontuários. A ausência de padronização na descrição de tais informações ou a ausência de relato dos efeitos adversos não pôde ser excluída. Outra limitação foi que as amostras foram coletadas em diferentes regiões do país e a heterogeneidade genética da população pode ter sido subestimada na análise e interpretação dos resultados. Além disso, o uso de clofazimina na PQT pode interferir na variação e redução de dose dos fármacos.

Devido ao grande potencial anti-inflamatório dos medicamentos utilizados no tratamento do ENH, esperávamos observar a melhora clínica do paciente por meio da redução de dose ao longo do tempo. Entretanto, pudemos identificar que devido a muitos pacientes apresentarem cronicidade da reação (90,8%), os regimes de tratamento foram prolongados e a redução esperada da dose ocorreu tardiamente, muitas vezes comprometendo ainda mais a saúde do paciente pelos efeitos adversos relacionados ao uso dos medicamentos. O ENH é uma condição crônica e de difícil controle, sendo que diferentes variáveis podem influenciar no aparecimento da reação. Além disso, devido ao fato de algumas regiões conterem um número menor de indivíduos, a avaliação da influência dos diferentes SNPs se torna mais dificultosa. Apesar disso, esse estudo mostra que a avaliação de TLRs pode auxiliar na compreensão dos processos de doença e no manejo do ENH.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse trabalho cumpriram os objetivos propostos.

***Em pacientes com ENH que utilizam talidomida e/ou prednisona estudar a frequência de polimorfismos dos genes *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR6*.**

***Identificar a relação entre o perfil de melhora no tratamento (firmado na redução de dose) com talidomida e/ou prednisona e os polimorfismos em *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR6*.**

As frequências das variantes foram estimadas e comparadas com a população brasileira do banco de dados ABraOM. Entretanto, não foi possível demonstrar o envolvimento dessas variantes com a resposta ao tratamento de ENH.

Nesse estudo, foi encontrada uma associação entre a dose de prednisona e polimorfismo rs3804099 (T>C) do gene *TLR2*. Além desse, foi encontrada uma associação entre a dose de talidomida e o polimorfismo rs5743810 (A>G) de *TLR6*. Em ambos os achados, o efeito do genótipo sobre a variação de dose do medicamento foi dependente do tempo. O SNP rs1927914 em *TLR4* estava em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo retirado das análises posteriores.

***Relacionar o perfil de efeitos adversos com a frequência dos polimorfismos nos genes *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR6*.**

Através da análise dos polimorfismos, identificamos uma associação entre o genótipo TT de *TLR1*/rs4833095 e edema. Além disso, os genótipos TT de *TLR2*/rs3804099 foram associados a efeitos dermatológicos adversos.

O *TLR9* foi relacionado às doenças autoimunes, infecciosas e inflamatórias (Dos Santos et al., 2012; Gebura et al., 2017). Um estudo demonstrou níveis mais altos de *TLR9* nas lesões de pele e na circulação de pacientes com ENH, sugerindo o envolvimento da imunidade inata na fisiopatologia do ENH (Dias et al., 2016). Por essa razão, ainda iremos incluir polimorfismos desse gene em nossas análises.

Para os receptores que formam heterodímeros, vamos avaliar o efeito de interação entre seus polimorfismos. Além disso, vamos investigar o motivo do desequilíbrio de ligação do polimorfismo TLR4/rs1927914, por meio de busca na literatura e realização de novas análises.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARÃO, Tinara Leila de Souza et al. Nerve growth factor and pathogenesis of leprosy: review and update. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 939, 2018.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Elsevier, 2015.

ALEMU BELACHEW, W.; NAAFS, B. Position statement: LEPROSY: Diagnosis, treatment and follow-up. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 7, p. 1205-1213, 2019.

ANTHONEY, Niki; FOLDI, Istvan; HIDALGO, Alicia. Toll and Toll-like receptor signalling in development. **Development**, v. 145, n. 9, p. dev156018, 2018.

ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 11, de 22 de março de 2011. Dispõe sobre o controle da substância Talidomida e do medicamento que a contenha.

ASATSUMA-OKUMURA, Tomoko et al. p63 is a cereblon substrate involved in thalidomide teratogenicity. **Nature chemical biology**, v. 15, n. 11, p. 1077-1084, 2019.

BOCHUD, P-Y et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 2, p. 253-261, 2008.

BRASIL et al. Guia prático sobre a hanseníase. 2017.

BRIGHTBILL, H. D.; MODLIN, R. L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. **Immunology**, v. 101, n. 1, p. 1-10, 2000.

BRUCE-HICKMAN, Damian et al. Erythema nodosum leprosum. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 79, n. 1, p. 54-54, 2018.

CERRONI, Lorenzo et al. (Ed.). **Histopathologie der Haut**. Springer-Verlag, 2016.

CHANDLER, David J. et al. Household costs of leprosy reactions (ENL) in rural India. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, 2015.

COSTA, Perpétua do Socorro Silva et al. Erythema Nodosum Leprosum: Update and challenges on the treatment of a neglected condition. **Acta tropica**, v. 183, p. 134-141, 2018.

CHOWDHRY, Sundeep et al. Treatment of severe refractory erythema nodosum leprosum with tumor necrosis factor inhibitor etanercept. **International journal of mycobacteriology**, v. 5, n. 2, p. 223-225, 2016.

DARLONG, Joydeepa et al. Experiences with thalidomide for erythema nodosum leprosum-a retrospective study. **Lepr Rev**, v. 87, p. 211-220, 2016.

DE ABREU, MAM Morgado et al. Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, p. 59-64, 2014.

DIAS, A. A. et al. DNA sensing via TLR-9 constitutes a major innate immunity pathway activated during erythema nodosum leprosum. **The Journal of Immunology**, p. 1600042, 2016.

DOS SANTOS, B. P. et al. TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from southern Brazil. **Lupus**, v. 21, n. 3, p. 302-309, 2012.

FISCHER, Marcellus. Leprosy—an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 15, n. 8, p. 801-827, 2017.

GAFFEN, S. L. et al. IL-23-IL-17 immune axis: discovery, mechanistic understanding, and clinical testing. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 9, p. 585, 2014.

GAO, D.; LI, W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 85, n. 1, p. 3-9, 2017.

GEBURA, K. et al. Polymorphisms within Genes Involved in Regulation of the NF- κ B Pathway in Patients with Rheumatoid Arthritis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1432, 2017.

GRZYBOWSKI, Andrzej et al. Leprosy: social implications from antiquity to the present. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 1, p. 8-10, 2016.

GURUNG, Pema et al. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1315-1327, 2019.

HART, B. E.; TAPPING, R. I. Differential trafficking of TLR1 I602S underlies host protection against pathogenic mycobacteria. **The Journal of Immunology**, p. 1201545, 2012.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature immunology**, v. 5, n. 10, p. 987, 2004.

KANG, Tae-Jin; CHAE, Gue-Tae. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2001.

KIM, B. S. et al. Immune modulatory effect of thalidomide on T cells. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2015. p. 787-790.

KIM, Eun Jee et al. Enhanced immune-modulatory effects of thalidomide and dexamethasone co-treatment on T cell subsets. **Immunology**, v. 152, n. 4, p. 628-637, 2017.

KRUTZIK, Stephan R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-532, 2003.

LASTÓRIA, Joel Carlos; ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects-part 1. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205-218, 2014.

LIU, Y. et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 47, n. 2, p. 136-147, 2014.

MADAN, N. K.; AGARWAL, K.; CHANDER, R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 371-383, 2011.

MAHAJAN, V. K. et al. Pulse dexamethasone, oral steroids and azathioprine in the management of erythema nodosum leprosum. **Leprosy review**, v. 74, n. 2, p. 171, 2003.

MATOS, A. M. F. et al. Assessing epidemiology of leprosy and socio-economic distribution of cases. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 14, p. 1750-1755, 2018.
MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current opinion in immunology**, v. 9, n. 1, p. 4-9, 1997.

MATTOS, Katherine A. et al. TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2548-2558, 2011.

MATTOS, Katherine A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 3, p. 371-384, 2010.

MILLRINE, D. et al. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4-induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. **International immunology**, v. 28, n. 6, p. 307-315, 2016.

MILLRINE, D.; KISHIMOTO, T. A brighter side to thalidomide: its potential use in immunological disorders. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 4, p. 348-361, 2017.

MISTRY, P. et al. Inhibition of TLR2 signaling by small molecule inhibitors targeting a pocket within the TLR2 TIR domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201422576, 2015.

MOREIRA, A. L. et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 6, p. 1675-1680, 1993.

MOTTA, Ana Carolina F. et al. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1145-1148, 2012.

MOUBASHER, A. E-D. A. et al. Cytokines in leprosy, II. Effect of treatment on serum cytokines in leprosy. **International journal of dermatology**, v. 37, n. 10, p. 741-746, 1998.

NEGERA, Edessa et al. The effects of Prednisolone Treatment on cytokine expression in Patients with erythema nodosum leprosum reactions. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 189, 2018.

NIITSUMA, E. N. A.; DA ROCHA FERNANDES, G.I; LANA, F. C. F. The TLR1 gene is associated with higher protection from leprosy in women. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205234, 2018.

NOMAN, Abu Shadat M. et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production via down-regulation of MyD88 expression. **Innate immunity**, v. 15, n. 1, p. 33-41, 2009.

NOREEN, M.; ARSHAD, M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. **Immunologic research**, v. 62, n. 2, p. 234-252, 2015.

OLIVEIRA, Rosane B. et al. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1427-1433, 2003.

OLIVEIRA, Rosane B. et al. Cytokines and Mycobacterium leprae induce apoptosis in human Schwann cells. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 64, n. 10, p. 882-890, 2005.

PINHEIRO, Roberta Olmo et al. Innate immune responses in leprosy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 518, 2018.

POLYCARPOU, Anastasia et al. Mycobacterium leprae activates toll-like receptor-4 signaling and expression on macrophages depending on previous bacillus Calmette-Guerin vaccination. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 72, 2016.

POLYCARPOU, Anastasia; WALKER, Stephen L.; LOCKWOOD, Diana NJ. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 233, 2017.

RANG, H. P. et al. Rang and Dales Pharmacology . Edinburgh, London, New York. 2012.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, Alexandra. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 45, n. 9, p. 383-393, 2015.

RIDÉY, D. S. et al. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966.

ROSENBACH, M.; WERTH, Victoria P. Dermatologic therapeutics: thalidomide. A practical guide. **Dermatologic therapy**, v. 20, n. 4, p. 175-186, 2007.

RUPASREE, Y. et al. Association of *TLR4* (D299G, T399I), *TLR9*– 1486T> C, *TIRAP* S180L and *TNF- α* promoter (– 1031,– 863,– 857) polymorphisms with risk for systemic lupus erythematosus among South Indians. **Lupus**, v. 24, n. 1, p. 50-57, 2015.

SAMPAIO, Elizabeth P. et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 3, p. 699-703, 1991.

SANTANA, N. de L. et al. Polymorphisms in genes *TLR1*, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

SANTOS, Julia Rocha Silva et al. Etanercept in erythema nodosum leprosum. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 92, n. 4, p. 575-577, 2017.

SCHREUDER, Pieter AM; NOTO, Salvatore; RICHARDUS, Jan Hendrik. Epidemiologic trends of leprosy for the 21st century. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 1, p. 24-31, 2016.

SCHURING, R. P. et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 12, p. 1816-1819, 2009.

SCHURZ, H. et al. *TLR1*, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0139711, 2015.

SHESKIN, Jakob. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 303-306, 1965.

SHEY, M. S. et al. Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide-and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion. **Genes and immunity**, v. 11, n. 7, p. 561, 2010.

SILVA, Cláuffer Luiz Machado et al. Spatial distribution of leprosy in Brazil: a literature review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 439-449, 2017.

STAPPERS, M. H.T et al. *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* gene polymorphisms are associated with increased susceptibility to complicated skin and skin structure infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 2, p. 311-318, 2014.

SURYADEVARA, Naveen Chandra et al. Genetic association of G896A polymorphism of *TLR4* gene in leprosy through family-based and case-control study designs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 12, p. 777-782, 2013.

TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors. **Current protocols in immunology**, v. 109, n. 1, p. 14.12. 1-14.12. 10, 2015.

TARTEY, Sarang; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. **International reviews of immunology**, v. 36, n. 2, p. 57-73, 2017.

WALKER, Stephen L. et al. ENLIST 1: an international multi-centre cross-sectional study of the clinical features of erythema nodosum leprosum. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. **Weekly epidemiological record. Geneva [Internet]: WHO**, p. 389-412, 2019.

ZHAO, Y et al. Genetic polymorphisms of CCL1 rs2072069 G/A and TLR2 rs3804099 T/C in pulmonary or meningeal tuberculosis patients. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 10, p. 12608, 2015.

ZIAKAS, P. D. et al. The role of TLR4 896 A> G and 1196 C> T in susceptibility to infections: a review and meta-analysis of genetic association studies. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81047, 2013.