

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Suscetibilidade Genética na Hanseníase:
Análise Molecular de *HLA classe II & classe III***

por

PATRÍCIA ROSA VANDERBORGHT

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Biologia Molecular.

Orientadores: **Dra. Euzenir Nunes Sarno**

Dr. Milton Ozório Moraes

Fevereiro, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**“Suscetibilidade Genética na Hanseníase:
Análise Molecular de *HLA classe II & classe III*”**

Banca examinadora:

Titulares:

Dr. Adalberto Rezende Santos – FIOCRUZ

Dra. Maria Gerbase De-Lima – UNIFESP

Dr. Pedro Hernán Cabello Acero – FIOCRUZ

Suplentes:

Dr. Marcelo T. Mira-PUC/Paraná

Dra. Alda Maria da Cruz- FIOCRUZ

Revisor:

Dr. Adalberto Rezende Santos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hanseníase, Departamento de Micobacterioses, Instituto Oswaldo Cruz- Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro.

*“Ao meu marido que tanto amo, Bart,
meus pais Nilton e Maria Hortência, meus
irmãos Max e Júnior e sobrinho Lucas, pelo
carinho, companheirismo, estímulo e
apoio...”*

AGRADECIMENTOS

Euzenir N. Sarno & Milton O. Moraes

*Pelos preciosos ensinamentos que terei o privilégio de carregar por
toda a minha vida!*

*Maria Elisa Moraes, pela receptividade, confiança depositada,
ensinamentos e sempre exigente em todos os detalhes...*

*Antônio Guilherme Pacheco, o que seria deste projeto sem seu
suporte estatístico e acima de tudo paciência...*

*Adalberto Rezende Santos, sem o seu “ponta pé” inicial e incentivo
este projeto não teria acontecido...*

A todos os *Amigos* que participaram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, com *carinho* agradeço:

Alejandra, Alexandre PA, Alexandre Freire, Ana Beatriz, Cynthia, Diogo, Flávia, Guilherme, Karina, Luana, Valcemir, Viviane, Sidra, Maristela, Rosaninha, Daniele, Jô, Tatiana, Harrison, Philip, Mara, Diogo, Adalgiza, Ida, Amanda, Marcia, Cristina Pessollani, Elisabeth Sampaio, José Augusto, Ana Sales, Denise, Nádia, M. Eugênia, Pedro, Daniel, Augusto, Fidelton, Paulo Sales, Solange, Benedita, Maria, Maria Isabel Hue, Matilde, Margareth.

Meu reconhecimento a

José Roberto Moraes

(in memorium)

A todos os meus AMIGOS que mesmo sem entender do assunto me deram muita força e que, felizmente, são muitos!!!

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado a influência da variabilidade genética humana na capacidade de resposta ao *M. leprae*, agente etiológico causador da hanseníase. Através de diferentes técnicas a genética moderna tem contribuído para a determinação de regiões importantes associadas à doença, dentre elas o cromossomo 6p21, apontando principalmente a associação da região *HLA/TNF*. Na hanseníase, o estudo de SNPs no gene de $TNF\alpha$ tem mostrado diferentes tipos de associações, dependendo da população estudada. Paralelamente, relatos têm demonstrado que alelos HLA-DRB1 desempenham um importante papel no desenvolvimento da doença. Assim sendo, vista a possibilidade da predisposição genética ser um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da hanseníase, o presente estudo teve como objetivo analisar o papel da região *HLA/TNF* na doença mediante distintas abordagens. Primeiramente, para as análises do locus *HLA-DR* foi realizado um estudo do tipo caso-controle englobando 1269 indivíduos pertencentes à população brasileira. Para a posterior confirmação dos resultados obtidos foi então realizado um estudo de replicação utilizando-se o método de TDT com 194 famílias vietnamitas. Para as análises da região *TNF* foi realizado um estudo do tipo caso-controle com 1170 indivíduos pertencentes à população brasileira onde foram analisados os SNPs nas posições +252 do gene de LTA e -863, -308 e -238 do gene de $TNF\alpha$. Testes de varredura e análise haplotípica foram aplicados com os respectivos SNPs. Os resultados encontrados para o locus HLA-DR corroboram achados prévios mostrando a associação do alelo *HLA-DRB1*15* com suscetibilidade a hanseníase na população brasileira. Adicionalmente, devido ao alto poder amostral utilizado nesta análise assim como o estudo de replicação, foi possível se observar os alelos *HLA-DRB1*10* e *HLA-DRB1*04* associados com suscetibilidade e resistência a doença, respectivamente. Na região *TNF*, os resultados obtidos sugerem que os haplótipos -863**C**/-308**A**; -308**A**/-238**G** e +252**G**/-308**A** encontram-se associados com resistência à hanseníase, destacando a recorrência do alelo **A** na posição -308 entre os três haplótipos significativos, sugerindo que o mesmo pode ser utilizado como tagSNPs em estudos posteriores. Portanto, baseado nos resultados apresentados no presente estudo pode-se inferir a importância dos alelos HLA-DRB1*10, HLA-DRB1*04 e TNF-308**A** como marcadores genéticos na hanseníase.

ABSTRACT

Several studies demonstrated the influence of human genetic variability on the capacity to respond against *M. leprae*, etiologic agent of leprosy disease. Through different techniques the modern genetics has contributed for the determination of important regions associated with this illness, such as the 6p21 chromosome, mainly pointing to the HLA/TNF region. In leprosy, studies involving SNPs of the TNF α gene have shown different associations depending on the studied population. Simultaneously, there are evidences that HLA-DRB1 alleles play an important role in the development of the illness. Therefore, considering the possibility of genetic pre-disposition to be one of the responsible factors for the development of leprosy, the present study has as objective to analyze the role of the HLA/TNF region using different approaches. First, for the analyses of the HLA-DR locus a case-control study was carried out involving 1269 Brazilian citizens. For the posterior confirmation of the obtained results, a replication study was carried out, using the TDT methodology with 194 Vietnamese families. For the analyses of the TNF region a case-control study was carried out with 1170 individuals belonging to the Brazilian population, analyzing SNPs at position +252 of the LTA gene and -863, -308 and -238 of the TNF α gene. Screening tests and haplotypic analyses were applied on the respective SNPs. Results found for the HLA-DR locus confirmed previous studies which demonstrated association of the HLA-DRB1*15 allele with susceptibility for leprosy in the Brazilian population. Additionally, due to the high power of the sample size used in this study as well as in the replication study, it was possible to observe the association of the HLA-DRB1*10 and HLA-DRB1*04 alleles with susceptibility and resistance for disease, respectively. In the TNF region, the results suggest that the haplotypes -863C/-308A; -308A/-238G and +252G/-308A are associated with resistance to leprosy, showing the recurrence of the "A" allele at position -308 between the 3 significant haplotypes, suggesting that it can be used as a tagSNP in further studies. Therefore, based on the results obtained in the present study it's possible to show the importance of the HLA-DRB1*10, HLA-DRB1*04 and TNF-308A alleles as genetic markers for leprosy.

ABREVIATURAS

BB – borderline borderline

BL – borderline lepromatoso

BT – borderline tuberculóide

DNA – ácido desoxirribonucleico

ENL – eritema nodoso leproso

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

LL – lepra lepromatosa

LPS – lipopolissacarídeo

LAM - lipoarabinomanana

HLA – antígenos leucocitários humanos

MB – multibacilar

MHC – complexo maior de histocompatibilidade

NF κ B – fator nuclear Kappa B

NK – “natural killer”

OMS – Organização Mundial de Saúde

PB – paucibacilar

PCR – reação de polimerase em cadeia

RFLP – “restriction fragment length polymorphism”

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

RR – reação reversa

SNPs – polimorfismos de base única

Th – células T “helper”

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TNF1 – alelo selvagem “G” na posição -308

TNF2 – alelo mutante “A” na posição -308

TNFG – não carreador de mutação na posição -238

TNFA – carreador de mutação na posição -238

TT – tuberculóide

IB – índice bacteriológico

ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO	1
I.1- Hanseníase	1
I.1.1- O <i>Mycobacterium leprae</i>	4
I.1.2 - Resposta imune na hanseníase	6
I.2- Genética nas doenças infecciosas	10
I.2.1-Estratégias em epidemiologia genética	12
I.2.2- Suscetibilidade genética na hanseníase	18
I.2.2.1- Anexo I: <i>Moraes et al., 2006</i>	24
II- OBJETIVOS	25
III- MATERIAIS E MÉTODOS	26
IV.1- RESULTADOS I	28
IV.1.1- Anexo II. <i>Vanderborgh et al, 2006</i>	28
IV.1.2- Análise de alta resolução de HLA-DRB1	30
IV.2- RESULTADOS II	32
IV.2.1- Estudo da região HLA classe III na hanseníase	32
V- DISCUSSÃO	38
VI- CONCLUSÕES	49
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE de FIGURAS

1. História natural da hanseníase: estágios de infecção da doença	6
2. Estudos de rastreamento genômico e genes	20
3. Localização dos genes nas regiões HLA-classes I, II e III	21
4. Distribuição de frequências de subtipos de HLA-DRB1*15	31
5. Alinhamento de seqüências de subtipos de HLA-DRB1*15	40
6. Estrutura de LD em torno da região HLA-DR.	43

ÍNDICE de TABELAS

1. Distribuição de frequências de SNPs em LTA e TNF α	33
2. Análise de varredura 2 a 2 de SNPs	34
3. Análise da distribuição haplotípica nas regiões LTA e TNF	35
4. Distribuição haplotípica de SNPs em LTA e TNF α	37

INTRODUÇÃO

I.1- HANSENÍASE:

Clínica

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica sistêmica, típica do homem e decorrente da infecção pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), patógeno intracelular obrigatório de multiplicação lenta. A transmissão do bacilo ocorre de pessoa para pessoa através das vias respiratórias por contato íntimo e prolongado especialmente com doentes que possuem alta carga bacilar. (Ridley e Jopling, 1966). O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, baseado na sintomatologia, no exame da pele, dos nervos periféricos e na história epidemiológica, com o eventual auxílio laboratorial para confirmação diagnóstica. Os sinais cardinais da doença são lesões cutâneas com nervos espessados e alterações da sensibilidade dérmica em 70% dos casos (Gallo e cols., 2005).

A hanseníase é uma doença de apresentação espectral, bem caracterizada tanto imunológica quanto clinicamente. Baseada em critérios de polaridade esta se apresenta classificada em cinco diferentes formas clínicas (Ridley e Jopling, 1966). Em um dos pólos encontra-se a forma denominada de *lepromatosa-lepromatosa* (LL), que é a forma disseminada da doença, apresentando deficiência de resposta imune celular e predomínio de resposta humoral. Nesta observa-se intensa multiplicação bacilar assim como lesões difusas atingindo a pele e órgãos internos. No outro extremo do pólo, a forma *tuberculóide-tuberculóide* (TT) caracteriza-se por apresentar lesão cutânea ou neural localizadas e predomínio de resposta imune celular com pouco ou nenhum bacilo. As formas interpolares foram denominadas de *Borderline*, respectivamente, *borderline-lepromatosa* (BL), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-tuberculóide* (BT). Estas apresentam como característica instabilidade imunológica com altas taxas de episódios reacionais. O dano neural está presente em todas as formas clínicas da hanseníase podendo levar o paciente a

apresentar lesões irreversíveis. Além destas formas clássicas são também encontradas outras formas denominadas de indeterminada (I) e neural pura (NP). Respectivamente, a forma indeterminada apresenta lesão cutânea isolada sendo considerada uma lesão precoce de todas as formas clínicas da doença. A forma disseminada neural pura se caracteriza pelo comprometimento do sistema nervoso periférico sem evidência de lesão cutânea. Em ambas as formas a baciloscopia é frequentemente negativa (Ridley e Jopling, 1966).

No curso crônico da hanseníase, vale ressaltar ainda a ocorrência de episódios reacionais que representam episódios inflamatórios que se intercalam no decorrer da doença. Estes estados reacionais são episódios agudos ou subagudos com comprometimento neurológico, cutâneo e sistêmico, variando com o tipo de reação. Os tipos de reações mais importantes são conhecidos como reação reversa (RR) ou reação tipo I e o eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação tipo II (Gallo e cols, 2005). As reações podem ocorrer antes da introdução do tratamento da doença, na vigência deste ou após a alta terapêutica. O diagnóstico clínico da RR pode ser realizado pela observação de reativação de lesões cutâneas preexistentes ou surgimento de novas lesões, sendo freqüente em pacientes que apresentam baciloscopia negativa. Os pacientes com ENH apresentam, dentre outros sintomas, nódulos cutâneos de aparecimento súbito, febre, mialgia e, frequentemente, este tipo de reação ocorre em indivíduos com alta carga bacilar.

Epidemiologia

A hanseníase é uma doença distribuída em quase todos os países da África, Ásia e América Latina. Em países endêmicos, no ano de 2003, foram contabilizados 543.662 novos casos de hanseníase, dos quais aproximadamente 473.658 encontram-se na Índia (WHO, 2006). Após a implementação da multidroga terapia (MDT) em 1981 houve efetivamente uma redução dramática na prevalência, ou seja, diminuição do número de casos da doença por cada 10 mil habitantes. Porém, não houve indicação de declínio na

detecção de novos casos (WHO, 2005). No Brasil, com exceção da região sul, a doença ainda é um problema relevante de saúde pública, pois o país detém o segundo lugar no mundo em número absoluto de casos (38.410 casos novos em dezembro de 2005) com uma taxa de prevalência de 1.48 casos/10.000 habitantes (27.313 casos em curso de tratamento em dezembro de 2005), considerado como de alta e média endemicidade (MS/SVS, 2006).

Tratamento

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1997 estipulou que todos os pacientes deveriam ser classificados de acordo com a carga bacilar, ou seja, em multibacilares (MB) e paucibacilares (PB). Portanto, o grupo MB passou a englobar todos os indivíduos com baciloscopia positiva que por sua vez possuíam as formas clínicas diagnosticadas como *LL*, *BL* e *BB*. No outro grupo foram classificados pacientes PB, possuindo baciloscopia negativa envolvendo pacientes que desenvolvem as formas clínicas *BT*, *TT*, *NP* e *I* (WHO, 1998). O Ministério da Saúde recomenda a associação de quimioterápicos para tratamento de todos os pacientes com hanseníase. Os pacientes pertencentes ao grupo MB, ou seja, aqueles que apresentam no mínimo 1 bacilo detectado em pelo menos um dos 100 campos analisados pela microscopia ótica, devem ser tratados por 12 meses. Através de administração oral mensal, supervisionada, deverão ser ingeridas 600 mg de rifampicina, 300 mg de clofazimina e doses diárias, auto-administradas, de 100mg de dapsona e 50 mg de clofazimina.

Todos os pacientes do grupo PB, que por definição não apresentam bacilos a níveis detectáveis em todos os campos analisados por microscopia, devem ser tratados por apenas 6 meses. As doses administradas são de 600mg de rifampicina mensal e 100mg de dapsona diariamente.

O esquema proposto de tratamento supervisionado tem por objetivo diminuir o número de casos de abandono, os riscos de recidivas com possíveis cepas de *M. leprae* quimiorresistentes, e a eliminação da população bacteriana viável em menor tempo possível.

I.1.1- O *Mycobacterium leprae*:

O bacilo foi identificado em 1873 pelo norueguês Gerhard H. A. Hansen e associado à hanseníase, sendo também o primeiro patógeno identificado como agente etiológico de uma doença infecciosa humana.

O *M. leprae* apresenta um longo período de incubação no hospedeiro humano (2 a 10 anos) até o desenvolvimento da doença sendo capaz de infectar o endotélio vascular, células musculares e macrófagos. E, também apresenta uma especial afinidade por células de Schwann, que são células de revestimento dos nervos periféricos. A capacidade do bacilo de invadir e infectar células de Schwann é responsável por desencadear os danos neurais que podem acarretar incapacidades físicas (Ridley e Jopling, 1966). Um dos grandes obstáculos para a maior compreensão dos mecanismos de ação inerentes ao patógeno historicamente foram i) a inexistência de meio de cultura artificial para o cultivo do *M. leprae* e ii) a ausência de modelo animal que mimetizasse a doença humana.

Em 2001, foi publicado o genoma completo do *M. leprae* (Cole e cols., 2001). A partir das informações adquiridas após o seqüenciamento foi então determinado o tamanho do genoma com $3,3 \times 10^6$ de pares de base (pb). Entretanto, apenas cerca de 1.600 genes foram caracterizados, e um elevado número de pseudogenes presentes no genoma foi também identificado (Cole e cols., 2001). A título de comparação o genoma de *M. tuberculosis* possui cerca de $4,4 \times 10^6$ bp, com 3.959 genes. Portanto, a característica extremamente peculiar do genoma do *M. leprae* com a existência de poucos genes, diferentemente do observado em *M. tuberculosis* pode ser devido a uma perda maciça de genes. Essa perda poderia, por sua vez, explicar a taxa de crescimento lento do bacilo (que varia em torno de 11 a 13 dias), bem como sua incapacidade de crescimento *in vitro*.

Dados mais recentes da literatura acerca do genoma de *M. leprae*, elaborados pelo grupo do pesquisador Stewart Cole, também contribuem para um melhor entendimento no que se refere à disseminação da doença. Através

da análise do genoma de 175 diferentes amostras de *M. leprae* provenientes de 21 países representativos dos cinco continentes verificou-se que a origem da hanseníase seria a África Oriental/Oriente Médio (Monot e cols., 2005). Acredita-se que o *M. leprae* tenha se propagado pelo mundo através de sucessivas migrações que se iniciaram a partir das guerras pré-idade média e posteriormente com o colonialismo e o comércio de escravos¹. Estes dados contradizem, portanto, a teoria até pouco tempo sugerida de que a doença teria sido originada na Ásia, particularmente na Índia. No entanto, um dos resultados mais interessantes apresentados neste trabalho foi a demonstração da variabilidade genética extremamente reduzida entre distintas cepas de *M. leprae*. Foram identificadas 4 cepas provenientes de países diferentes comparadas com base na distribuição de polimorfismos de base única (“single nucleotide polymorphisms” – SNPs), os quais revelaram um padrão muito semelhante de agrupamento filogenético (Monot e cols., 2005). Estes dados demonstraram, portanto, que pelo fato do bacilo não apresentar grande variabilidade no seu genoma, a diversidade genética do hospedeiro humano representa efetivamente o fator primordial para a suscetibilidade e severidade à doença.

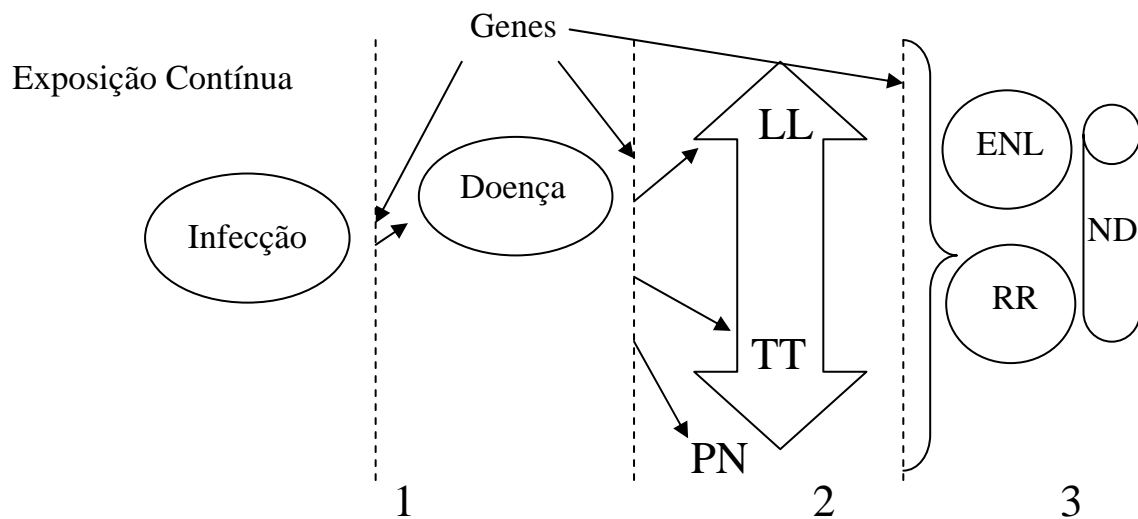
Todavia, os estudos de proteoma têm demonstrado genes efetivamente funcionais pertencentes ao *M. leprae*. Atualmente, a associação de técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa têm sido utilizadas para a conclusão do projeto proteoma de *M. leprae* (Williams e cols., 2004; Geluk e col, 2005).

Portanto, espera-se que em médio prazo através de resultados advindos de transcriptoma e proteoma de *M. leprae* possam ser obtidos maiores esclarecimentos a respeito dos efeitos patogênicos desencadeados pelo *M. leprae*, conseqüentemente, contribuindo para o melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro.

¹ Uma das hipóteses presumidas sugere que a doença fora introduzida na Europa por soldados das tropas de *Alexandre o Grande*, após incursões no Oriente Médio.

I.1.2 - Resposta imune na hanseníase:

A resposta imune específica desencadeada pela infecção via *M. leprae* determina não só o curso da doença como suas diversas formas clínicas (ver também anexo 1, Moraes e cols. 2006). A partir do momento da infecção algumas etapas até o desenvolvimento da doença podem ser claramente identificadas e subdivididas. Em um primeiro momento um indivíduo infectado pode se curar ou desenvolver a doença (hanseníase *per se*). Em uma segunda etapa, observa-se a gravidade onde o organismo uma vez doente “define” a forma do espectro da hanseníase que o acometerá: a forma tuberculóide (que pode ser considerada branda, por ser localizada), até a forma lepromatosa, disseminada, considerada grave. Finalmente a terceira etapa, consiste na ocorrência de estados reacionais que se intercalam no curso natural da doença (Fig.1; Anexo I).



LL= forma lepromatosa; TT=forma tuberculóide; PN= neural pura; ENL= eritema nodoso leproso; RR= reação reversa; ND= dano nervoso.

Figura 1. História natural da hanseníase: estágios de infecção da doença (adaptado de Moraes e cols, 2006)

Para cada um dos estágios relatados acima podem ser caracterizados tipos diferenciados de resposta imune. Devido a característica intracelular do *M. leprae*, sabe-se que a resposta imune celular apresenta maior importância na eliminação do bacilo.

Na hanseníase *per se*, a primeira via de interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro humano vem a ser através da mediação de receptores que reconhecem padrões antigênicos da micobactéria. Este é o caso, por exemplo, dos receptores Toll-like (TLR) de células fagocíticas, principalmente TLR-2 que são ativados por lipoproteínas do patógeno (Oliveira e cols., 2003). Entretanto, a efetiva resposta efetuada pela imunidade celular caracteriza-se pela mediação de diferentes citocinas, dentre elas as interleucina (IL)-12/23, o interferon gama ($IFN\gamma$) e o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) (Moraes e cols., 2006).

Resumidamente, após a fagocitose do *M. leprae* por células apresentadoras de antígeno (p.ex. macrófagos, células dendríticas, etc) os componentes micobacterianos são devidamente processados e apresentados na membrana celular. Os macrófagos ativados produzem citocinas como $TNF\alpha$ e IL-12, que por sua vez têm a capacidade de atuar sobre linfócitos $CD4^+$ que passam a produzir suas próprias citocinas. A interleucina-12 (IL-12) estimula linfócitos e células “natural killer” (NK) a liberar $IFN\gamma$ com função de potencializar a ativação do macrófago, que por sua vez, sinergiza a produção de TNF (Van de Vosse e cols., 2004; Ottenhoff e cols., 2002) Entretanto, quando a resposta imune não é capaz de debelar a infecção, outros mecanismos de ação deverão ser desencadeados.

Em um segundo estágio a partir do momento do estabelecimento da doença, diferentes padrões de resposta imune podem ser observados quando a forma clínica do paciente é definida. Historicamente um padrão dicotômico entre lepromatosos (resposta humoral) e tuberculóides (resposta celular) tem sido estabelecido. Na década de 80, o desenvolvimento de métodos de rastreamento de marcadores celulares (como $CD4^+$ e $CD8^+$) na superfície de células T estenderam os padrões ao microambiente imunológico de pacientes com

hanseníase. Esses estudos revelaram que indivíduos pertencentes ao pólo tuberculóide (BT, TT, I e NP) desenvolvem resposta imune celular com predomínio de células T CD4⁺ na lesão, embora células T CD8⁺ também estejam presentes, contudo em menor quantidade. Conseqüentemente, este tipo de resposta passa a acarretar à morte e eliminação da maioria dos bacilos, e danos nervosos (Modlin e cols., 1982). Por outro lado, pacientes lepromatosos tinham uma razão CD4⁺/CD8⁺ inferior a 1, com um excedente de células T CD8⁺ ditas à época células T supressoras.

Mais recentemente, no início da década de 90, o reconhecimento de pelo menos duas subpopulações distintas de linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th1 e Th2) contribuiu para um melhor entendimento dos mecanismos reguladores envolvidos na resposta imune contra o *M. leprae*.

Na hanseníase, o padrão de resposta imune Th1 ou Th2 foi determinado através da detecção da expressão de RNAm de citocinas na lesão de pacientes dos pólos tuberculóide e lepromatoso, respectivamente (Yamamamura e cols 1991). Constatou-se que RNAm de citocinas com perfil Th1 (IL-2, IL-12, IL-18, IFN γ e TNF α) estavam presentes em lesões de pele de pacientes com a forma clínica tuberculóide, sugerindo um certo grau de proteção a doença. Por outro lado, níveis de RNAm de citocinas apresentando perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) encontravam-se aumentados em pacientes com a forma lepromatosa, sugerindo com isso aumento da suscetibilidade à doença (Yamamura e cols., 1991; Dockrell e colss., 1996). Neste contexto observa-se que também para a definição do quadro clínico da hanseníase, citocinas do eixo IL-12/IL-23/IFN γ desempenham um papel importante na resposta imune frente ao patógeno.

Fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF α , também conhecido como caquetina, pertence a uma das mais importantes e bem estudadas famílias de citocinas (que incluem *LTA*, linfotóxina- α e *LTB*, linfotóxina- β), sendo considerado uma molécula extremamente importante na ativação tissular na hanseníase. O TNF α é uma citocina pró-inflamatória com sua produção induzida em uma variedade de tipos celulares

que incluem macrófagos, linfócitos T e B, entre outras. Na hanseníase, estudos realizados no final da década de 80, já demonstravam a presença $TNF\alpha$ no soro de pacientes que apresentavam a forma clínica menos severa da doença (Silva e cols 1989). Em contrapartida, o mesmo não fora detectado em pacientes que desenvolveram as formas lepromatosas. Estes resultados indicam que o $TNF\alpha$ encontra-se diretamente associado à formação de granulomas e a destruição de micobactérias como fora amplamente demonstrado em modelos experimentais de infecções micobacterianas (Kindler e cols 1989).

Uma das outras funções do $TNF\alpha$ é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio da infecção ativando tais células para a destruição do patógeno. Contudo, dependendo da concentração em que se encontra no organismo, o $TNF\alpha$ pode apresentar características tanto fisiológicas quanto fisiopatológicas. Em baixos níveis, atua no local da infecção ativando leucócitos e células endoteliais; em concentrações moderadas modula o efeito sistêmico da inflamação; e em altas concentrações passa a ser deletério causando anormalidades patológicas, dentre elas o choque séptico e na hanseníase danos no nervo ou necroses teciduais (Grau e colss, 1992; Abbas e colss., 2000).

Com base neste conceito, a ocorrência do terceiro estágio imunológico no curso da hanseníase, os chamados estados reacionais, têm sido correlacionados com a produção exacerbada de $TNF\alpha$ tanto *in vivo* quanto *in vitro*. (Sarno e cols., 1991; Khanolkar-Young e colss.,1995; Moraes e cols., 1999). O aumento da imunidade celular, com altos níveis de citocinas, em pacientes que desenvolvem reação reversa (RR) frequentemente ocorre naqueles que apresentam as formas clínicas BT ou BB. No entanto, os pacientes que apresentam as formas lepromatosas da doença desenvolvem o estado de eritema nodoso hansênico (ENH) com níveis extremamente elevados de $TNF\alpha$. Estes episódios inflamatórios ocasionados em virtude da presença do patógeno, quando não tratados, desencadeiam danos neurais que, por consequência, poderão vir a causar seqüelas irreversíveis (Nery e cols., 1998).

Todavia, pelo fato da hanseníase apresentar-se como uma doença que

possui estágios diferenciados a partir do momento da infecção, e devido a baixa variabilidade encontrada no genoma do *M. leprae*, a mesma torna-se um interessante modelo de estudo e estas observações sugerem fortemente que fatores genéticos do hospedeiro são um dos componentes primordiais para o estabelecimento e desencadeamento da doença.

I.2- Genética nas doenças infecciosas:

Por definição, o termo infecção designa o estabelecimento de interação entre o parasito e o hospedeiro, podendo ou não desencadear doença, que seria a manifestação de danos com exteriorização clínica e patológica (Coura e cols., 2005). Dentro deste conceito, sabe-se hoje que para a ocorrência de tais manifestações a virulência dos patógenos e a contribuição de fatores ambientais não são suficientes para a explicação dos diferentes padrões de resistência e suscetibilidade observados em uma mesma população frente às doenças infecciosas. Por exemplo, o número de indivíduos expostos a um patógeno em particular excede o número daqueles que desenvolvem a doença.

De fato, diferenças inter-individuais com relação à suscetibilidade a infecções podem ser observadas em níveis populacionais. Um exemplo histórico que demonstra a variabilidade de resposta imune dentro de uma população foi dado no final da década de 20 em Lubeck na Alemanha. Lamentavelmente, foram administradas de forma acidental doses da vacina BCG oral contaminada com *Mycobacterium tuberculosis* em mais de 250 crianças. Este fato, contudo, evidencia um padrão de heterogeneidade mediante a um mesmo agente infeccioso porque fora verificado que após os primeiros 6 meses a partir da inoculação, cerca de 30% das crianças infectadas faleceram. Em torno de 50% desenvolveram tuberculose pulmonar e curaram-se e o restante apresentou teste cutâneo do PPD² positivo e não desenvolveram a doença clinicamente

² O teste de PPD (do inglês protein purified derivative) é um teste cutâneo que mede a hipersensibilidade do tipo imediata após 96h da injeção intradérmica de um extrato purificado de *M. tuberculosis*. A positividade, normalmente o diâmetro da induração acima de 15mm, indica exposição ao *M. tuberculosis*.

(Cooke e Hill, 2001). Portanto, pode-se concluir que a resposta imune do hospedeiro é um fator crítico para o desencadeamento de doença e os níveis desta resposta são influenciados pelos produtos de diversos genes. Um outro exemplo clássico que fundamenta a existência de associação genética a uma doença infecciosa pode ser visto em pacientes com malária, doença infecciosa causada por *Plasmodium sp.* (Pauling e cols.,1949). Indivíduos carreadores do alelo A (SNP) que codifica para valina no sexto códon da β -globina apresentam alteração na estrutura da proteína e conseqüentemente da hemácia, por isso, pacientes com genótipos heterozigotos para este polimorfismo são resistentes à malária. Porém, vale ressaltar que, além deste “background” genético as interações bem- ou mal-sucedidas entre parasito-hospedeiro são também dependentes da variabilidade genética existente no patógeno, assim sendo, a variabilidade “ao quadrado” propicia uma maior complexidade para a análise e o entendimento dos processos que em última análise conferem resistência ou suscetibilidade (Cabello, 2005).

Ademais, um outro grande obstáculo a ser ultrapassado para a obtenção de um melhor entendimento da etiologia das doenças complexas comuns (multifatoriais) é o de não apresentarem um padrão de herança Mendeliana clássica. Doenças complexas apresentam um padrão de herança imperfeita. A variação dos componentes que resultam em um determinado fenótipo provém, além dos fatores ambientais, da interação entre múltiplos genes (Barnette, e cols., 2005).

I.2.1-Estratégias em epidemiologia genética:

A epidemiologia genética moderna tem proposto ferramentas de estudo para questões como a suscetibilidade genética em doenças complexas como, por exemplo, as doenças infecciosas. No entanto, no que tange a elaboração de

desenhos de estudos alguns critérios devem ser considerados como, por exemplo, o prévio conhecimento dos processos patofisiológicos da doença a ser investigada. Partindo-se da premissa de que tais processos são conhecidos a realização de estudos utilizando os chamados *genes candidatos* pode ser aplicada.

Geralmente, genes candidatos são selecionados com base na importância que estes apresentam na resposta imunológica e algumas vezes tornam-se objeto de pesquisa em humanos pelo fato de serem descritos a partir de experimentos realizados em animais. Este é o caso, por exemplo, do gene *NRAMP1* (do inglês, “natural resistance associated macrophage protein 1”), hoje conhecido como *SLC11A1* (“solute carrier family 11, member 1”), localizado no cromossomo 2q35, sendo ortólogo ao gene *Nramp* de camundongos, com 92% de similaridade (Vidal e cols., 1995; Abel e cols., 1998). Em camundongos, uma única substituição de aminoácido (G169D) é suficiente para conferir suscetibilidade em determinadas linhagens a alguns patógenos intracelulares como micobactérias, leishmanias e salmonelas, tornando-se com isso um gene candidato para estudos de associação com doença em humanos (Abel e cols., 1998; Marquet e Schurr, 2001). Entretanto, a abordagem de genes candidatos também apresenta sua desvantagem, tendo em vista que outros genes ainda não descritos, contudo, com igual ou maior importância não são contemplados neste tipo de análise.

Recentes avanços na área de genômica e biotecnologia têm gerado ferramentas para a caracterização de novos genes em média/larga escala. Um modelo de estudo que tem sido utilizado para a determinação de genes ou polimorfismos candidatos em doenças, sem necessariamente o conhecimento prévio de suas funções, é o chamado “genome scan” (Marquet e Schurr, 2001; Barnette e cols., 2005). Com o advento desta metodologia é possível se obter uma visão mais abrangente de quais genes ou regiões no genoma poderiam, de fato, estar participando em uma dada patologia. Visto que, através de uma refinada varredura ao longo do genoma, que é dividido em pequenas regiões cromossômicas, utilizando-se famílias com vários indivíduos afetados observa-

se aquelas regiões que estão segregando com mais freqüência entre indivíduos afetados. Com isso há possibilidade de identificação de novos *loci* ou até mesmo um locus conhecido e associado a outras doenças. Este foi o caso, por exemplo, da região 6q25 que foi associada a hanseníase, recentemente, nas populações Vietnamita e Brasileira (Mira e cols 2004). Contudo, vale ressaltar que para a realização deste tipo de estudo a metodologia de “genome scan” tem sido considerada bastante laboriosa e de custo muito elevado.

A partir do momento que os genes candidatos ou as regiões cromossômicas foram escolhidas/definidas, diferentes estratégias para a verificação de associação entre marcadores genéticos e doenças multifatoriais podem ser realizadas (Abel e Dessein, 1998). Uma abordagem bastante utilizada neste tipo de análise, com uma gama de exemplos descritos na literatura, são os chamados *estudos de associação* que podem ser realizados em populações (caso-controle) ou em famílias (TDT). O estudo do tipo caso-controle consiste em determinar a existência ou não de correlação entre um dado marcador (ou alelo) e a doença em questão. Estes estudos implicam na utilização de uma população de indivíduos doentes e sadios, independentes não aparentados, pertencentes a uma mesma área geográfica. Além disso, um outro critério importante a ser considerado na elaboração deste estudo são as devidas informações referentes a origem, sexo, etnia, idade e etc. da população utilizada. Obviamente, em se tratando da seleção de casos, em primeiro lugar deve ser realizada a definição clara do desfecho (doença) baseada na clínica e em testes laboratoriais. Com relação aos controles estes devem apresentar características representativas da população sob risco de adquirir a doença. Todavia, visando à obtenção de resultados seguramente válidos e precisos se faz necessário neste tipo de abordagem a aquisição de um número amostral elevado a fim de ser proporcionado o aumento do poder das análises estatísticas, conseqüentemente, minimizando possíveis erros ou viés (de Bakker e cols., 2005; Schaid e cols., 2005).

Em doenças infecciosas, por conseqüência da exposição diferencial ao agente etiológico, a identificação de predisposição hereditária à infecção não

deverá ser considerada condição suficiente para o desencadeamento do desfecho, contudo, esta poderá ser necessária para supor a participação de um componente genético importante em sua manifestação (Beiguelman, 1994).

Dentro deste contexto, diferentes análises para a verificação de associação familiar entre genes marcadores e doenças infecciosas têm sido realizadas. Indubitavelmente, uma das abordagens mais antigas aplicadas em estudos de famílias são as pesquisas elaboradas através da utilização de pares de gêmeos. Por exemplo, a constatação da existência de uma maior concordância entre uma dada doença infecciosa em gêmeos monozigóticos comparada aos dizigóticos sugere fortemente a ocorrência de um componente genético associado (Beiguelman, 1994). No entanto, hoje em dia testes de associação genética têm sido aplicados para estudos de informação genotípica parenteral como, por exemplo, o conhecido *Teste de Desequilíbrio de Transmissão* (TDT) (Schaid 1998; Mira e cols., 2003). Esta abordagem classicamente engloba trios constituídos pelos dois pais e um filho afetado, onde, pelo menos um dos genitores deverá apresentar o genótipo heterozigoto. O teste TDT considera os pais que apresentam um alelo associado a um determinado desfecho e avalia a frequência com que o mesmo é transmitido ao filho afetado. Portanto, os resultados significativos podem indicar a existência de associação entre o marcador e a doença investigada. Como vantagem, este teste permite a pesquisa através da utilização de famílias simples. Por outro lado, devido à exigência do uso de pais heterozigotos na análise TDT, após a caracterização dos referentes genótipos, as famílias que por ventura não venham a contemplar esta regra, necessariamente, serão descartadas do estudo. Por conseqüência, este fato implicará na diminuição do poder da análise estatística (Shaid, 1998; Alcais e Abel, 2003; Barnetche et. al. 2005).

Em estudos de associação tem sido constatada que a presença de um único gene ou alelo positivamente associado ao desfecho aponta para a predisposição a doença, contudo, é comum que este mesmo gene apresente uma característica de penetrância incompleta pelo fato de não apresentar necessariamente um papel de determinação da mesma (Petzl-Erler;

comunicação oral, 2006). Com isso, torna-se de fundamental importância a utilização de um número maior de marcadores combinados em uma mesma região cromossômica, a fim de proporcionar dados mais informativos nas respectivas análises estatísticas (Hinds e cols., 2005). Não obstante a avaliação de suscetibilidade ou resistência de determinados genes às doenças infecciosas, esforços consideráveis têm sido realizados no intuito de se caracterizar não somente os *loci* de interesse.

Simultaneamente as celebrações dos 50 anos da descoberta da dupla hélice do DNA por Watson e Crick, outra página importante da história da ciência pôde ser virada com o então anúncio da conclusão do seqüenciamento do genoma humano (Venter e cols., 2001). No decorrer de mais de dez anos de pesquisa foram mapeados e seqüenciados cerca de 3 bilhões de pares de base que compõem todo o genoma da espécie humana³. Com isso, abriu-se uma nova era na medicina apontando perspectivas para o desenvolvimento no tratamento de doenças, assim como a possibilidade de desenvolvimento futuro de métodos para o diagnóstico precoce. Dentre outras conclusões, através da comparação do genoma humano entre indivíduos não aparentados foi possível se constatar uma identidade média de 99,9%. Ou seja, diante de todo o genoma, a sutil diferença de 0,1% é o que de fato representa a ampla diversidade humana, e grande maioria dessa diversidade provém dos então conhecidos *Polimorfismos de Base Única* (“Single Nucleotide Polymorphisms” - *SNPs*). Esta variação de 0,1% deve-se à uma coleção de 15×10^6 de *SNPs* (Sachidanandam e colss., 2001).

Os *SNPs* constituem verdadeiramente um elemento-chave para a compreensão da variabilidade genética humana (atual e evolutiva) e sua associação com distintas doenças. Diversos estudos de associação com a abordagem caso-controle têm sido desenvolvidos no intuito de se investigar o potencial destes polimorfismos como marcadores genéticos de suscetibilidade ou proteção em distintas patologias, inclusive nas infecciosas. Entretanto, no

³ O impacto desta descoberta pode ser comparado ao da descoberta da roda ou da chegada do homem à Lua, segundo o geneticista Andrew Simpson.

âmbito das associações entre SNPs isolados e doenças, sabe-se que o conhecimento gerado é limitado devido especialmente aos desenhos de estudos não muito bem elaborados gerando, eventualmente, interpretações espúrias (Moraes col., 2006).

No entanto, esta limitação poder vir a ser minimizada quando as análises passam a ser direcionadas para combinações específicas de alelos, denominadas de haplótipos que podem ser definidos como a combinação de alelos de *loci* distintos em um mesmo cromossomo. Ou seja, as combinações de SNPs agrupados em haplótipos são geralmente herdadas como blocos de informação. Em conseqüência, após a conclusão do Projeto Genoma Humano (PGH) um consórcio internacional de pesquisadores elaborou um mapa mais detalhado caracterizando tais blocos haplotípicos denominado de HapMap (www.hapmap.org/index.html.en). A priori, este projeto tem por objetivo proporcionar a melhor escolha de SNPs alvos que capturem a variação genética em uma dada região cromossômica, reduzindo com isso o tempo e o trabalho em regiões não-informativas (Thorisson e cols., 2005; de Bakker e cols., 2005).

Entretanto, para a devida aplicação do uso de SNPs no contexto de haplótipos é necessário que se observe o estado definido como Desequilíbrio de Ligação (“Linkage Disequilibrium” - *LD*). Posto que, qualquer desvio deste estado demonstrará a existência de associação gamética aleatória entre alelos de regiões/genes diferentes, portanto, não caracterizando segregação (Alcais e Abel, 2003; Gourraud e cols., 2005). Em se tratando de estimativas de freqüências haplotípicas em populações onde indivíduos independentes são recrutados, estas podem ser calculadas por um método comumente utilizado denominado de máxima-verossimilhança (“maximum likelihood”), que pode estar implementado, por exemplo, dentro do algoritmo conhecido como “Expectation Maximisation” (EM), que consiste na aproximação de freqüências haplotípicas estimadas (Schaid, 2002).

Contudo, voltando ao concerne da questão que trata da epidemiologia genética em doenças infecciosas, estudos de associação abordando haplótipos estendidos de SNPs em LD tem sido bastante utilizados. Geralmente, os SNPs

são usados como importantes marcadores em estudos de genes candidatos. No entanto, a escolha dos mesmos dentre uma gama de opções apresentadas pela literatura pode ser crítica.

Trabalhos mais recentes tem demonstrado o aumento abundante de SNPs (cerca de 7 milhões) com uma frequência alélica mínima (ou MAF do inglês, “Minor Allele Frequency”) de 5% no genoma da população mundial (Kruglyak e Nickerson, 2001). Uma grande quantidade de SNPs comuns podem ser encontrados na maioria das populações embora a frequência de alguns alelos possam variar consideravelmente entre elas. Tal evidência pode ser visualizada em um laborioso trabalho elaborado pelo grupo do pesquisador David Cox que caracterizou padrões de variações no genoma humano através da genotipagem de 1.586.383 SNPs em 71 americanos descendente de europeus, africanos e asiáticos (Hinds e cols., 2005). Basicamente, os autores foram capazes de construir um mapa denso de SNPs apresentando um painel de marcadores que poderiam ser informativos em estudos de associação, agrupando tais polimorfismos por valores de MAF. Através de um método de determinação de LD por r^2 (método que considera o valor= 1 como LD perfeito) modificado foi então elaborado um algoritmo denominado de “Bins”, que seriam regiões delimitadas as quais continham SNPs comuns com forte desequilíbrio de ligação. Cada “Bin”, portanto, poderia possuir um número variável de SNPs, com no mínimo um SNP que funcionaria como marcador/etiqueta (tag SNP), que seria de fato o set de polimorfismos comuns mais informativos segundo o algoritmo proposto (Carlson et cols, 2004). Curiosamente, dentre as observações realizadas nas três distintas etnias foi possível se verificar, por exemplo, um alto grau de redundância de “tag SNPs” entre os americanos asiáticos e euro- descendentes, ao passo que os afro descendentes apresentaram poucos bins com muitos SNPs. Apesar dos resultados demonstrarem certas diferenças intra-populacionais foi possível se capturar um set maximizado de informações a partir a definição dos “tag SNPs” e da construção dos bins com forte desequilíbrio de ligação (Hinds e cols., 2005). Estes dados demonstram, portanto, que mesmo com a quantidade

extremamente elevada de variantes comuns no DNA humano, “tag SNPs” efetivamente informativos poderão ser discriminados dentre a gama de polimorfismos ora já caracterizados no genoma.

Em genética de populações, as doenças infecciosas têm sido bastante investigadas, principalmente em estudos de família. Contudo, o fato de que a consangüinidade próxima estará normalmente associada com a continuidade estreita e com o período mais prolongado de coabitação entre o indivíduo exposto e o foco não poderá ser ignorado. Tal conceito, portanto, deverá ser estendido à todas as moléstias infecciosas, dentre elas, aquela que reconhecidamente apresenta o padrão mais variável e curioso de manifestação clínica, a hanseníase (Beiguelman, 1968; Moraes e cols 2006).

I.2.2- Suscetibilidade genética na Hanseníase.

A visualização extremamente diversificada de resposta imune na hanseníase aponta para a existência de uma rede complexa de fatores estimulantes e inibidores atuando simultaneamente. Evidências no campo da genética de doenças infecciosas têm demonstrado o importante papel da variabilidade genética individual influenciando a resposta ao *M.leprae* (Santos e cols., 2002; Moraes e cols., 2004; Vanderborght e cols., 2004). Ademais, indícios adicionais como o adoecimento de apenas cerca de 1% dos indivíduos expostos ao bacilo reforçam a hipótese da influência de componentes genéticos no desenvolvimento da doença (Moraes e cols., 2006).

Efetivamente, fora através dos estudos de famílias ou estudos de pedigree que a hipótese de participação de um componente genético no desenvolvimento da hanseníase passou a ser postulada (Beiguelman, 1994).

Na década de setenta, ensaios abordando a análise de gêmeos em famílias Indianas portadoras de hanseníase constataram a existência de uma maior concordância da doença em gêmeos monozigóticos comparados aos dizigóticos. Estes dados sugeriram, portanto, a associação da predisposição à hanseníase a um fator genético (Chakravarti e Vogel 1973). Entretanto, a

genética moderna vem proporcionando um aumento significativo de informações no que diz respeito à influência de fatores genéticos na hanseníase (Moraes e cols., 2006). A figura 2 mostra a identificação de distintas regiões cromossômicas associadas a hanseníase em diferentes populações. Inicialmente, o grupo do pesquisador Adrian Hill em 2001, realizou um estudo através de rastreamento genômico (“genomic scan”) em 224 famílias do Sul da Índia que possuíam filhos afetados pela hanseníase. Neste trabalho foi detectada a importância da região 10p13 associada a suscetibilidade a hanseníase *per se*, esta região engloba, entre outros, o gene que codifica para o receptor de manose de macrófagos (Siddiqui e cols., 2001). Ainda na Índia, o mesmo grupo descreveu uma importante associação da doença com a região 20p12 (Tosh e cols., 2002). Posteriormente, outros estudos reportaram tanto através de abordagens de rastreamento genômico como clonagem posicional a relevância de outras regiões associadas à suscetibilidade a hanseníase em diferentes populações. Este foi o caso da identificação de associação da região 6q25 com hanseníase *per se* na população Vietnamita e da confirmação nesta da região 10p13, contudo, em pacientes paucibacilares (Mira e cols., 2003). Em seguida, dada a caracterização da importância da região 6q25 no aumento da suscetibilidade à doença, fora então realizado através da técnica de clonagem posicional a identificação dos genes *PARK2* (previamente descrito como gene associado a Parkinson juvenil) e *PACRG* (gene co-regulador da parkina) associados a hanseníase em Vietnamitas, com resultados replicados na população Brasileira (Mira e cols., 2004). Dados mais recentes demonstram também a associação da região 17q11, a qual contem outros genes importantes na resposta imune, implicada na suscetibilidade a hanseníase na população brasileira (Miller e cols., 2004) (Fig. 2).

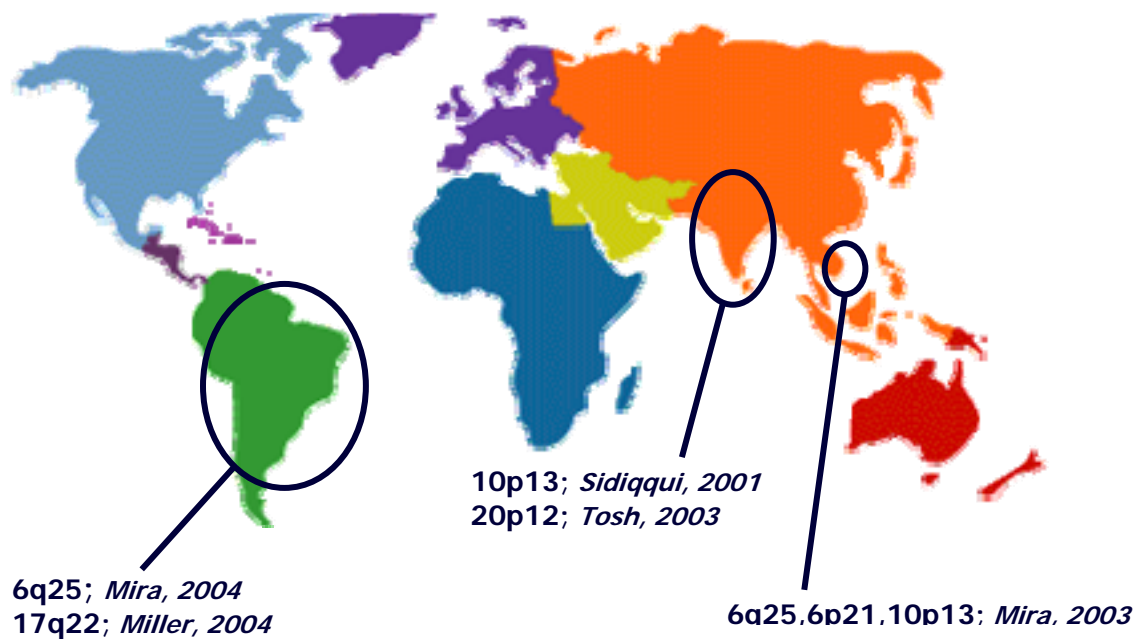


Figura 2. Estudos de rastreamento genômico e genes candidatos na Hanseníase em diferentes populações.

Reconhecidamente, os padrões de intensidade de resposta imune são influenciados pelos genes, onde no caso da hanseníase, genes importantes como os das interleucinas, do $TNF\alpha$, assim como o antígeno leucocitário humano (HLA) localizado no braço curto o cromossomo 6, encontram-se presentes (Moraes e cols., 2006).

Região HLA e a Hanseníase

Diversos estudos têm demonstrado a importância dos genes do Sistema HLA em transplantes, na regulação da resposta imune, e como marcadores de doenças, entre as quais a hanseníase.

Os genes HLA localizam-se no braço curto do cromossomo 6, abrangendo uma região de aproximadamente 4 milhões de pares de base estendidas a partir da região 6p21.31. Encontram-se agrupados em três regiões: a região HLA classe I, classe II e classe III, conforme exemplificado na figura 3.

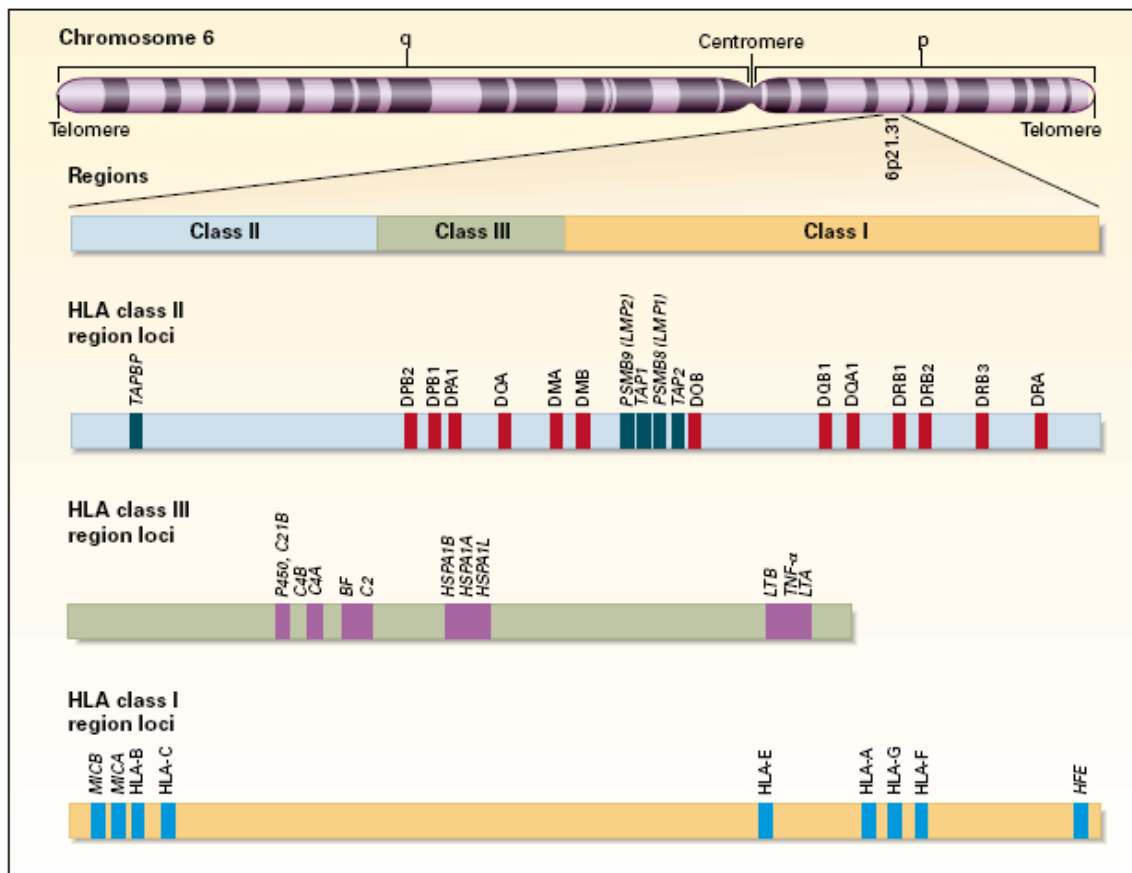


Figura 3. Localização dos genes nas regiões HLA-classe I, II e III. (Adaptado de Klein e Sato, 2000).

As moléculas de HLA-classe I possuem uma cadeia pesada α , polimórfica, que é codificada por genes localizados nos loci HLA-A, B e C e uma cadeia leve, a cadeia β_2 -microglobulina, não polimórfica, que é codificada no cromossomo 15 (Trowsdale e cols, 1991). As moléculas de classe I tem como principal função apresentar peptídeos de origem endógena a células T CD8+.

Os genes HLA classe II, localizados nos *loci* HLA-DQ, DP e DR, codificam para as moléculas presentes apenas nas superfícies de alguns tipos celulares como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas. Uma de suas principais funções é a de apresentação de peptídeos exógenos as células T CD4+ (Klein e Sato, 2000). O polimorfismo encontrado nestas moléculas situam-se nos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ para os genes DQB1 e DPB1, ao passo que, nas moléculas codificadas pelo gene DRB1, é encontrado apenas no domínio $\beta 1$ (Klein e Sato, 2000).

Uma série de outros genes de função complementar ou correlata também pode ser encontrada nesta região, dentre eles, genes que codificam para proteínas proteossomais que promovem a degradação de proteínas endógenas ou virais (LMP 2,7), assim como TAP 1 e 2, transportadores de peptídeos degradados no citoplasma.

Os genes de classe III, embora estejam incluídos dentro do complexo, não codificam moléculas de histocompatibilidade. Por outro lado, a região agrega genes que codificam alguns componentes do sistema complemento (*C4A*, *C4B* e *fator B*), para as proteínas de choque térmico *Hsp 70*, e para as enzimas *CYP 21A-B*, assim como os genes de *TNF α* e *LTA*.

Ainda no contexto de estudos de famílias na hanseníase, a importância da região HLA tem sido demonstrada em análises de segregação de genes em filhos afetados. Um estudo abordando seis regiões cromossômicas, dentre elas a região *HLA/TNF*, foi realizado em um grupo de 20 famílias contendo pelo menos dois filhos afetados. A conclusão mais significativa observada neste trabalho fora a associação da região *HLA/TNF* com as formas espectrais da hanseníase, ou seja, filhos afetados que desenvolviam as mesmas características clínicas da doença apresentavam o mesmo padrão de

segregação da região *HLA/TNF* (Mira e cols., 2002). Todavia, trabalhos mais antigos já indicavam a presença de associação entre genes pertencentes ao complexo HLA (incluindo SNPs no locus $TNF\alpha$) e a hanseníase (Moraes e cols. 2006).

Portanto, não obstante a influência de diferentes genes no desencadeamento da doença foi devido a comprovação do papel do gene TNF na mediação da resposta imune frente ao *M. leprae* que tornou a região *HLA/TNF* o foco principal do presente trabalho.

Adicionalmente, informações mais detalhadas acerca de SNPs presentes na região *HLA/TNF*, assim como outros genes situados em distintas regiões cromossômicas e a hanseníase poderão ser encontradas na revisão apresentada no anexo I.

I.2.2.1- Anexo I: Genetics of host response in leprosy. *Milton O. Moraes, Cynthia C. Cardoso, Patrícia R. Vanderborght, Antônio G. Pacheco.* *Leprosy Review.* 2006; 77: 189-202.

O presente manuscrito apresenta uma revisão de dados mais recentes descritos na literatura no que tange a questão da influência de fatores genéticos no desenvolvimento da hanseníase.

Diversas abordagens como estudos de genes candidatos em caso-controle, “scans” genômicos e análises de famílias têm sido utilizadas para a identificação de regiões cromossômicas distintas associadas tanto à hanseníase *per se* quanto as suas variadas formas clínicas. Em geral, a grande maioria dos trabalhos sugere a associação de diferentes genes implicados na resistência ou suscetibilidade à doença. Este é o caso, por exemplo, da região HLA/TNF, da interleucina 10 (IL-10), receptor da vitamina D (VDR) e da parkina. Interessantemente, embora alguns destes resultados obtidos sejam controversos quando analisados em populações distintas, a observação de um padrão recorrente de determinados alelos associados à doença tem sido caracterizados, sugerindo fortemente uma influência genética na hanseníase. Assim sendo, marcadores genéticos poderão ser selecionados em populações de alto risco para o desenvolvimento da doença, funcionando como indicadores de suscetibilidade ou gravidade na hanseníase.

OBJETIVOS

GERAL:

Estudar a influência dos genes HLA-DRB1, TNF e LTA situados no cromossomo 6p21 na hanseníase.

ESPECÍFICOS:

Determinar a distribuição de alelos HLA-DRB1 em amostragem de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis residentes no Rio de Janeiro.

Investigar por estudos de *caso-controle* e *replicação* em amostragem populacional distinta a possível associação de alelos HLA-DRB1* na suscetibilidade e gravidade na hanseníase.

Caracterizar a distribuição de SNPs nas posições +252 do gene de LTA, -863, -308 e -238 do gene de TNF α em pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis residentes no Rio de Janeiro.

Caracterizar a distribuição haplotípica formada a partir dos SNPs +252/-863/-308/-238 na amostragem de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis.

Avaliar a existência de associação de haplótipos de SNPs com suscetibilidade a hanseníase.

Identificar possíveis SNPs que possam ser caracterizados como etiquetas (*tag*) para posteriores estudos de associação com hanseníase.

MATERIAIS E MÉTODOS*

Este trabalho fez parte de um projeto mais abrangente financiado pela Organização Mundial de Saúde-OMS/TDR/Pathogenesis, aprovado e de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ nº.151-01. Assim sendo, todos os pacientes foram convidados a participar como voluntários no estudo tendo ciência dos procedimentos que foram realizados, assinando o referido termo de “*Consentimento Livre e Esclarecido para Participação de Projeto*”.

Análises Moleculares:

- Tipificação de média/alta resolução do locus *HLA-DR*:

A identificação de subtipos do alelo HLA-DRB1*15 foi realizada através das técnicas de hibridação reversa PCR-SSO (One Lambda, Inc) e InnoLiPA (Innogenetics, NV).

- Tipificação de SNPs na região *TNF*:

Tanto pacientes (n=570) quanto controles (n=600) foram tipificados para os SNPs nas posições +252 do gene de LTA, -308 e -238 do gene de TNF através da técnica de *PCR-RFLP* (“polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism”) (Gallagher,1997 e Wilson,1992). Para a caracterização genotípica do SNP na posição -863 de TNF α foi utilizada a técnica de *PCR-ARMS* (“amplification refractory mutation system”) (Newton, 1989).

Análises Estatísticas:

As análises das frequências dos subtipos de HLA-DRB1*15 foram realizadas por contagem direta de alelos e para avaliação de associação foi utilizado o teste de Qui-quadrado com correção de Yates no programa Epi Info. Todos os SNPs na região TNF foram avaliados para visualização de equilíbrio segundo o princípio de Hardy-Weinberg (HWE). As comparações entre as distribuições genotípicas e alélicas foram realizadas, respectivamente, através dos modelos *GLM* (“generalized linear model”) e *LRM* (“logistic regression model”) no pacote de programas “R” para Windows 2.1.1. A estimativa dos haplótipos foi realizada por máxima verossimilhança utilizando o programa EH (Terwiliger e Ott, 1994).

* Os procedimentos não descritos neste tópico constam do artigo encontrado no anexo II (Vanderborght et. al, 2007)

RESULTADOS

I

IV.1-Estudo da região HLA classe II na hanseníase:

ANEXO II. Artigo: *HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. Vanderborght e cols, 2007. Genes and Immunity. No prelo.*

A relevância da região 6p21 tem sido reportada, apontando principalmente a associação HLA classe II (especificamente HLA-DR), à hanseníase. Todavia, apesar de bem elaborados esses estudos tendem a não alcançar uma robustez satisfatória, dado, pois, o baixo poder amostral para a realização das análises estatísticas. Hoje em dia, estudos de genética epidemiológica baseados em populações vêm requerendo a confecção de desenhos experimentais que apresentem um número amostral elevado, conseqüentemente, incrementando o poder das análises. Além disso, estudos de replicação através da utilização de amostras independentes também vêm sendo recomendados para a confirmação de resultados obtidos.

Com base nestas premissas, a fim de melhor se compreender o papel do gene HLA-DRB1 na suscetibilidade e gravidade na hanseníase, o trabalho a seguir aborda a influência de seus alelos através de duas diferentes abordagens.

A primeira abordagem foi realizada na população *brasileira* e direcionada para o estudo de *caso-controle*. Foram analisados 1269 indivíduos (578 pacientes e 691 controles), sendo todos pertencentes à mesma área geográfica do Rio de Janeiro. Os pacientes estudados apresentavam todas as formas clínicas do espectro da hanseníase, variando do pólo lepromatoso ao pólo tuberculóide. Tanto pacientes quanto controles foram igualmente estratificados

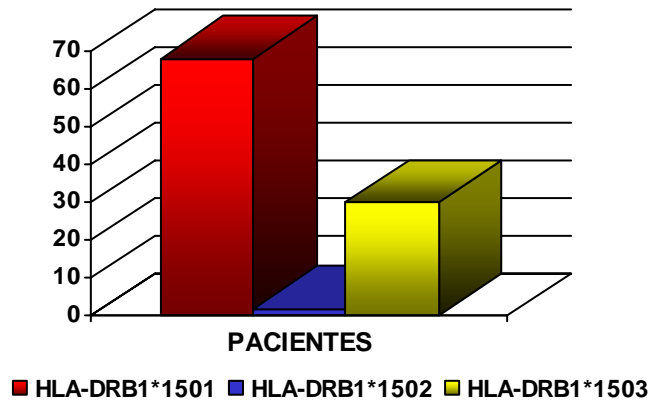
em grupos caracterizados como *Afro-Brasileiros* e *Euro-Brasileiros*. As análises estatísticas utilizadas para a visualização de associação entre os treze alelos HLA-DRB1 existentes e a doença foram realizadas por modelo *Log-linear*, ao passo que, para as análises de genótipos foi realizado o *modelo de regressão logística*. Tanto etnia quanto gênero foram utilizados como co-variáveis, sendo os resultados obtidos através de cálculos realizados pelo pacote de programas “R” para Windows versão 2.1.1.

1.2- Análise de definição de subtipos de HLA-DRB1*15 em pacientes com hanseníase na população brasileira:

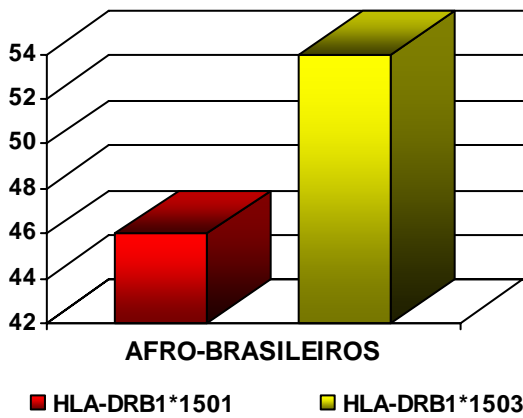
Apesar dos resultados apresentados pelo manuscrito anterior (anexo II) sugerirem associação dos alelos DRB1*04 e DRB1*10 à hanseníase, o aumento da frequência do alelo DRB1*15 em pacientes na população brasileira pode ser destacada. Assim sendo, a análise do alelo DRB1*15 foi estendida para a caracterização de seus respectivos subtipos na amostragem de pacientes (n=47) da população brasileira. A figura 4a mostra a existência de três subtipos distintos, sendo; HLA-DRB1*1501, HLA-DRB1*1502 e HLA-DRB1*1503 com suas respectivas frequências alélicas. A figura 4b e 4c mostra o perfil de distribuição dos subtipos encontrados no grupo de pacientes estratificados por etnia. Pode ser observado dentre o grupo caracterizado como Afro-Brasileiros a frequência aumentada do alelo HLA-DRB1*1503, seguido de DRB1*1501, (Figura 4b). Dentre o grupo caracterizado como Euro-Brasileiros pode se verificar a frequência aumentada HLA-DRB1*1501 e a frequência diminuída de HLA-DRB1*1503 e HLA-DRB1*1502, respectivamente (Figura 4c).

Todavia, as frequências dos respectivos subtipos ora descritos nesta análise apresentaram os mesmos perfis de distribuições observados em dados da literatura para indivíduos saudáveis na população brasileira (Stastny e cols., 1991; Moraes e cols., 1993). Portanto, estes resultados sugerem que a associação atribuída ao alelo HLA-DRB1*15 para suscetibilidade a hanseníase, na população brasileira, não provém de subtipos particulares.

a)



b)



c)

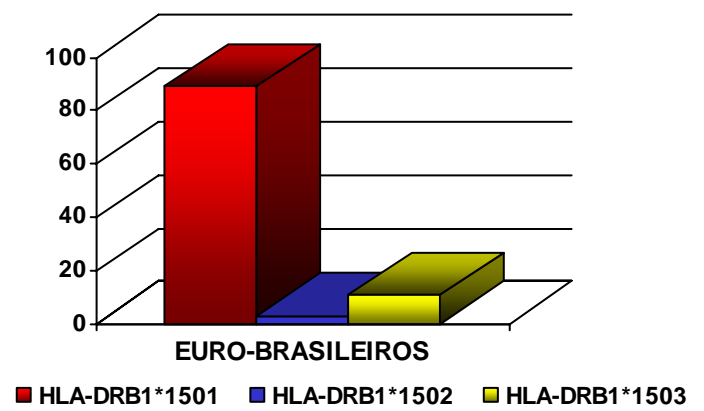


Figura 4: Distribuição de freqüências de subtipos de HLA-DRB1*15 em pacientes com hanseníase, sem e com estratificação por etnia; a) Distribuição de freqüências em pacientes com hanseníase não estratificados etnicamente; b) Distribuição de freqüências em pacientes Afro-Brasileiros com hanseníase; c) Distribuição de freqüências em pacientes Euro-Brasileiros com hanseníase.

RESULTADOS

II

2.1-Estudo da região HLA classe III na hanseníase:

A região do cromossomo 6p21 apresenta além do complexo HLA uma série de outros genes que foram estudados em hanseníase destacando-se o locus TNF. Dados da literatura apontam para uma região “hot spot” entre os genes HLA-DRB2, próximo fisicamente de HLA-DRB1, e a região TNF, o que demonstra a possível inexistência de desequilíbrio de ligação entre eles (Trahe e cols., 2006). Sendo assim, os resultados apresentados agora abordam SNPs nos genes TNF e LTA na hanseníase e foram elaborados de forma a se caracterizar padrões haplotípicos na região TNF, independentemente da observação de LD com os alelos HLA-DRB1 ora descritos na primeira análise.

Em relação a TNF, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o alelo -308A encontrava-se associado à resistência à hanseníase (Santos e cols., 2002) e que pacientes paucibacilares carreadores da variante -308A apresentavam reatividade aumentada no teste cutâneo à lepromina (Moraes e cols., 2001). Ainda, pacientes multibacilares carreadores do alelo -308A apresentavam em sua maioria uma carga bacteriana diminuída (Vanderborght e cols 2004). Mesmo assim estudos em outras populações não confirmaram o achado epidemiológico (Roy e cols., 1997; Mira e cols., 2003; Fitness e cols., 2004). Portanto, o envolvimento do alelo -308A ainda é controverso e para esclarecer esse ponto o presente trabalho estudou o *loci* TNF estendendo o número de SNPs na região e definindo os haplótipos formados. Foram realizadas análises do tipo caso-controle para cada SNP isoladamente de LTA (+252G/A) e TNF (-863C/A, -308G/A, -238G/A) e posteriormente uma análise de varredura com a estruturação de haplótipos 2 a 2 pela combinação dos SNPs isolados. Finalmente, os 4 SNPs foram combinados e analisados em blocos haplotípicos simultaneamente.

Distribuição de freqüências genotípicas e alélicas de SNPs nos genes de LTA e TNF.

A tabela 1 mostra a freqüência de cada SNP nos genes de LTA e TNF em pacientes com hanseníase e controles sadios na população brasileira. Pode-se observar uma distribuição equilibrada tanto das freqüências genotípicas quanto alélicas de LTA +252 e TNF α -238 entre pacientes e controles. Por outro lado, pode ser visualizado um aumento de freqüência do alelo TNF α -863A no grupo controle em comparação aos pacientes, contudo, não significativo, ao passo que o alelo TNF α -308A mostrou-se ligeiramente significativo também com aumento de freqüência no grupo controle. Neste contexto, vale ressaltar que os SNPs nas posições TNF α -863 e -308 desviaram-se do equilíbrio segundo o princípio de Hardy-Weinberg.

Tabela 1. Distribuição de freqüências genotípicas e alélicas de SNPs nos genes de LTA e TNF α em pacientes com hanseníase e indivíduos sadios na população brasileira.

<i>SNPs</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Controles</i>	<i>p-valor</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>
LTA +252					
AA	0.44	0.42			
AG	0.44	0.46			
GG	0.11	0.11			
G	0.33	0.34			
TNF -863*					
CC	0.78	0.70			
CA	0.18	0.28			
AA	0.04	0.03			
A	0.13	0.17			
TNF -308*					
GG	0.79	0.74	--	<i>baseline</i>	--
GA	0.20	0.21	0.38	0.86	0.61-1.21
AA	0.02	0.05	0.009	0.35	0.16-0.77
A	0.11	0.16	0.04	0.69	0.47-0.99
TNF -238					
GG	0.9	0.89			
GA	0.09	0.11			
AA	0.02	--			
A	0.06	0.06			

*SNPs desviados do equilíbrio segundo o princípio de HWE na amostra de controles. Valores corrigidos para as co-variáveis gênero e etnia. *Baseline*: genótipo utilizado como base de comparação no modelo de regressão logística.

Análises de haplótipos de SNPs nos genes de LTA e TNF em pacientes e controles.

Uma abordagem realizada no grupo de indivíduos (casos vs. controles) nos quais os 4 SNPs foram avaliados conforme as combinações agrupadas 2 a 2 foi elaborada para a identificação de blocos haplotípicos significativos (Tabela 2). Esta avaliação tem o objetivo de definir o número mínimo de SNPs que poderiam representar genético-epidemiologicamente o locus TNF. Essa varredura poderia então em estudos subseqüentes de replicação dos dados em outras populações indicar claramente os SNPs que devem ser estudados naquela região. Essa estratégia foi utilizada anteriormente (Moraes e cols, 2004) e visa poupar recursos e tempo mantendo a robustez das análises em estudos de associação baseados em populações. A princípio, os resultados de varredura mostram valores estatisticamente significativos para os haplótipos formados pelas combinações <LTA+252.TNF-308>; <TNF-863.TNF-308> e <TNF-308.TNF-238>. Curiosamente, estes resultados demonstram a presença recorrente do SNP na posição -308 nas três combinações descritas.

Tabela 2. Análise de varredura 2 a 2 de SNPs em pacientes e controles agrupados na população brasileira.

<i>Haplótipos SNPs</i>				<i>p.valor*</i>
<i>(2 x 2 scan)</i>				
LTA	+252	TNF	-863	0.678
LTA	+252	TNF	-308	0.001
LTA	+252	TNF	-238	0.686
TNF	-863	TNF	-308	0.001
TNF	-863	TNF	-238	0.245
TNF	-308	TNF	-238	0.001

*valores corrigidos para as co-variáveis sexo e etnia.

A partir dos resultados obtidos na análise de varredura 2 a 2 na qual foram identificadas três combinações significativas, foi então realizada a análise para identificação dos haplótipos específicos para a determinação de associação com a doença. A tabela 3 mostra valores estatisticamente significativos para os haplótipos <LTA+252**G**.TNF-308**A**>; <TNF-863**C**.TNF-308**A**> e <TNF-308**A**.TNF-238**G**>, com todos os valores de ORs indicativos de proteção. Estes resultados demonstram nos três haplótipos significativos a presença recorrente do alelo “A” na posição -308 do gene de TNF.

Tabela 3. Análise da distribuição haplotípica nas regiões LTA+252.TNF-308; TNF-863.TNF-308 e TNF-308.TNF-238 em pacientes e controles agrupados na população brasileira

<i>Haplótipos SNPs</i>	<i>freq.</i>	<i>p.valor</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>
LTA +252 TNF -308				
A A	0.04	0.2	0.6	0.28--1.3
G A	0.09	<i>0.04</i>	0.6	0.36--0.99
G G	0.28	0.38	1.18	0.81--1.71
A G	0.57	--	<i>baseline</i>	--
TNF -863 TNF -308				
A G	0.11	0.45	1.18	0.75--1.88
C A	0.13	<i>0.002</i>	0.5	0.32--0.78
A A	--	--	--	--
C G	0.74	--	<i>baseline</i>	--
TNF -308 TNF -238				
A G	0.12	<i>0.005</i>	0.56	0.37--0.84
G A	0.06	0.54	0.84	0.48--1.46
A A	--	--	--	--
G G	0.8	--	<i>baseline</i>	--

Baseline: alelos utilizados como base de comparação no modelo de regressão logística.

Os dados sugeriam muito fortemente o papel predominante de TNF -308A na proteção à hanseníase. Portanto, para a confirmação dos dados anteriores a distribuição dos seis haplótipos gerados a partir das combinações dos 4 SNPs no *loci* TNF foi realizado. Para isso, utilizou-se mais uma vez a amostragem de pacientes com hanseníase e controles sadios da população brasileira (Tabela 4). Seguindo a ordem dos SNPs +252/-863/-308/-238 pode ser observada o haplótipo majoritário ACGG na população geral (0,48 pacientes vs 0,4 controles), ao passo que, com freqüência extremamente baixa tanto em pacientes quanto em controles encontra-se o haplótipo ACAG (0.04 em ambos os grupos). No entanto, para as análises de associação pode ser verificado para o haplótipo (GCAG) um aumento estatisticamente significativo de sua freqüência em controles (0,11) quando comparados aos pacientes (0,8), com valor de OR indicativo de proteção. Com base nos resultados apresentados torna-se notória a presença recorrente e significativa do alelo TNF α -308A associado à proteção no desenvolvimento da hanseníase. Portanto, estes dados sugerem que para posteriores estudos de associação na população brasileira a posição -308 do gene de TNF poderá ser utilizada como Tag-SNP na hanseníase pelo menos em brasileiros.

Tabela 4. Distribuição haplotípica de SNPs localizados no genes de LTA e TNF α na amostragem de paciente e controles da população brasileira.

Haplótipos SNPs TNF loci				Pacientes	Controles	p.value	OR	95% CI
+252/-863/-308/-238								
A	C	G	G	0.48	0.4	--	<i>baseline</i>	--
G	C	G	G	0.22	0.22	--	--	--
A	A	G	G	0.11	0.15	--	--	--
G	C	A	G	0.08	0.11	0.042	0.54	0.3-0.97
A	C	G	A	0.04	0.04	--	--	--
A	C	A	G	0.01	0.03	--	--	--

Baseline: haplótipos utilizados como base de comparação no modelo de regressão logística.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por finalidade aprofundar o conhecimento no que concerne a questão da suscetibilidade genética no desencadeamento da hanseníase, com o objetivo de caracterizar melhor genes/regiões associadas à doença cuja associação fora descrita em trabalhos anteriores.

Devido a variabilidade extremamente baixa descrita no genoma do *M. leprae* resta a possibilidade da variabilidade genética humana ser a responsável tanto pelo desenvolvimento da doença *per se* quanto pelo nível de gravidade apresentado por cada paciente. A estimativa de que somente cerca de 1-3% dos indivíduos expostos desenvolvam a doença corrobora a hipótese da influência genética na hanseníase.

Portanto pode-se concluir que os riscos de desenvolvimento da doença dependem da capacidade protetora da resposta imune celular em resposta ao bacilo, sendo os níveis desta resposta influenciados pelos genes (Moraes e cols., 2006). Na resposta imune, a resistência a patógenos intracelulares como as micobactérias está associada a capacidade da produção de células Th1, com a importante participação de $IFN\gamma$, que apresenta a habilidade de estimular a expressão das proteínas do complexo HLA, mais especificamente as moléculas de HLA-classe II. Nestas circunstâncias, a importância da região classe II com ênfase no locus DR tem sido destacada na hanseníase (Ottenhoff e cols., 1986; Moraes e cols., 2006).

Do ponto de vista imunológico, tem sido reportado que moléculas de HLA-classe II podem ser expressas na superfície de células de Schwann em lesões de pele de pacientes que apresentam certas neuropatias (Cadoni e cols., 1986; Mancardi e cols. 1988; Spierings e cols., 2001). Na hanseníase, o dano nervoso periférico é considerado uma das maiores complicações da doença, principalmente durante os estados inflamatórios. Em 2001 Spierings e cols., considerando o marcante tropismo apresentado pelo *M. leprae* por células de Schwann observaram um mecanismo imunopatogênico de dano no nervo em pacientes com hanseníase envolvendo moléculas de HLA-classe II. Através de

cultura de células de Schwann humanas infectadas por *M. leprae* foi possível observar que estas são capazes de processar e apresentar antígenos do patógeno no contexto de moléculas HLA-DR para linfócitos T CD4⁺, que subsequentemente passam a ter a capacidade de induzir a morte das células infectadas. Estes dados demonstram que este mecanismo pode não apenas desencadear a lise em células de Schwann do hospedeiro acarretando dano nervoso, como também reduzir a variabilidade bacteriana intracelular (Spierings e cols., 2001). Baseado nesta hipótese, pode-se sugerir que da mesma forma que fora verificado nos resultados apresentados no anexo II com a observação dos alelos de HLA-DRB1 associados a proteção e a suscetibilidade à hanseníase, estes poderiam estar também associados ao dano neural.

Associação de alelos HLA-DRB1 na Hanseníase em amostragens das populações brasileira e vietnamita.

Os resultados apresentados na primeira análise deste trabalho (anexo II) confirmam uma forte associação do alelo HLA-DRB1*15 com hanseníase *per se* na população brasileira. As análises proporcionadas pela abordagem de caso-controle nesta população sugeriram fortemente uma associação étnico-específica à doença. Apesar da noção que a “etnia” na população brasileira é uma variável de caracterização extremamente complexa (Parra e cols., 2003), a estratificação dos indivíduos em grupos denominados de Euro e Afro-brasileiros foi realizada. Efetivamente, a presença o alelo HLA-DRB1*15 dentre o grupo de brasileiros mostrou-se de fato importante, com um efeito mais restrito aos pacientes definidos como Afro-descendentes. Esta inferência pode ser evidenciada através dos resultados extremamente significativos onde os valores de ORs indicam o aumento da força de associação, passando de 1,41 no grupo não estratificado para 2,72 no grupo Afro-Brasileiro. De fato, sabe-se que certos alelos encontram-se mais representados em determinadas etnias. Tal representatividade encontra-se destacada com respeito a distribuição dos distintos subtipos de HLA-DRB1, como, por exemplo, os subtipos de DRB1*15

na população brasileira (Moraes e cols 1993). Assim sendo, devido a força de associação apresentada pelo respectivo alelo foram realizadas as subseqüentes análises de alta resolução para definição de seus subtipos.

Os resultados encontrados na amostragem de pacientes caracterizaram os subtipos DRB1*1501 e DRB1*1502 que diferem entre si pela presença do aminoácido valina (V) e glicina (G), respectivamente, no códon 86, bem como o subtipo DRB1*1503 que se distingue de DRB1*1501 pela presença de histidina (H) no códon 30. A comparação das regiões hipervariáveis entre as seqüências dos respectivos alelos pode ser visualizada na figura 5. Contudo, os resultados apresentados mostraram que as distribuições das freqüências de cada subtipo no grupo de pacientes estudados correspondem ao mesmo perfil encontrado na população brasileira em geral baseado, em dados da literatura. A freqüência do alelo DRB1*1501 é reconhecidamente mais freqüente entre indivíduos Euro-descendentes, ao passo que, a freqüência do alelo DRB1*1503 é encontrada com maior freqüência em Afro-descendentes (Stastny e cols., 1992; Moraes e cols., 1993). Portanto, estes dados sugerem que o alelo DRB1*15 (genérico) encontra-se associado com a suscetibilidade à hanseníase *per se*, na população brasileira, independentemente de subtipos específicos.

	10	30	50	70	86
DRB1*010101	RFLWQ LKFEC	LLERC I	EYRAV	DLLEQRRRA	G
DRB1*150101	----- P-R--	// F-D-Y F //	-F---	// -I---A--	// V
DRB1*150201	----- P-R--	F-D-Y F	-F---	-I---A--	-
DRB1*1503	----- P-R--	F-D-H F	-F---	-I---A--	V
DRB1*160101	----- P-R--	F-D-Y F	-----	-F--D---	-
DRB1*160201	----- P-R--	F-D-Y F	-----	----D---	-

Figura 5: Alinhamento de seqüências de aminoácidos das regiões hipervariáveis dos subtipos do alelo HLA-DRB1*15 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>); DRB1*010101: alelo base de comparação; DRB1*15 e DRB1*16 *split* de DR2.

A utilização de um número amostral elevado na população de estudo possibilitou a detecção dos alelos HLA-DRB1*10 e HLA-DRB1*04 associados à suscetibilidade e proteção, respectivamente, na hanseníase. Mais uma vez pôde ser observada uma associação étnico-específica na amostragem brasileira onde o alelo DRB1*10 mostrou-se extremamente associado ao aumento da suscetibilidade na hanseníase *per se*, exclusivamente no grupo estratificado como Afro-brasileiros (OR= 3.21). Curiosamente, no estudo de replicação realizado na amostragem vietnamita, via análise TDT onde a transmissão de cada alelo foi comparada à transmissão de todos os outros combinados, fora verificada uma chance aumentada em duas vezes da transmissão de DRB1*10 para filhos afetados. Houve, portanto, a possibilidade de confirmação do alelo DRB1*10 significativamente associado com suscetibilidade a doença.

A associação com resistência ao desenvolvimento de hanseníase também pôde ser visualizada e novamente com um padrão étnico-específico na amostragem brasileira. Este dado pode ser observado através da análise genotípica onde fora demonstrado um aumento na força de associação do genótipo HLA-DRB1*04 (heterozigoto) no grupo controle. Em outras palavras, este se mostrou mais associado aos indivíduos saudáveis caracterizados como Euro-brasileiros, com o aumento dos valores de ORs do grupo não estratificado para o grupo estratificado. Portanto, este resultado sugere que o alelo DRB1*04 encontra-se associado a proteção na hanseníase *per se* nesta população. Através da análise de replicação na amostragem vietnamita que se pôde confirmar a presença do alelo HLA-DRB1*04 também associado a proteção na doença. Tendo em vista que análise de TDT mostrou uma chance diminuída em duas vezes da ocorrência do respectivo alelo em filhos afetados.

Portanto, a confirmação dos resultados de associação nas duas populações sugere que a observação recorrente dos mesmos alelos implica o HLA como um dos componentes genéticos majoritários associado a doença. Contudo, estes mesmos alelos não podem ser considerados fatores suficientes nem essenciais para a manifestação da mesma.

A fim de contribuir para um melhor entendimento do desfecho, dado os resultados apresentados no anexo II, a posterior análise do perfil haplotípico caracterizando-se os *loci* A, B e, sobretudo, DQ dos indivíduos carreadores dos alelos DRB1*04 e DRB1*10 poderia ser realizada.

De fato, observa-se que alguns alelos pertencentes as regiões HLA classe I e II segregam num mesmo haplótipo com uma frequência maior que a esperada, como por exemplo o haplótipo comum HLA-A1,B8,DR3 descrito principalmente em doença auto-imunes e em distintas populações (Wilson e cols., 1993; Witt e cols., 2002). Assim, pode-se inferir que genes localizados em regiões que se intercalam entre as respectivas regiões HLA-classe I e II, ou seja, os genes pertencentes a região HLA-classe III (vide figura 3) possam estar segregando conjuntamente. Este seria o caso, por exemplo, dos genes da família TNF que incluem os genes TNF e LTA. Contudo, a determinação deste tipo de abordagem caracterizando segregação entre as regiões classe II e III é extremamente complexa.

Devido tanto a localização da região TNF no genoma quanto sua importância na resposta imune em diversas doenças, alguns trabalhos tentaram através de diferentes modelos matemáticos inferir a existência de segregação entre os produtos dos genes TNF e HLA para determinação de algum padrão haplotípico, contudo, neste tópico, os resultados apresentados foram de certa forma evasivos (Wilson e cols., 1993; Shaw e cols., 2001; Mira e cols., 2003). Recentemente, estudos realizados por pesquisadores europeus demonstraram, dentre outros dados, eventos de recombinação determinando “hot spots” entre as regiões HLA-classe I, II e III no genoma de indivíduos caucasóides provenientes da Holanda, África do Sul e Inglaterra (Trahe e cols., 2006). A visualização das respectivas regiões de “hot spot” caracterizadas pelo referido estudo pode ser encontrada na figura 6. Portanto, devido a evidência de que TNF e HLADRB1 não se encontram em LD sugere que de fato os achados de suscetibilidade/resistência dos 2 *loci* são independentes.

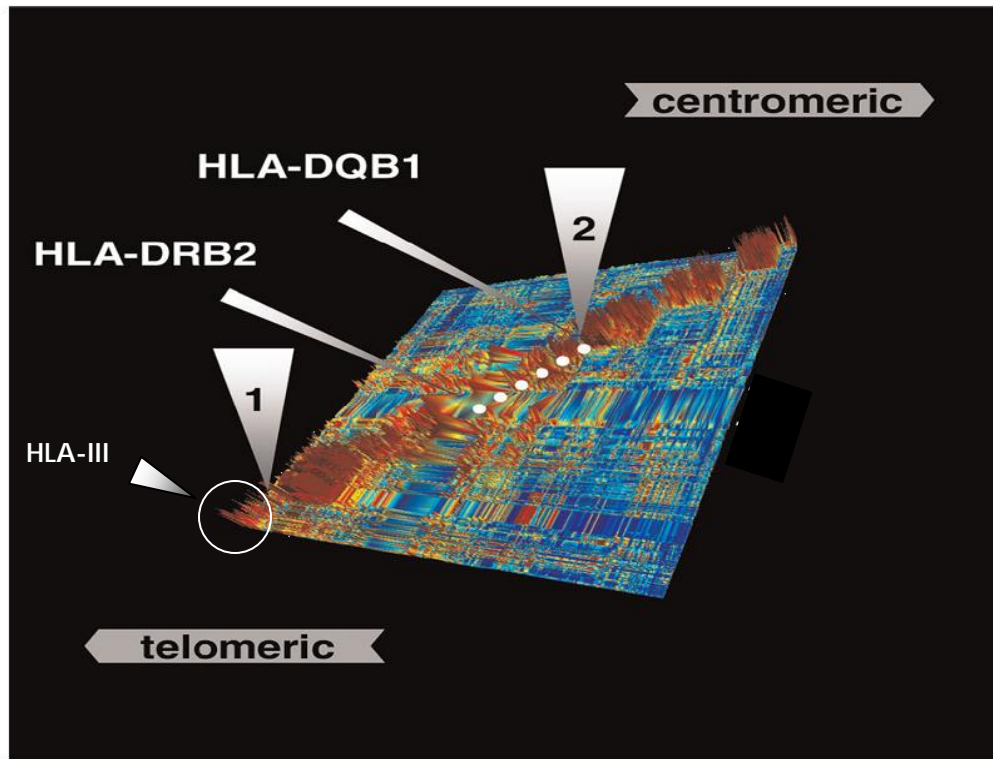


Figura 6. Estrutura de LD em torno da região HLA-DR. As indicações mostradas em “1” e “2” correspondem aos pontos de recombinação (hotspot) entre as regiões classe II-III e dentro da região classe II, respectivamente. Adaptado de Traherne e cols.,2006.

Associação da região HLA-classe III na hanseníase: haplótipos de SNPs nos genes de TNF e LTA.

Dando prosseguimento as análises de genes situados no braço curto do cromossomo 6 e a hanseníase, o presente trabalho apresentou o estudo de associação com haplótipos de SNPs na região TNF (incluindo TNF e LTA) através da abordagem de caso-controle na população brasileira. Efetivamente, o importante papel do gene TNF na resposta imunológica da hanseníase tem sido extremamente destacado, principalmente nas questões que abordam os SNPs

nas posições -308 e -238 do gene (Moraes e col., 2001; Santos e col., 2002; Chester, 2006). Por exemplo, um trabalho realizado somente com pacientes de hanseníase pertencentes ao ambulatório Souza Araújo na Fundação Oswaldo Cruz estabeleceu a associação entre os SNPs nas posições -308 e -238 de TNF com diminuição e aumento, respectivamente, da carga bacteriana em pacientes multibacilares (Vanderborght e col., 2004). Estes resultados corroboraram os achados previamente descritos por Santos e col.,(2001) no qual fora descrita a associação do SNP -308 com proteção a doença.

Assim sendo, mediante esses achados sugerindo associação genética da região TNF no desenvolvimento da hanseníase que se desencadearam novas perguntas, dentre elas: *“Se a posição -308A tem se comportado como um marcador de resistência a hanseníase, será que a identificação de combinações de diferentes SNPs localizados em regiões próximas a -308 poderia fornecer informações mais consistentes para a determinação de associação genética a doença?”*

Com base nestes resultados e perante a necessidade da utilização de um número maior de marcadores presentes em regiões importantes do genoma foram genotipadas as posições -863 (C:T), -308 (G:A), -238 (G:A) do gene TNF α e +252 (A:G) de LTA, em 1.170 indivíduos incluindo pacientes e controles (*ver: resultados II, tabela 1*).

Através da análise por máxima verossimilhança puderam ser realizadas as estimativas haplotípicas a partir das combinações dos 4 SNPs localizados no *loci* TNF encontrados no grupo de paciente e controles. Entretanto, através da análise de varredura (scan) 2 a 2 que puderam, verdadeiramente, ser caracterizados os SNPs que poderiam ser denominados de “tags”. Mediante os resultados encontrados no presente estudo foram verificados valores extremamente significativos na comparação entre pacientes e controles nas combinações +252G/-308A, -863C/-308A; -308A/-238G, com frequências de 0.09, 0.13 e 0.12, respectivamente na população geral (pacientes + controles). Interessante, vem a ser a observação de que todos os resultados de OR para estas combinações apresentam-se com valores indicativos de proteção, onde de

fato pode ser destacada a presença recorrente do alelo “A” na posição -308. Na análise individual de SNPs o alelo -308A mostrou-se ligeiramente associado a proteção, sendo evidenciado um aumento estatisticamente significativo quando o mesmo é visualizado na formação de haplótipos. Portanto, estes dados sugerem que dentro do contexto dos haplótipos ora determinados nesta região o polimorfismo na posição -308 do gene de TNF pode ser considerado como TagSNP na população brasileira, continuando a ser útil para posteriores análises nos estudos de associação genética na hanseníase.

Recentemente, um estudo do nosso laboratório elaborado a fim de reproduzir os dados de TNF foi conduzido com uma nova população caso-controle. Neste estudo os controles foram todos escolhidos dentre um grupo de contatos domiciliares de pacientes não relacionados entre si ou aos pacientes. Estes resultados também sugerem a associação de -308A com a resistência à hanseníase (Chester, 2006).

Contudo, há de ser ainda considerado os dados gerados a partir do modelo de equilíbrio de *Hardy e Weinberg* (H-W). Este princípio baseia-se na relação matemática entre as frequências alélicas e genotípicas para cálculo dos valores esperados de cada genótipo em uma determinada população (Hartl & Clark, 1997). Portanto, vale ressaltar que nas análises que precederam o referido estudo que abrangeram os SNPs aqui descritos, as posições -308 e -863 nos indivíduos controles encontraram-se fora do equilíbrio segundo a lei de H-W. Por esse motivo, foi realizada a confirmação da genotipagem nestas amostras a fim de se detectar possíveis erros na metodologia utilizada, contudo, os novos resultados demonstraram o mesmo perfil genotípico observado anteriormente (dados não mostrados), sendo assim os resultados foram confirmados. De fato, a lei de H-W assume que as frequências gênicas não se alterarão e as proporções genotípicas atingirão um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo em uma população que obedeça a três premissas principais: ser infinitamente grande, encontrar-se em panmixia e ausência de mutação, migração ou seleção (Beiguelman, 1994). Contudo, há de se admitir que a obediência a tais premissas dentro de uma

população como a brasileira, por exemplo, é praticamente inviável, visto que a história de formação dessa população é demasiadamente complexa.

Deste modo, com base no pressuposto da ausência de artefato na técnica utilizada e tendo em vista também dados da literatura que utilizam como parâmetros de descarte de amostra genótipos que apresentam valores de χ^2 maiores que 10 para equilíbrio de H-W (Miretti e col., 2005), foi dado prosseguimento as análises estatísticas e genéticas (com a construção de haplótipos) utilizando os SNPs nas posições -308 e -863 de TNF.

Dado os SNPs no *loci* TNF, ora sendo investigados no contexto de doenças infecciosas ora em doenças autoimunes, a posição -308 do gene aquela que efetivamente apresenta-se de forma mais marcante, sendo assim mais comumente avaliada, inclusive a nível funcional.

Dentro deste parâmetro, sabe-se que a transcrição do gene de TNF pode ser induzida por diferentes estímulos como, por exemplo, o LPS (lipopolissacarídeos), PMA (ésteres de forbol), vírus, bactérias e outras citocinas como IL-12 e IFN γ , que são capazes de desencadear cascatas distintas de transdução de sinal levando a expressão do gene (Kroeger & Abraham, 1996). Considerando a localização de alguns SNPs dentro de regiões regulatórias, estudos sobre regulação da expressão gênica avaliando a influência do polimorfismo na posição -308 têm demonstrado alguns resultados interessantes, contudo, contraditórios. Ensaio funcionais mais antigos iniciados por Wilson e col. (1994) avaliaram o comportamento de -308A através da utilização de gene repórter com sistema CAT (cloranfenicol-acetil-transferase) e indução por PMA. Os resultados demonstraram que o alelo "A" encontrou-se associado com o aumento de 6 a 7 vezes na taxa de transcrição do gene de TNF quando comparado ao alelo "G". A partir desse momento diferentes ensaios foram realizados com a finalidade de se constatar a importância da posição -308 na regulação do gene de TNF. Desta maneira, foram elaborados novos experimentos com a construção de plasmídeos que poderiam possuir seqüências contendo o alelo -308A ou G. De fato, alguns resultados apresentaram associações significativas para o alelo "A" aumentando a

expressão de TNF (Kroeger e cols., 1997 e Abraham & Kroeger, 1999; Sallakci e col., 2005). No entanto, outros experimentos utilizando tipos celulares diferenciados, bem como componentes indutórios variados, tempo e concentração de estímulos, não foram capazes de observar diferença alguma (Brinkman e cols., 1996; Ugliarolo e cols., 1998; Kroeger e cols., 2000;). Por este motivo, dados acerca da influência do alelo -308A na atividade transcricional do gene de TNF ainda continuam controversos. Uma das hipóteses presumidas para explicação dessa variabilidade de resultados poderia ser a influência de outros SNPs localizados em regiões próximas como, por exemplo, os do gene de LTA.

Dados da literatura têm demonstrado que tanto o TNF quanto a LTA são proteínas similares com relação à estrutura e função sendo ambas com características de citocinas pró-inflamatórias que compartilham o mesmo receptor (Moraes e col., 2006). A importância do polimorfismo localizado no primeiro intron de LTA (+252) foi inicialmente visualizada em um estudo onde foram analisados pacientes com infarto do miocárdio. Neste trabalho foi demonstrado além da associação do SNP com doença cardíaca, sua implicação funcional via ensaios de gene repórter, mostrando que indivíduos que carregavam o alelo G apresentavam um aumento da expressão do gene LTA (Ozaki e col., 2002). Portanto, com vista nos resultados apresentados no presente estudo que constataram a associação do haplótipo **+252G/-308A** com resistência a hanseníase, pode-se postular a hipótese de que tal combinação poderia aumentar potencialmente a resposta imune individual debelando de forma mais eficiente a infecção pelo bacilo. Assim sendo, para estudos futuros poderia ser interessante a investigação no contexto de haplótipos do SNP -308 estendido para outros SNPs na direção do gene LTA.

Contudo, em termos epidemiológicos, há de se ter em mente que determinadas associações entre SNPs versus doença são visualizadas de forma positiva ou negativa dependendo a população estudada. No caso citado acima para a posição +252 de LTA, por exemplo, a associação funcional foi dada na população japonesa (Ozaki e col., 2002).

Hoje em dia, devido à quantidade extremamente elevada de publicações descrevendo o impacto de SNPs na região TNF em diferentes doenças, alguns grupos tem realizado estudos de meta-análise. Resumidamente, esta abordagem define-se pela interação estatística de resultados de estudos independentes sobre o mesmo tópico. Estes estudos contribuem para a confirmação de uma informação, descoberta de erros, buscas de achados adicionais e conseqüentemente novas idéias. Assim sendo, foi através do um estudo de meta-análise realizado recentemente que foi dada a confirmação de que o SNP -308 de TNF, em artrite reumatoide (RA), apresenta uma associação étnico-específica (Lee e col., 2007). Com base nos dados de 14 estudos (10 Europeus, 3 Latinos Americanos e 1 Asiático) ficou caracterizado significativamente que a associação do SNP -308 com RA não se apresentava de forma positiva em todas as populações. Os autores foram capazes de demonstrar, estatisticamente, que o polimorfismo nesta posição do gene representa um fator de risco para a doença apenas na população da América Latina (Lee e col., 2007). Logo, em estudos de associação entre SNPs e doenças, principalmente infecciosas, além de todos os requisitos impostos para a realização das análises estatísticas há ainda de ser avaliada a condição da influência de pressões seletivas étnico-específicas.

Efetivamente, dado os resultados apresentados neste manuscrito pode se inferir a importância dos alelos HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*10 na hanseníase tanto na população brasileira quanto vietnamita e TNF-308A na população brasileira. Contudo, a descoberta da efetiva combinação de fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença, ou seja, fatores imunológicos/epidemiológicos do hospedeiro assim como a variabilidade genética do patógeno, certamente, continuará sendo objeto de pesquisa por longos anos.

CONCLUSÕES

A fim de melhor se compreender a dinâmica da doença, o presente estudo enfatizou a utilização de diferentes abordagens de epidemiologia genética no intuito de caracterizar melhor marcadores genéticos previamente associados ao desfecho.

- 1) No estudo do locus HLA-DR foi possível observar a associação do alelo HLA-DRB1*15 com suscetibilidade a hanseníase *per se* na população brasileira. Estes resultados corroboram dados descritos na literatura, porém, fornecem a inferência adicional de que a associação visualizada encontra-se mais significativa em indivíduos caracterizados como Afro-Brasileiros;
- 2) Devido da utilização neste estudo de um número amostral elevado comparado a outros estudos em hanseníase, assim como as análises de replicação na população Vietnamita, foi possível se detectar a associação dos alelos HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*10 associados à resistência e suscetibilidade à doença;
- 3) Mesmo com o número amostral elevado não houve a visualização de associação entre os alelos HLA-DRB1 com as formas clínicas da doença.

- 4) No estudo da região TNF, através da utilização de número amostral elevado, nas análises individuais para cada SNP o alelo *TNF-308A* mostrou-se associado com resistência a hanseníase *per se*, corroborando dados prévios descritos anteriormente na população brasileira;

- 5) Contudo, no estudo de haplótipos foi observado um aumento na força de associação quando o mesmo foi combinado a outros alelos. Estes resultados sugerem, portanto, que a posição -308 do gene de TNF poderá ser utilizada como Tag-SNP em posteriores estudos de associação com hanseníase na população brasileira;

- 6) Em contrapartida, foi possível se constatar que os alelos *LTA+252G*, *TNF-863C* e *TNF-238G* encontravam-se associados com resistência a hanseníase *per se* somente quando combinados ao alelo *TNF-308A*;

- 7) Estes dados sugerem que estes SNPs poderiam atuar como potencializadores do efeito de *TNF-308A* como marcador de resistência a doença;

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. **Cellular and Molecular Immunology**. 2000 Fourth Edition 235.
- Abel L, Dessein AJ. Genetic epidemiology of infectious diseases in humans: design of population-based studies. **Emerg Infect Dis**. 1998 Oct-Dec;4(4):593-603.
- Abel L, Sanchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, Skamene E, Lagrange PH, Schurr E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **J Infect Dis**. 1998 Jan;177(1):133-45.
- Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. **J Leukoc Biol**. 1999 Oct;66(4):562-566.
- Alcais A, Abel L. Removing phenotypic distribution assumptions from tests of linkage disequilibrium for quantitative traits. **Genet Epidemiol**. 2003, 24:191-9.
- Barnetche T, Gourraud PA, Cambon-Thomsen A. Strategies in analysis of the genetic component of multifactorial diseases; biostatistical aspects. **Transpl Immunol**. 2005 Aug;14(3-4):255-66.
- Beiguelman B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. **Sociedade Brasileira de Genética** 1994; 2 ed.
- Beiguelman B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. **Acta Genet Med Gemellol**. 1968; 17: 584-594.
- Boldt AB, Culp L, Tsuneto LT, de Souza IR, Kun JF, Petzl-Erler ML. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. **Hum Immunol**. 2006;67(9):722-34.

- Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF α) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. **J Inflamm.** 1996 46(1):32-41.
- Cabello, PH. Fatores Genéticos nas Doenças Infecciosas e Parasitárias.. In: José Rodrigues Coura. (Org.). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. 1, p. 133-142.
- Cadoni A, Zicca A, Mancardi GL. Schwann cell expression of HLA-DR antigen in peripheral neuropathies. **Lancet.** 1986; 29: 1281-2.
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. **Am J Hum Genet.** 2004 Jan;74(1):106-20.
- Chakravarti, M. R. & Vogel, F. A Twin Study on Leprosy Vol. **Stutthart Thieme,** 1973.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, *et. al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature.** 2001 22;409(6823):1007-1011.
- Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nat Rev Genet.** 2001 Dec;2(12):967-77.
- de Bakker, P.I.W., Yelensky, R., Pe'er, I., Gabriel, S.B., Daly, M.J., and Altshuler, D. Efficiency and power in genetic association studies. **Nature Genetics.** 2005, 37(11):1217-1223.
- Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, Lucas SB, Shahid F, Dojki M, Chiang TJ, Ehsan Q, McAdam KP, Hussain R.. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. **Infection and Immunity.** 1996 Oct. 4385-4389.
- Gallagher G, Eskdale J, Oh HH, Richards SD, Campbell DA, Field M. Polymorphisms in the TNF gene cluster and MHC serotypes in the West of Scotland. **Immunogenetics** 1997;45(3):188-94.

- Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JA, Moraes MO, Antunes SL, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. Em: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Vol. II. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2005 Págs: 1383-1394.
- Geluk A, Klein MR, Franken KL, van Meijgaarden KE, Wieles B, Pereira KC, Buhner-Sekula S, Klatser PR, Brennan PJ, Spencer JS, Williams DL, Pessolani MC, Sampaio EP, Ottenhoff TH. Postgenomic approach to identify novel Mycobacterium leprae antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. **Infect Immun**. 2005 Sep;73(9):5636-44.
- Gourraud PA, Barnetche T, Vidan-Jeras B, Cambon-Thomsen A. Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. **Transpl Immunol**. 2005;14:245-53.
- Grau G.E., Parida S.K., Pointaire P., Barnes P.F., Modlin R.L. TNF and mycobacteria. In: Buetler B. Ed. Tumor necrosis factor—the molecules and their emerging role in medicine, **New York: Raven Press**, 1992: 329-40.
- Hartl DL, Clark AG. Organization of Genetics Variation. **Principles of Population Genetics**. USA Sunderland, Massachusetts. 1997 Third edition, 71-109.
- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. **Science**. 2005 Feb 18;307(5712):1072-9.
- Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine**. 2002 Oct 21;20(2):56-62.

- Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, Lockwood DN. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. **Clin Exp Immunol**. 1995 99(2):196-202.
- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**. 1989 Mar 10;56(5):731-40.
- Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. **N Engl J Med**. 2000 Sep 7;343(10):702-9.
- Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. **N Engl J Med**. 2000 Sep 14;343(11):782-6. Erratum in: **N Engl J Med** 2000 Nov 16;343(20):1504.
- Kroeger KM, Abraham LJ. Identification of an AP-2 element in the -323 to -285 region of the TNF-alpha gene. **Biochem Mol Biol Int** 1996 Sep;40(1): 43-51.
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol. Immunol**. 1997 Apr;34(5):391-9.
- Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. **Cytokine** 2000 Feb;12(2):110-9.
- Kruglyak, L. e Nickerson, D. A. Variation is the spice of life. **Nature Genet**. 2001; 27, 234–236.
- Lee YH, Ji JD, Song GG. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. **J Rheumatol**. 2007 Jan;34(1):43-9.
- Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, Sampaio EP, Alvim IM, Nery JA, Sarno EN, Pessolani MC. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. **Scand J Immunol**. 2000 Apr;51(4):419-28.

- Mancardi GL, Cadoni A, Zicca A, Schenone A, Tabaton M, De Martini I, Zaccheo D. HLA-DR Schwann cell reactivity in peripheral neuropathies of different origins. **Neurology**. 1988; 38: 848-51.
- Marquet S, Schurr E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. **Drug Metab Dispos**. 2001 Apr;29(4 Pt 2):479-83.
- Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, Cordell HJ, Shaw MA, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. **Genes Immun**. 2004 Jan; 5(1): 63-7.
- Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde – Departamento de Vigilância Epidemiológica – **Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase**, 2006.
- Mira MT, Alcais A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, Schurr E. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. **Genes Immun**. 2003 Jan;4(1):67-73.
- Mira MT, Alcais A, VanThuc N, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VH, e cols. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 e PACRG. **Nature** 2004; 427(6975): 636-640.
- Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S, Morrison J, Whittaker P, Lander ES, Cardon LR, Bentley DR, Rioux JD, Beck S, Deloukas P. A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. **Am J Hum Genet**. 2005 Apr;76(4):634-46.
- Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. In situ characterization of T lymphocyte subsets in leprosy granulomas. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 1982 Sep;50(3):361-2.

- Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. In situ characterization of T lymphocyte subsets in leprosy granulomas. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1982 Sep;50(3):361-2.
- Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *The Journal of Investigative Dermatology.* 1994; 102:828-832,
- Mohamed-Ali P e Ramanujam K. Leprosy in twins. **International Journal of Leprosy.** 1966; 34:405-407.
- Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofy V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. **Science.** 2005; 13:1040-1042.
- Moraes ME, Fernandez-Vina M, Salatiel I, Tsai S, Moraes JR, Stastny P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. **Tissue Antigens.** 1993 May;41(5):238-42.
- Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. **Lep Reviews.** 2006; 7: 189-202.
- Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JAC, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. **Immunogenetics.** 2001; 53: 45-47.
- Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes Immun.** 2004 Nov;5(7):592-5.
- Moraes, M.O. e cols. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon- γ and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). **Scand. J. Immunol.** 1999; 50: 541-549.

- Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 1998; 40(6): 363-70.
- Newton CR, Heptinstall LE, Summers C, Super M, Schwarz M, Anwar R, Graham A, Smith JC, Markham AF. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. **Lancet**. 1989 Dec 23-30;2(8678-8679):1481-3.
- Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun**. 2003 Mar;71(3):1427-33.
- Ottenhoff TH, Neuteboom S, Elferink DG, de Vries RR. Molecular localization and polymorphism of HLA class II restriction determinants defined by Mycobacterium leprae-reactive helper T cell clones from leprosy patients. **J Exp Med**. 1986; 164(6):1923-39.
- Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, van Dissel JT. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet*. 2002 Sep;32(1):97-105. Erratum in: **Nat Genet** 2002 Oct;32(2):331.
- Ottenhoff THM Immunology of leprosy: lessons from and for leprosy. **International journal of Leprosy**. 1994; 62:108-121.
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin- α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. **Nat Genet**. 2002 Dec; 32(4): 650-4.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Jan 7; 100(1): 177-82.

- Pauling L, Itano HA, e cols. Sickle cell anemia a molecular disease. **Science**. 1949 Nov 25;110(2865):543-8.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity- a five group system. **Int J Lepr** 1966; 34: 255-273.
- Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, Kwiatkowski D. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J Infect Dis**. 1997 Aug; 176(2): 530-2.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et. al. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**. 2001; 15;409(6822):928-933.
- Sallakci N, Akcurin G, Koksoy S, Kardelen F, Uguz A, Coskun M, Ertug H, Yegin O. TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. **J Autoimmun**. 2005; 25(2):150-4.
- Sampaio, E.P., Sarno, E.N. Expression and cytokine secretion i the states of immune reactivation in leprosy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1998 v.31, p. 69-76.
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TJW, Ottenhoff THM, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis**. 2002; 186: 1687-1691.
- Sarno, E.N. Grau G.E., Vieira L.M., Nery J..A.C. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 β during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.**, 84: 103-108, 1991.
- Schaid DJ, McDonnell SK, Hebring SJ, Cunningham JM, Thibodeau SN. Nonparametric tests of association of multiple genes with human disease. **Am J Hum Genet**. 2005 May;76(5):780-93.

- Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. **Am J Hum Genet.** 2002 Feb;70(2):425-34.
- Schaid DJ. Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations **Am J Hum Genet.** 1998; 4:935-41.
- Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes Immun** 2001; 2: 196-204.
- Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, Golding M, Shanker Narayan NP, Sitaraman T, Sengupta U, Pitchappan R, Hill AV. A major susceptibility locus for leprosy on chromosome 10p13. **Nat Genet.** 2001; 4: 439-41.
- Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. **J Infect Dis.** 1989;159(4):787-90.
- Spierings E, de Boer T, Wieles B, Adams LB, Marani E, Ottenhoff TH.J. Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. **J Immunol.** 2001; 15: 5883-8.
- Stastny P, Gao X, Moraes ME et al. Class II haplotypes defined by oligonucleotide typing in 11 different ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford: **Science Publications**, 1992: 2: 233-4.
- Terwilliger JD and Ott J. Linkage disequilibrium between alleles at marker loci In: Handbook of human genetics linkage. Baltimore and London: **The John Hopkins University Press**; 1994, p. 188-193.
- The International Human Genome Mapping Consortium. A physical map of the human genome. **Nature** 2001, 409: 934-941.

- Thorisson, G.A., Smith, A.V., Krishnan, L., and Stein, L.D. The International HapMap Project Web site. **Genome Research**. 2005;15:1591-1593.
- Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR, Balakrishnan K, Ghei S, Golding M, Sengupta U, Pitchappan RM, Hill AV. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. **J Infect Dis**. 2002 Oct 15;186(8):1190-3.
- Traherne JA, Horton R, Roberts AN, Miretti MM, Hurles ME, *e cols*. Genetic analysis of completely sequenced disease-associated MHC haplotypes identifies shuffling of segments in recent human history. **PLoS Genet** 2006; 2(1): e9.
- Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD. Map of the human MHC. **Immunol Today**. 1991; 12:443-6.
- Ugialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, Mckenzie FE, Gribbem JG, Hartl D, Yunis EJ, Goldfeld AE.. Identification of three new single nucleotide polymorphism in the human tumor necrosis factor- α gene promoter. **Tissue Antigens**. 1998; 52: 359-367.
- Van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. **Lancet Infect Dis**. 2004 Dec;4(12):739-49.
- Vanderborght PR, Matos HJ, Salles AM, Vasconcellos SE, Silva-Filho VF, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN, Santos AR, Moraes MO. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNF α promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 2004; 2:143-8.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW *e cols*. The Celera Genomics Sequencing Team. The sequence of the human genome. **Science**. 2001; 16: 1304-1351.

- Vidal S, Gros P, Skamene E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. **J Leukoc Biol.** 1995 Oct;58(4):382-90.
- WHO. Global leprosy situation, 2006. **Weekly epidemiological record [online].** 2006a; Disponível em <http://www.who.int/lep/Reports/wer8034.pdf>.
- Williams DL, Torrero M, Wheeler PR, Truman RW, Yoder M, Morrison N, Bishai WR, Gillis TP. Biological implications of Mycobacterium leprae gene expression during infection. **J Mol Microbiol Biotechnol.** 2004;8(1):58-72.
- Wilson A.G., De Vries N., Pociot F., Di Giovine F.S., Van der Putte L.B.A. Duff G.W. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. **Journal of Experimental Medicine.** 1993; 177:557-560.
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor (TNF) alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Hum Mol Gen.** 1992; 1:353.
- Wilson AG, Symons, JA, McDowell, TL, di Giovine, FS, Duff, GW. Effects of Tumor necrosis factor (TNF- α) promoter base transition on transcriptional activity. **Br. J. Rheumatol.** 1994; 33, 89.
- Witt CS, Price P, Kaur G, Cheong K, Kanga U, Sayer D, Christiansen F, Mehra NK. Common HLA-B8-DR3 haplotype in Northern India is different from that found in Europe. **Tissue Antigens.** 2002 Dec;60(6):474-80.
- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science.** 1991; 254:277-279,.
- Young D, Robertson B. Genomics: leprosy - a degenerative disease of the genome. **Curr. Biol.** 2001;15;11(10): R381-3.

REVIEW

Genetics of host response in leprosy

MILTON OZÓRIO MORAES*,
CYNTHIA CHESTER CARDOSO*,
PATRÍCIA ROSA VANDERBORGHT* &
ANTÔNIO GUILHERME PACHECO**

**Leprosy Laboratory, Department of Mycobacterioses, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro*

***Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde (DEMQS), Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil*

Accepted for publication 10 May 2006

Summary In this review, we discuss recently accumulated data, analysing genetic influence on leprosy outcome. Most leprosy-related epidemiological studies are based on the comparison of frequencies of genetic markers in case-control designs using candidate genes, mainly on immunological pathways. Genomic scans using family-based designs also identified some chromosome regions to be tested for association with leprosy. The results have suggested that different genes are implicated in resistance/susceptibility to leprosy, such as tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin (IL)-10, vitamin D receptor (VDR), and parkin, although some of the results obtained in different populations are controversial. In spite of the recent advances in genomics and genetic epidemiology we have experienced, the results must be confirmed using better designed epidemiological studies to directly pinpoint the genes responsible for leprosy outcome. Furthermore, there is a clear requirement of functional/biological data in order to validate epidemiological findings. In this way, these genetic markers could be used to screen high-risk populations introducing gene testing as diagnostic and prognostic tools to interrupt the chain of transmission and prevent neurological damage.

Introduction

Leprosy outcome is influenced by the genetic background of the host and also environmental features like nutritional status, BCG vaccination and exposition rates to *Mycobacterium leprae* or other mycobacteria. Even though several clinical and epidemiological evidences suggest that leprosy has a genetic influence, some issues should be highlighted: (i) leprosy is an infectious disease in which the genetic diversity of the pathogen is very low¹ and could not

account for the major clinical differences observed among patients; (ii) epidemiological studies have been reporting consistently that contacts exhibit the highest risk of developing the disease (household contacts with close consanguineous relationship to the index case are at the highest risk);² (iii) very few people, only 0.1–1% of the infected population, are susceptible to leprosy; (iv) twin studies showed that disease and disease type is more frequent among monozygotic twins when compared to dizygotic twins; (v) there are some reports suggesting that populations with different ethnic backgrounds living in the same endemic areas exhibit distinct prevalence rates;³ (vi) clinical forms in leprosy are not interchangeable; (vii) BCG protection rates are highly variable among different populations; (viii) complex segregation analyses have suggested a predominant genetic rather than environmental model for associations in leprosy.

During the natural course of the disease some steps can be clearly identified. Thus, leprosy can be divided into: (i) leprosy *per se*; (ii) severity of clinical forms; and (iii) occurrence and severity of reactional states. The host responses in every one of those stages can originate a specific outcome (Figure 1). An infected person can either cure or develop the disease. In the latter case, it may evolve towards a mild (tuberculoid) or a severe (lepromatous) state of leprosy. Some patients can interrupt the natural course of the disease with inflammatory episodes of either type I (reversal reaction, RR) or type II (erythema nodosum leprosum, ENL). It is clear that immunological responses play a critical role in controlling each one of these stages, although response patterns can be modified along the course of the disease.

Resistance to intracellular pathogens such as mycobacteria is associated with the ability to mount T helper (Th)1 responses. The first line of interaction of *M. leprae* with humans is mediated by host receptors that recognize patterns of mycobacteria. Thus, Toll-like receptors (TLR) on phagocytic cells, especially TLR-2, are activated by *M. leprae* lipoproteins and the ability to start protective responses is directly associated to interleukin (IL)-12/23 secretion and differentiation of type-1 macrophages and dendritic cells.^{4,5} This process can lead to expansion and differentiation of Th1 interferon (IFN) γ -producing cells that, in turn, induce *M. leprae* killing and control of disease spread. Furthermore, the dichotomy of Th1 versus Th2 as an explanation for clinical features observed among tuberculoid and lepromatous leprosy patients, respectively, also reflects the ability to mount an effective cellular immune response against the mycobacteria, consequently preventing the development of severe forms of the disease.

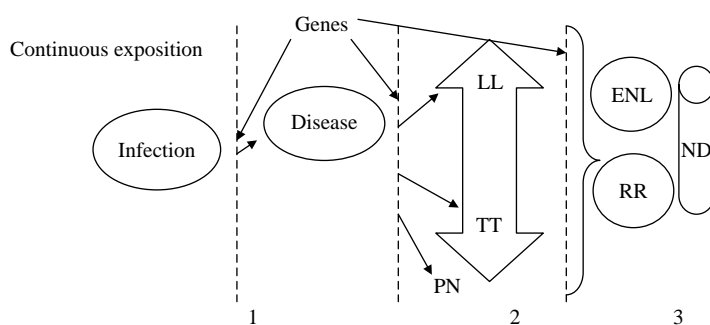


Figure 1. Natural history of leprosy: stages of infection and disease. Genetic factors can contribute to: outcome of the disease (1); severity of clinical forms (2); and occurrence of reactional episodes and nerve damage (3). LL = lepromatous; TT = tuberculoid; PN = pure neural; ENL = erythema nodosum leprosum; RR = reversal reaction; ND = nerve damage.

The most categorical example towards resistance mediated by IL-12/23-IFN γ axis to mycobacterioses was obtained with rare hereditary diseases of patients exhibiting infection to low virulence intracellular pathogens, including *M. avium*, *M. bovis*-BCG, and *Salmonella spp.*⁶ Genetic analyses in those patients revealed truncating mutations in IFN γ receptors or IL-12/23 common subunit (p40) and IL-12/23 β 1 receptors. Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) is another very important cytokine involved in the regulation of mycobacterial diseases. The administration of anti-TNF α drugs for autoimmune diseases (rheumatoid arthritis and Crohn's disease) was capable of activating *Mycobacterium* latent infection and patients developed pulmonary tuberculosis or leprosy.^{7,8} This example demonstrated the critical role of TNF α in granulogenesis and latency control of mycobacterium infection preventing dissemination.

Obviously, both situations described above are rare and very drastic. In common diseases like leprosy it is not expected to observe patients with Th1 responses completely knocked out, but it is possible that decreased expression of IL-12/23 reflects a down modulation of IFN γ secretion and an inability to mount strong Th1 protective responses resulting in disease. One hypothesis is that leprosy outcome is defined by the strength of Th1 responses once *M. leprae* challenge begins (Figure 2).

Thus, regulation of cytokine production can influence the strength of immune responses and it is expected that subtle differences in the levels of cytokines secreted could account for the establishment of different phenotypes (leprosy versus healthy or LL versus TT).

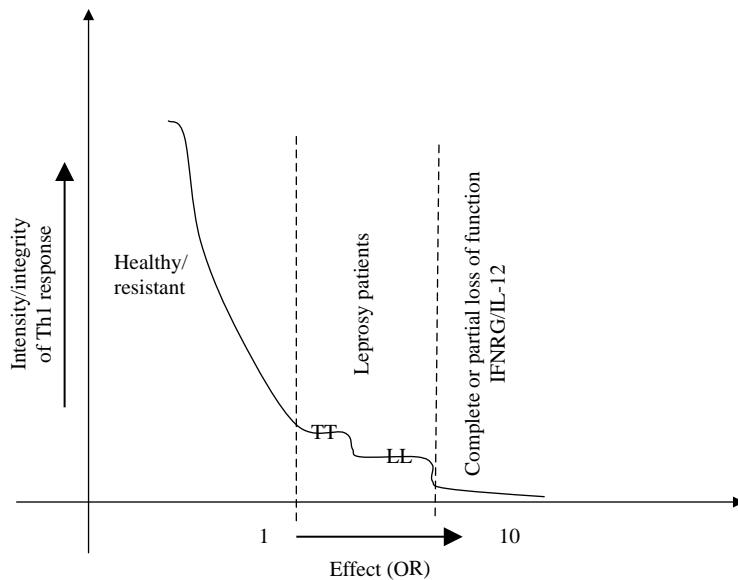


Figure 2. Genetic influence on immunological responses and resistance to intracellular pathogens, using leprosy as an example. According to the level of Th1 responses there are healthy individuals able to mount strong Th1 responses. At the other extreme, there are patients who develop infections caused by low virulent mycobacteria unable to activate IL-12/23-IFN γ axis. It is possible that leprosy patients are in the middle of these two extremes and within leprosy, the tuberculoid patients have stronger Th1 responses as compared to lepromatous ones, although during inflammatory reactions an upregulation of Th1 responses is observed. Since leprosy is a complex disease, it is expected that genetic effect evaluated as odds-ratios of different markers in leprosy patients varies from 1.3–4.0. Subtle genetic variations, such as SNPs, can modulate the levels of cytokines and consequently, immunological responses and could be responsible for the differences observed among individuals.

genetic polymorphisms are able to regulate cytokine levels. The most common and studied of those polymorphisms are microsatellites and single nucleotide polymorphisms (SNPs). The latter are biallelic point substitutions (G-A, C-T, C-A and so on) lying on intragenic non-coding regions, like promoters and introns, but also on coding as well as intergenic regions. As a result, SNPs can alter binding affinity to transcriptional factors at promoter regions or modify splice sites. When SNPs are located at coding regions they can change an amino acid leading to variations in protein structure and/or function. Use of SNPs also provides a chance to link biological phenomena to epidemiological evidences, since SNPs can also be used as genetic markers in disease association and linkage studies.

Recently, extended haplotypes have increasingly been used as genetic markers. Haplotypes are combinations of two or more polymorphisms (SNPs in this case) within a single chromosome in an individual. It has become a very popular approach to study the association of haplotypes with diseases when two or more SNPs are in linkage disequilibrium (LD) in the population, i.e. the SNPs are inherited together more frequently than it would be expected by chance alone. The advantages of using haplotypes instead of individual SNPs are that: (i) less information is contained in a SNP alone than in a combination of SNPs that are in LD; (ii) correction for multiple comparisons (e.g. Bonferroni) would have to be employed if the information gathered separately from several SNPs were combined, considerably lowering the power to detect associations; (iii) there would be an increased chance of gathering epidemiological along with biological evidences since a larger region of a chromosome is analysed.

Genetic case-control studies for infectious diseases

There are two basic approaches in genetic epidemiology to study the association of genetic markers, such as SNPs, with a disease: (i) family studies; and (ii) population-based candidate gene association studies. Both approaches have advantages and disadvantages, some of which were recently discussed elsewhere.⁹

Case-control studies are the most popular in genetic epidemiology because of the simplicity of recruiting either healthy individuals (controls) or patients (cases). This type of design has been largely employed in leprosy studies; generally SNPs are used as markers in candidate genes, like TNF α and IL-10, and comparisons are made with unrelated (independent) controls. The design of these studies are just like any classical epidemiological study, i.e. cases are identified in the source population assessed for exposure to a risk or protection factor and other covariates, and controls are chosen randomly from the source population, where we expect, on average, that controls differ from cases only by their outcome.

Case-control studies can be challenging to design and extreme care should be taken to choose suitable controls, in order to avoid bias and control for confounding variables.¹⁰ It is not uncommon to find articles in the literature that use inadequate controls in case-control studies of infectious diseases. It is likely that some of the results obtained are spurious associations due to poor selection of the controls. Moreover, the different results obtained for the same SNPs/genes in studies conducted in different populations also suggest some sort of bias in few of these designs. For example, most of the published papers compare leprosy cases with healthy blood donors. It should be considered that controls have to be exposed to *M. leprae* and not develop infection in order to guarantee one of the basic concepts about controls: they need to have some probability of getting the disease. In endemic countries like

Brazil and India, depending on the city, and specifically the area being studied, a variation of 20–100% exposure to *M. leprae* is estimated, as evaluated using PGL-I antibody detection (X. Illarramendi, personal communication). Thus, if blood donors are the best choice to obtain healthy controls, it is mandatory to choose a hospital/clinic located nearby the area where the leprosy out-patient is and if possible run a PGL-I ELISA to test rates of latent infection. Even though, it would be impossible to tell for sure if a person was exposed or not to a certain infectious agent, there are some ways to at least increase this probability, which would be to work with household contacts.

Another key feature that should be carefully handled is the calculation of a suitable sample size. On one hand, the sample size should not be so small that it will not allow tests with enough power to detect a clinically significant difference; on the other hand, given scarce resources, it should not be bigger than necessary to provide adequate power to test the phenomenon being studied, to avoid unnecessary waste of time and money. Sample size depends on several factors: desired power, probability of type I error, the magnitude of the difference to be tested and the variance of the variable studied in the source-population. Simulations would help find a suitable sample size, which is done by the construction of power curves and evaluation of different scenarios, given some guesstimation for prior parameters, which describe a very simple situation, when comparing two proportions in a balanced setting (they could be allelic proportions, genotype proportions in a dominant model, etc). Note that for very common situations in our setting, where we are dealing with low baseline proportions, huge sample sizes would be required to detect low differences, suggesting that many of the studies are underpowered (please check below “candidate genes” and Table 1).

For case-control studies that use independent controls, the analytical tools available for classical epidemiology have also been used in genetic case-control studies. Logistic and log-linear regression models are suitable for many analyses that are carried out in those studies, when we are trying to infer the association between SNPs genotypes or alleles with a certain disease. Recently, a method that combines generalized linear models (GLM) with the expectation-maximization (EM) algorithm have been proposed,¹¹ in which a score statistic is used to infer the association of haplotypes of unknown phase and diseases, and with the possibility to include covariates in the model.

Candidate genes

As discussed above, due to the importance of immune response in leprosy, the most common candidate genes are those of cytokines and other important molecules in immunological pathways. One of the first studies reporting candidate gene experimental design was performed with the transporter associated antigen processing molecule 2 (TAP2), which is located on chromosome 6p21, and plays an important role in peptide translocation inside the cell and their binding to major histocompatibility complex (MHC) molecules. A study performed among Indians reported association of the TAP2-B allele with susceptibility to tuberculoid leprosy.¹²

HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN COMPLEX

The human leukocyte antigens (HLA) complex, located on chromosome 6p21, is the most polymorphic genetic system in mammals. The well known function of the HLA gene

Table 1. Leprosy association studies using the candidate gene approach and SNPs as markers. Susceptibility or protection phenotypes are shown with odds ratio (OR) and statistical significance (*P*-value)

Gene	Population origin	SNP/Haplotype	Phenotype	Reference
<i>VDR</i>	India	Codon 352 (TT)	Susceptibility to lepromatous form, (OR = 1.67; <i>P</i> = 0.03)	42
		Codon 352 (CC)	Susceptibility to tuberculoid form (OR = 3.22; <i>P</i> = 0.001)	
<i>CR1</i>	Malawi	Codon 352 (TC)	Protection (OR = 0.58; <i>P</i> < 0.01)	31
	Malawi	Codon 352 (CC)	Susceptibility (OR = 4.3; <i>P</i> = 0.004)	
<i>TNFA</i>	India	K1590E (GG)	Protection (OR = 0.3; <i>P</i> = 0.02)	31
	India	-308A	Susceptibility to lepromatous form (OR = 3.0; <i>P</i> = 0.02)	27
<i>IL10</i>	Brazil	-308A	Protection against leprosy <i>per se</i> (OR = 0.62; <i>P</i> = 0.05) and multibacillary forms (OR = 0.52; <i>P</i> = 0.02)	28–29
	Malawi	-238/-308/-376/-863	No association	31
	Brazil	-819T	Susceptibility (OR = 2.28; <i>P</i> < 0.01)	29
	Brazil	-3575A/-2849G/-2763C	Protection against leprosy <i>per se</i> (OR = 0.35; <i>P</i> = 0.0005) and multibacillary forms (OR = 0.32; <i>P</i> = 0.006)	38
<i>IL12RB2</i>	India	-3575T/-2849A/-2763C	Susceptibility (OR = 2.37; <i>P</i> = 0.027)	39
		-3575T/-2849G/-2763C	Protection (OR = 0.58; <i>P</i> = 0.01)	
		-1082A/-819C/-592C5		
<i>IL12RB2</i>	Malawi	-592/-819/-1082	No association	31
	Japan	-1035G	Susceptibility (OR = 3.97; <i>P</i> < 0.001)	47
		-1023G	Susceptibility (OR = 2.95; <i>P</i> < 0.01)	
		-464G	Susceptibility (OR = 3.64; <i>P</i> < 0.01)	

products is the processing and presentation of peptide antigens to T cells.¹³ Thus, proper activation of T cell subsets, in the context of T cell receptors and major histocompatibility complex, might be influenced by HLA haplotypes. This can reflect the amount of IFN γ production upon *M. leprae* stimulation and it is historically accepted that HLA is involved in differential development of leprosy clinical forms.¹⁴ HLA molecules are cell surface glycoproteins divided into two groups: HLA class I (A, B and C) and class II (DR, DQ and DP) antigens. Case-control studies on HLA loci as candidate genes have described different haplotypes of either class I or class II regions associated with susceptibility or resistance in different populations. In Chinese, a negative association of HLA-B46 antigen was observed in leprosy patients, suggesting that there might be an HLA-B-linked disease resistance.¹⁵ Recently, the existence of positive association of the HLA A*0206, A*1102, B*4016, B*5110, Cw*0407, and Cw*0703 alleles with the disease, and also a highly significant association of the HLA-A*1102-B*4006-Cw*1502 haplotype¹⁶ with leprosy susceptibility was reported in Mumbai.

However, a greater number of studies analyzing HLA class II were conducted showing more consistent associations. In a family study, using co-segregation analyses in Latin American people have shown the presence of HLA-DQw1 associated with LL patients.¹⁴ On the HLA-DRB1 locus, several studies have provided evidence for the association of the previously assigned HLA-DR2 (now DRB1*15 and DRB1*16) with susceptibility to leprosy

(both lepromatous and tuberculoid) in India,^{17,18} Thailand¹⁹ and Brazil.²⁰ Some other alleles were also implicated in leprosy susceptibility, especially HLA-DRB1*03 in Surinam²¹ and Mexico.²²

In 1998, Rani and coworkers,²³ described in India a new subset of DR2 (HLA-DRB1*1506) that differs from DRB1*1501 only at codon 50 in the second exon, where the nucleotide sequence has changed from GTG to GCG, resulting in one amino acid substitution from valine to alanine in DRB1*1506. This codon (50) has always been considered non-polymorphic and it becomes necessary to study which DRB1*15 carriers are truly susceptible to leprosy.

NON-HLA GENES

There are increasing numbers of epidemiological case-control studies in leprosy. Some association studies using non-HLA candidate genes approach using SNPs as markers are highlighted in Table 1 and some others polymorphisms are discussed along the text. Only data for LT α /TNF α , IL-10, and vitamin D receptor (VDR) have been assessed in more than one population. Some of the studies confirm the previous findings, but not always the same alleles are associated with leprosy *per se* or some specific form of the disease. Moreover, very few papers report biological relevance of the epidemiological findings, which is a huge gap in genetic studies of leprosy.

Tumour necrosis factor alpha (TNFA) and lymphotoxin alpha (LTA)

TNF- α and lymphotoxin- α (LT- α) are structural and functionally related proteins. They are pro-inflammatory cytokines with some redundant functions as they share the same receptor. The TNF genes are located on class III MHC region at 6p21-3. TNF α is involved in inflammatory response in the skin²⁴ and in granuloma formation after mycobacterial infection.²⁵ The TNFA gene is the most common target of association studies in leprosy, especially the G-A promoter SNP at position -308. The functional role of this polymorphism in gene expression has been widely tested. However, differences between protocols, including stimuli used and time of exposure, has led to opposite results.²⁶ Nevertheless, it is believed that -308A is associated with higher levels of TNF α secretion. The first study with TNF α SNPs in leprosy reported susceptibility to lepromatous leprosy among carriers of the -308A variant.²⁷ Other studies, in a Southern Brazilian population, reported opposite results where the protective effect of the same allele against leprosy *per se* was observed.^{28,29} Another group performed both linkage and association studies with Northern Brazilian families. At first, the importance of the TNF locus in linkage studies was reported, after which association studies were developed using transmission disequilibrium tests and replication of the results showed protection against leprosy *per se* for the -308A allele.³⁰ Even though, Fitness and coworkers (2004)³¹ did not find associations of -308 TNF α promoter SNP with leprosy.

LT α gene was also studied where a SNP located in the first intron, at the +252 position (A-G) was investigated. No association between +252 and leprosy was found, although when analysis was performed with haplotypes, a protective association with the -308A/+252G haplotype resulted in protection.³⁰ Functional characterization using gene reporter assays demonstrated an increase in LTA gene expression in the presence of allele G.³² Taken together, it seems that, at least in Brazilians, the -308A carriers (and -308A/+252G

carriers) are able to restrict *M. leprae* replication and progression of disease possibly by production of higher TNF α and LT α levels.

Indeed, the functionality of the -308A TNF α promoter SNP can be measured indirectly using clinical and biological parameters. For example, the -308A allele was found to be associated with a stronger response to heat-killed *M. leprae* in borderline tuberculoid leprosy patients.³³ Slit skin smears can also be used as an alternative for *in vivo* determination of the bacterial load. Our recent data³⁴ demonstrate that the TNF α -308A SNP has an impact on the amount of bacilli that a patient is carrying, since -308A carriers had lower bacteriological index (BI) than non-carriers. Thus, augmented TNF production seems to be associated with the -308A allele based on this indirect evidence.

Interleukin 10

The IL-10 gene is located at 1q31-q32 and its product is classically considered an anti-inflammatory molecule that counterbalances the effect of proinflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 β . Also, IL-10 is an immunoregulatory cytokine involved in IL-4-producing T cell expansion,³⁵ and B cell proliferation and differentiation.³⁶ High TNF- α /IL-10 levels have been correlated with better prognosis in leprosy outcome among household contacts.³⁷ The first study of this gene in leprosy was provided by genotyping the promoter SNPs located at position -819 in Brazilians.²⁹ This study reported a susceptibility phenotype in the presence of allele T. Moreover, IL-10 promoter SNPs were arranged in extended haplotypes³⁸ and a combination of distal SNPs in a haplotype -3575A/-2849G/-2763C revealed an increased frequency among controls when compared to patients. Furthermore, the -3575T/-2849A/-2763C haplotype, which is in linkage with allele -819T was associated to the disease. First, the Brazilian study was replicated in Malawians and -1082, -819 and -592 promoter SNPs were not associated with leprosy. In India the data suggested association of the locus with protection, although a different haplotype -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C was responsible for resistance.³⁹ This work also found the association of allele -819T with leprosy susceptibility.³⁹ Therefore, there is confirmatory epidemiological evidence that IL-10 is participating in resistance/susceptibility to leprosy. There is no biological evidence linking those genotypes/haplotypes and IL-10 production in leprosy. Nevertheless, the role of IL-10 in differentiation of type-2 macrophages and Th2 maintenance could suggest that lower levels were expected among resistant individuals. The data obtained with blood cells from healthy donors, stimulated with LPS suggest that the -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C haplotype leads to low IL-10 production.⁴⁰ Nevertheless, this needs confirmation for *M. leprae* stimulation.

Vitamin D receptor (VDR)

The VDR gene is located at 12q12-q14 and is responsible for the biological effects of vitamin D in its active form, being produced by monocytes and T and B lymphocytes. The active form of vitamin D, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃), induces monocyte differentiation, while macrophage activation through VDR, in combination with TNF α and IFN γ is responsible for killing of *Mycobacterium tuberculosis*.⁴¹ The evidence for association of the VDR gene in leprosy was firstly reported in a study in an Indian population (Bengalis), testing for a T-C substitution at codon 352, located at the 3' gene region.⁴² This work detected susceptibility to lepromatous and tuberculoid leprosy in the presence of genotypes TT and

CC, respectively. Recently, a larger case-control study conducted in Malawians reported susceptibility to leprosy *per se* in the presence of the CC genotype.³¹ There is no further information about the influence of this SNP on VDR function and the possible consequences in leprosy.

Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1 (SLC11A1)

The SLC11A1 protein, also known as NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein-1) is located at 2q35 and has a role in ion transportation. NRAMP was described as the gene involved in resistance/susceptibility to intracellular pathogens in mice where a single coding SNP was responsible for susceptibility in Balb/C. In humans, it is more complicated and this direct correlation was not found in patients with infectious diseases caused by intracellular pathogens, even though several reports have tested NRAMP1 for leprosy association. A study using Vietnamese families reported linkage between this locus and leprosy.⁴³ They also performed association studies with a haplotype composed of six polymorphisms and obtained borderline results ($P = 0.06$). The work by Roy and colleagues (1999)⁴² could not find association in a microsatellite in the promoter region. The first association evidence for this gene in leprosy was found in a study where a 4 nucleotide deletion in the 3' untranslated region was found more frequently among multibacillary patients.⁴⁴

Clinical parameters such as induration of Mitsuda reaction were also used in these studies. Alcais and coworkers (2000) showed that NRAMP1 was linked to lepromin reaction,⁴⁵ whereas another group worked with the microsatellite of the promoter region and found that a combination between some genotypes and the lepromin negative reaction could contribute to susceptibility.⁴⁶

OTHER GENES

There are other studies testing for IL-12R β 1,⁴⁷ laminin,⁴⁸ and TLR-2⁴⁹ which are good candidates for leprosy susceptibility. Indeed, the coding polymorphism at the +7809 position in the laminin gene were associated to genotypes TT and TC and the development of lepromatous and tuberculoid leprosy, respectively, in a study with a small population from Indonesia.⁴⁸ A study with TLR2 reported association between a coding polymorphism Arg677Trp and susceptibility to the lepromatous form of leprosy.⁴⁹ Then, this SNP was not found in several populations analysed even among Brazilians (M. O. Moraes, unpublished data). Recently, Malhotra and colleagues (2005)⁵⁰ demonstrated that this alleged polymorphism was in fact the detection of an exon duplication. The IL-12 β 1 receptor promoter SNPs, associated with lower transcriptional activity, have a significantly increased frequency among lepromatous patients.⁴⁷

Nevertheless, it is important to bear in mind that negative results in association studies can be found more often than positive ones. SNPs in IL12/IL23/IFN- γ genes were screened in a population from Korea and results showed no evidence for association in any of the polymorphisms typed.⁵¹ Fitness and colleagues (2004)³¹ reported association for two markers (located at VDR and CR1 genes) among 38, distributed in 13 candidate genes.

Genomic scan studies

The use of genomic scans in leprosy has the ability to uncover a region/gene not apparently associated with disease to be tested as candidate genes. This is a great advantage in the study of complex diseases, especially leprosy, in which low mortality rates enable the collection of samples from several generations, which is necessary in this kind of test.⁵² Genetic linkage studies performed for leprosy are summarized in Table 2.

The first study in Indians detected linkage in the 10p13 region, which contains the macrophage mannose receptor, important in lipoarabinomannan recognition.⁵² Another study in Indians reported a peak at the 20p12 region.⁵³ The study developed by Mira and colleagues found linkage in the 6q25 region⁵⁴ and also replicated the results in region 10p13 but only for tuberculoid leprosy. The analysis of families used in the first study indicated that most of the families used in the Siddiqui work were composed by paucibacillary patients. Thus, it seems that the 10p13 region is important to leprosy susceptibility, although no further information on the potential genes involved have been provided.

Later, Mira and colleagues (2004)⁵⁵ used positional cloning techniques to pinpoint the gene in chromosome 6q25 and scan the region with increasing resolution, i.e. augmenting the number of genetic markers. This methodology identified a promoter region shared by *PARK2* also denoted as parkin and *PACRG* (parkin co-regulated gene). A panel of SNPs depicted as few as two tag SNPs representing a block of approximately 80 kb, located in the *PARK2* promoter region. The haplotype composed by allele T at region -2599 and C at SNP rs1040079 was responsible for the susceptibility phenotype both in Vietnamese families and a Brazilian population.⁵⁵

Parkin (*PARK2*) and parkin co-regulated gene (*PACRG*) were first identified during genome-wide studies to find genes and regions linked to early onset Parkinson's disease,⁵⁷ and then characterized structurally and functionally as a RING-type E3 ubiquitin ligase.⁵⁸ These proteins are very important in a series of functions involving immunological responses, where parkin loss-of-function leads to apoptosis, for example. The specific role of parkin in leprosy susceptibility remains to be defined, but the genetic uncovering in leprosy of a gene involved in neurodegeneration in Parkinson's disease provides new insights of immune response control in leprosy.

A recent study using a panel of 350 healthy controls and 286 leprosy patients reported significant association for allele T at -2599 region. Nevertheless, this significant result disappeared after correcting results for multiple comparisons. Also, haplotype analysis did not replicate the previously reported association.⁵⁶ The inability to replicate the associations

Table 2. Genetic linkage studies in leprosy using genomic scan approach

Main associated region	Population analysed	Phenotype observed*	Reference
10p13	Indian	Susceptibility	52
20p12	Indian	Susceptibility	53
6q25	Vietnamese	Susceptibility	54
10p13		Severity (paucibacillary form)	
17q11	Brazilian	Susceptibility	59, 60

*Unless indicated, all susceptibility phenotypes are related to leprosy *per se*.

as observed in parkin haplotypes should be carefully analysed in the light of sample size, allele frequencies and power as suggested above.

The most recent genome-wide study implicated chromosome region 17q11 in susceptibility to leprosy. This region contains many genes involved in immune regulation, such as *NOS2A* and *CCL2* (MCP-1), but none of these regions has been depicted with greater resolution and there is no confirmation of the association of these genes with leprosy.^{59,60}

Conclusions

Genetic studies have shed some light on pathways leading to leprosy outcome. Indeed, there is confirmation of the role of the immunological response in protection/susceptibility of the disease. Nevertheless, conflicting results were observed and there are few papers exploring the physiological relevance of the associated genetic variants with leprosy outcome, which imposes difficulties in clearly defining the role of these genes in resistance/susceptibility. The conflicting results primarily reflect biases of design such as bad choice of the statistical tools, poor selection of controls and recruitment of a low number of individuals since most of the studies are underpowered. But, for TNF α , IL-10, VDR and parkin there is confirmation of epidemiological associations in different populations. TNF α – 308A was associated with lepromatous leprosy in Indians, whereas in Brazilians it was associated with resistance. These results may also be ascribed to an association of other polymorphisms in *TNFA* loci, that could be in linkage disequilibrium to the – 308A allele, due to differences in haplotypic structures in both Indians and Brazilians.

We cannot rule out some artefacts in genotyping to explain the discrepancies observed among the studies. The Hardy–Weinberg test is generally used to evaluate departures from equilibrium in observed genotypic frequencies. Sometimes these deviations are observed due to genotyping errors and if this is the case it introduces a huge bias in statistical analysis. Indeed, the evaluation of some of the published associated findings demonstrate that either control or patient populations are deviating from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in some of the studies, which may indicate some sort of bias.^{27,29,31} Thus extreme care should be taken in the interpretation of these data with departure from HWE. Recently, Shin and co-workers (2005)⁶¹ have raised this point towards the – 1082G/A IL-10 promoter SNP in association studies in tuberculosis. Alternatively, the discrepancies in different studies can be influenced by ethnic-specificity of susceptibility/resistant variants that are being selected by different environmental pressures. Distinct populations have been exposed to very different selective environments in past centuries. Thus, it is possible that they mounted distinct strategies to cope with infectious pathogens. Canadian aborigines are much more susceptible to tuberculosis than Caucasian Canadians due to the recent history of exposure.⁶² This ethnic specificity of association may also suggest that leprosy is a result of the genetic heterogeneity, where variations in different genes are responsible for the outcome of the same phenotype, leprosy.

Although we are experiencing great achievements towards genetics of leprosy, there is no published data investigating the genetic basis of inflammatory reactional states and neurological damage. Genetic testing is very expensive, especially to screen high-risk populations like household and peri-domiciliary contacts, but the definition of genetic severity markers, specifically to nerve impairment could have a great prognostic value. Genetic testing could improve predictability of other tests, like PGL-1 antibody detection.⁶³ This is a very important issue since it could reduce the morbidity upon patient testing for

markers that may indicate the odds of developing a reaction and/or neuritis at the time of diagnosis, thus preventing disabilities.

High throughput techniques to genotype large numbers of SNPs and statistical tools to organize and test this information are now available. The recruitment of large samples and correct choice of controls and patients is critical to better design and produce reliable results. The replication in different populations is also expected and the ultimate validation will only be achieved when the functional significance of epidemiologically associated SNPs/genes are discovered, which is essential to understanding leprosy immunopathogenesis and, finally control the disease. It is possible that in the near future these genetic tools can be used to better diagnose and treat patients as well as to help eradicate leprosy.

References

- ¹ Monot M, Honore N, Garnier T *et al.* On the origin of leprosy. *Science*, 2005; **308**: 1040–1042.
- ² Moet FJ, Pahan D, Schuring RP *et al.* Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis*, 2006; **193**: 346–353.
- ³ Beiguelman B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet Med Gemello*, 1968; **17**: 584–594.
- ⁴ Krutzik SR, Tan B, Li H *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*, 2005; **11**: 653–660.
- ⁵ Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; **101**: 4560–4565.
- ⁶ Van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis*, 2004; **4**: 739–749.
- ⁷ Keane J. Tumor necrosis factor blockers and reactivation of latent tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 2004; **39**: 300–302.
- ⁸ Joyce MP, Scollard DM. Borderline lepromatous leprosy in a patient treated with infliximab (a tumor necrosis factor inhibitor). In: Proceedings of the 16th International Leprosy Congress, Salvador, Brazil, 2002, p. 145.
- ⁹ Daly AK. Candidate gene case-control studies. *Pharmacogenomics*, 2003; **4**: 127–139.
- ¹⁰ Rothman KJ, Greenland S, *Modern epidemiology* Lippincott-Raven, Philadelphia 1998.
- ¹¹ Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE *et al.* Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet*, 2002; **70**: 425–434.
- ¹² Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens*, 1997; **49**: 168–172.
- ¹³ Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol*, 1993; **11**: 403–450.
- ¹⁴ Gorodezky C, Alaez C, Munguia A *et al.* Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis*, 2004; **84**: 82–92.
- ¹⁵ Wang LM, Kimura A, Satoh M, Mineshita S. HLA linked with leprosy in southern China: HLA-linked resistance alleles to leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1999; **67**: 403–408.
- ¹⁶ Shankarkumar U, Ghosh K, Badakere S, Mohanty D. Novel HLA class I alleles associated with Indian leprosy patients. *J Biomed Biotechnol*, 2003; **2003**: 208–211.
- ¹⁷ De Vries RR, Mehra MK, Vaidya MC *et al.* HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. *Tissue Antigens*, 1980; **16**: 89–112.
- ¹⁸ Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA *et al.* Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. *Tissue Antigens*, 1993; **42**: 133–137.
- ¹⁹ Schauf V, Ryan S, Scollard D *et al.* Leprosy associated with HLA-DR2 and DQw1 in the population of northern Thailand. *Tissue Antigens*, 1985; **26**: 243–247.
- ²⁰ Visentainer JE, Tsuneto LT, Serra MF *et al.* Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*, 1997; **30**: 51–59.
- ²¹ van Eden W, de Vries RR, D'Amara J *et al.* HLA-DR-associated genetic control of the type of leprosy in a population from surinam. *Hum Immunol*, 1982; **4**: 343–350.
- ²² Gorodezky C, Flores J, Arevalo N *et al.* Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. *Lepr Rev*, 1987; **58**: 401–406.

- ²³ Rani R, Mukherjee R, Stastny P. Diversity of HLA-DR2 in North Indians: the changed scenario after the discovery of DRB1*1506. *Tissue Antigens*, 1998; **52**: 147–152.
- ²⁴ Groves RW, Mizutani H, Kieffer JD, Kupper TS. Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; **92**: 11874–11878.
- ²⁵ Kindler V, Sappino AP, Grau GE *et al*. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*, 1989; **56**: 731–740.
- ²⁶ Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun*, 2004; **5**: 315–329.
- ²⁷ Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG *et al*. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis*, 1997; **176**: 530–532.
- ²⁸ Santos AR, Almeida AS, Suffys PN *et al*. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2000; **68**: 325–327.
- ²⁹ Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR *et al*. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis*, 2002; **186**: 1687–1691.
- ³⁰ Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A *et al*. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun*, 2001; **2**: 196–204.
- ³¹ Fitness J, Floyd S, Warndorff DK *et al*. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of Northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg*, 2004; **71**: 330–340.
- ³² Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A *et al*. Functional SNPs in the lymphotoxin- α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*, 2002; **32**: 650–654.
- ³³ Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN *et al*. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics*, 2001; **53**: 45–47.
- ³⁴ Vanderborght PR, Matos HJ, Salles AM *et al*. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNF α promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2004; **72**: 143–148.
- ³⁵ Volk H, Asadullah K, Gallagher G *et al*. IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol*, 2001; **22**: 414–417.
- ³⁶ Llorente L, Zou W, Levy Y *et al*. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, 1995; **181**: 839–844.
- ³⁷ Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD *et al*. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol*, 2000; **51**: 419–428.
- ³⁸ Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ *et al*. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun*, 2004; **5**: 592–595.
- ³⁹ Malhotra D, Darvishi K, Sood S *et al*. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet*, 2005; **118**: 295–300.
- ⁴⁰ Mörmann M, Rieth H, Hua TD *et al*. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun*, 2004; **5**: 246–255.
- ⁴¹ Denis M. Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol*, 1991; **84**: 200–206.
- ⁴² Roy S, Frodsham A, Saha B *et al*. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis*, 1999; **179**: 187–191.
- ⁴³ Abel L, Sanchez FO, Oberti J *et al*. Susceptibility to leprosy is linked to the human *NRAMP1* gene. *J Infect Dis*, 1998; **177**: 133–145.
- ⁴⁴ Meisner SJ, Mucklow S, Warner G *et al*. Association of *NRAMP1* polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy *per se* in west africans. *Am J Trop Med Hyg*, 2001; **65**: 733–735.
- ⁴⁵ Alcais A, Sanchez FO, Thuc NV *et al*. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (mitsuda reaction) is linked to the human *NRAMP1* gene in Vietnamese leprosy sibships. *J Infect Dis*, 2000; **181**: 302–308.
- ⁴⁶ Ferreira FR, Goulart LR, Silva HD, Goulart IMB. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the *NRAMP1* promoter polymorphisms and the lepromin response. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2004; **72**: 457–467.
- ⁴⁷ Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K *et al*. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol*, 2005; **58**: 740–743.
- ⁴⁸ Wibawa T, Soebono H, Matsuo M. Association of a missense mutation of the laminin- α 2 gene with tuberculoid type of leprosy in Indonesian patients. *Trop Med Int Health*, 2002; **7**: 631–636.
- ⁴⁹ Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the Toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine*, 2002; **20**: 55–62.
- ⁵⁰ Malhotra D, Relhan V, Reddy BSN, Bamezai R. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum Genet*, 2005; **116**: 413–415.

- ⁵¹ Lee SB, Kim BC, Jin SH *et al.* Missense mutations of the interleukin-12 receptor beta 1 (IL12RB1) and interferon-gamma receptor 1 (IFNGR1) genes are not associated with susceptibility to lepromatous leprosy in Korea. *Immunogenetics*, 2003; **55**: 177–181.
- ⁵² Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K *et al.* A major susceptibility locus for leprosy on chromosome 10p13. *Nat Genet*, 2001; **27**: 439–441.
- ⁵³ Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR *et al.* A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J Infect Dis*, 2002; **186**: 1190–1193.
- ⁵⁴ Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N *et al.* Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet*, 2003; **33**: 412–415.
- ⁵⁵ Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* e *PACRG*. *Nature*, 2004; **427**: 636–640.
- ⁵⁶ Malhotra D, Darvisi K, Lohra M *et al.* Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of *PARK2* and *PACRG* genes with leprosy in an Indian population. *Eur J Hum Genet*, 2005 Dec 14; [Epub ahead of print].
- ⁵⁷ Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S *et al.* Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet*, 1997; **60**: 588–596.
- ⁵⁸ Shimura H, Hattori N, Kubo S *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature*, 2000; **25**: 302–305.
- ⁵⁹ Miller EN, Jamieson SE, Joberty C *et al.* Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun*, 2004; **5**: 63–67.
- ⁶⁰ Jamieson SE, Miller EN, Black GF *et al.* Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun*, 2004; **5**: 46–57.
- ⁶¹ Shin HD, Park BL, Kim YH *et al.* Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp Mol Med*, 2005; **37**: 128–132.
- ⁶² Greenwood CM, Fujiwara TM, Boothroyd LJ *et al.* Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including *NRAMP1*, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet*, 2000; **67**: 405–416.
- ⁶³ Jardim MR, Antunes SL, Simons B *et al.* Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Rev*, 2005; **76**: 232–240.

ORIGINAL ARTICLE

HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients

PR Vanderborcht¹, AG Pacheco², ME Moraes³, G Antoni⁴, M Romero³, A Verville⁵, VH Thai⁶, NT Huong⁶, NN Ba⁶, E Schurr⁵, EN Sarno¹ and MO Moraes¹

¹Leprosy Laboratory, Department of Mycobacterioses, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; ²Department of Epidemiology and Quantitative Methods in Health (DEMQS), Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; ³Immunogenetics Laboratory, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴INSERM U.550, Necker Medical School, Paris, France; ⁵Departments of Human Genetics, Medicine and Biochemistry, McGill Centre for the Study of Host Resistance, McGill University, Montreal, Canada and ⁶Hospital for Dermato-Venereology, Ho Chi Minh City, Vietnam

The host genetic background has been considered one of the factors that influence leprosy outcome, a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Genome scans demonstrated that the 6p21 region is associated with leprosy and a substantial number of population-based studies analyzing human leukocyte antigen (HLA) class II loci suggested association of HLA-DR with leprosy. However, some studies lacked robustness as they had limited power. Indeed, experimental designs require increased sample size to achieve adequate power, as well as replication studies with independent samples for confirmation of previous findings. In this work, we analyzed the influence of the HLA-DRB1 locus on leprosy susceptibility *per se* and disease type using a case–control design carried out in Brazilians (578 cases and 691 controls) and a replication study based on a family design in a Vietnamese population ($n = 194$ families). The results showed that HLA-DRB1*10 is associated with susceptibility to leprosy and HLA-DRB1*04 is associated with resistance, both in the Brazilian and Vietnamese populations suggesting that these alleles play an important role in the activation of cellular immune responses against *M. leprae*.

Genes and Immunity advance online publication, 29 March 2007; doi:10.1038/sj.gene.6364390

Keywords: HLA; polymorphism; leprosy; SNPs; mycobacteria; population

Introduction

Leprosy is a human infectious disease caused by the obligate intracellular pathogen, *Mycobacterium leprae*, which colonizes macrophages in skin and Schwann cells in peripheral nerves. Although the number of registered cases decreased in the past 20 years worldwide, leprosy still affects about 400000 individuals that are newly diagnosed each year. However, epidemiological data have shown that only a small percentage of people exposed to the bacillus develop the disease, suggesting that the majority of individuals are resistant, mounting effective cellular immune responses.¹ The clinical spectrum of leprosy includes two polar and three borderline forms classified according to clinical, histological and immunological features.² Indeed, the leprosy spectrum is classically used as a paradigm of immunological response. The activation of cellular immune responses characterized by the interferon gamma (IFN γ)/interleukin (IL)-12/23

axis is considered protective of leprosy *per se*.³ Some patients are able to mount a cellular immunity that restrains replication of the bacilli and spread of the disease without hampering disease progression. These patients exhibit a paucibacillary (PB) leprosy, of which the polar form is called tuberculoid.⁴ At the other pole, there are patients classified as lepromatous leprosy, which is a multibacillary (MB) form. These patients show very low cellular immunity characterized by *M. leprae*-specific T-cell unresponsiveness and high bacterial load.⁴ In this context, human leukocyte antigen (HLA) loci are crucial as antigen presentation is one of the pathways associated with cellular immune responses and differential levels of IFN γ secreted, and, consequently, the outcome of the disease.

Genetic factors have a strong influence on the leprosy-triggered immune response.^{5,6} Two recent genome scans have pinpointed chromosome 6p21 as a leprosy susceptibility locus.^{7,8} This region harbors the HLA gene cluster, which has been extensively studied for its role in leprosy pathogenesis.^{9–12} Candidate gene studies have detected association of leprosy with both class I and II genes. However, class II genes, especially the *DRB1* locus, have been found more consistently associated with leprosy.¹³

Several studies have reported association of HLA-DR2 (HLA-DR15 and DR16) with susceptibility to leprosy in

Correspondence: Dr MO Moraes, Leprosy Laboratory, Department of Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil.
E-mail: mmoraes@fiocruz.br
Received 27 October 2006; revised 2 January 2007; accepted 14 February 2007

India, Thailand and Brazil.^{14–16} Rani *et al.*¹⁷ confirmed these data by molecular typing, and reported association of *DRB1*1501* with leprosy susceptibility, whereas *DRB1*04* and *DRB1*07* were associated with resistance to leprosy. In addition, HLA-DR3 has been found associated with leprosy susceptibility in Surinam and Mexico.^{18,19} Some of these studies had limited power owing to low numbers of individuals recruited. Moreover, to avoid premature conclusions, independent replication studies with different populations for confirmation of previous findings are necessary in multifactorial diseases, such as leprosy.

Thus, to understand better the contribution of the *HLA-DRB1* locus to leprosy susceptibility we analyzed the distribution of *DRB1* alleles in two ways: a case-control study in a large sample of Brazilian individuals searching for associations between alleles and the disease and a family based study with a Vietnamese population analyzing transmission of *DRB1* alleles to leprosy affected children in simplex families, combining both aspects of adequate power and result replication.

Results

Distribution of HLA-DRB1 alleles and genotypes in a Brazilian population*

A total of 1269 Brazilian individuals (578 patients and 691 controls) were typed for *HLA-DRB1*. Table 1 shows the allelic frequency distributions in leprosy patients (MB and PB forms) and healthy controls along with the results of a log-linear model to identify alleles selectively enriched in either patients or controls. The *DRB1*13* allele was chosen as the baseline for comparisons because it is the most frequent allele both in the overall study population and also among the controls. Frequencies for *DRB1*15* and *DRB1*10* showed a significant increase among leprosy patients. On the other hand, the frequencies of *DRB1*04* and *DRB1*07* and *DRB1*12* were increased among healthy individuals. These results were significant, despite the low frequencies of *DRB1*10* (0.02 and 0.04 for controls and cases, respectively) and *DRB1*12* (0.02 and 0.01 for controls and cases, respectively) (Table 1). No statistically significant difference in the allelic frequency distributions was observed between MB and PB forms (Table 1).

In a further step we looked at the genotypic distributions of *HLA-DRB1*, collapsing all the alleles that were not significantly different in a unique group – herein called NN, leaving the other five in separate groups, studying their combinations as genotypes (Table 2). We also considered the intermarriage of the Brazilian population and investigated the ethnic-specific associations by stratifying the Brazilian population into Afro- and Euro-Brazilians (Table 2). The comparison of genotypic frequencies in patients and controls demonstrated that the heterozygous individuals carrying *DRB1*04* and *DRB1*07* had a significant decreased chance of developing the disease ((OR)=0.61, *P*-value=0.008; OR=0.66, *P*-value=0.022, respectively). Heterozygotes carrying *DRB1*10* and *DRB1*15* had an increased chance of developing leprosy, even though the significance was borderline for both groups (OR=1.83, *P*-value=0.083; OR=1.41, *P*-value=0.04, respectively) (Table 2). These results proved to be ethnic specific, as they are even stronger when data were stratified. For *DRB1*04* and *DRB1*07* the protection is stronger for Euro-Brazilians (OR=0.51, *P*-value=0.01; OR=0.53, *P*-value=0.01, respectively) whereas the risk is higher in Afro-Brazilians for both *DRB1*10* and *DRB1*15* (OR=3.21, *P*-value=0.024; OR=2.72, *P*-value=0.0002, respectively).

HLA-DRB1 alleles in Vietnamese leprosy patients*

To reinforce the results found among Brazilians we analyzed the role of *HLA-DRB1* alleles in Vietnamese leprosy simplex families (*n*=194) using a transmission disequilibrium test (TDT) design (Table 3). The associations observed in the Vietnamese families corroborated the results obtained for the Brazilian patients. The TDT analysis showed that the chance of transmission is lower for the *DRB1*04* allele (OR=0.48, *P*-value=0.03) whereas higher for *DRB1*10* (OR=2.03, *P*-value=0.04) (Table 3).

Discussion

Leprosy occurs in only a small percentage (1–3%) of infected people.¹ The risk of developing the disease depends on the ability to mount a protective cellular immune response against leprosy bacilli.¹³

Table 1 Allele frequency distribution of *HLA-DRB1** between leprosy patients vs controls and MB vs PB forms

<i>HLA alleles</i>	<i>Controls (n = 691)</i>	<i>Patients (n = 578)</i>	<i>P-value</i>	<i>MB (n = 371)</i>	<i>PB (n = 207)</i>	<i>P-value</i>
<i>DRB1*01</i>	0.10	0.12	0.41168	0.11	0.13	0.526031
<i>DRB1*03</i>	0.11	0.10	0.56475	0.09	0.12	0.343947
<i>DRB1*04</i>	0.12	0.09	0.04076	0.09	0.07	0.523217
<i>DRB1*07</i>	0.12	0.09	0.04753	0.09	0.09	0.827310
<i>DRB1*08</i>	0.05	0.06	0.80741	0.07	0.05	0.288540
<i>DRB1*09</i>	0.01	0.01	0.33784	0.01	0.02	0.118504
<i>DRB1*10</i>	0.02	0.04	0.02102	0.04	0.03	0.678100
<i>DRB1*11</i>	0.13	0.12	0.34813	0.11	0.13	0.683131
<i>DRB1*12</i>	0.02	0.01	0.04399	0.01	—	0.137320
<i>DRB1*13</i>	0.14	0.14	Baseline	0.14	0.14	Baseline
<i>DRB1*14</i>	0.03	0.03	0.88658	0.03	0.03	0.674096
<i>DRB1*15</i>	0.10	0.15	0.02288	0.14	0.16	0.530738
<i>DRB1*16</i>	0.04	0.05	0.55168	0.05	0.04	0.513072

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; MB, multibacillary; PB, paucibacillary. Bold rows express significant values (*P*<0.05).

Table 2 HLA-DRB1 genotypes in Brazilian population

HLADRB1* genotypes	Brazilian		Euro-Brazilian		Afro-Brazilian	
	P-value	OR	P-value	OR	P-value	OR
04/NN^a	0.008	0.61	0.01	0.51	0.47	0.81
04/04	0.33	0.54	0.23	0.37	0.65	1.56
04/07	0.83	0.91	0.77	0.86	0.97	1.03
04/10	0.89	1.08	0.89	1.11	0.85	0.79
04/12	—	—	—	—	—	—
04/15	0.42	1.37	0.46	1.46	0.93	0.93
07/NN^a	0.022	0.66	0.01	0.53	0.9	1.03
07/07	0.18	0.54	0.09	0.26	0.6	0.54
07/10	0.26	2.2	0.94	1.07	0.17	4.91
07/12	0.16	0.32	—	—	0.81	0.81
07/15	0.96	0.98	0.99	0.99	0.79	0.82
10/NN^a	0.083	1.83	0.77	1.16	0.024	3.21
10/10	—	—	—	—	—	—
10/12	0.69	0.61	—	—	0.68	1.79
10/15	0.07	4.17	0.31	3.25	0.08	6.91
12/NN^a	0.25	0.58	0.55	0.59	0.79	0.86
12/12	—	—	—	—	—	—
12/15	0.62	0.54	—	—	0.72	1.63
15/NN^a	0.04	1.41	0.79	0.94	0.0002	2.72
15/15	0.48	1.4	0.79	0.81	0.31	1.98

Abbreviation: OR, odds ratio.

^aNN, any other genotypes except DRB1* 04, 07, 10, 12 and 15. Genotypes not observed are represented as blank P-values and OR.

Bold rows express significant values ($P < 0.05$).

Table 3 Association of DRB1 with leprosy among Vietnamese families

HLA alleles	Vietnamese overall ^a	P-value	OR (CI 95%) ^b
DRB1*01	<0.01	—	—
DRB1*03	0.08	—	—
DRB1*04	0.07	0.03	0.48 (0.24–0.96)
DRB1*07	0.07	—	—
DRB1*08	0.03	—	—
DRB1*09	0.09	—	—
DRB1*10	0.08	0.04	2.03 (1.20–4.05)
DRB1*11	0.03	—	—
DRB1*12	0.26	—	—
DRB1*13	0.03	—	—
DRB1*14	0.07	—	—
DRB1*15	0.15	—	—
DRB1*16	0.04	—	—

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio.

^aEstimated on the parentals nontransmitted alleles.

^bAdditive model.

Bold rows express significant values ($P < 0.05$).

There is evidence that HLA polymorphisms modulate the cytokine profile of *M. leprae*-reactive CD4⁺ T cells and hence influence the cellular-mediated immune response. The cytokine profile from leprosy patients and healthy controls with *M. leprae*-derived heat shock proteins (hsp65 and hsp18) showed the induction of a Th1 cytokine profile such as IFN γ and IL-2 in the context of all HLA-DR restricted alleles, except HLA-DR1 and DR7, which induced a Th2 (IL-4) type response.²⁰ Indeed, the importance of HLA-DR was highlighted by Ottenhoff and coworkers,¹² showing that the majority of the restriction determinants for *M. leprae* reside in HLA-DR

and not in DP or DQ molecules.¹² Thus, HLA-DR antigens play a major role in the presentation of *M. leprae* antigens to T cells in leprosy patients.

In this work we show that certain haplotypes in the HLA-DRB1 locus are associated with susceptibility to and protection from leprosy, but not with disease type of the disease. Moreover, the results clearly point to ethnic-specific associations, denoted by the differences we found among Euro- and Afro-Brazilians, and also in respect to the Vietnamese population. Our results corroborate the findings in other studies and the strength of our study is twofold: (i) we were able to work with a relatively large sample size for a genetic case-control study, which allowed us to detect small differences as well as to rule out nonexisting associations; (ii) we were able to replicate part of the results in a different population, using a different analytical approach – TDT in Vietnamese families.

Previous studies analyzing the HLA-DRB1 locus in leprosy patients have shown different haplotypes associated with susceptibility or resistance in distinct populations and most of them point to HLA-DR2, more specifically HLA-DRB1*15.¹³ These studies have been conducted in very distinct populations such as Brazilians,¹⁶ Indians¹⁴ and Thais.¹⁵ Furthermore, HLA-DRB1*10 is associated with susceptibility and HLA-DRB1*04 is associated with resistance to leprosy, both in the Brazilian and Vietnamese populations (Tables 2 and 3). On the other hand, when the clinical forms of the disease were analyzed no statistical differences were observed with respect to the allelic frequency distribution between MB and PB groups (Table 1), showing that HLA-DRB1 locus is associated only with susceptibility of leprosy *per se* and not with disease type.

Corroborating these previous data, our paper suggests that HLA-DRB1*15 is important among Brazilians, and

points to an ethnic-specific effect as it is restricted to Afro-Brazilians, denoted by the increased ORs after stratification. Another interesting finding in this study is that HLA-DRB1*07 was also associated with leprosy resistance but only in Brazilians and the effect was restricted to Euro-Brazilians. The difference of HLA-DRB1*15 subtype distribution could be involved in an ethnic specificity of leprosy susceptibility. This is in accordance to the work of Moraes and coworkers,²¹ where different trends of HLA-DRB1*15 subtypes in Brazilians were shown. The observed frequencies of DRB1*1503 were higher among Afro- and lower or absent among Euro-Brazilians and the reverse was observed for DRB1*1501. The ethnic-specific profiles are actually corroborated by other studies. For example, work analyzing the distribution of HLA class I and class II allele haplotypes among Venezuelan mestizos showed the genes of Mongoloid, Negroid and Caucasoid origin have created a distinctive HLA genetic profile in this mestizo population that influences HLA frequencies and, consequently, disease susceptibility.²² Thus, although a clear ethnic specificity was observed when several alleles were compared, the association of HLA-DRB1*04 and DRB1*10 in Brazilian and Vietnamese individuals demonstrated that these alleles are major determinants of protective and susceptible cellular immune responses against *M. leprae*.

It is known that polymorphic residues in the binding cleft of HLA class II molecules control the binding of foreign peptides, and consequently, the immune response. For example, in HLA-DQB1 the presence of aspartic acid, instead of alanine, at codon 57 resulted in a significantly reduced ability to bind a peptide from the central region of the ESAT-6 protein and consequently less Ag-specific IFN- γ production from CD4⁺-T cells in tuberculosis patients was observed.²³ In HLA-DR, codon differences that could account for distinct levels of IFN γ and T-cell activation patterns are yet to be defined. On the basis of the results presented here, we could hypothesize that HLA-DRB1*04 would elicit a stronger cellular immune response, whereas HLA-DRB1*10 is involved with lower cellular immune levels. We would expect the same dichotomic pattern for HLA-DRB1*07 and HLA-DRB1*15, where the former induces higher and the latter lower levels of cellular immune response, but as the effect was observed only in Brazilians, the data suggest that the activation of immune responses through HLA is also dependent on other genes involved in specific pathways that could modulate the outcome of the disease.

In summary, infectious diseases are complex traits and besides HLA-DRB1, several other genes like IL-10, VDR and Parkin,^{9,24–27} have been implicated in leprosy susceptibility, corroborated by result replication in more than one population. Thus, it is likely that genetic heterogeneity is a common feature of this disease, but other genes are also involved, as expected in any complex trait.

Materials and methods

Patients

A total of the 578 Brazilian leprosy patients from the Leprosy Out-Patient Unit, Oswaldo Cruz Foundation

(FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) were included in this study. The control group was constituted of 691 healthy donor subjects from the same geographic area of Rio de Janeiro. Three hundred and seventy-one MB and 207 PB patients were studied covering the entire clinical spectrum of the disease (polar and borderlines forms). All individuals were ascertained according to their ethnicity as African-Brazilians and Euro-Brazilians. Both groups were equally distributed among cases and controls (46.7 vs 43.4% for Afro-Brazilians, respectively, P -value=0.23). This study has been approved by the Ethical Committee within FIOCRUZ. We also enrolled a second independent set of 194 simplex families to perform the replication study using a family based design, where two parents and one leprosy-affected child were selected. The phenotype characterization and the clinical classification of these patients have been described previously.²⁷ Ethical approval of the study was obtained from the Local Health Authorities in Ho Chi Min City, Vietnam and the Ethics Committee of the McGill University Health Centre, Montreal, Canada. All patients were diagnosed on the basis of clinical and bacteriological criteria and classified according to the Ridley and Jopling scale.²

DNA extraction and HLA-DRB1* typing

For Brazilian samples genomic DNA was prepared from frozen whole blood by a commercially available DNAzol extraction kit (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). HLA-DRB1 low-resolution typing was achieved after PCR amplification of exon 2 and reverse hybridization of the products by line probe assay (InnoLiPA – Innogenetics, Belgium).

For Vietnamese samples genomic DNA was extracted and typed according to methods described before.²⁷ The DRB1 alleles were identified using sequence-specific primers (SSP) for PCR amplification as described previously.²⁸

Statistical analysis

In Brazilians, log-linear and logistic regression models were used to test the association between alleles and genotypes, respectively, and leprosy. Gender and ethnicity were also used as covariables in our models, being the latter used to stratify our analyses as well. All the analyses for the Brazilian sample were carried out with R for Windows 2.1.1.²⁹ In the Vietnamese sample, a family-based association analysis was performed using the classical TDT as implemented in the software FBAT.³⁰ For the gene under study (*DRB1*) the transmission of each allele was compared to the transmission of all the others combined. P -values were computed using the empirical variance-covariance estimator,³¹ and tests were performed assuming either an additive or a dominant model. Alleles showing some evidence of association were also analyzed using conditional logistic regression to estimate odds-ratio.³² Conditional logistic analysis was performed using the PHREG procedure as implemented in the SAS software v.8.1 (SAS institute, Cary, NC, USA).

This study has adequate power to study the distribution of HLA alleles. Given that the distribution of alleles is multinomial, a power analysis via 10 000 simulations of the observed frequencies, considering the distribution of cases as the true alternative hypothesis, yielded the following results: α : 0.1; power: 92.61%; α : 0.05; power:

86.97%; α : 0.01; power: 69.48%. Sample size calculation ahead of time is a very important step of any study design. In our case, for a significance level of 0.05 (which is the one used in this study), given the distributions found in our samples we get 86.97% power, which is perfectly adequate for our purposes.

Acknowledgements

We are grateful to Alexandre Alcais for critical reading and analysis of the paper to Valcemir F Silva-Filho for technical assistance and Denise Vieira for collection of Brazilian samples. These studies were supported in part by PAPES/FIOCRUZ, CNPq.

References

- Kaplan G, Cohen ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lep Rev* 1986; **57**: 199–202.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity – a five group system. *Int J Lepr* 1966; **34**: 255–273.
- van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against *Mycobacteria* and *Salmonellae*. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**: 739–749.
- Sampaio EP, Moraes MO, Pessolani CVF, Sarno EN. The role of Th1 responses in *Mycobacterium leprae* infection. In: Kotb M, Calandra T (eds). *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Humana Press: NJ, 2003, pp 163–188.
- Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 1179–1185.
- Beiguelman B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1968; **17**: 584–594.
- Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun* 2004; **5**: 63–67.
- Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 2003; **33**: 412–415.
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH et al. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002; **11**: 1687–1691.
- Roy S, McGuire W, Mascie Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* 1997; **176**: 530–532.
- De Vries RRP, van Eden W, Ottenhoff THM. HLA class II immune response genes and products in leprosy. *Prog Allergy* 1985; **36**: 95.
- Ottenhoff TH, Neuteboom S, Elferink DG, de Vries RR. Molecular localization and polymorphism of HLA class II restriction determinants defined by *Mycobacterium leprae*-reactive helper T cell clones from leprosy patients. *J Exp Med* 1986; **164**: 1923–1939.
- Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lep Rev* 2006; **7**: 189–202.
- De Vries RRP, Mehra MK, Vaidya MC, Gupte MD, Khan PM, Van Rood JJ. HLA-linked control of susceptibility to tubercu-
loid leprosy and association with HLA-DR types. *Tissue Antigens* 1980; **16**: 89–112.
- Schauf V, Ryan S, Scollard D, Jonasson O, Brown A, Nelson K et al. Leprosy associated with HLA-DR2 and DQw1 in the population of northern Thailand. *Tissue Antigens* 1985; **26**: 243–247.
- Visentainer JE, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzl-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 1997; **30**: 51–59.
- Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA, Beena KR, Stastny P. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. *Tissue Antigens* 1993; **42**: 133–137.
- van Eden W, de Vries RR, D’Amaro J, Schreuder I, Leiker DL, van Rood JJ. HLA-DR-associated genetic control of the type of leprosy in a population from Surinam. *Hum Immunol* 1982; **4**: 343–350.
- Gorodezky C, Flores J, Arevalo N, Castro LE, Silva A, Rodriguez O. Tubercloid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. *Lep Rev* 1987; **58**: 401–406.
- Mitra DK, Rajalingam R, Taneja V, Bhattacharyya BC, Mehra NK. HLA-DR polymorphism modulates the cytokine profile of *Mycobacterium leprae* HSP-reactive CD4⁺ T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; **82**: 60–67.
- Moraes ME, Fernandez-Vina M, Stastny P. DNA typing for Class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. IV. Typing for alleles of HLA-DR2 group. *Hum Immunol* 1991; **31**: 139–144.
- Makhatadze NJ, Franco MT, Layrisse Z. HLA class I and class II allele and haplotype distribution in the Venezuelan population. *Hum Immunol* 1997; **55**: 53–58.
- Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfeld AE. Aspartic acid homozygosity at codon 57 of HLA-DQ beta is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *J Immunol* 2006; **176**: 1090–1097.
- Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 2005; **118**: 295–300.
- Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Waungulu LM, Crampin AC et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of Northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **71**: 330–340.
- Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 1999; **179**: 187–191.
- Mira MT, Alcais A, VanThuc N, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VH et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 e PACRG. *Nature* 2004; **427**: 636–640.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 h: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; **39**: 225–235.
- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2005.
- Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 301–306.
- Lake SL, Blacker D, Laird NM. Family based tests of association in the presence of linkage. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 1515–1525.
- Schaid DJ, Rowland C. Use of parents, sibs, and unrelated controls for detection of associations between genetic markers and disease. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 1492–1506.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)