

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Estudo da associação entre polimorfismos de base
única (SNPs) nos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* e a
suscetibilidade à hanseníase**

Cynthia Chester Cardoso

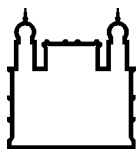
RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Cynthia Chester Cardoso

**Estudo da associação entre polimorfismos de base única (SNPs)
nos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* e a suscetibilidade à hanseníase**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO
2009

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

C268

Cardoso, Cynthia Chester.

Estudo da associação entre polimorfismos de base única (SNPs) nos genes IL10, IFNG e TNF e a suscetibilidade à hanseníase / Cynthia Chester Cardoso. – Rio de Janeiro, 2009.

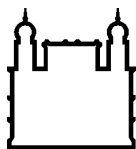
xiv, 149 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 105-121

1. Hanseníase. 2. Suscetibilidade. 3. Polimorfismos. 4. Citocinas I.
Título.

CDD 616 998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Cynthia Chester Cardoso

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs)
NOS GENES *IL10*, *IFNG* E *TNF* E A SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE**

Orientador: Dr. Milton Ozório Moraes

Aprovada em: 30/10/2009

EXAMINADORES:

Dra. Euzenir Nunes Sarno – Fundação Oswaldo Cruz – Presidente

Dr. Marcelo Távora Mira – Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Titular

Dr. Adalberto Rezende Santos – Fundação Oswaldo Cruz – Titular

Dr. Antônio Guilherme F. Pacheco – Fundação Oswaldo Cruz – Suplente/Revisor

Dra. Danuza Esquenazi – Fundação Oswaldo Cruz – Suplente

Rio de Janeiro, 30 Outubro de 2009

“Os biólogos nunca perdem a empolgação pela descoberta científica... nem o amor pela perseguição de novas idéias, novos vislumbres, novos organismos... Ser biólogo não significa ter um emprego; significa escolher um estilo de vida.”

Ernst Mayr
“Isto é biologia”

Agradecimentos

A Deus, a maior de todas as fontes de inspiração. De onde mais viria a força e a perseverança para levar adiante uma tarefa tão laboriosa?

Aos meus pais, Ricardo e Cátia, meus eternos exemplos de caráter. Agradeço o amor e também o apoio incondicional a todas as minhas decisões.

Ao meu marido, Henrique, pelo amor, paciência, companheirismo e pelo bom humor eterno, que me ajuda a levar a vida com mais leveza.

Ao meu orientador, Dr. Milton Moraes, pela oportunidade de desenvolver mais este trabalho. Agradeço pelos acertos e até pelos erros, porque todos acabam contribuindo igualmente para a formação dos alunos. Acima de tudo, serei eternamente grata pela confiança e pelo tratamento como igual, que me permitiram evoluir muito como profissional e me tornar mais independente a cada dia.

A Antônio Pacheco, por fazer parte deste trabalho como um todo. Pela contribuição nas análises estatísticas, desenhos de estudo, elaboração de artigos e pela cuidadosa revisão deste manuscrito.

À Dra. Euzenir Sarno e a todos os membros da equipe do Ambulatório Souza Araújo, pelo recrutamento dos pacientes e disponibilização das amostras e informações. Sem eles, este projeto seria impossível.

Às colaboradoras Ana Carla, Vânia e Ida e a todos os demais integrantes da equipe do Instituto Lauro de Souza Lima, pela sólida colaboração que enriqueceu muito este trabalho.

À Dra. Sandra Duraes e à Dra. Maria Leide de Oliveira, pela construção do banco de famílias de Duque de Caxias.

À equipe do Dr. Marcelo Távora Mira, da PUC do Paraná, pela colaboração no projeto de TNF e em alguns outros ainda por finalizar.

À grande amiga Sabrina, a quem tenho como uma irmã, por fazer parte desta história. Agradeço a amizade, o apoio e a presença marcante nos momentos mais importantes da minha vida.

Às não menos queridas amigas Carol e Luciana, que me acompanham desde a época da graduação. Agradeço o apoio, compreensão e amizade constantes tanto na vida pessoal quanto na profissional.

À “minha aluna” Suelen, pela ajuda na parte de bancada. Sem ela eu jamais teria tido o tempo disponível para me dedicar a uma maior formação na área de desenhos de estudo e análise de dados.

Às amigas Alejandra e Xuxu, pela paciência e boa vontade nestes últimos dias e pela valiosa contribuição na formatação deste manuscrito.

A todos os demais amigos do laboratório de hanseníase (sala 19), incluindo aqueles que já não fazem mais parte da nossa equipe: Patrícia Rosa, Viviane, Sidra, Luana, Flávia, Guilherme, Diogo, Carol Marques, Cláudia, Matilde, Paula, Marcelo, Alice, Tiana, Thiago, Carolzinha, Amina, Graça, Lucía, Valcemir, Sandro e Ricardo, pela convivência divertida e harmoniosa que sempre tivemos no laboratório.

A todos os demais amigos do Pavilhão de Hanseníase, pelo convívio agradável e pelas divertidas conversas de corredor.

A todos os funcionários do Departamento, cujas atividades são essenciais para viabilizar o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa integral.

A todos os demais amigos e colaboradores que não tenham sido listados, mas que tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Índice

Lista de siglas e abreviaturas.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
Capítulo 1.....	1
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Hanseníase: aspectos gerais.....	1
1.1. Epidemiologia.....	1
1.2. Diagnóstico e classificação.....	2
1.3. O <i>Mycobacterium leprae</i>	4
1.4. A relação patógeno-hospedeiro na hanseníase	6
1.4.1. Mecanismos de interação entre o <i>M. leprae</i> e as células fagocitárias.....	6
1.4.2. Resposta imune ao <i>M. leprae</i> e o espectro clínico da hanseníase	7
1.4.3. Desenvolvimento de episódios reacionais	9
1.4.4. Mecanismos de neuropatogênese	10
2. Suscetibilidade genética a doenças infecciosas	12
2.1. Estratégias de estudo	14
3. Suscetibilidade genética à hanseníase	16
3.1. Estudos observacionais	17
3.2. Estudos de rastreamento genômico	18
3.3. Genes candidatos	19
3.4. Polimorfismos genéticos e o desenvolvimento de complicações clínicas na hanseníase.....	21
4. Papel dos genes <i>TNF</i> e <i>LTA</i> na suscetibilidade à hanseníase	22
5. Variações no gene <i>IL10</i> e a suscetibilidade à hanseníase	25
6. Papel do eixo IL-12/IL-23/IFN- γ na suscetibilidade genética à hanseníase	27
II. OBJETIVOS.....	29
1. Objetivo geral.....	29
2. Objetivos específicos.....	29
Capítulo 2: Análises genéticas, epidemiológicas e biológicas de polimorfismos de base única na região promotora do gene da interleucina 10 sugerem uma participação definitiva do marcador -819 C/T na suscetibilidade à hanseníase.....	30

Capítulo 3: Associação entre o polimorfismo de base única <i>IFNG</i>+874 T/A e a hanseníase em brasileiros	43
Capítulo 4: Avaliação do polimorfismo de base única <i>TNF</i> -308G/A como um marcador específico de suscetibilidade à hanseníase em brasileiros.....	70
Capítulo 5	91
I. DISCUSSÃO	91
II. CONCLUSÕES	104
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXO I: Genética da resposta imune na hanseníase	122
ANEXO II: Polimorfismos <i>IFNG</i> +874T/A, <i>IL10</i> -1082G/A e <i>TNF</i> -308G/A em associação com a suscetibilidade à tuberculose: um estudo de meta-análise.....	137

Lista de siglas e abreviaturas

- 3'UTR: região 3' não traduzida de um gene.
- 5'UTR: região 5' não traduzida de um gene.
- BAAR: bacilo álcool-ácido resistente.
- BB: borderline-bordeline
- BL: borderline-lepromatosa
- BT: borderline-tuberculóide
- CD: molécula diferenciadora de subgrupos celulares, do inglês “cluster differentiator”.
- DC-SIGN: receptor de células dendríticas, do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin”.
- DN: dano neural.
- DNA: ácido desoxirribonucleico.
- ENH: Eritema nodoso hansênico, também denominada Reação do Tipo 2.
- HLA: antígeno leucocitário humano, do inglês “human leukocyte antigen”.
- HLP: proteína do *M. leprae* que se assemelha à histona, do inglês “histone-like protein”.
- I: hanseníase indeterminada.
- IFN- γ : interferon-gama.
- IL: interleucina.
- IL-1 β : interleucina 1 beta.
- LAM: lipoarabinomanana
- LIR: receptor leucocitário semelhante à imunoglobulina, do inglês “leukocyte immunoglobulin-like receptor”.
- LL: lepromatosa.
- LPS: lipopolissacarídeo.
- LT- α : linfotóxina alfa.
- MB: multibacilar.
- MBL: lectina ligadora de manose.
- MS: Ministério da Saúde
- MSMD: Suscetibilidade Mendeliana a Doenças Micobacterianas.
- NRAMP: proteína associada à resistência natural de macrófagos, do inglês “natural resistance-associated macrophage protein”.
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PACRG: gene que compartilha o promotor do gene PARK2, do inglês “parkin co-regulated gene”.
- PARK2: gene que codifica a proteína parkina.
- PB: paucibacilar.

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGL-1: glicolípido fenólico 1.

PN: forma neural pura, também conhecida como hanseníase neurítica.

PQT: poliquimioterapia.

RNA: ácido ribonucléico.

RR: Reação reversa, também denominada Reação do Tipo 1.

SLC11A1: gene que codifica a proteína conhecida como NRAMPI. A sigla vem do inglês “solute carrier family 11, member 1”.

SNPs: polimorfismos de base única, do inglês “single nucleotide polymorphisms”.

STRs: polimorfismos do tipo microssatélite, do inglês “short tandem repeats”.

TDT: teste de desequilíbrio de transmissão

TGF- β : fator de crescimento e transformação beta, do inglês “transforming growth factor beta”.

Th1/Th2: linfócitos T auxiliares 1 e 2, do inglês “T helper”.

TLR: receptores Toll, do inglês “Toll-like receptors”.

TN: Tamil Nadu.

TNF: fator de necrose tumoral

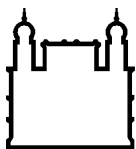
TT: tuberculóide.

VDR: receptor de vitamina D.

WHO: do inglês “World Health Organization”

Lista de Figuras

Figura 1: Estágios da interação entre o homem e o ambiente durante o curso das infecções.....	14
Figura 2: História natural da hanseníase.....	17
Figura 3: Representação esquemática da distribuição dos principais polimorfismos nos genes <i>TNF</i> e <i>LTA</i>	23
Figura 4: Participação de genes e regiões cromossômicas nos diferentes estágios da hanseníase.....	97
Figura 5: Sobreposição de eixos na resposta imune a doenças micobacterianas	100



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

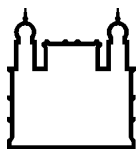
ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs) NOS GENES *IL10*, *IFNG*
E *TNF* E A SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Cynthia Chester Cardoso

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*. Dados obtidos a partir de diferentes estudos epidemiológicos têm fornecido evidências a respeito da participação de um componente genético humano tanto no desenvolvimento da doença, quanto nas formas clínicas. Até então, polimorfismos de base única (SNPs) nos genes *PARK2/PACRG*, *HLADRB1* e *LTA* foram consistentemente associados à hanseníase em estudos independentes de populações etnicamente distintas. Já o efeito dos SNPs nos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* ainda precisa ser determinado. Por esta razão, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a associação destes genes na suscetibilidade à hanseníase através do desenvolvimento de novos estudos de associação na população brasileira, e também de meta-análise de dados já publicados. Inicialmente, um novo estudo caso-controle foi realizado com o objetivo de verificar o efeito de haplótipos do gene *IL10* na hanseníase utilizando uma amostra de Bauru, Estado de São Paulo. Os novos dados foram então incluídos em uma meta-análise de estudos caso-controle em que foi verificada a associação do SNP *IL10* -819C/T à hanseníase. As razões de chance (ORs) geradas refletiram um risco aumentado de desenvolver a doença entre carreadores do alelo -819T (OR = 1,40; p = 0,01). Em seguida foram conduzidos dois estudos de caso-controle independentes para determinar o efeito de SNPs no gene *IFNG* sobre a hanseníase. Os resultados revelaram um efeito protetor étnico-específico do alelo +874T nas populações de Bauru (OR = 0,40; p = 0,004) e Rio de Janeiro (OR = 0,59; p = 0,01). Na terceira etapa do projeto foi verificada a participação do SNP *TNF* -308G/A na suscetibilidade à doença. O projeto incluiu o desenvolvimento de um novo estudo caso-controle em Bauru, além de dois novos estudos de associação em famílias do Rio de Janeiro e da Colônia do Prata, no Estado do Pará. A meta-análise dos dados foi então conduzida para gerar estimativas de consenso de risco, que pudessem de fato refletir o efeito deste SNP no desfecho da hanseníase. Embora os dados dos novos estudos não tenham sido significativos, os mesmos sugeriam um efeito protetor do alelo -308A. A meta-análise dos dados publicados não identificou associação entre este SNP e a hanseníase independente da inclusão dos novos estudos. Em contrapartida, quando apenas os estudos em brasileiros foram incluídos, verificou-se um efeito protetor do alelo -308A, sugerindo que a associação seja específica para esta população (OR = 0,6; p = 0,003). Os resultados obtidos confirmaram a associação dos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* a suscetibilidade à hanseníase e sugerem ainda que o SNP *IFNG* +874T/A possa ser um marcador de suscetibilidade a doenças micobacterianas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF ASSOCIATION BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs) IN THE *IL10*,
IFNG AND *TNF* GENES AND SUSCEPTIBILITY TO LEPROSY

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Cynthia Chester Cardoso

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the obligatory intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*. Several epidemiological pieces of evidence have supported a role for the host genetic component in both disease outcome and its clinical forms. To date, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes *PARK2/PACRG*, *HLADRBI* and *LTA* have been consistently associated with leprosy in independent studies of ethnically distinct populations. Conversely, a definitive role for *TNF*, *IL10* and *IFNG* SNPs in leprosy susceptibility remains to be determined. The aim of the present study was to characterize the association of these genes in leprosy susceptibility by developing new genetic association studies using Brazilian subjects, and also through meta-analysis of published data. First, we conducted a new case-control analysis to assess the effect of *IL10* haplotypes in leprosy development in a population of Bauru, a municipality of the São Paulo State. Then, we included these new data in a meta-analysis of case-control studies in which the association between the *IL10* -819C/T SNP and leprosy susceptibility was assessed. The pooled odds ratio (OR) reflected a higher risk of leprosy development among -819T carriers (OR = 1.40; p = 0.01). Then, we developed two independent case-control studies to determine the role of *IFNG* SNPs in disease outcome. As a result, we found an ethnic-specific association between the +874T allele and protection against leprosy, first in Bauru (OR = 0.40; p = 0.004) and also in a replication study conducted among individuals from the city of Rio de Janeiro (OR = 0.59; p = 0.01). The third step of this project aimed to determine the role of the *TNF* -308G/A SNP on the susceptibility to leprosy *per se*. The study included the development of an additional case-control study and also two family-based association analyses using subjects from Bauru, Rio de Janeiro and the Prata Colony, in the Pará State, respectively. Next, a meta-analysis was conducted to determine a consensus pooled risk estimates that could properly reflect the effect of this SNP in leprosy outcome. Although not significant, results of the three association studies suggested a role of the -308A allele in protection against leprosy. No association was found when the meta-analysis either with the published data alone or after the inclusion of our newly generated data. Nevertheless, a consistent protective effect was found when only studies involving Brazilian subjects were included, suggesting a population-specific effect (OR = 0.6; p = 0.003). Our new findings confirm the role of the genes *IL10*, *IFNG* and *TNF* in leprosy susceptibility and suggest the SNP *IFNG* +874T/A as a marker of susceptibility to mycobacterial diseases.

Capítulo 1

I. INTRODUÇÃO

1. Hanseníase: aspectos gerais

A hanseníase é uma das doenças mais antigas que acometem o homem. Recebeu este nome em homenagem a Gerhard Henrik Armauer Hansen, médico e botânico norueguês que contrariou a antiga hipótese de transmissão hereditária da doença em 1873, ao identificar e descrever a bactéria *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) como o agente causador da doença. Esta, infecta preferencialmente os macrófagos da pele e as células de Schwann nos nervos periféricos (Kaplan & Cohn, 1986), gerando um quadro clínico de inflamação crônica associado a uma neuropatia periférica que pode resultar em seqüelas irreversíveis.

O contágio entre seres humanos através das secreções nasais tem sido sugerido como a forma mais provável de transmissão. Deste modo, o contato íntimo e prolongado com os pacientes, especialmente os de alta carga bacilar, constitui um importante fator determinante para a transmissão do bacilo. Sendo assim, os indivíduos residentes na mesma casa dos pacientes (contatos domiciliares) são considerados um grupo de alto risco de desenvolvimento da doença e, por esta razão, permanecem sob constante vigilância por parte das equipes de saúde. Contudo, ainda que a infecção pelo *M. leprae* seja a causa primária da doença, sabe-se hoje que esta doença apresenta um caráter multifatorial, em que condições de risco relacionadas ao hospedeiro e ao ambiente desempenham um papel tão importante quanto o do *M. leprae* no desenvolvimento da fase clínica da infecção (Moraes e col., 2006). Mesmo assim, a impossibilidade de cultivo *in vitro* do *M. leprae* combinada à ausência de modelos animais que sejam capazes de mimetizar a doença humana contribui para a permanência ainda hoje de diversos questionamentos a respeito da patogênese da hanseníase.

1.1. Epidemiologia

A hanseníase acomete aproximadamente 250.000 indivíduos a cada ano em todo o mundo. Atualmente, esta doença ainda é endêmica em diversos países com baixos níveis de desenvolvimento sócio-econômico, dentre os quais se destacam o Brasil e a Índia, que concentram os maiores números absolutos de casos. Estatísticas recentes demonstram que Brasil, Nepal e Timor Leste constituem o grupo de países que ainda não foram capazes de

alcançar a prevalência máxima de 1 caso para cada 10.000 habitantes, estabelecida como meta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), apresentando prevalências de 2,40, 1,18 e 1,23 casos a cada 10.000 habitantes, respectivamente. De fato, dos 254.525 novos casos de hanseníase registrados em 2007, 54% ocorreram na Índia, enquanto Brasil, Nepal e Timor Leste concentraram em conjunto outros 23% deste total (WHO, 2008).

Estima-se que sejam registrados aproximadamente 40.000 novos casos de hanseníase no Brasil a cada ano, dos quais 8% são detectados em menores de 15 anos (WHO, 2008). Em 2007, a taxa de detecção do Brasil foi de 21,2/100.000 habitantes, considerada muita alta. As regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste concentram o maior número de casos, com taxas de detecção de 54,3, 41,2 e 31,7 a cada 100.000 habitantes, configurando um quadro de hiperendemicidade. Dados recentes do Ministério da Saúde (MS) chamam atenção ainda para o alto potencial incapacitante da doença, uma vez que cerca de 3.000 casos já são diagnosticados com deformidades físicas instaladas (Ministério da Saúde, 2008), o que sugere que o diagnóstico seja tardio e ineficiente, o que por sua vez contribui para a continuidade da transmissão.

1.2. Diagnóstico e classificação

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, tendo como base a sintomatologia observada durante os exames dermatológico e neurológico. Os sinais cardinais da hanseníase são representados por lesões cutâneas com nervos espessados e sensibilidade alterada em 70% dos casos (Gallo e col., 2005). Em alguns casos, a confirmação do diagnóstico requer o uso de testes laboratoriais. Neste caso, a baciloscopia, a sorologia e a histopatologia são os testes mais utilizados, sendo a histopatologia uma análise de grande utilidade para a classificação clínica do paciente. Em casos mais complicados, faz-se necessário o uso de técnicas moleculares tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de detectar e quantificar o DNA de *M. leprae* em amostras clínicas (Martinez e col., 2006), bem como determinar a viabilidade do bacilo (Martinez e col., 2009).

A principal classificação para as formas clínicas da hanseníase foi proposta na década de 60, tendo como base aspectos clínicos, imunológicos (reação à lepromina), baciloscópicos e histológicos. De acordo com esta classificação, o espectro clínico da hanseníase inclui 5 formas clínicas e apresenta dois pólos opostos. O primeiro deles, conhecido como tuberculóide (TT), representa a forma mais localizada da doença, em que as lesões de pele geralmente têm baciloscopia negativa e os indivíduos têm reação positiva à lepromina. O segundo pólo é composto pelos indivíduos lepromatosos (LL), os quais apresentam lesões com índice

baciloscópio alto e reação negativa à lepromina. Completando o espectro de manifestações clínicas característico da hanseníase, existem ainda três formas intermediárias denominadas “borderlines”. Estas são representadas pelas formas borderline-tuberculóide (BT), borderline-bordeline (BB) e borderline-lepromatosa (BL), classificadas com base na proximidade a cada um dos pólos (Ridley & Jopling, 1966). Posteriormente, a forma indeterminada da doença (I) foi descrita como sendo um estágio inicial e transitório, que evolui para uma das cinco formas clinicamente estáveis (Jopling e Mc Dougall, 1988).

O tratamento da hanseníase se dá através da poliquimioterapia (PQT), a qual prevê a administração combinada de dapsona, rifampicina e clofazimina em doses e esquemas diferenciados de acordo com a carga bacilar do paciente. Por esta razão, a OMS propôs outro método classificatório com fins terapêuticos, segundo o qual os pacientes são subdivididos em dois grandes grupos com base no exame baciloscópio dos esfregaços de linfa cutânea (Gallo e col., 2005). De acordo com este método, são classificados como paucibacilares (PB) os casos com baciloscopia negativa (normalmente pacientes da forma BT e TT), e multibacilares (MB) aqueles com baciloscopia positiva (normalmente os BB, BL e LL). A OMS sugere ainda a utilização de uma classificação essencialmente clínica com base no número de lesões cutâneas para uso em áreas endêmicas onde métodos diagnósticos laboratoriais não sejam disponíveis ou confiáveis. Nesta classificação simplificada os pacientes são chamados paucibacilares quando apresentam de uma a cinco lesões de pele, ou multibacilares, caso apresentem mais de cinco lesões de pele (WHO, 2004).

Independentemente das classificações com embasamento imunológico ou baciloscópio, existe ainda uma denominação específica para os casos em que os danos neurais apresentam-se isoladamente, na forma de uma neuropatia periférica caracterizada por disfunção motora, sensorial ou por ambas. Este tipo de manifestação clínica é denominado forma neural pura, ou hanseníase neurítica, cujo diagnóstico exige a realização de biópsias de nervo periférico devido à ausência de lesões cutâneas (Jardim e col., 2003).

1.3. O *Mycobacterium leprae*

O bacilo de Hansen apresenta tropismo por macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos, o que explica as lesões anestésicas características da doença. É considerada intracelular obrigatória e também é capaz de infectar outros tipos celulares tais como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, bem como afetar as mucosas das vias aéreas superiores, olhos, vísceras abdominais, linfonodos, medula óssea, testículos e ovários. As principais características do bacilo incluem alta infectividade e baixa patogenicidade, tanto em função de sua própria fisiologia quanto da relação com o hospedeiro e o ambiente em que este último se encontra. A multiplicação é lenta, com um período de incubação médio entre 3 e 5 anos na maior parte dos casos. A faixa ideal de temperatura para esta multiplicação é de 27 a 30°C, o que explica não só o fato de o bacilo se concentrar em áreas superficiais do corpo humano, mas também a sua capacidade de sobreviver em tatus e porções distais do corpo de roedores (Britton & Lockwood, 2004).

Morfologicamente, o *M. leprae* apresenta-se como um bastonete reto ou ligeiramente encurvado. É dito álcool-ácido resistente (BAAR) devido ao fato de corar-se de vermelho pela fucsina e manter esta coloração mesmo após a lavagem com solução álcool-ácida (Ress, 1985). Apresenta um envoltório celular composto pela membrana plasmática, parede celular e uma camada mais externa rica em lipídios complexos, distintos daqueles normalmente observados em outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Muitas das propriedades relativas à virulência e a sobrevivência do *M. leprae* no interior da célula hospedeira parecem estar associadas à estrutura característica do seu envelope.

O genoma completo do *M. leprae* foi publicado em 2001. A partir desta seqüência o tamanho do genoma foi caracterizado como tendo 3,27 Mb, conteúdo G+C médio de 57,8 % e 1604 genes. A partir da comparação com o genoma do *M. tuberculosis* é possível constatar uma perda maciça de genes pelo *M. leprae*, o que poderia explicar tanto a lenta taxa de crescimento do bacilo, quanto sua incapacidade de crescimento *in vitro* (Cole e col., 2001).

O genoma do *M. leprae* contém 1.116 pseudogenes que equivalem à cerca de 27% do seu genoma total. A análise funcional dos genes preservados no *M. leprae* revela uma integridade na maioria das vias anabólicas e a presença de deleções e mutações em algumas vias catabólicas essenciais (Vissa e Brennan, 2001). A maioria dos genes perdidos pelo *M. leprae* codificam enzimas essenciais (isoenzimas) que se apresentam duplicadas no genoma de *M. tuberculosis*, o que demonstra uma grande redundância no genoma deste patógeno. A presença de um número

tão elevado de pseudogenes reflete a enorme adaptação do *M. leprae* ao ambiente intracelular. Recentemente, alguns trabalhos têm sugerido um papel funcional para alguns dos pseudogenes do *M. leprae* já que eles se apresentam aumentados na infecção e podem até mesmo ser detectados na pele de pacientes com hanseníase (Nakamura e col., 2009). Curiosamente alguns RNAs não codificantes são altamente expressos o que poderia sugerir se tratar de RNA reguladores, mas essas sequências de *M. leprae* não têm nenhuma similaridade nucleotídica com as sequências padrão dessas classes de RNAs em outros organismos (Akara e col., 2009). Mesmo assim, a análise detalhada da estrutura genômica dos pseudogenes revela que embora eles sejam transcritos por estarem “in-frame” com outros genes, dentre outras características, há uma série de mecanismos reguladores pós-transcricionais que silenciam a sua tradução (Williams e col., 2009).

Em 2005, um trabalho multinacional demonstrou claramente a reduzida variabilidade do *M. leprae*. Esse trabalho utilizou 7 cepas de *M. leprae* obtidas da Etiópia, Brasil, México, Tailândia, Estados Unidos e duas obtidas da Índia. A cepa indiana de Tamil Nadu (TN) foi utilizada como base para as comparações, as quais foram capazes de revelar um padrão de agrupamento filogenético apenas quando foram utilizados polimorfismos de base única (SNPs, do inglês “single nucleotide polymorphisms”) como marcadores. Mais especificamente, as análises com SNPs foram capazes não apenas de detectar diferenças entre as cepas, mas também de fornecer evidências para a formulação de hipóteses a respeito da rota de disseminação da doença por todo o mundo (Monot e col., 2005). A reduzida variabilidade do *M. leprae* sugere que as variações do hospedeiro seriam o fator determinante para a suscetibilidade genética à hanseníase e suas complicações. Mais recentemente, estudos conduzidos com alguns isolados de pacientes de hanseníase têm sugerido a existência de uma nova espécie de micobactéria, o *M. lepromatosis*. A análise mais detalhada de sequências de RNAr 16S de genes sugere uma divergência no nível de espécie (Han e col., 2008; Han e col., 2009). Os dados até agora dessa nova espécie responsável por hanseníase são baseados unicamente em evidências moleculares com poucos casos clínicos. Portanto, uma investigação epidemiológica pormenorizada é necessária para saber se de fato essa nova espécie é importante para a saúde pública e se poderia ajudar a entender os padrões polares de resposta imune na hanseníase.

1.4. A relação patógeno-hospedeiro na hanseníase

Após a infecção pelo *Mycobacterium leprae*, o hospedeiro pode evoluir para a cura espontânea, o que ocorre em 97-99% dos casos, ou para uma das diversas manifestações clínicas da hanseníase. Desta forma, pode-se dizer que as respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro

interferem no desenvolvimento da doença em dois estágios principais. O primeiro deles consiste no controle da infecção *per se* e, uma vez que o indivíduo desenvolve a doença, os padrões de resposta imune tendem a influenciar diretamente a forma clínica que o paciente irá desenvolver. Em virtude desta correlação direta entre o espectro clínico da hanseníase e o estado imunológico do paciente, que vai desde uma resposta exacerbada até uma ausência total de resposta contra o bacilo, a hanseníase tem servido como “modelo” humano para o estudo dos mecanismos de resistência e suscetibilidade da resposta imune a micobactérias ou mesmo a patógenos intracelulares.

1.4.1. Mecanismos de interação entre o *M. leprae* e as células fagocitárias

Após a entrada do *M. leprae* no organismo hospedeiro, ele deve obrigatoriamente ser internalizado por uma célula de modo a garantir a sua sobrevivência. De uma maneira geral, a internalização do bacilo se dá através de uma interação entre as moléculas de superfície do mesmo e os receptores localizados na membrana da célula hospedeira. Mais especificamente, estudos direcionados ao entendimento dos mecanismos de fagocitose do *M. leprae* pelos macrófagos descreveram inicialmente a interação entre o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) e componentes do sistema complemento (Schlesinger & Horwitz, 1991). Análises subsequentes culminaram na descrição de uma participação importante dos receptores Toll (TLRs, do inglês “Toll-like receptors”), receptores de manose (MBL) e DC-SIGN (do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin”) no processo de reconhecimento das moléculas de superfície e internalização do bacilo (Krutzik e col., 2003 e 2005; Kang e col., 2005).

A ativação dos macrófagos em resposta ao estímulo do fator de necrose tumoral (TNF) e IFN- γ induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais são responsáveis pela eliminação do bacilo após a fagocitose (Bekker e col., 2001). Durante este processo, componentes micobacterianos tais como o lipoarabinomana (LAM, comum a *M. tuberculosis* e *M. leprae*) e o PGL-1 (exclusivo do *M. leprae*) têm sido descritos como moduladores da resposta imunológica. De acordo com a literatura, o LAM pode tanto estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF e a interleucina 1 beta (IL-1 β) quanto modular a atividade microbicida dos macrófagos ao inibir a produção de IFN- γ (Adams e col., 1993). Já o PGL-1, presente tanto na superfície da bactéria quanto livre no tecido infectado, foi descrito como supressor da atividade imune celular e da produção de IFN- γ , além de ser capaz de modular a produção de TNF *in vitro* (revisto por Sampaio e col., 2003) e inibir o metabolismo

oxidativo do macrófago, impedindo a destruição das bactérias (Neill & Klebanoff, 1988). Estes dados, em conjunto, refletem a constante interação entre o *M. leprae* e a célula hospedeira e evidenciam a importância desta interação na manutenção de uma relação de equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro.

1.4.2. Resposta imune ao *M. leprae* e o espectro clínico da hanseníase

Assumindo o modelo de duas fases proposto anteriormente, nos indivíduos em que a resposta imune não é capaz de controlar a infecção ocorre o desenvolvimento de uma das formas clínicas da hanseníase, dependendo da capacidade do hospedeiro de montar uma resposta imune eficiente e conseqüentemente contera proliferação do bacilo.

Dentre as diversas moléculas que atuam na resposta protetora, as moléculas de HLA (do inglês “human leukocyte antigen”) merecem destaque devido ao seu papel fundamental de apresentação dos antígenos de *M. leprae* aos linfócitos do hospedeiro, desencadeando o processo de ativação destas células e o conseqüente desenvolvimento da resposta celular. Visando um melhor entendimento da participação do HLA na ativação da resposta imune ao *M. leprae*, Thole e colaboradores (1999) desenvolveram estudos que visavam a identificação de antígenos capazes de desencadear respostas protetoras de diferentes intensidades, de modo a determinar quais indivíduos expostos seriam capazes de manter a infecção subclínica e quais viriam a desenvolver as formas clínicas mais ou menos severas. Conforme esperado, os resultados demonstraram a existência de perfis antigênicos diferentes dentre os indivíduos avaliados. Em contrapartida, não foi identificado nenhum tipo exclusivo de antígeno que pudesse desencadear padrões de resposta diferentes em indivíduos sadios e afetados. Dentre o repertório analisado, foi demonstrada a importância de peptídeos provenientes de proteínas de choque térmico e de antígenos do complexo 85B como desencadeadores de resposta imune ao *M. leprae* (Thole e col., 1999).

Ainda no contexto dos receptores celulares, estudos das vias de ativação e sinalização celular demonstraram um papel fundamental do receptor Toll 2 (TLR2) ao sugerir que o homodímero TLR2 e o heterodímero TLR2/TLR1 sejam os únicos capazes de promover a ativação celular na presença de lipoproteínas do *M. leprae* (Krutzik e col., 2003). Em 2005 o mesmo grupo demonstrou a capacidade dos receptores Toll de promover a diferenciação de monócitos tanto em macrófagos DC-SIGN⁺ quanto em células dendríticas CD1b⁺ (Krutzik e col., 2005). A análise conjunta de ambos os estudos fornece evidências inquestionáveis da importância dos receptores Toll nos mecanismos de reconhecimento do bacilo bem como nos processos de

ativação e diferenciação celular em resposta à internalização do mesmo. A participação destes receptores na ativação dos mecanismos de fagocitose e apresentação de antígenos aos linfócitos sugere que estes receptores possam ser responsáveis por promover uma ligação entre as duas fases da resposta imune. Neste mesmo estudo foi observada ainda uma capacidade das células dendríticas CD1b⁺ de ativar linfócitos e induzir a expressão de citocinas como TNF e IL-12. Estas células não estavam presentes em pacientes lepromatosos. Por outro lado, pacientes tuberculóides apresentam marcação intensa para anticorpos CD1b⁺ (Krutzik e col., 2005). Dados mais recentes sugerem que a diferenciação dos macrófagos em IL-10⁺ ou IL-15⁺ participe do desencadeamento de uma resposta imune suscetível ou protetora, respectivamente, em um mecanismo dependente da ativação pelos receptores Toll-2 e da via de sinalização do receptor de vitamina D (Modlin RL, comunicação pessoal).

Considerando a condição intracelular obrigatória do *M. leprae*, o paradigma imunológico clássico que subdivide as respostas dos linfócitos T auxiliares (Th, do inglês “T helper”) em dois pólos conhecidos como Th1 e Th2, tem sido utilizado como um modelo para explicar a enorme variação nos níveis de resposta imune do hospedeiro. De fato, o espectro clínico da hanseníase encontra-se diretamente correlacionado aos níveis de ativação de uma resposta imune celular, a qual é reconhecidamente mediada pelos linfócitos Th1.

Estudos de expressão gênica foram capazes de evidenciar este padrão diferenciado de ativação da resposta ao medir os níveis de RNA mensageiro de diferentes citocinas em pacientes dos pólos LL e TT. Inicialmente, os resultados obtidos demonstram expressão aumentada de genes de citocinas típicas de respostas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10, por exemplo), em pacientes LL, favorecendo a produção de anticorpos, ao passo que os pacientes do pólo tuberculóide apresentaram expressão aumentada de citocinas como a IL-2 e o interferon- γ , ambas características de um padrão Th1 de resposta (Yamamura e col., 1991; Misra e col., 1995; Dockrell e col., 1996). Estudos posteriores corroboraram este padrão diferencial de expressão gênica através do uso da técnica de microarranjo (Bleharski e col., 2003). Além desta confirmação, este estudo demonstrou ainda uma ativação da expressão de receptores LIR (do inglês “leukocyte immunoglobulin-like receptor”), os quais tendem a inibir ainda mais o desenvolvimento de uma resposta imune protetora (Bleharski e col., 2003). A incapacidade de diferenciação de monócitos em células dendríticas em indivíduos LL recentemente descrita por Krutzik e colaboradores (2005) contribui ainda mais para a validação desta teoria uma vez que as células dendríticas são as únicas capazes de ativar linfócitos T virgens, essenciais para a indução de uma resposta imune celular.

Como resultado, indivíduos do pólo tuberculóide são relativamente resistentes ao patógeno, apresentando infecção localizada, baciloscopia negativa e resposta positiva à lepromina, o que reflete ainda mais a capacidade de indução de uma resposta imune celular aos antígenos de *M. leprae*. Todavia, é importante observar que tais indivíduos não podem ser considerados resistentes, uma vez que chegam a desenvolver a fase clínica da doença. Na extremidade oposta do espectro, os pacientes LL se mostram particularmente suscetíveis à doença, apresentando infecção disseminada e alta carga bacilar (revisado por Young, 2001). Tais resultados, entretanto, demonstram apenas uma indução preferencial de um dos eixos da resposta Th, o que não significa que o outro eixo esteja totalmente reprimido. Mais especificamente, sabe-se que indivíduos TT também apresentam anticorpos anti-PGL-1 (Roche e col., 1993), ao passo que células mononucleares de pacientes LL também foram capazes de produzir IFN- γ em resposta a estímulos fracionados de *M. leprae*, indicando a presença de linfócitos T específicos para antígenos de *M. leprae* também nestes indivíduos (Ottenhoff e col., 1989).

1.4.3. Desenvolvimento de episódios reacionais

Durante o curso da infecção frequentemente ocorrem episódios de reação inflamatória aguda, os quais podem ser desencadeados pelo próprio tratamento ou por fatores tais como co-infecções, imunizações, gravidez, parto, estresse, dentre outros. Tais alterações na resposta imune são conhecidas como episódios reacionais e geram exacerbações no quadro clínico do paciente que podem resultar no surgimento de novas lesões, reativação de lesões antigas e agravamento do quadro neurológico do paciente (Rea e col., 1998). Por esta razão, diz-se que a resposta imune do hospedeiro também influencia diretamente os níveis de morbidade dos pacientes à medida que acarreta danos ao tecido em decorrência da reação inflamatória.

As reações hansênicas podem ser subdivididas em dois tipos principais, ambos com características bem definidas: a reação do tipo 1, ou Reação reversa (RR), ocorre predominantemente em pacientes borderline, enquanto que a reação do tipo 2, ou Eritema nodoso hansênico (ENH) acomete principalmente pacientes BL e LL. A Reação Tipo 1 ocorre devido a um aumento na imunidade celular ao *M. leprae*, causando uma resposta inflamatória de hipersensibilidade tardia eficiente na eliminação do bacilo, mas extremamente danosa ao tecido afetado. Imunologicamente ocorre uma expansão dos linfócitos T *M. leprae*-específicos e produção de IFN- γ , levando à formação de granulomas e ao aumento da atividade microbicida dos macrófagos. Como resultado, indivíduos que desenvolvem RR apresentam lesões inflamatórias na pele e quadro de neurite aguda (Scollard e col., 2006).

Clinicamente, a Reação Tipo 2 é considerada mais grave uma vez que os pacientes desenvolvem sintomatologia sistêmica com febre alta, mialgia, dores articulares e aparecimento de novas lesões de pele. As citocinas associadas incluem o TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-8 (Nery e col., 1998). Apesar dos constantes relatos na literatura associando este tipo de reação a uma resposta de anticorpos, existem fortes evidências de uma contribuição da imunidade celular, já que estudos de expressão gênica demonstraram a expressão de RNAm das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α tanto em pacientes com RR quanto naqueles que desenvolveram ENL. A produção de TNF- α foi detectada em todos os pacientes testados (Moraes e col., 1999), sugerindo que esta citocina seja a responsável pelos sintomas observados nos pacientes em reação (Sarno e col., 1991; Khanolkar-Young e col., 1995).

1.4.4. Mecanismos de neuropatogênese

A capacidade de infecção do tecido nervoso constitui uma característica única do *M. leprae*. Nesse sentido, antes mesmo de ser uma doença dermatológica, a hanseníase é uma neuropatia. O tropismo do *M. leprae* pelos nervos periféricos implica em perda de mielina e inflamação neural, o que pode gerar sequelas irreversíveis.

O processo de infecção das células nervosas tem início a partir da fixação do *M. leprae* à lâmina basal que envolve o axônio e a célula de Schwann utilizando como ligante a laminina- α 2 (Rambukkana e col., 2002). No que diz respeito às moléculas desuperfície do *M. leprae*, tanto a proteína HLP (do inglês “histone-like protein”) quanto o PGL-1 foram descritos como mediadores desta interação entre o *M. leprae* e a célula hospedeira (Shimoji e col., 1999; Ng e col., 2000). Durante a invasão propriamente dita da célula, o complexo *M. leprae*-laminina- α 2 utiliza como receptor o α -dístroglicana presente na superfície da célula de Schwann (Rambukkana, 2001). Estudos recentes descreveram ainda a capacidade de ligação da HLP a diferentes isotipos de colágeno, sugerindo que esta molécula é capaz de mediar também a interação do *M. leprae* com outros tipos de células e membranas basais (Pessolani e col., 2003).

Após a infecção, o *M. leprae* tende a proliferar nas células de Schwann ao redor dos nervos periféricos, podendo acarretar problemas de interação entre as células, bem como entre as células e os axônios através de alterações na expressão de moléculas de adesão importantes neste processo (Hagge e col., 2002). No que diz respeito à perda de mielina, os resultados

obtidos têm gerado explicações controversas. Uma das hipóteses propostas sugere que este processo independe do fato do bacilo estar ou não viável, sugerindo que a simples presença de componentes de parede tais como PGL-1 seria suficiente para desencadeá-lo (Rambukkana e col., 2002). Em contrapartida, resultados observados a partir de co-cultura de células de Schwann e neurônios de ratos não demonstraram perda maciça de mielina ou destruição axonal em virtude da exposição ao bacilo (Hagge e col., 2002).

Em seguida, um novo estudo de co-culturas de neurônios e células de Schwann revelou resistência das células de Schwann mielinizantes à penetração pelo *M. leprae*. Além disso, foi observada uma capacidade indutora do *M. leprae* sobre a proliferação das células não-mielinizantes (Rambukkana e col., 2004), a qual se deve à habilidade do *M. leprae* de induzir a liberação de ciclina D1 (Tapinos & Rambukkana, 2005). A influência do *M. leprae* sobre a célula hospedeira inclui ainda uma interferência na via endocítica, de modo a impedir a acidificação excessiva do fagossomo e fornecer um nicho propício para a sobrevivência e proliferação do bacilo (Alves e col., 2004).

O comprometimento neurológico da hanseníase é capaz de afetar as fibras motoras, sensoriais e autônomas e pode ser desencadeado por mecanismos bioquímicos, através da influência do *M. leprae* sobre o metabolismo celular, por dano mecânico decorrente do influxo de células e fluido, ou dano imunológico. A presença do *M. leprae* atua como estímulo para a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α e o IFN- γ , gerando um processo inflamatório que pode acarretar lesões (Dockrell e col., 1996). Além disso, a resposta de hipersensibilidade característica das Reações do tipo 1 é um dos principais responsáveis pelos danos neurais, gerando lesões caracterizadas por infiltrado inflamatório crônico ou subagudo composto por células epitelióides e macrófagos infectados pelo *M. leprae* (Scollard e col., 1999).

Outro aspecto importante a ser considerado reside na morte celular, a qual pode ocorrer em virtude de diferentes processos. Um destes é a apresentação de antígenos do *M. leprae* aos linfócitos T citotóxicos, resultando na indução da citotoxicidade mediada por células e conseqüente morte das células infectadas (Spierings e col., 2000). Além disso, freqüentemente ocorre a indução de apoptose nas células de Schwann infectadas. Recentemente, Oliveira e col. (2005) demonstraram a expressão de receptores de TNF- α e TGF- β (do inglês “transforming growth factor beta”) nas células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*, bem como a indução da expressão destas citocinas e de seus respectivos receptores após a infecção. Estes resultados em conjunto com dados anteriores a respeito da apoptose induzida após ativação de TLR2 (Oliveira

e col., 2003), sugerem que a apoptose das células de Schwann infectadas é induzida pela interação do *M. leprae* e as células hospedeiras. O aumento de expressão observado nesse trabalho corrobora ainda resultados anteriores, que apontaram o TNF- α como citocina-chave nos mecanismos de dano neural, especialmente durante os episódios reacionais (Sarno e col., 2000).

2. Suscetibilidade genética a doenças infecciosas

As infecções são uma das principais causas de mortalidade e morbidade humana, particularmente em crianças. Ainda hoje, as doenças infecciosas exercem pressões seletivas importantes sobre as populações humanas, sobretudo no que diz respeito aos genes envolvidos na resposta imunológica, os quais concentram a maior diversidade dentre todas as classes de genes. A notável variabilidade dos genes das moléculas de HLA ilustra perfeitamente esta característica e sugere uma vantagem adaptativa das variações na resposta imune, ao permitir que o organismo responda a diferentes tipos de patógenos (Burgner e col., 2006). Estas observações tornam evidente a importância do componente genético na resistência a infecções, sugerindo o estudo dos padrões de suscetibilidade genética como um campo promissor para o entendimento da dinâmica da interação entre parasita e hospedeiro.

De maneira geral, os estudos de suscetibilidade genética a doenças infecciosas consistem na busca ativa de polimorfismos genéticos que possam vir a auxiliar na identificação de indivíduos com maior probabilidade de desenvolvimento das doenças, uma vez que ocorra a transmissão ao agente infeccioso. Tais estudos partem da premissa de que a exposição ao agente infeccioso seja por si só não é suficiente para causar a doença. De fato, sabe-se hoje que o processo de desenvolvimento de uma enorme variedade de doenças infecciosas é produto de uma interação entre a exposição ao patógeno e fatores de risco genéticos, sócio-econômicos, dentre outros. A dinâmica desta interação faz com que indivíduos infectados com uma mesma cepa patogênica respondam à infecção de maneiras completamente distintas (Casanova e Abel, 2004).

Um exemplo histórico deste padrão diferenciado de resposta a um mesmo agente infeccioso foi obtido a partir de um acidente ocorrido em 1927 em Lübeck, na Alemanha. Nesta ocasião, após a administração de uma cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*, parte da população infectada permaneceu assintomática, enquanto os demais desenvolveram doença severa que, em alguns casos, ocasionou a morte do paciente (revisto por Cooke e Hill, 2001). Episódios como este evidenciam a importância da resposta imune do hospedeiro para o desencadeamento de

doença e levantam a hipótese de que variações genéticas podem ser a causa dos diferentes padrões de resposta observados. Os estudos em malária, por sua vez, constituem um exemplo claro da presença de um componente genético na resistência a infecções. Neste caso específico, os carreadores de um polimorfismo no sexto códon do gene da β -globina apresentam uma alteração na estrutura desta proteína. Conseqüentemente, estes indivíduos apresentam uma alteração morfológica nas hemácias, o que confere a eles uma resistência à infecção pelo *Plasmodium* (Pauling e col., 1949).

Embora existam evidências claras da existência de um componente genético na suscetibilidade a doenças infecciosas, o estudo destas variações pode enfrentar ainda uma série de problemas. Um dos grandes obstáculos neste sentido reside no fato de a maior parte das doenças não apresentar um padrão de herança Mendeliana clássica. As doenças ditas complexas apresentam um padrão de herança imperfeita, em que a variação dos componentes que resultam em um determinado fenótipo provém, além dos fatores ambientais, da interação entre múltiplos genes (Barnette, e col., 2005). Além disso, é importante ter em mente que o componente genético nas doenças infecciosas pode ser produto ainda de uma combinação das variações do parasita e do hospedeiro, o que resulta em uma complexidade ainda maior para o entendimento da participação da genética na resistência a infecções. O modelo abaixo foi proposto inicialmente com o objetivo de ilustrar a complexidade da interação entre o hospedeiro humano e as micobactérias (Casanova & Abel, 2002). Em seguida, os mesmos autores sugeriram uma adaptação deste modelo (Casanova & Abel, 2004), de modo a extrapolar os conceitos para o contexto de doenças infecciosas em geral (Figura 1).

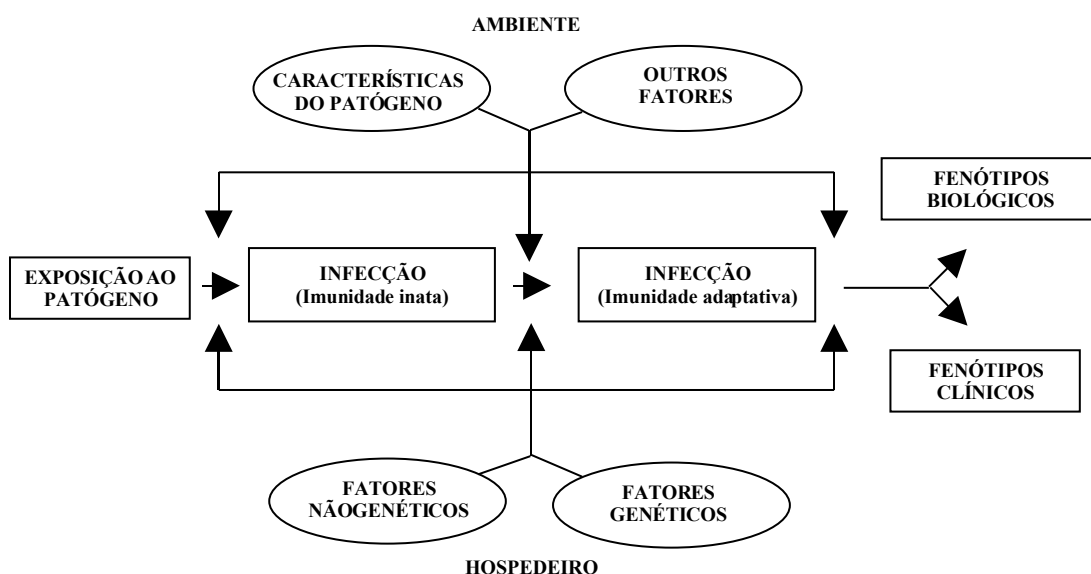


Figura 1: Estágios da interação entre o homem e o ambiente durante o curso das infecções. A exposição ao parasita nem sempre gera infecção, uma vez que o desfecho

doença depende do desenvolvimento de uma resposta imune inata ou ainda de sua combinação a uma resposta adquirida. Fenótipos clínicos e biológicos podem ser observados após o estabelecimento da infecção e da resposta imune associada. O desenvolvimento de cada uma das etapas representadas depende da participação de fatores inerentes ao hospedeiro (genéticos ou não-genéticos) e ao ambiente em que ele se encontra (exposição e variabilidade do patógeno), as quais interferem diretamente nos estágios da infecção. Adaptado de Casanova & Abel (2004).

2.1. Estratégias de estudo

O primeiro passo para a caracterização de um componente genético na resposta a infecções consiste no desenvolvimento de estudos observacionais. As análises de agregação familiar e segregação, bem como os estudos comparativos de gêmeos constituem metodologias eficientes na comprovação desta teoria. Entretanto, nenhuma destas estratégias de estudo é capaz de definir a quantidade de genes envolvidos no desfecho analisado, nem mesmo a exata localização dos mesmos. Sendo assim, uma vez que o componente genético é descrito, faz-se necessário o uso de técnicas moleculares a fim de promover um melhor entendimento desta característica (Lander e Schowk, 1994). Neste âmbito, os estudos de ligação e associação têm sido amplamente utilizados para a identificação e mapeamento fino dos loci envolvidos no desenvolvimento de doenças.

Os estudos de ligação constituem uma ferramenta poderosa para o mapeamento de regiões cromossômicas que abrigam genes de suscetibilidade à doença. Este tipo de análise consiste basicamente na caracterização de marcadores moleculares em amostragens familiares, de modo a verificar a existência de uma co-segregação entre os marcadores de uma determinada região genômica e o fenótipo em questão. Desta maneira, é possível estabelecer se a região analisada está “ligada” ao desfecho (Teare & Barret, 2005). Uma das abordagens utilizadas neste tipo de estudo consiste em analisar regiões candidatas tendo como base a localização de genes com função importante para o fenótipo em questão. Alternativamente, podem ser analisados marcadores dispersos ao longo de todos os cromossomos, de modo a viabilizar o mapeamento de regiões independentemente do estabelecimento de hipóteses *a priori*, configurando uma estratégia conhecida como “rastreamento genômico” (do inglês “genome-wide scan”). Este desenho de estudo é particularmente útil no contexto das doenças complexas, em virtude de seu potencial para a identificação de regiões que abriguem genes supostamente não-relacionados ao desfecho de interesse (Marquet & Schurr, 2001).

Os estudos de associação, por sua vez, têm como objetivo principal a definição dos marcadores genéticos associados a este desfecho. Por esta razão, os mesmos são frequentemente utilizados para complementar os achados dos estudos de ligação, de modo a permitir o mapeamento fino dos genes e variações associadas ao fenótipo observado. Ao contrário dos estudos de ligação, que exigem o uso de amostragens familiares, os estudos de associação permitem o uso de amostragens populacionais, o que contribui de maneira notável para um incremento no poder estatístico (Risch, 2000). Este fato, combinado a uma maior facilidade no recrutamento dos indivíduos, faz dos estudos populacionais, mais especificamente os de caso-controle, a abordagem mais comumente utilizada nos estudos de epidemiologia genética.

Em linhas gerais, os estudos de caso-controle consistem inicialmente no recrutamento de uma amostra de casos e na seleção de controles a partir da mesma população-fonte que os originou. Em seguida, são comparadas as frequências de um determinado fator de risco (polimorfismos genéticos, neste caso) em pacientes e controles, de modo a estabelecer medidas de associação que possam refletir o efeito desta exposição sobre o desfecho de interesse (desenvolver ou não uma doença, por exemplo). Neste caso, os SNPs e microssatélites (STRs) costumam ser os marcadores mais comuns (Burton e col., 2005).

Contudo, os resultados deste tipo de análise podem ser afetados por diversos fatores inerentes ao desenho de estudo dentre os quais se destaca a dificuldade na seleção de controles válidos (Cardon e Bell, 2001), ou seja, a seleção de uma amostra de indivíduos sadios que de fato represente a população fonte que originou os casos. Quando casos e controles apresentam frequências alélicas distintas em virtude de características intrínsecas de cada população e não do desfecho de interesse, diz-se que existe estratificação populacional. Este fenômeno, assim como possíveis falhas no desenho de estudo, pode resultar na obtenção de medidas de associação que não refletem a verdadeira relação entre exposição e desfecho (Pacheco & Moraes, 2009).

A fim de evitar este tipo de problema, frequentemente os estudos de associação utilizam amostragens familiares, geralmente compostas pelos pais biológicos e um filho afetado. Este tipo de estudo é ideal para os chamados testes de desequilíbrio de transmissão (TDT), cujo princípio estatístico foi descrito em 1993 (Spielman e col., 1993). Este tipo de abordagem tem como finalidade determinar o padrão de transmissão dos alelos de um determinado marcador a partir de pais heterozigotos para os filhos afetados (Strachan & Read, 2002). Uma vez que os alelos não transmitidos pelos pais são utilizados como controle daqueles que foram transmitidos, este tipo de abordagem elimina o problema da estratificação populacional. Em

contrapartida, este tipo de estudo apresenta também uma série de limitações, que vão desde uma maior dificuldade no recrutamento dos indivíduos até o reduzido poder estatístico. Mais especificamente, uma vez que apenas as famílias com pais heterozigotos são consideradas informativas, este tipo de estudo requer o recrutamento de um número muito grande de indivíduos a fim de manter o poder desejado devido à exclusão das famílias não informativas (Cardon & Palmer, 2003).

3. Suscetibilidade genética à hanseníase

A incidência reduzida de hanseníase dentre os indivíduos expostos associada ao contraste entre o amplo espectro clínico e a baixa variabilidade do agente infeccioso, faz da hanseníase um modelo ideal para o estudo do componente genético do homem no contexto das doenças infecciosas. Ademais, a complexidade do espectro clínico sugere que a hanseníase sirva como um modelo para o estudo da influência genética em diferentes fases da infecção (Figura 2). Na primeira fase, o desenvolvimento da doença *per se* diferenciaria os indivíduos suscetíveis daqueles capazes de manter a infecção subclínica. Em uma segunda fase, os pacientes seriam subdivididos de acordo com o desenvolvimento de formas clínicas mais localizadas ou disseminadas. Por fim, a incidência de complicações clínicas tais como o dano neural e os episódios reacionais forneceria um exemplo da influência dos genes na regulação da resposta imunológica no sentido de evitar as exacerbações que podem acarretar o dano tecidual.

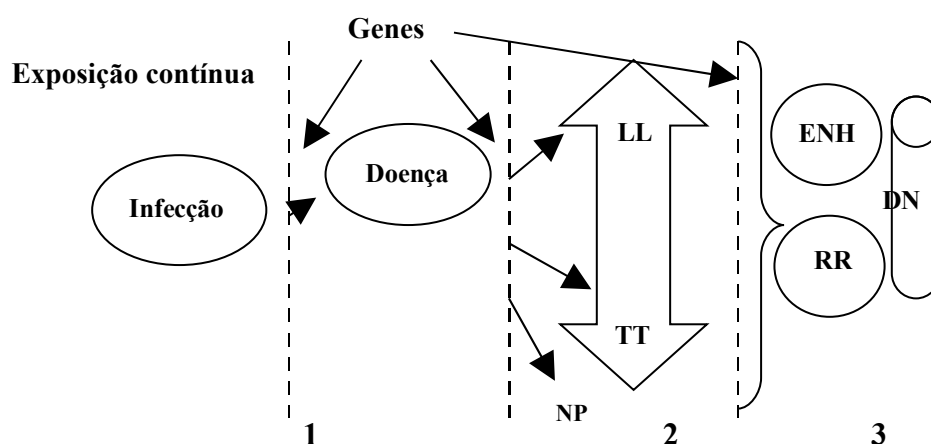


Figura 2: História natural da hanseníase. Fatores genéticos podem contribuir para o desenvolvimento da doença *per se* (1), das diferentes formas clínicas (2) e complicações como episódios reacionais e dano neural (3). LL = forma lepromatosa; TT = forma tuberculóide; PN = forma neural pura; ENH = eritema nodoso hansênico; RR = reação reversa; DN = dano neural. Adaptado de Moraes e col., 2006.

3.1. Estudos observacionais

A hipótese da existência de um componente genético na hanseníase é anterior ao isolamento e descrição do próprio *M. leprae*. Observações do monge franciscano Bartholomaeus Angelicus em 1246 o levaram a postular que a transmissão da doença ocorria de pais para filhos (Mira, 2006). Apesar da identificação do agente infeccioso ter contrariado a teoria da hereditariedade da hanseníase, a hipótese de uma participação genética no desenvolvimento desta doença tem sido testada e confirmada repetidas vezes a partir de estratégias de estudo distintas.

Inicialmente, esta confirmação foi possibilitada pelo uso de análises de agregação familiar, estudos comparativos de gêmeos e, mais adiante, por análises de segregação. Em conjunto, os resultados destes estudos demonstraram uma frequência aumentada de pacientes em famílias com casamentos cosanguíneos, além de maior concordância entre gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos no que diz respeito à incidência da doença (Alter e col., 2008). Estudos posteriores demonstraram ainda que o desenvolvimento tanto de hanseníase *per se* quanto das diferentes formas clínicas não é aleatório em parentes afetados e também detectaram diferentes prevalências da doença em grupos étnicos distintos vivendo em uma mesma área endêmica (Moraes e col., 2006).

As características clínicas da hanseníase sugerem ainda a participação de vários genes na regulação da resposta imune no que diz respeito à proteção/suscetibilidade. Resultados obtidos a partir de análises de segregação confirmaram esta hipótese ao sugerir um modelo de herança poligênica em que alguns genes teriam uma participação mais acentuada (Abel & Demenais, 1988; Abel e col., 1995). Os estudos de associação e ligação conduzidos posteriormente deram suporte ainda maior para esta teoria ao descrever a participação de vários genes e regiões candidatas no desenvolvimento da doença. Os principais estudos publicados até o ano de 2006 foram discutidos recentemente em um artigo de revisão (Anexo I: Moraes e col., 2006). Por esta razão, apenas os dados mais consistentes serão discutidos nos itens que se seguem juntamente aos estudos mais recentes, posteriores à referida publicação.

3.2. Estudos de rastreamento genômico

O sequenciamento do genoma humano bem como o advento das técnicas de genotipagem em larga escala têm feito do rastreamento genômico uma das mais importantes ferramentas para o estudo de doenças complexas. O primeiro estudo de rastreamento genômico em hanseníase foi

conduzido em famílias indianas e detectou ligação na região 10p13, a qual abriga, dentre outros, o gene que codifica o receptor da manose em macrófagos, envolvido no reconhecimento do LAM e internalização do *M. leprae* (Siddiqui e col., 2001). Estudos subsequentes desenvolvidos pela mesma equipe identificaram um segundo pico de ligação na região 20p12 (Tosh e col., 2002).

No ano seguinte, Mira e colaboradores (2003b) identificaram a importância da região 6q25 na suscetibilidade à hanseníase *per se* em um estudo da população Vietnamita. Embora a princípio os resultados obtidos em estudos anteriores não tenham sido replicados, a estratificação da análise de acordo com a forma clínica permitiu a confirmação dos resultados da região 10p13 nas famílias com casos unicamente paucibacilares. De fato, a partir de uma análise detalhada das famílias utilizadas no trabalho de Siddiqui e colaboradores (2001), é possível concluir que este estudo foi composto predominantemente por pacientes paucibacilares, o que implica em uma participação da região 10p13 no desenvolvimento da forma localizada da doença. Em seguida, este mesmo grupo conduziu um estudo de clonagem posicional a fim de caracterizar melhor o efeito da região 6q25 (Mira e col., 2004). A partir do aumento da densidade de marcadores, bem como do desenvolvimento de estudos de associação utilizando populações e desenhos de estudo distintos, os autores foram capazes de identificar os genes *PARK2* e *PACRG* como os responsáveis pelo efeito observado nesta região.

No ano seguinte, a importância da região 17q11 na suscetibilidade à hanseníase foi identificada a partir da análise de famílias brasileiras (Miller e col., 2004; Jamieson e col., 2004). Em 2007, um novo estudo com famílias vietnamitas identificou uma ligação entre as regiões cromossômicas 2q35 e 17q21 e os resultados quantitativos do teste de Mitsuda (Ranque e col., 2007). A análise detalhada dos genes localizados em cada uma destas regiões corrobora achados epidemiológicos anteriores, uma vez que a região 2q35 abriga o gene *SLC11A1* (que codifica a proteína conhecida como NRAMP1, do inglês “natural resistance-associated macrophage protein”), o qual havia sido previamente implicado na resposta à lepromina com o auxílio de estudos de associação e ligação (Moraes e col., 2006). A região identificada no cromossomo 17, por sua vez, abriga inúmeros genes de quimiocinas, fatores de transcrição e moléculas de adesão, dentre outras proteínas induzidas durante a resposta inflamatória.

3.3. Genes candidatos

Os genes candidatos para estudos de associação e/ou ligação são aqueles tipicamente selecionados com base em um possível papel crítico na patogênese da doença ou ainda em sua

localização em região genômica previamente envolvida no controle da doença. Seguindo o primeiro critério, os genes de citocinas e receptores celulares têm sido os principais alvos dos estudos de associação em hanseníase em virtude de sua participação no reconhecimento do patógeno e posterior ativação e regulação da resposta imune ao agente infeccioso.

Os genes candidatos envolvidos na definição de susceptibilidade à hanseníase podem ser ligados ou não à região do HLA. No que diz respeito à primeira classe de genes, estudos de ligação e associação identificaram alelos e haplótipos do complexo HLA, particularmente os de classe II, como importantes fatores de susceptibilidade aos subtipos da hanseníase (revisto por Mira, 2006). Um estudo recente viabilizou ainda a confirmação da importância do locus HLA-DRB1 na hanseníase *per se* ao utilizar uma amostra numerosa o suficiente para alcançar o poder estatístico adequado (Vanderborgh e col., 2007). Neste estudo, os alelos HLA-DRB1*10 e 14 foram associados à susceptibilidade e resistência à hanseníase, respectivamente, utilizando amostras de famílias vietnamitas e de uma população brasileira. Estudos adicionais identificaram ainda a associação entre um SNP no gene *BTNL2* e o desenvolvimento da hanseníase. Entretanto, os próprios autores discutem a possibilidade de este resultado ter sido obtido em função do desequilíbrio de ligação com alelos HLA-DR (Johnson e col., 2007). Uma enorme variedade de estudos tem contemplado ainda o estudo de polimorfismos nos genes *TNF* e *LTA*, ambos localizados na região do HLA de classe III. Estes dados serão discutidos adiante no item 4 deste capítulo.

No que diz respeito aos genes não-ligados ao HLA, os resultados mais consistentes publicados até então apontam para o efeito dos genes *IL10*, *VDR*, *SLC11A1* e *PARK2*. Assim como no caso do complexo *TNF/LTA*, os resultados do gene *IL10* serão descritos adiante, no quinto item deste capítulo. No caso do gene *VDR*, que codifica o receptor de vitamina D, um estudo da população indiana inicialmente obteve associação entre o SNP localizado no códon 352 e a susceptibilidade à hanseníase. Posteriormente, estes achados foram confirmados a partir do desenvolvimento de novos estudos de caso-controle conduzidos nas populações do Malauí (Fitness e col., 2004) e, mais recentemente, do México (Velarde-Félix e col., 2009).

O gene da proteína transportadora de íons *SLC11A1* (do inglês “solute carrier family 11, member 1”), conhecida como *NRAMP1*, também tem sido alvo constante de estudos em hanseníase. Estudos em famílias vietnamitas indicaram ligação deste gene à susceptibilidade mas não foram capazes de identificar os polimorfismos associados a este efeito (Abel e col., 1998). No ano seguinte, estudos da população indiana também não observaram associação entre este gene e a hanseníase utilizando um marcador do tipo microssatélite (Roy e col., 1999). A confirmação da importância deste gene na hanseníase foi confirmada no ano seguinte por Alcaïs

e colaboradores (2000) a partir de um estudo de ligação que utilizou a resposta à lepromina como desfecho. A associação deste gene foi confirmada a partir do estudo de uma população africana, cujos resultados associaram uma deleção de 4 nucleotídeos na região 3' não traduzida (3'UTR) ao desenvolvimento de hanseníase multibacilar (Meisner e col., 2001). A associação entre variações neste gene e a resposta à lepromina foi confirmada 3 anos depois (Ferreira e col., 2004). Os estudos mais recentes que utilizaram a abordagem de genes candidatos com função na patogênese da doença detectaram uma associação entre a hanseníase *per se* e a presença de polimorfismos nos genes da ficolina-2 (de Messias-Reason e col., 2009), beta-defensina 1 (Prado Montes e col., 2009) e receptores Toll 2 e 4 (Schuring e col., 2009; Bochud e col., 2009) nas populações brasileira, mexicana e etíope, respectivamente.

Os genes *PARK2* e *PACRG*, por sua vez, foram os primeiros candidatos definidos a partir do mapeamento fino de uma região previamente ligada à hanseníase. Conforme descrito anteriormente, a identificação destes genes foi resultado de um estudo de clonagem posicional que visava uma melhor caracterização da ligação da região 6q25 a um fenótipo de suscetibilidade (Mira e col., 2004). Em seguida, os mesmos autores conduziram estudos de associação a fim de confirmar a consistência do achado e, como resultado, as análises de regressão logística permitiram concluir que o haplótipo composto pelos alelos *PARK2* -2599T e rs1040079-C poderia refletir toda a informação a respeito da associação do gene *PARK2* à hanseníase (Mira e col., 2004). Entretanto, um estudo de replicação conduzido no ano seguinte foi capaz de confirmar estes resultados apenas em parte ao utilizar uma amostra da população indiana. Embora os resultados iniciais tenham sugerido associação entre o alelo -2599T e maior suscetibilidade à hanseníase, este resultado perdeu significância estatística após a aplicação da correção de Bonferroni (Malhotra e col., 2006). Adiante, a forte associação observada no primeiro estudo em conjunto com a participação destes genes no sistema de ubiquitinação e degradação de proteínas motivou o desenvolvimento de análises funcionais utilizando inibidores de proteossomo. A partir destes estudos foi observada uma redução tanto nos níveis de apoptose quanto na liberação de TNF- α e IL-10 em resposta ao *M. leprae*, sugerindo uma participação do sistema de ubiquitinação na interação entre o *M. leprae* e a célula hospedeira (Fulco e col., 2007).

3.4. Polimorfismos genéticos e o desenvolvimento de complicações clínicas na hanseníase

Os primeiros estudos de associação utilizando o gene *TLR2* como candidato geraram resultados discutíveis, uma vez que o suposto polimorfismo associado (Kang e col., 2004) foi posteriormente caracterizado como uma duplicação de éxon (Malhotra e col., 2005b). Dados

recentes, entretanto, têm fornecido resultados interessantes a respeito da associação destes receptores ao desenvolvimento de reações hansênicas. Estudos nas populações de Bangladesh e do Nepal identificaram associação entre variantes do gene *TLR1* e o desenvolvimento de reação reversa (Misch e col., 2008; Schuring e col., 2009), enquanto os resultados de um estudo conduzido na Etiópia associaram SNPs no gene *TLR2* a uma sinalização reduzida em resposta ao *M. leprae*, bem como ao desenvolvimento de reação reversa (Bochud e col., 2008).

No que diz respeito ao dano neural, estudos prévios desenvolvidos no laboratório identificaram a associação de um SNP no gene da molécula de adesão ninjurina-1. Inicialmente, análises de expressão gênica demonstraram um aumento na expressão tanto de RNA mensageiro quanto da proteína resposta à infecção pelo *M. leprae*, confirmando a participação da ninjurina-1 na hanseníase. Em seguida, o polimorfismo asp110ala foi utilizado como marcador durante os estudos de associação, os quais permitiram que o mesmo fosse associado não à hanseníase *per se*, mas sim ao desenvolvimento do dano neural associado (Cardoso e col., 2007).

4. Papel dos genes *TNF* e *LTA* na suscetibilidade à hanseníase

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a linfotóxina alfa (LT- α) são citocinas pró-inflamatórias relacionadas tanto estruturalmente quanto no que diz respeito às suas funções biológicas, já que ambas são capazes de ativar o mesmo receptor. O TNF- α é uma citocina pleiotrópica cujas ações biológicas são vastas e muitas vezes contrastantes. Sua secreção é induzida durante a inflamação aguda, ativando uma cascata de sinalização que culmina em eventos que podem levar à apoptose e necrose, bem como em sintomas sistêmicos como a febre (revisto por Idriss & Naismith, 2000). Estudos realizados no final da década de 80 demonstraram a participação do TNF- α na formação de granulomas em infecções por micobactérias (Kindler e col., 1989). Em hanseníase, foram detectados níveis elevados desta citocina no soro de pacientes tuberculóides, ao contrário do observado em portadores da forma lepromatosa (Pisa e col., 1990). Em contrapartida, os altos níveis de TNF- α têm sido constantemente associados também à imunopatogenia da doença em virtude de sua participação no desenvolvimento de reações hansênicas e dano neural (Sarno e col., 1991; Khanolkar-Young e col., 1995; Nery e col., 1998; Moraes e col., 1999).

A LT- α , por sua vez, é essencial para o desenvolvimento dos órgãos linfóides secundários, participa da regulação da resposta imune celular e atua como um estímulo inicial para o

desenvolvimento de quadros de inflamação crônica (Ware, 2005). Embora a expressão de LT- α nas lesões de pacientes com hanseníase já fosse conhecida há algum tempo (Yamamura e col., 2001; Bleharski e col., 2003), a participação exata desta citocina na resposta ao *M. leprae* só foi descrita em 2009, com o auxílio de modelos animais (Hagge e col., 2009). A partir do estudo de camundongos nocaute foi possível observar a inabilidade destes de recrutar linfócitos, desenvolver e manter granulomas ou ainda de controlar o crescimento do *M. leprae* na ausência de LT- α . A deficiência de TNF, por sua vez, gerou inflamação intensa e aguda e aumentou a taxa de crescimento do bacilo frente à infecção pelo *M. leprae*. Esses dados indicam que, assim como o TNF, a LT- α também consiste em um mediador essencial para a regulação do granuloma na hanseníase. No que diz respeito à resposta imune celular, entretanto, estas citocinas parecem ter efeitos completamente distintos no recrutamento de linfócitos e manutenção da resposta granulomatosa durante a inflamação crônica (Hagge e col., 2009).

Os genes *TNF* e *LTA*, responsáveis pela codificação destas citocinas, estão localizados no braço curto do cromossomo 6, mais especificamente na região do HLA de classe III. O complexo conhecido como TNF engloba ainda o gene *LTB*, que codifica a linfotoxina- β . A localização física dos genes *TNF* e *LTA* no contexto do completo HLA, bem como os principais polimorfismos analisados estão representados na Figura 3.

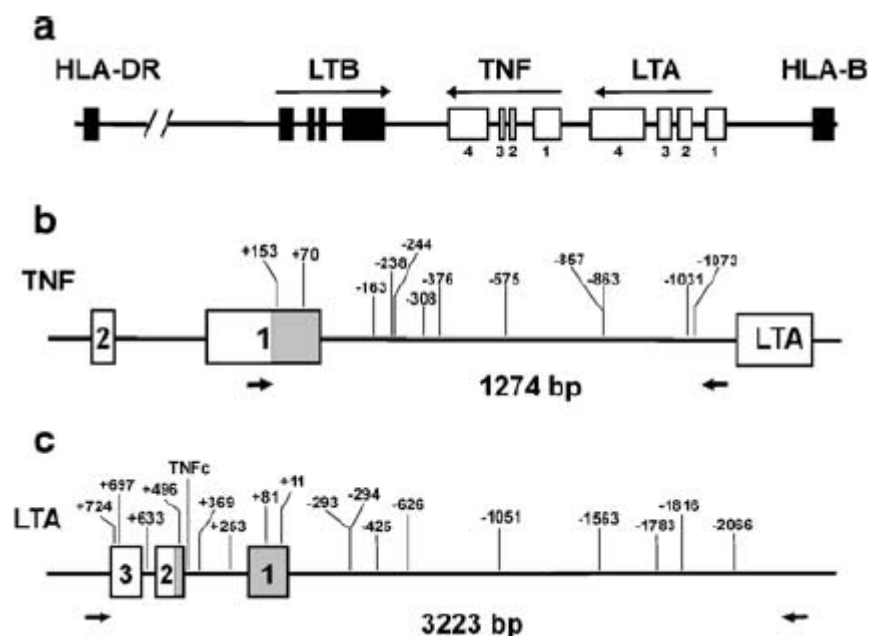


Figura 3: Representação esquemática da distribuição dos principais polimorfismos nos genes *TNF* e *LTA*. (a) Localização dos genes no complexo HLA. O esquema representa os principais polimorfismos dos genes *TNF* (b) e *LTA* (c). As setas indicam a orientação do gene. Os números 1, 2 e 3 representam os éxons, enquanto as

regiões em cinza representam as porções não traduzidas (5'UTR).
Extraído de Posch e col., 2003.

Embora ambos os genes apresentem diversos polimorfismos ao longo de sua seqüência, o *TNF* tem sido o principal alvo dos estudos de associação em hanseníase, o que provavelmente se deve a uma melhor caracterização do papel deste gene na doença. No que diz respeito ao desenho de estudo, a maior parte dos estudos do gene *TNF* na hanseníase utilizou a estratégia de caso-controle. O estudo desenvolvido por Shaw e colaboradores (2001) representa a única exceção a essa regra, uma vez que o desenho familiar foi a estratégia selecionada para os estudos de associação. Durante a primeira fase deste estudo, foram conduzidas análises de ligação que descreveram a importância dos genes *TNF* e *LTA* na suscetibilidade à hanseníase. Em seguida, os autores demonstraram a associação do haplótipo composto pelos alelos *TNF* -308A e *LTA* +252G à proteção contra a hanseníase *per se* com o auxílio de testes de desequilíbrio de transmissão (Shaw e col., 2001). Estudos subsequentes confirmaram o efeito protetor do alelo -308A na população brasileira (Santos e col., 2002; Franceschi e col., 2009). Em contrapartida, dados das populações indiana (Roy e col., 1999) e tailandesa (Vejbaesya e col., 2007) associaram este mesmo alelo à suscetibilidade, ao passo que o estudo da população do Malauí não observou associação significativa entre o SNP *TNF* -308G/A e a hanseníase (Fitness e col., 2004). Embora a maior parte destes estudos confirme a associação do gene *TNF* à doença, a enorme contradição entre os resultados das diferentes populações sugere um importante componente de heterogeneidade genética, o que dificulta a identificação do polimorfismo que de fato apresenta um significado funcional.

A questão da heterogeneidade genética neste locus ficou ainda mais evidente a partir da publicação de um novo estudo desenvolvido pela mesma equipe (Mira e col., 2004) que identificou o haplótipo de suscetibilidade nos genes *PARK2* e *PACRG*. A fim de melhor caracterizar a importância do cromossomo 6 na suscetibilidade à hanseníase, os autores analisaram marcadores genéticos também na região 6p21, mais precisamente nos genes do HLA de classe II e III (Alcaïs e col., 2007). De início, os pesquisadores concluíram que o SNP na posição -293 seria a principal variação associada. Entretanto, uma vez que este polimorfismo funcionava como uma etiqueta para um haplótipo composto por outras 6 variações em desequilíbrio de ligação perfeito ou quase perfeito ($r^2 > 0,8$, configurando o que se conhece como bin), virtualmente qualquer um destes polimorfismos poderia ser o responsável pelo efeito observado. Neste sentido, a replicação do estudo na população indiana forneceu uma nova hipótese a respeito de qual seria a variação funcional deste bin, uma vez que o SNP associado à doença nesta população foi o -294. Ao ajustar o modelo logístico para este segundo

SNP, os autores verificaram uma associação significativa com o polimorfismo da posição +80. A posterior análise dos padrões de desequilíbrio de ligação da população indiana demonstrou que o SNP -293 pertencera a um bin distinto daquele em que os SNPs +80 e -294 estavam incluídos. Estes dados, em conjunto com significado biológico previamente demonstrado para o SNP *LTA* +80 (Knight e col., 2004) sustentam a hipótese de que este SNP seja o responsável pelo efeito observado. Estes dados reforçam a importância de se considerar os padrões de desequilíbrio de ligação de cada região antes de sugerir que determinada variação seja de fato a responsável pelo desfecho analisado.

5. Variações no gene *IL10* e a suscetibilidade à hanseníase

O gene *IL10* está localizado na região 1q31-32 e codifica a interleucina 10 (IL-10), a qual é secretada principalmente por células da linhagem macrófagica e classicamente conhecida como uma citocina anti-inflamatória capaz de modular os níveis de TNF- α e IL-1 β (Moraes e col., 2006). A IL-10 tem sido constantemente associada a um padrão de resposta Th2 em virtude de sua participação na proliferação e diferenciação de linfócitos B (Llorente e col., 1995) acrescida de sua capacidade de estimular a proliferação de células produtoras de IL-4. Além disso, esta citocina também regula negativamente a produção de mediadores da resposta Th1 e moléculas co-estimuladoras em macrófagos, contribuindo para a persistência das infecções (Volk e col., 2001). No contexto da hanseníase, uma razão TNF/IL-10 aumentada tem sido considerada como um importante fator prognóstico no que diz respeito ao desenvolvimento da doença em contatos, uma vez que reflete a ativação de uma resposta imune eficiente. Durante o curso da doença, níveis elevados de IL-10 têm sido associados ao desenvolvimento da forma multibacilar (Misra e col., 1995).

A participação desta citocina na resposta imune ao *M. leprae* tem motivado o desenvolvimento de estudos de associação utilizando o gene *IL10* como candidato. O primeiro estudo da população brasileira utilizou os SNPs -592 e -819 como marcadores e obteve uma associação entre o alelo -819T e a suscetibilidade à hanseníase (Santos e col., 2002). Este achado foi reforçado dois anos depois da publicação do estudo de um haplótipo estendido composto por variações nas porções proximal e distal da região promotora deste gene. Como resultado, o haplótipo -3575A/-2849G/-2763C foi associado à proteção, enquanto a combinação dos alelos -3575T, -2849A e -2763C resultou em um fenótipo de suscetibilidade. Embora o SNP da posição -819 não tenha sido associado à doença quando isolado, o desequilíbrio de ligação entre o alelo -819T e o haplótipo de suscetibilidade obtido reforçam a importância deste SNP na

suscetibilidade à doença. A participação do haplótipo -3575A/-2849G/-2763C na proteção também contra o desenvolvimento da forma multibacilar sugere que a IL-10 desempenhe uma função chave nas diferentes fases da resposta ao *M. leprae* (Moraes e col., 2004).

Posteriormente, o alelo -819T foi novamente associado à suscetibilidade em um estudo da população indiana. Embora os haplótipos associados à doença tenham sido diferentes dos que haviam sido descritos em brasileiros, estes dados reforçam o papel do SNP -819T/C no desenvolvimento da hanseníase (Malhotra e col., 2005a). Em contrapartida, estudos da população do Malauí (Fitness e col., 2004) e de uma nova amostra da população brasileira (Franceschi e col., 2009) não foram capazes de replicar a associação do gene *IL10* à hanseníase utilizando os SNPs – 1082, -819 e -592 como marcadores. As análises funcionais conduzidas até hoje descreveram uma produção reduzida de IL-10 em resposta ao LPS em indivíduos sadios portadores do haplótipo composto pelos alelos -3575T, -2849G, -2763C, -1082A, -819C e -592C (Mörmann e col., 2004). Entretanto, nenhum estudo foi conduzido a fim de determinar a produção de IL-10 em resposta ao *M. leprae* na presença destas variações.

6. Papel do eixo IL-12/IL-23/IFN- γ na suscetibilidade genética à hanseníase

A IL-12 é um dos principais mediadores da resposta a patógenos intracelulares e é considerada um importante elo entre a imunidade inata e a adquirida. Suas funções mais importantes incluem o estímulo da produção de IFN- γ e da diferenciação de linfócitos T CD4⁺ virgens em linfócitos produtores de IFN- γ (Langrish e col., 2004). Este, por sua vez, induz a liberação de ainda mais IL-12, estimulando a polarização da resposta imune na direção do eixo Th1 (Schroder e col., 2004). Em hanseníase, esta citocina desempenha uma função essencial na ativação do metabolismo oxidativo dos macrófagos (Natan e col. 1983) e, conseqüentemente, na eliminação do bacilo (Ramasesh e col. 1991; Hagge e col. 2004). De fato, estudos *in vitro* demonstraram maior secreção de IFN- γ em pacientes tuberculóides, sugerindo um papel crucial deste mediador na resposta ao *M. leprae* (Sieling e col. 1994).

A importância do eixo IL-12/IL-23/IFN- γ na resposta a patógenos intracelulares fica ainda mais evidente a partir da análise dos casos clínicos de uma síndrome conhecida como “Susceptibilidade Mendeliana a Doenças Micobacterianas” (MSMD), caracterizada pelo desenvolvimento de doenças severas após a infecção por parasitas intracelulares de baixa virulência, particularmente as micobactérias (van de Vosse e col., 2004). A caracterização genética destes pacientes permitiu a identificação de mutações de perda de função nos genes

IFNR1, *IFNR2*, *STAT1*, *IL12B* e *IL12RB1* como as responsáveis pela ausência de resposta imune efetiva já que, em última análise, todas estas mutações impediam por completo o funcionamento da via de liberação e sinalização do IFN- γ , resultando na incapacidade de desenvolver resposta Th1 (Ottenhoff e col., 2002). Por esta razão, os genes que participam desta via têm sido alvo constante de estudos de associação a doenças infecciosas com destaque para a tuberculose, que concentra o maior número de estudos.

No contexto da hanseníase, haplótipos do gene *IL12RB2*, que codifica a cadeia $\beta 2$, presente exclusivamente no receptor da IL-12, foram associados ao desenvolvimento de hanseníase lepromatosa em japoneses (Ohyama e col., 2005). De fato, estudos funcionais demonstraram uma diferença entre os níveis de expressão de *IL12RB2* em pacientes TT e LL após o estímulo do *M. leprae* (Kim e col., 2001), sugerindo que a cadeia $\beta 2$ desempenha uma função chave na resposta a este patógeno. Embora o gene *IL12RB1* concentre o maior número de mutações causadoras da síndrome MSMD, variações na região codificante deste gene não foram associadas à hanseníase em um estudo da população coreana. Resultados semelhantes foram obtidos para o gene *IFNGR1* (Lee e col., 2003). Polimorfismos nas regiões promotora e 3'UTR do gene *IL12B*, por sua vez, foram associados tanto à hanseníase quanto à tuberculose em indianos (Morahan e col. 2007).

No que diz respeito ao gene *IFNG*, a variação funcional localizada na posição +874 tem sido alvo constante de estudos de suscetibilidade a infecções por patógenos intracelulares. Até o presente momento, este gene já foi alvo de três estudos de associação com a hanseníase. O primeiro deles observou uma associação entre o microssatélite adjacente ao SNP +874 e o desenvolvimento da doença em brasileiros (Reynard e col., 2003). Os estudos seguintes foram conduzidos na população do Malawi (Fitness e col., 2004) e em uma segunda amostra da população brasileira (Franceschi e col., 2009). Em ambos, não foi observada qualquer associação entre o SNP +874 e a suscetibilidade à hanseníase. Entretanto, o reduzido tamanho amostral associado às possíveis inconsistências na genotipagem refletidas por desvios do Equilíbrio de Hardy-Weiberg, sugerem que estes dados ainda não foram capazes de fornecer evidências conclusivas a respeito da associação deste SNP à doença.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar a participação de polimorfismos de base única nos genes *TNF*, *IL10* e *IFNG* na suscetibilidade a doenças infecciosas utilizando a hanseníase como um modelo experimental.

2. Objetivos específicos

- Estabelecer a associação entre o polimorfismo *IL10* -819T/C e a suscetibilidade à hanseníase utilizando a estratégia de meta-análise.
- Caracterizar a participação do polimorfismo *IFNG* +874T/A na suscetibilidade à hanseníase através de estudos do tipo caso-controle.
- Investigar a associação entre o polimorfismo *TNF* -308G/A e a hanseníase com o auxílio de estudos de associação e posterior meta-análise dos dados.

Capítulo 2

Análises genéticas, epidemiológicas e biológicas de polimorfismos de base única na região promotora do gene da interleucina 10 sugerem uma participação definitiva do marcador -819 C/T na suscetibilidade à hanseníase.

A questão da suscetibilidade genética a doenças infecciosas tem motivado o desenvolvimento de uma enorme variedade de estudos utilizando desenhos experimentais e amostras populacionais distintas. Neste âmbito, a hanseníase representa um exemplo claro da participação do componente genético na relação parasita-hospedeiro. O fato de a doença não se desenvolver em mais de 97% dos indivíduos expostos por si só já sugere a participação de fatores de risco adicionais nos mecanismos de suscetibilidade. A publicação de estudos observacionais, incluindo análises comparativas de gêmeos, agregação familiar e segregação, forneceu evidências experimentais da existência de um componente hereditário nos padrões de suscetibilidade à hanseníase. Soma-se a isso o evidente contraste entre a variedade de formas clínicas e a reduzida variabilidade genética do hospedeiro. Estas características, em conjunto, fazem da hanseníase um modelo ideal para o estudo específico do componente genético do hospedeiro no desenvolvimento da resposta imune a agentes infecciosos. A aplicação de metodologias de análise genética em larga escala, bem como o desenvolvimento de estudos de genes candidatos, têm fornecido evidências a respeito da participação de vários genes e regiões cromossômicas na hanseníase. Contudo, a maior parte dos dados gerados até o presente momento provém do uso da abordagem de genes candidatos e desenhos de associação, especialmente os de caso-controle. Mais especificamente, os genes do TNF e da IL-10 concentram uma grande parte dos estudos publicados até então.

Embora o desenho de caso-controle seja de mais fácil execução quando comparado a um desenho familiar, este tipo de estratégia de estudo apresenta a clara desvantagem de ser mais suscetível a erros, o que pode resultar em associações espúrias. Por esta razão, é aconselhável a condução de estudos de replicação, de modo a confirmar a existência do achado epidemiológico antes de confirmar a associação do marcador ao desfecho de interesse. Entretanto, os resultados obtidos a partir de estudos independentes nem sempre corroboram o achado original, gerando muitas vezes resultados negativos (ausência de associação) ou até mesmo conflitantes (associação inversa à anterior). Nestes casos, a estratégia de meta-análise torna-se particularmente útil para a definição de uma estimativa de associação que reflita um consenso

entre os dados de todos os estudos, de modo a auxiliar na compreensão do efeito da exposição analisada no desfecho de interesse.

No caso específico da IL-10, até o presente momento estavam disponíveis na literatura apenas 4 estudos em que foi avaliada a associação entre SNPs localizados na região promotora do gene *IL10* e a suscetibilidade à hanseníase. Embora os resultados indiquem uma associação entre os SNPs de IL-10 e a hanseníase nas populações brasileira e indiana, os dados de um estudo conduzido no Malawi não indicaram associação estatisticamente significativa entre este gene e a doença. Este panorama ainda incerto a respeito do gene *IL10* motivou o desenvolvimento de um novo estudo de replicação utilizando uma nova amostra da população brasileira, selecionada no município de Bauru, no Estado de São Paulo. Os resultados desta abordagem reforçaram a associação entre haplótipos do gene *IL10* e a suscetibilidade à hanseníase.

A partir da análise detalhada de cada estudo, observou-se que a associação do alelo -819T com risco elevado de desenvolvimento de hanseníase era comum a quase todos os trabalhos publicados (com exceção do caso-controle da população do Malawi). Por esta razão, embora os dados de desequilíbrio de ligação não justificassem o uso deste SNP como um “tag” ($r^2 < 0,8$), a análise conjunta dos resultados sugeria que o mesmo pudesse ser utilizado ao menos como um marcador do efeito do gene. Esta hipótese motivou o desenvolvimento de um estudo de meta-análise, seguido por experimentos funcionais que pudessem refletir a participação deste SNP nos níveis de IL-10. Embora a etapa de meta-análise tenha sido o principal objeto de estudo deste item da tese, os demais resultados gerados ao longo do trabalho contribuíram muito para o entendimento da participação dos polimorfismos do gene *IL10* na imunopatogenia da hanseníase. A metodologia empregada, bem como os dados obtidos e discussões pertinentes foram descritos em detalhes no trabalho de Pereira e col. (2009), publicado no periódico “Genes and Immunity” e anexado nas páginas seguintes deste manuscrito.

ORIGINAL ARTICLE

Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for –819C/T in leprosy susceptibility

AC Pereira^{1,5}, VN Brito-de-Souza^{1,5}, CC Cardoso², IMF Dias-Baptista¹, FPC Parelli^{1,3}, J Venturini^{1,3}, FR Villani-Moreno¹, AG Pacheco⁴ and MO Moraes²

¹Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil; ²Laboratório de Hanseníase, Departamento de Micobacterioses, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ³Tropical Diseases Area, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil and ⁴Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde (DEMQS), Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)/PROCC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

*Leprosy is a complex infectious disease influenced by genetic and environmental factors. The genetic contributing factors are considered heterogeneous and several genes have been consistently associated with susceptibility like PARK2, tumor necrosis factor (TNF), lymphotoxin- α (LTA) and vitamin-D receptor (VDR). Here, we combined a case-control study (374 patients and 380 controls), with meta-analysis (5 studies; 2702 individuals) and biological study to test the epidemiological and physiological relevance of the interleukin-10 (IL-10) genetic markers in leprosy. We observed that the –819T allele is associated with leprosy susceptibility either in the case-control or in the meta-analysis studies. Haplotypes combining promoter single-nucleotide polymorphisms also implicated a haplotype carrying the –819T allele in leprosy susceptibility (odds ratio (OR) = 1.40; $P = 0.01$). Finally, we tested IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Mycobacterium leprae* antigens and found that –819T carriers produced lower levels of IL-10 when compared with non-carriers. Taken together, these data suggest that low levels of IL-10 during the disease outcome can drive patients to a chronic and unprotective response that culminates with leprosy.*

Genes and Immunity advance online publication, 25 December 2008; doi:10.1038/gene.2008.97

Keywords: leprosy; cytokines; interleukin-10; SNPs; tuberculosis; leishmaniasis

Introduction

Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae* that infects macrophages in skin and Schwann cells in nerves. The global number of new cases is still high; around 260 000 patients registered in 2006, and it is estimated that one-third of these patients exhibit a form of nerve injury that leads to disabilities.¹

Epidemiological and clinical observations suggested that the disease does not occur in most of the exposed individuals, and only 0.1–1% develop leprosy.² Thus, the vast majority of people have some sort of innate resistance that can be, at least in part, explained by their genetic background. There is a large body of evidence indicating genetic influence in leprosy outcome, such as (i) familial clustering; (ii) distinct prevalence rates

associated with distinct ethnic groups in an endemic area with similar exposure to the infectious agent; (iii) in complex segregation analyses, candidate gene approaches and genome-wide scans various genetic associations and linkages have been demonstrated.^{3,4} Furthermore, high-throughput sequencing data from *M. leprae* genomes suggest that this pathogen has a very low genetic diversity,⁵ indicating a crucial role for the host genetics in disease outcome. Thus, leprosy has been considered a model for genetic susceptibility studies.⁴ However, results on genetic screenings and case-control designs on candidate genes are still controversial and any region, gene or single-nucleotide polymorphism (SNP), unequivocally associated with leprosy is rarely reported.⁴

Among these, *PARK2/PACRG*, *TNF/LTA/HLADRB1*, *VDR* and *IL10* have been analyzed in more than one population in studies demonstrating the association of these genes with disease.^{3,6,7} Interleukin (IL)-10 is an immunoregulatory cytokine that is primarily secreted by cells of the monocyte/macrophage lineage.⁸ CD4+ T-regulatory 1 cells secreting IL-10 have been characterized mediating suppression of T-helper cells,⁹ and these Tr1 cells are critical in controlling pathogen-driven

Correspondence: Dr MO Moraes, Leprosy Laboratory—FIOCRUZ, Av. Brasil 4365—Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP: 21040-360, Brazil.

E-mail: mmoraes@fiocruz.br

³These authors contributed equally to this work.

Received 16 September 2008; revised and accepted 18 November 2008

response. IL-10 downregulates T-helper 1 cytokines and costimulatory molecules on macrophages, contributing to the persistence of the pathogens.¹⁰ Moreover, *IL10* is localized in 1q32, a region where other important immunoregulatory cytokines are clustered (*IL-19*, *IL-20* and *IL-24*) and have been associated with other skin diseases like psoriasis and systemic lupus erythematosus.^{11,12}

Genetic epidemiological studies evaluated leprosy in Brazilian, Indian and Malawian populations.³ In the Brazilian population, two different studies demonstrated the association of *IL10* loci with leprosy. Santos *et al.*¹³ showed that -819T allele was associated with leprosy susceptibility. Later, extended haplotypes were studied and the combination of -3575A/-2849G/-2763C/-1082G/-819C was associated with resistance, whereas -3575T/-2849A/-2763C/-1082G/-819T was the susceptible haplotype¹⁴ confirming the participation of -819T as a susceptibility allele of the locus. A replication study carried out in Indians implicated a different promoter haplotype associated with leprosy susceptibility (-3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819T/-592A), but again -819T was associated with the disease outcome.¹⁵ Finally, in a study among a Malawi population, proximal *IL10* SNPs were not associated with leprosy.¹⁶

In this study, we replicated the data of the *IL10* promoter SNPs using a case-control design in a countryside Brazilian population from the state of São Paulo. We analyzed pooled published data using meta-analysis to clear ambiguity among papers published using -819C/T and, finally, this SNP was also a marker for *in vitro* genetic influence of IL-10 production.

Results

IL10 genotyping

All SNP frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in control and leprosy patient groups, except -1082G/A in control group ($P=0.002$) and therefore this SNP was excluded from genotypic and haplotypic comparisons.

We performed pairwise linkage disequilibrium analysis using genotypes obtained from the control group. The D' values were at least 0.7 (Supplementary Figure 1), reflecting that there is an important association between these SNPs. Nevertheless, the r^2 values showed a low correlation between the markers (Supplementary Figure 1), and according to the $r^2 > 0.8$ threshold defined by the HapMap project,¹⁷ we could not define a tag to predict haplotype bins and all SNPs were compared between cases and controls (Table 1). Our results show that -819CT and -819TT genotypes as well as T-allele carriers were associated with leprosy susceptibility, whereas correction for covariates turned some comparisons borderline significant. No association between distal SNPs and disease outcome was observed.

The frequencies of haplotypes encompassing the four SNPs validated in this study at the *IL10* promoter region were estimated (Table 2). We collapsed all rare haplotypes (frequencies < 0.03) in one group to avoid spurious associations. A high-frequency haplotype (0.30 for controls and 0.35 for patients) carrying the allele -819T (-3575T/-2849G/-2763C/-819T) was also associated

with leprosy susceptibility (adjusted odds ratio (OR) = 1.35; 95% confidence interval (CI) = 1.03–1.78; $P=0.03$).

Meta-analysis

A total of four case-control studies were searched in the PubMed, all of them fitted the inclusion criteria and were combined with the present data to generate -819C/T meta-analysis (Supplementary Table 1). The modified Egger's test for funnel plot symmetry did not show significant evidence for publication bias (data not shown).

Results of meta-analysis are shown in Table 3 and Figure 1. We found significant associations of the -819 SNP with leprosy susceptibility, with pooled ORs of 1.29 (95% CI: 1.12–1.49; $P=0.0003$), 1.28 (95% CI: 1.03–1.59; $P=0.023$) and 1.66 (95% CI: 1.28–2.15; $P=0.0001$) for allele T, T carriers and TT genotype comparisons, respectively.

When the data used in our case-control study were removed from the pool with the other studies, effect estimates remained almost unaltered, with ORs of 1.30 (95% CI: 1.07–1.57, $P=0.007$) and 1.80 (95% CI: 1.33–2.44, $P=0.0001$) for allele T and TT genotypes, respectively. T carriers presented a nonsignificant association with leprosy risk (OR = 1.24, 95% CI: 0.93–1.66, $P=0.1384$) (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 2).

IL-10 measurement in PBMC culture supernatants

To evaluate the biological significance of -819C/T SNP genotypes and IL-10 production, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures were stimulated with different antigens and mitogens (Figure 2). Individuals with the -819CC genotype produced higher amounts of IL-10 under any stimulus than -819T allele carriers (-819TT/TC genotypes). Statistically significant higher levels of IL-10 were observed among CC vs CT/TT carriers either when eight bacilli per ml was used as stimulus (median: 1293.8 vs 521.9 pg ml⁻¹; $P=0.019$) or in non-stimulated cultures (median: 841.2 vs 550.7 pg ml⁻¹; $P=0.047$). Following lipopolysaccharide, phytohemagglutinin-M or sonicated *M. leprae* stimulation, no significant differences were observed between -819CC individuals when compared with -819TT/CT carriers.

Discussion

Here, we explored the effect of *IL10* locus on leprosy susceptibility using genetic, epidemiological and immunological tools. To do so, we analyzed a predominantly Caucosid population from countryside Southern Brazil in a case-control study. Both genotypes and haplotypes including the -819T allele were associated with leprosy susceptibility, confirming the earlier findings^{13,15} and suggesting this SNP as a marker for the locus. The study by Malhotra¹⁵ found the most frequent haplotype associated with susceptibility and it was the same as that we observed here (exception for the presence of -1082G/A that we excluded from the comparison). In fact, the data that also combine the -1082G/A SNP to form haplotypes reinforced the results, demonstrating the combination carrying -819T as associated with leprosy susceptibility (data not shown).

Table 1 Genotypic, allelic and carrier frequencies of promoter IL-10 polymorphisms in leprosy cases and controls

SNPs	Genotype	Controls	Leprosy	OR (P-value)	Adjusted OR ^a (P-value)
-819C/T	TT	43 (11.6%)	54 (14.9%)	1.58 (0.05)	1.60 (0.05)
	CT	165 (44.2%)	178 (49.0%)	1.36 (0.05)	1.34 (0.07)
	CC ^b	165 (44.2%)	131 (36.1%)		
	Total	373	363		
	Allele	T	0.34	0.39	1.28 (0.10)
	C ^b	0.66	0.61		
Carriers	TT/CT	208 (56%)	232 (64%)	1.40 (0.024)	1.44 (0.026)
Pass HWE		Yes			
-1082G/A	GG	20 (5.4%)	35 (10.8%)	ND	
	GA	186 (50.0%)	145 (45.2%)		
	AA	166 (44.6%)	141 (44.0%)		
	Total	372	321		
	Allele	G	0.30	0.33	
	A	0.70	0.67		
Carriers	GG/GA	206 (55%)	180 (56%)		
Pass HWE		No			
-2763C/A	AA	23 (6.3%)	30 (6.2%)	1.36 (0.29)	1.29 (0.38)
	CA	141 (38.3%)	141 (38.5%)	1.04 (0.77)	1.00 (0.97)
	CC ^b	204 (55.4%)	195 (53.3%)		
	Total	368	366		
	Allele	A	0.25	0.27	1.11 (0.53)
	C ^b	0.75	0.73		
Carriers	AA/CA	164 (44.5%)	171 (46.7%)	1.09 (0.55)	1.06 (0.70)
Pass HWE		Yes			
-2849G/A	AA	9 (2.4%)	14 (3.8%)	1.60 (0.28)	1.50 (0.35)
	GA	110 (29.6%)	108 (29.4%)	1.00 (0.95)	0.98 (0.91)
	GG ^b	252 (68.0%)	245 (66.8%)		
	Total	371	367		
	Allele	A	0.17	0.19	1.1 (0.65)
	G ^b	0.83	0.81		
Carriers	AA/GA	119 (32%)	122 (33.2%)	1.05 (0.73)	1.02 (0.90)
Pass HWE		Yes			
-3575T/A	TT	194 (51.0%)	189 (51.2%)	0.97 (0.94)	1.16 (0.65)
	TA	166 (43.7%)	160 (43.4%)	0.96 (0.91)	1.08 (0.81)
	AA ^b	20 (5.3%)	20 (5.4%)		
	Total	380	369		
	Allele	A	0.27	0.27	0.99 (0.99)
	T ^b	0.73	0.73		
Carriers	AA/TA	186 (48%)	180 (48.7%)	0.99 (0.96)	0.88 (0.43)
Pass HWE		Yes			

Abbreviations: HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism.

Bold values express statistically significant results.

^aResults of logistic regression analyses adjusted for the covariates gender and ethnicity. Statistical analysis for -1082G/A was not done (ND) as it does not fit HWE.

^bBaseline.

The association exhibited an OR of approximately 1.4, suggesting a consistent risk of 40% for this allele in leprosy susceptibility. This result was reinforced with meta-analysis, in which the SNP -819C/T was tested in association with leprosy.¹³⁻¹⁶ The pooled sample reached a total of 2702 individuals (1355 cases and 1347 controls), including subjects belonging to three Brazilian, one Malawian and one Indian populations (total of five populations). We pooled data from papers found in the literature using key words, but also included our data that were not selected in a canonical way to compare with all selected papers for meta-analysis, but the results with or without our case-control study show basically the same: association of -819T with leprosy susceptibility. We adopted the random effects model despite the lack of heterogeneity evidence in Cochran's Q statistic

because this test is underpowered when there are few studies under analysis.¹⁸ The pooled ORs indicated that this SNP is indeed associated with leprosy and -819T (the minor frequent allele) was found to confer a susceptibility status in all combinations tested: T allele, T carriers and TT genotype. Exclusion of our new data from the meta-analysis decreased the pooled sample size to 1966 individuals (992 cases and 974 controls). The effect estimates remained almost unaltered but statistical power was clearly damaged. Consequently, T-carrier comparisons could not reach statistical significance, even though the point estimate was hardly altered. We also considered the use of -1082G/A in meta-analysis, but most of the published papers had genotypic data deviating from HWE, which led to the exclusion of these particular studies from the

pooled data turning meta-analysis impractical (data not shown).

Finally, the phenotypic data suggest that this SNP indeed regulates the secretion of IL-10 *in vitro*. As expected, IL-10 production was not influenced by genotypes in every stimulus used.¹⁹ Levels of IL-10 in PBMC cultures stimulated lipopolysaccharide, and phytohemagglutinin-M did not vary among -819C/T genotypes. Nevertheless, when *M. leprae* was used at eight bacilli per cell, significant differences between -819CC vs -819TT/CT carriers were observed. Also, without stimulation, the IL-10 innate response was also affected by each genotype. Surprisingly, either innate responses or *M. leprae*-stimulated -819TT/CT individuals pro-

duced lower levels of IL-10 as compared with -819CC individuals. This was unexpected as higher IL-10 levels are observed in patients exhibiting extreme forms (lepromatous) as compared with localized (tuberculoid) forms of leprosy.²⁰ Furthermore, IL10 is a major immunomodulator, being produced by T-regulatory cells, leading to anergy in tuberculosis,²¹ while it also downregulates T-helper 1 responses and consequently protective immune responses. Thus, it is likely that different stimuli mobilize different transcription factors in a way that *M. leprae*, but not lipopolysaccharide or phytohemagglutinin-M, genetic regulates IL-10 levels through -819 promoter SNP. Family and twin studies showed that IL-10 production is, at least, 50% influenced by genetic factors.^{22,23} Moreover, -819C/T and -592C/A SNPs are in linkage disequilibrium²⁴ and have been considered as strong candidates for a regulatory role of the cytokine production as they are located in positive and negative regulatory elements, respectively, and the latter is inside a putative STAT3-binding site.²⁵ It has been reported that a lower production of IL-10 from -819T carriers in which the exchange of this nucleotide alters the binding affinity of nuclear transcription factors and -819T is also involved in leishmaniasis outcome.²⁶

In this functional analysis, we tested healthy people from an endemic area, which means that these people will respond to *M. leprae*, but similarly to the interaction during the early phases of the disease. We chose to do so because patients with high loads, like 10¹⁰ mycobacteria, would obviously have biased levels of IL-10 production as they already produce the highest levels of IL-10. Even though we used healthy volunteers, we cannot guarantee that this pattern of IL-10 production would be followed in leprosy-susceptible individuals, but low and constant production of IL-10 has been reported to be crucial for chronification of leishmaniasis lesions.²⁷ Thus, -819T

Table 2 Haplotype frequencies in controls and leprosy patients and association analyses for leprosy

Haplotype				Frequency ^a		OR	OR
				(P-value)	(P-value) ^b		
-3575	-2849	-2763	-819	Controls	Leprosy		
A	A	A	C	0.12	0.12	1.17 (0.42)	1.06 (0.78)
A	G	A	C	0.08	0.08	1.12 (0.59)	1.06 (0.79)
A	G	C	C	0.03	0.03	1.05 (0.90)	0.89 (0.76)
T	G	C	T	0.30	0.35	1.39 (0.01)	1.35 (0.03)
T	G	C	C ^c	0.37	0.30	—	—

Abbreviation: OR, odds ratio.

Bold values express statistically significant results.

^aFrequencies of patients and controls will not sum up to 100% because rare haplotypes (<0.03) were collapsed in one for comparisons and are not represented in the table.

^bResults adjusted for the covariates gender and ethnicity.

^cBaseline.

Table 3 Summary of meta-analysis of case-control studies of IL-10 -819, including present data

	Meta-analysis					Homogeneity		
	Leprosy	Controls	OR	95% CI	P-value	Q	P-value	I ²
T allele	1088	919	1.2964	(1.1283; 1.4897)	0.0003	5.78	0.2163	30.8
T carrier	859	775	1.2846	(1.0339; 1.5960)	0.0237	7.14	0.1285	44
T/T genotype	229	144	1.6640	(1.2872; 2.1511)	0.0001	4.81	0.3068	16.9

Abbreviations: CI, confidence interval; IL-10, interleukin-10; OR, odds ratio.

Results are shown for random effects models.

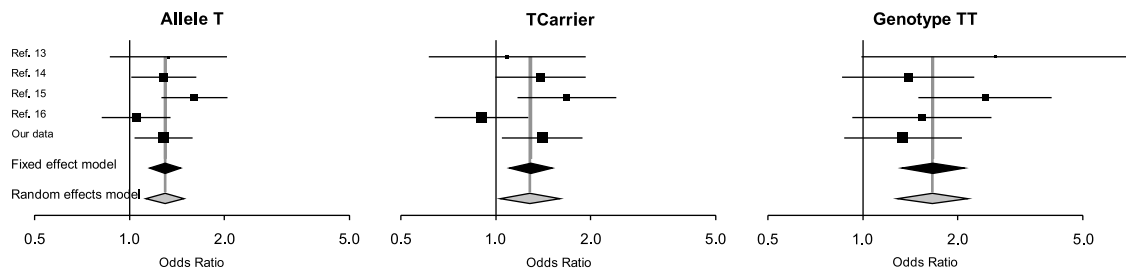


Figure 1 Meta-analysis of five leprosy case-control studies using the SNP IL-10 -819T/C including present data. Meta-analysis was performed under both fixed-effect and random models. Bars represent 95% CI and boxes represent OR values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled results. CI, confidence interval; IL-10, interleukin-10; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism.

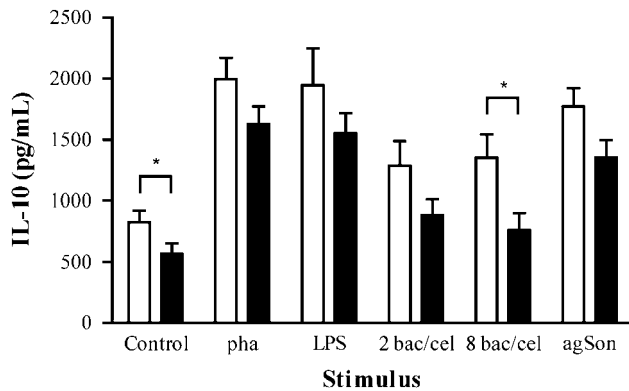


Figure 2 IL-10 production by PBMC according to the -819C/T individual genotypes. PBMC cultures were performed for 48 h with $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phytohemagglutinin-M (PHA), $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS), whole *M. leprae* at two bacilli per cell (Ag2) or eight whole bacilli per cell (Ag8), or $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of sonicated *M. leprae* antigen (AgSon). White bars—CC individuals; black bars—CT/TT individuals. There is a significant lower production of IL-10 among CT/TT individuals when compared with cells stimulated only with whole *M. leprae* at eight bacilli per cell ($P < 0.05$) or without any stimulus ($P < 0.05$). IL-10, interleukin-10; LPS, lipopolysaccharide; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

carriers as low IL-10 producers bring up a new understanding for the disease, where, maybe, these sustained low levels of IL-10 are necessary to lead leprosy to a chronic and unresponsive state.

Leprosy and tuberculosis are diseases caused by similar intracellular pathogens. Recently, we showed that *IFNG* +874T/A was an important SNP in tuberculosis susceptibility, whereas *IL-10* -1082G/A was not,²⁸ assuming that *IL-10* locus is not contributing effectively to the outcome of tuberculosis. On the other hand, it seems that in leprosy, *IL-10* SNPs are responsible for genetic effects controlling IL-10 production through a subtle but consistent association with leprosy susceptibility. So, it seems that different host immune strategies have evolved during interactions with intracellular pathogens, in which IL-10 is important for leprosy, but not for TB susceptibility.

Considering that leprosy is a chronic inflammatory disease and that severity is related to the host immune response, not only the amount, but also the timing of IL-10 production can be crucial to define disease outcome. In conclusion, our data point out the definitive role of the -819T allele in leprosy susceptibility and suggest that this polymorphism has a participation in a lower IL-10 production.

Materials and methods

Subjects

Case-control study. Seven-hundred and sixty individuals (374 cases and 380 controls) were selected from an outpatient unit at Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, São Paulo State, located at the southeastern region of Brazil. The leprosy patients were classified in accordance with Ridley and Jopling²⁹ criteria and divided into multibacillary ($n = 291$) and paucibacillary ($n = 79$) as guided by the World Health Organization (WHO) for treatment purposes. The remaining four patients could not be classified as multibacillary or paucibacillary. Among patients, the mean age was

40.7 ± 17.5 years and the M/F gender ratio was 1.4. The healthy population (mean age = 35.9 ± 10.7) was selected among blood donors from the same geographic area. In this control group, the M/F gender ratio was 1.95. Ethnicity was classified after careful inspection of facial morphological features, hair type, skin color and inquiry about direct ancestry until grandparents. Three groups were ascertained: caucasoids, mestizoes and blacks. Even though considering that common ethnicity markers do not cluster 'African-', 'Native' or 'Euro-Brazilians' as defined by morphological criteria,^{30,31} all comparisons were performed with both adjusting and not adjusting OR and *P*-values for ethnicity.

Taking the -819 SNP as an example, given the frequencies we found in our population, the power to detect an OR of 1.4 was about 62% when -819TT was compared with the other two genotypes. Nevertheless, we would have about 80% power to detect an OR as low as 1.5 for the other SNPs, given this same frequency distribution, which seems pretty reasonable.

Genotype-phenotype comparisons. To analyze IL-10 production *in vitro*, 27 healthy volunteers were selected in accordance with their -819C/T genotype. A total of nine individuals exhibited -819CC genotype, five women and four men (mean age 41.1 ± 10.4 years). Then, 18 -819T carriers (8 women and 10 men, mean age 42.7 ± 13.3 years) were also selected. The study was approved by the ethical committee at Lauro de Souza Lima Institute and signed informed consent was obtained from all participants.

Genotyping

Genomic DNA was obtained from white blood cells by using the salting out method. Genotyping for the polymorphisms -819C/T, -1082G/A, -2763C/A, -2849G/A and -3575T/A in *IL-10* promoter was performed by PCR restriction fragment length polymorphism.

PCR amplifications were carried out as described¹⁴ with modifications. Briefly, PCR mix was carried out with 50 ng of genomic DNA, 10 pmol of each specific primer, 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1.5 mM of MgCl_2 in a final reaction volume of $12.5 \mu\text{l}$ using a thermal cycler (MJ Research PTC100, Hercules, CA, USA). SNP typing at positions -2849 and -2763 was performed by nested PCR.¹⁴ PCR products were digested by specific restriction enzymes (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) for each SNP and genotypic profiles were determined by 2.0% agarose gel electrophoresis.

Peripheral blood mononuclear cell culture and IL-10 measurement

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from fresh blood of different donors using Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis, MO, USA) density centrifugation. The mononuclear cells were grown at 2×10^5 cells per well in RPMI-1640 medium with L-glutamine, supplemented with $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of penicillin-streptomycin and 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cell cultures were stimulated for 48 h with $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phytohemagglutinin-M (Sigma), $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of *Escherichia coli* lipopolysaccharide from Sigma, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of irradiated and sonicated *M. leprae* (AgSon) and whole-

irradiated *M. leprae* (kindly provided by Dr Patrick Brennan, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) at two and eight bacilli per cell. Cultures were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The culture supernatants were harvested after 48 h and kept at -80 °C.

IL-10 levels were measured in cell-free supernatants in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay (IL-10 DuoSet; R&D Systems, Emeryville, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The lower limit of detection was 15.6 pg ml⁻¹.

Identification of eligible studies and data extraction for meta-analysis

We searched for studies that examined the association of *IL10* -819C/T with leprosy. Literature search was made in MEDLINE using PubMed citations to identify available articles (from December 2002 to June 2008) in which the *IL10* -819C/T SNP was tested for association with leprosy in case-control studies. Articles related to the selected papers (using PubMed search) and references in the studies were also reviewed to identify other studies. Keywords used were 'interleukin-10', 'IL-10', 'polymorphism', 'SNP' and 'leprosy', entered as text words. No language restrictions were applied. A study was included in the analysis if (1) it was published before June 2008, (2) it was not related to earlier publications and (3) it provided enough genetic data to calculate OR. We excluded studies (1) that contained overlapping data and (2) studies in which the control population deviated from HWE.

Statistical analysis

Case-control study. Deviations from HWE were tested with χ^2 -tests. Genotype data were analyzed using genotypic and allelic frequencies by using logistic regression models adjusted for the covariates gender and ethnicity. Linkage disequilibrium was measured by *D'* and *r*² statistics.³² Haplotype frequencies were estimated by using the Expectation/Maximization algorithm. All analyses were performed using the statistical software R for Windows version 2.6.1, with the packages 'genetics' and 'haplo.stats'.

Meta-analysis. All analyses were performed as described.²⁸ Briefly, allele frequencies at the *IL10* -819C/T SNP from the selected studies were determined by the allele-counting method, and a χ^2 -test was used to determine if observed frequencies of genotypes conformed to HWE. All comparisons were made with respect to the minor frequency allele. ORs were used as the point estimates of risk and were calculated along with their 95% CIs for each study. To test for publication bias, a modification of Egger's test was performed to provide statistical evidence for funnel plot symmetry. Heterogeneity across studies was assessed through Cochran's Q statistic and *I*² statistic. Finally, the overall or pooled estimate of risk (OR) was obtained by using Mantel-Haenszel method in the fixed-effect model and by using DerSimonian and Laird method in the random effects model. Pooled OR in the meta-analysis was performed weighting individual OR by the inverse of their variance. All analyses were carried out with R for Windows 2.6.1 with the package 'meta'.

Genotype-phenotype comparisons. Cytokine measurement data were analyzed by using non-parametric Mann-Whitney *U*-tests with GraphPad InStat version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

References

- Richardus JH, Habbema JD. The impact of leprosy control on the transmission of *M. leprae*: is elimination being attained? *Lepr Rev* 2007; **78**: 330-337.
- Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004; **5**: 315-329.
- Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006; **77**: 189-202.
- Alter A, Alcais A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet* 2008; **123**: 227-235.
- Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C *et al*. On the origin of leprosy. *Science* 2005; **308**: 1040-1042.
- Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M *et al*. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 2007; **39**: 517-522.
- Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A *et al*. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 2007; **8**: 320-324.
- Moraes MO, McNicholl JM, Huizinga TWJ, Ottenhoff THM. Cytokine genes I: IL10, IL6, IL4, and the IL1 family. In: Kaslow RA, McNicholl, JM, Hill AVS (eds). *Genetic Susceptibility to Infectious Diseases*. Oxford University Press: NY, 2008, pp 208-226.
- Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003; **421**: 388-392.
- Volk H, Asadullah K, Gallagher G, Sabat R, Grutz G. IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol* 2001; **22**: 414-417.
- Köks S, Kingo K, Vabrit K, Rätsep R, Karelson M, Silm H *et al*. Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes Immun* 2005; **6**: 407-415.
- Chung EY, Liu J, Zhang Y, Ma X. Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Genes Immun* 2007; **8**: 577-589.
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH *et al*. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002; **186**: 1687-1691.
- Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR *et al*. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 2004; **5**: 592-595.
- 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.
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analysis using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 106-120.

- 18 Kavvoura FK, Ioannidis JP. Methods for meta-analysis in genetic association studies: a review of their potential and pitfalls. *Hum Genet* 2008; **123**: 1–14.
- 19 Mörmann M, Rieth H, Hua TD, Assouh C, Roupelieva M, Hu SL *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.
- 20 Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol* 1998; **37**: 733–740.
- 21 Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC *et al*. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 2000; **105**: 1317–1325.
- 22 Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI *et al*. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; **349**: 170–173.
- 23 Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Höhler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors—a twin study. *Genes Immun* 2002; **3**: 407–413.
- 24 Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME *et al*. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics* 2003; **54**: 896–899.
- 25 Kube D, Platzter C, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M *et al*. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 1995; **7**: 1–7.
- 26 Salhi A, Rodrigues Jr V, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR *et al*. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 2008; **180**: 6139–6148.
- 27 Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA *et al*. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 2001; **194**: 1497–1506.
- 28 Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* 2008; **123**: 477–484.
- 29 Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; **34**: 255–273.
- 30 Gonçalves VF, Carvalho CM, Bortolini MC, Bydlowski SP, Pena SD. The phylogeography of African Brazilians. *Hum Hered* 2008; **65**: 23–32.
- 31 Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS *et al*. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006; **62**: 190–195.
- 32 Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 1995; **29**: 311–322.

Supplementary Information accompanies the paper on Genes and Immunity website (<http://www.nature.com/gene>)

Supplementary material

This file contains all information necessary to a complete understanding of linkage disequilibrium and meta-analysis results. Supplementary table 1 includes pairwise linkage disequilibrium results measured by D' and r^2 . Supplementary table 1 includes data obtained from previous papers selected during our systematic review. Supplementary figure 2 and Supplementary table 2 show the results of meta-analysis after exclusion of our data.

Supplementary Figure 1: Pairwise linkage disequilibrium analysis of *IL10* promoter SNPs.

(a)

	<i>IL10</i> -1082	<i>IL10</i> -2763	<i>IL10</i> -2849	<i>IL10</i> -3575
<i>IL10</i> -819	0.9995659	0.8794310	0.7420687	0.7075617
<i>IL10</i> -1082		0.7524330	0.7488093	0.6876804
<i>IL10</i> -2763			0.7846385	0.7453028
<i>IL10</i> -2849				0.7392885

(b)

	<i>IL10</i> -1082	<i>IL10</i> -2763	<i>IL10</i> -2849	<i>IL10</i> -3575
<i>IL10</i> -819	0.2210396	0.1335800	0.05821011	0.09439622
<i>IL10</i> -1082		0.4420041	0.26792013	0.40304364
<i>IL10</i> -2763			0.37680058	0.50883544
<i>IL10</i> -2849				0.30641641

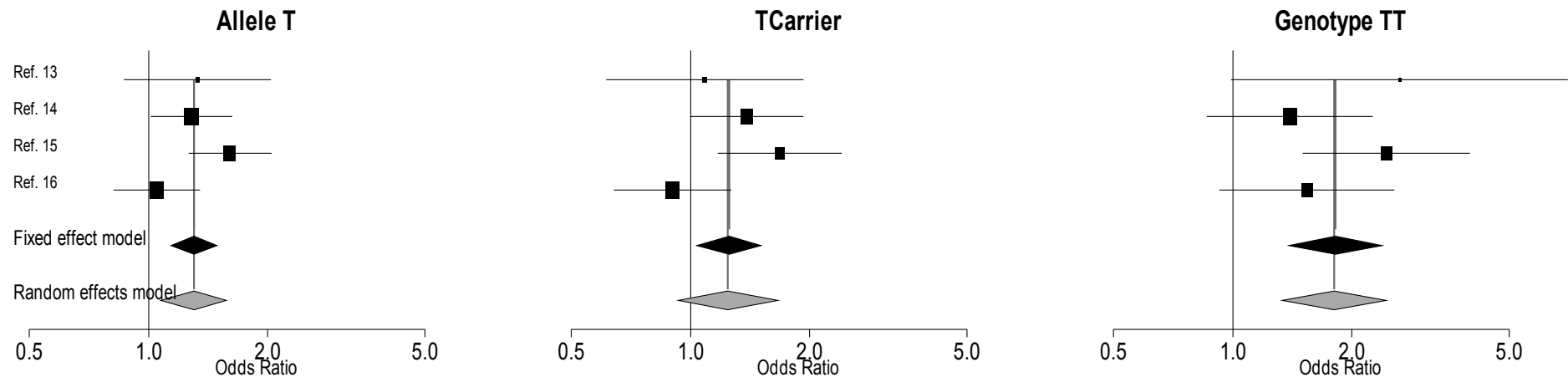
Pairwise linkage disequilibrium was measured by D' (a) and r^2 (b) statistics.

Supplementary Table 1: Papers selected for meta-analysis of the SNP at -819 position of *IL10* gene.

	<i>IL10</i> -819	Ref. 12	Ref. 13	Ref. 14	Ref. 15
Population		Brazilians	Brazilians	Indians	Malawians
Controls	CC	28 (0.45)	129 (0.44)	103 (0.39)	147 (0.42)
	CT	29 (0.47)	131 (0.45)	136 (0.51)	170 (0.48)
	TT	5 (0.08)	33 (0.11)	27 (0.1)	36 (0.1)
	Total	62	293	266	353
	Allele C	85 (0.68)	389 (0.66)	190 (0.36)	464 (0.66)
	Allele T	39 (0.31)	197 (0.34)	342 (0.64)	242 (0.34)
	T carriers	34 (0.17)	164 (0.56)	239 (0.90)	206 (0.58)
	Pass HWE test?	Yes	Yes	Yes	Yes
Patients	CC	87 (0.43)	106 (0.36)	77 (0.27)	95 (0.44)
	CT	77 (0.38)	143 (0.49)	144 (0.51)	88 (0.41)
	TT	38 (0.19)	44 (0.15)	61 (0.22)	32 (0.15)
	Total	202	293	282	215
	Allele C	251 (0.62)	355 (0.61)	266 (0.47)	278 (0.65)
	Allele T	153 (0.38)	231 (0.39)	298 (0.53)	152 (0.35)
	T carriers	115 (0.57)	187 (0.64)	221 (0.78)	120 (0.56)
	Pass HWE test?	No	Yes	Yes	Yes

Results are shown in absolute numbers (frequency).

Supplementary Figure 2- Meta-analysis of four leprosy case-control studies using the SNP *IL10* -819 C/T.



Meta-analysis was performed under both fixed-effect and random models. Bars represent 95% CI and boxes represent OR values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled results.

Supplementary Table 2- Summary of meta-analysis of 4 case-control studies of *IL10* -819 C/T.

	Meta-analysis					Homogeneity		
	Leprosy	Controls	OR	95% CI	P-value	Q	P-value	I ²
T Allele	802	668	1.3011	[1.0745; 1.5755]	0.007	5.76	0.1238	47.9
T Carrier	627	567	1.2445	[0.9319; 1.6621]	0.1384	6.73	0.0812	55.4
T/T Genotype	175	101	1.8056	[1.3352; 2.4417]	0.0001	3.54	0.315	15.4

Results are shown for random effects model.

Capítulo 3

Associação entre o polimorfismo de base única *IFNG*+874 T/A e a hanseníase em brasileiros.

O paradigma imunológico Th1/Th2 tem sido constantemente utilizado para explicar a variabilidade da hanseníase em virtude da correlação entre os níveis de resposta imune celular e o espectro clínico da doença. De uma maneira geral, a resposta a patógenos intracelulares depende primordialmente do desenvolvimento de uma imunidade celular, uma vez que a resposta mediada por anticorpos não é capaz de conter este tipo de infecção. No contexto da hanseníase, os indivíduos que desenvolvem preferencialmente uma resposta Th2 apresentam uma enorme dificuldade em conter a dispersão do bacilo, o que resulta na disseminação da doença. Ao contrário, os pacientes que tendem a desenvolver uma resposta do tipo Th1 apresentam uma maior habilidade de conter a proliferação do bacilo e, por esta razão, desenvolvem a doença em sua forma localizada. Diante deste padrão, citocinas tais como a IL-12 e o IFN γ desempenham função essencial no controle da infecção pelo *M. leprae* e outros patógenos intracelulares. A síndrome conhecida como “Suscetibilidade Mendeliana a Doenças Micobacterianas” constitui um exemplo ainda mais claro da participação do eixo IL-12/IL-23/IFN γ no desenvolvimento da resposta a micobacterioses, uma vez que a perda da função de genes essenciais para esta cascata resulta em infecção severa e até mesmo a morte, ainda que o patógeno em questão seja de baixa virulência. Estes dados sugerem que mutações comuns, com efeitos mais sutis sobre a atividade da proteína, poderiam contribuir para os mecanismos de suscetibilidade genética a micobacterioses mais comuns, como a hanseníase e a tuberculose.

De acordo com os dados publicados até então, o gene *IFNG* não parecia estar associado à hanseníase. Entretanto, a participação do polimorfismo +874T/A nos mecanismos de resistência a diferentes tipos de infecção, particularmente a tuberculose, fazem deste polimorfismo um importante candidato para estudos de associação no contexto de infecções por patógenos intracelulares em geral. Além disso, a aparente inconsistência nos resultados da genotipagem deste SNP em ambos os estudos que o utilizaram como um marcador, sugeriam que os dados existentes até então não representavam uma prova definitiva da ausência de associação entre o polimorfismo +874T/A e a hanseníase. Sendo assim, dois novos estudos de caso-controle foram desenvolvidos a fim de esclarecer a associação do gene *IFNG* com a

hanseníase. O primeiro deles incluiu a genotipagem dos SNPs +874T/A, +2109G/A e rs2069727 em indivíduos da população de Bauru. Os resultados deste primeiro estudo caso-controle demonstraram associação étnico-específica do polimorfismo +874T/A, uma vez que apenas os carreadores afro-descendentes do alelo +874T foram beneficiados por seu efeito protetor. Os dados desta população permitiram ainda a seleção do SNP +874T/A como um marcador da associação observada em virtude do forte desequilíbrio de ligação com o SNP rs2069727 e também da ausência total de associação do marcador +2109 tanto em isolado quanto nas combinações haplotípicas. Em seguida, um novo estudo de associação foi desenvolvido com o objetivo de replicar o achado epidemiológico. Esta segunda etapa incluiu a genotipagem apenas do SNP da posição +874 em uma população do Rio de Janeiro. Os resultados observados confirmaram a associação do alelo +874T com proteção contra a hanseníase mesmo na população geral. Entretanto, esta associação também se mostrou étnico-específica após a estratificação da análise, dado que a associação só foi observada no subgrupo de indivíduos afro-descendentes. Os estudos funcionais conduzidos em seguida reforçam o significado do achado, uma vez que os níveis de IFN γ se mostraram mais elevados entre carreadores do alelo +874T.

Os resultados obtidos em ambos os estudos indicam claramente a associação entre o polimorfismo +874 T/A e o desenvolvimento da hanseníase. Apesar do efeito ter-se mostrado étnico-específico, os dados obtidos a partir deste estudo somam-se aos anteriormente publicados, pontuando ainda mais a funcionalidade do marcador. A metodologia empregada, bem como os resultados e suas referidas discussões estão descritos no artigo que se segue, o qual foi submetido recentemente para a publicação no periódico “PLoS Neglected and Tropical Diseases”:

IFNG+874 T/A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians.

Cardoso CC^{1*}, Pereira AC^{2*}, Brito-de-Souza VN², Dias-Baptista IM², Maniero VC¹, Venturini J^{2,3}, Vilani-Moreno FR¹, Ribeiro-Alves M¹, Sarno EN¹, Pacheco AG⁴, Moraes MO¹

1 Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

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

3 Tropical Diseases Area, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

4Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde (DEMQS) - Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)/PROCC - FIOCRUZ - Rio de Janeiro, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

corresponding author: Milton Ozório Moraes
Leprosy Laboratory - FIOCRUZ
Av. Brasil 4365 - Manguinhos
Rio de Janeiro - RJ
CEP: 21040-360
Phone: (21) 25984467
Fax: (21) 22709997
e-mail: mmoraes@fiocruz.br

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, a low virulence mycobacteria, and the outcome of disease is dependent on the host genetics for either susceptibility per se or severity. The *IFNG* gene codes for interferon- γ (IFN γ), a cytokine that plays a key role in host defense against intracellular pathogens. Indeed, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IFNG* have been evaluated in several genetic and epidemiological studies, and the SNP +874 T/A has been associated to protection against infectious diseases, especially tuberculosis. Here, we evaluated the association of the *IFNG* locus with leprosy enrolling 2,125 individuals in two independent case-control designs in different cities of Brazil and also verified the influence of the +874 T and A alleles in IFN γ production. First, we conducted a case-control study (n=755) with subjects recruited from the State of São Paulo, using the +874 T/A, +2109 G/A and rs2069727 SNPs, located in introns 1 and 3 and the 3'UTR region of *IFNG*, respectively. Results of this study showed an ethnic-specific effect of the +874 T/A SNP. Only afro-descendant carriers of the +874T allele showed a strong association towards protection against leprosy (OR = 0.40; p = 0.004). In a second independent case-control study, we recruited another 1,370 individuals from Rio de Janeiro and replicated the ethnic-specific effect among afro-descendants (OR = 0.59; p = 0.01). We also conducted functional analyses with peripheral blood mononuclear cells and found that +874T carriers produced higher IFN γ levels in the absence of any stimulus. Our data showed a strong and ethnic-specific association between the SNP *IFNG* +874 T/A and leprosy susceptibility. Furthermore, our data reinforce the role of this SNP in protection against intracellular pathogens diseases.

Key words: leprosy, tuberculosis, *Mycobacterium leprae*, population, ethnicity, cytokines

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), which mainly infects macrophages in skin and Schwann cells in peripheral nerves. The clinical manifestations are presented in a wide spectrum ranging from a localized to a disseminated form - called tuberculoid (TT) and lepromatous (LL) leprosy, respectively. The intermediate forms are called *borderline* and classified into three groups according to their proximity to polar forms [1]. *M. leprae* is highly adapted to the intracellular environment and exhibits very low genetic diversity [2] suggesting that variability of clinical presentations are partially explained by host immune responses. Also, genetics of the human host is responsible for the susceptibility to leprosy *per se* observed among only a small percentage of the exposed individuals (1-3%). The genetic component of susceptibility to leprosy *per se* and clinical types were first demonstrated using segregation analyses and twin studies [3,4]. Recently, several case-control and family-based association analyses have reported the role of genes coding for proteins of the immune system, independently confirming their findings [5]. Among these genes are *TNF* [6,7], *IL10* [8-10], *LTA* [11], and *HLADRBI* [12]. Furthermore, recent studies have suggested an association between leprosy and additional candidate genes such as toll-like receptors [13].

Interferon-gamma (IFN γ) is a cytokine secreted mainly by CD4⁺ Th1 cells, CD8⁺ T cells and NK cells whenever these cells are stimulated by IL-12, among other stimuli. IFN γ , in turn, induces IL-12 production in phagocytes and inhibits IL-4 secretion by Th2 populations, which may further drive Th1 differentiation *in vivo* [14]. This axis of activation plays a critical role in killing of intracellular pathogens such as *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Salmonella* and *Chlamydia* species and is considered a key modulator of innate and adaptative immune responses [15] since it promotes macrophage microbicidal activity based on oxidative metabolism [16]. In leprosy, IFN γ enables macrophages to effectively inhibit or kill *M. leprae* [17,18]. *In vitro* studies have shown that T lymphocytes obtained from TT patients secrete mainly IFN γ , while the LL patients release IL-4 preferentially [19]. Taken together, these data suggest that *IFNG* is an important candidate gene for susceptibility to leprosy *per se*.

IFNG is located in the 12q14 region, and despite the high conservation of its coding region, some polymorphisms have been detected along the *IFNG* sequence, especially in introns 1 and 3, and in the 3' UTR region [20]. The single nucleotide polymorphism (SNP) +874 T/A (rs2430561) has been a target in association studies of diverse infectious diseases, especially

those caused by intracellular pathogens. The allele +874T was associated with higher INF γ production in blood cells stimulated with purified protein derivative (PPD) from *M. tuberculosis* [21] and was also defined as a key allele in TB resistance after a meta-analysis study [22]. Nevertheless, previous studies did not detect association between this SNP and leprosy [23,24].

Herein we conducted a population-based study using two Brazilian case-control panels to investigate the role of genetic polymorphisms along the sequence of *IFNG* in leprosy susceptibility. We were able to demonstrate an ethnic-specific protection against leprosy for the +874T allele.

Subjects and Methods

Subjects: a total of 2,125 individuals, 1,370 from the metropolitan area of Rio de Janeiro (RJ) and 755 from Bauru, a city in the countryside of the state of São Paulo, were included in this study. Of these, 1,045 were cases (670 from RJ and 375 from Bauru) and 1080 were controls (700 from RJ and 380 from Bauru). Diagnosis was determined by experienced professionals from the Souza Araújo Clinic at Fiocruz and Lauro de Souza Lima Institute (Bauru). Patients were classified according to Ridley and Jopling (1966), and for treatment purposes were classified as pauci- or multibacillary. They were treated as specified by the World Health Organization (WHO). The control group was composed of unrelated individuals who lived in the same endemic area as the patients. All individuals were ethnically classified as Afro- or Euro-descendants after careful inspection of characteristics such as facial morphological features, hair type and skin color of both the individual as well as his/her family. General characteristics of patients and controls recruited in this study are summarized in Supplementary Table 1. For the functional analyses, twenty-eight healthy individuals were selected in accordance with their genotype for the +874 T/A SNP. More specifically, a total of nine volunteers presented the AA genotype, of which six were women and three were men (mean age: 40.1 years), and nineteen carried the +874T allele (TA or TT genotypes), of which fifteen were women and four were men (mean age: 43.8 years). Written informed consent was obtained from all individuals included in the study as required by the local ethics committees (CEP-FIOCRUZ and Lauro de Souza Lima Institute, Bauru).

Study design: during the course of this work, two independent case-control studies were conducted. First, we compared the frequencies of the *IFNG* SNPs +874 T/A, +2109 G/A and

rs2069727 between cases and controls recruited from Bauru. The analyses were performed using all subjects and then, among individuals of 4 subgroups defined according to sex and ethnicity. Haplotype analyses were conducted following this same method. A second study was conducted using a sample selected from RJ to assess the reproducibility of the results. These analyses were performed following the same strategy described for the first study. Finally, functional analyses were performed to determine the effect of the SNPs on IFN γ production.

DNA extraction and genotyping: DNA was extracted from frozen blood samples using a salting-out precipitation method. The SNP +874 T/A was genotyped by PCR-ARMS as described [25]. The polymorphism +2109 G/A created a restriction site for the enzyme *Aci* I and was genotyped by a previously described PCR-RFLP method [26]. Briefly, PCR reactions were carried out with 50 ng of genomic DNA, 0.3 μ M of each specific primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen, CA, USA) and 1.5 mM of MgCl₂ in a final reaction volume of 25 μ l. Genotyping of the SNP at +874 included a second primer pair (0.15 μ M, each) used as an internal control for amplification. The SNP rs2069727 was genotyped using a real time SNP genotyping Assay (Assay ID: C__2683475_10) according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, CA, USA). Conventional and real-time PCR reactions were performed using the MJ Research PTC100 (Hercules, CA, USA) and ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, CA, USA) thermal-cyclers, respectively.

PBMC culture and IFN γ measurement: Mononuclear cells were separated from 20 ml of venous blood by Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis, MO, USA). The total number of mononuclear cells was determined in a Neubauer chamber and final concentration was adjusted to 2×10^6 mononuclear cells/ml using RPMI-1640 medium containing L-glutamine and 25 mM HEPES buffer (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) (Gibco). The cell suspension (100 μ l/well) was distributed in 96-well, flat-bottom tissue culture plates (Corning, New York, NJ, USA) in the presence of 8 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA, Gibco), 10 μ g/ml of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS, Sigma), 10 μ g/ml of *M. leprae* sonicated antigen (AgSon) and 4 μ g/ml of whole *M. leprae* antigen (8 bacilli:1 mononuclear cell). The antigens were kindly provided by Dr. Patrick Brennan, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, USA. Control cultures were not stimulated. Plates were incubated at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ for 5 days and the supernatants were

collected and stored at -80°C until the cytokine measurement. The total concentration of $\text{IFN}\gamma$ in the mononuclear cell culture supernatant was measured by ELISA using $\text{IFN}\gamma$ Duo-Set (R&D Systems, Minneapolis, USA). Results were reported as pg/ml based on the standard curve established for each assay.

Statistical analyses: All statistical analyses were applied as previously described [10]. Briefly, deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were assessed by chi-squared tests. Cases and controls were compared according to the frequencies of genotypes, alleles and minor allele carriers. Odds ratios (ORs) were obtained through unconditional logistic regression models, controlling for potential confounders such as sex and/or ethnicity. Haplotype frequencies were estimated by maximum likelihood and compared with the same logistic regression models conducted for the isolated SNPs. Linkage disequilibrium was assessed by the r^2 statistics using frequencies obtained from the control group. For functional analyses, ELISA $\text{IFN}\gamma$ data were rescaled by a linear transformation into the interval [0,1] for easier visualization and interpretation of results. A Welch Two Sample t-test was then applied for differences of means of $\text{IFN}\gamma$ production among carriers and non-carriers of the +874T allele for each stimulus. Results were presented as Mean \pm SEM (Standard Error of the Mean). P-values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using the R software [27], version 2.9.1, with the packages “genetics”, “haplo.stats” and “MASS”.

Results

For the first case-control study with the sample from Bauru, total counts and frequencies of the 3 different genotypes, alleles and carriers of the minor allele are shown for each SNP in Supplementary table 2. Frequencies of all SNPs were in HWE in both control and patient groups. Comparisons of cases and controls according to the frequencies of each polymorphism did not show any association between the SNPs +874 T/A, +2109 G/A and rs2069727 and leprosy development. However, after adjustment for sex and ethnicity, almost all OR values of the SNPs +874 T/A and rs2069727 were changed in about 10% (Supplementary table 2).

In ethnicity-stratified models, a clear specific effect was detected for the SNPs +874 T/A and rs2069727, as both were associated to protection against leprosy among afro-descendants only (Table 1). More specifically, carriers of alleles +874T and rs2069727C were less likely to

develop leprosy (OR = 0.40; $p = 0.004$ and OR = 0.37; $p = 0.006$, respectively) in the afro-descendant group (Table 1). Conversely, the same alleles were not associated to leprosy in the euro-descendant group (Supplementary table 3).

Pairwise linkage disequilibrium (LD) analyses performed using all individuals from the control group showed a r^2 value of 0.9 for the SNPs +874 T/A and rs2069727, which indicate that these polymorphisms belong to the same LD bin. Analyses among Afro- and Euro-descendants provided similar results (data not shown). Pairwise comparisons with the +2109 G/A polymorphism resulted in low r^2 values, indicating that this SNP was included in another bin.

Thus, to exclude redundancy, the +874T/A SNP was selected for haplotype analysis, along with +2109. Frequencies of each haplotype in cases and controls were also compared and no association was found neither in the comparisons of the entire population (Supplementary Table 4) nor among Euro-descendants (Supplementary Table 5). Nevertheless, comparisons of the Afro-descendant group demonstrated that the +874T/+2109A haplotype was associated with protection against leprosy (OR = 0.52; $p = 0.03$), using the +874A/+2109A haplotype as baseline (Table 2).

The results shown so far indicated that the SNP at +874 T/A could be used as a tag for the bin and as a marker for the genetic association effect of *IFNG* found in the Bauru population. Data from the study with the sample recruited from Rio de Janeiro are shown in Supplementary table 6. As observed in this table, the OR values indicated an association between the +874T allele and protection against leprosy in non-adjusted models (OR = 0.75; $p = 0.03$), although adjusted models did not reach statistical significance (OR = 0.81; $p = 0.21$). Stratified analyses corroborated the ethnic-specific effect observed in the Bauru population, since protection against leprosy was observed among Afro- (OR: 0.59; $p = 0.01$ for +874T carriers comparisons), but not Euro-descendants (Table 3 and Supplementary Table 7).

Finally we tested the functional activity of the +874T/A SNP (Figure 1). In the absence of any stimulus, results of ELISA measurements showed higher IFN γ levels in the culture supernatants of +874T carriers (+874 TA and TT genotypes) when compared to non-carriers (Mean 0.197 vs 0.048; $p = 0.02$). Nevertheless, when the PBMC cultures were stimulated with

either LPS, PHA, or *M. leprae* antigens, the IFN γ levels were not different, regardless the genotype of the donor ($p > 0.05$ for comparisons between +874T carriers and non-carriers).

Discussion

Two independent case-control studies were conducted to define the role of *IFNG* SNPs in leprosy susceptibility. Results obtained from the Bauru population showed a clear ethnic-specific association between the +874 T/A SNP and leprosy susceptibility. Furthermore, our second study replicated these results, since the +874T allele was also associated to protection against leprosy in Afro-descendant individuals.

Given the pivotal role of *IFNG* in the development of the cellular immune response, several genetic association studies have been conducted to define a marker associated with susceptibility to intracellular pathogens diseases. To date, the +874T allele was shown to play a role in infectious diseases such as leishmaniasis [28], hepatitis [29] and tuberculosis [22].

Our results in the case-control study conducted in Bauru, showed a clear ethnic-specific effect of the SNPs at +874 T/A and rs2069727, in a way that the alleles T and C, respectively, were associated with protection against leprosy only among individuals ethnically classified as afro-descendants.

Moreover, linkage disequilibrium analysis showed that these polymorphisms were in almost perfect LD and, therefore, belonged to the same bin ($r^2 > 0.8$ cutoff defined by the HapMap Project [30]), suggesting that the association observed for both SNPs was genetically redundant. Accordingly, a detailed analysis of HapMap and literature had already reported a strong correlation between these SNPs in ethnically distinct populations [20]. Thus, we used only the +874 and +2109 SNPs for haplotype analyses. As a result, the ethnic-specific effect was reinforced since the haplotypes carrying the +874T allele were associated to leprosy specifically in Afro-descendants.

Since it seems that the +874T/A SNP could capture the information of this locus, we selected this marker as a tag for further analyses in a replication study in another population to validate our genetic epidemiological findings [4,31]. An additional 1,370 individuals were recruited in Rio de Janeiro and an independent case-control study was conducted. In this study, the +874T allele was associated to protection against leprosy even when the entire population was

analyzed (Supplementary table 6), suggesting a discrepancy between the two studies. However, when the stratified analyses were performed, the OR values indicated a stronger association among Afro-descendants, suggesting that the effect was probably diluted and, therefore, underestimated when the whole population was analyzed.

After a careful review of the literature, we found only two association studies which had failed to detect association between this SNP and leprosy susceptibility [23,24]. Nevertheless, results of both studies showed deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in the control population, which can reflect some inconsistency in the genotyping methodology [31]. Also, for this reason, we could not combine data available in the literature to perform meta-analysis as we did before for this SNP in association with TB [22]. Nevertheless, our data indicates an ethnic-specific effect that may not be supported by meta-analyses of populations with distinct ethnic backgrounds. Although the definition of ethnicity is very difficult among Brazilians [32] and the individuals were classified according to phenotypic features, some of our previous studies have indeed shown a correlation between our ethnic classification and the presence of HLA alleles associated to specific ethnicities [12]. Furthermore, a lower frequency of the +874T allele among individuals classified as Afro-descendants was detected in this study, replicating previous findings reported for distinct populations [33-36].

The ethnic-specific effect of the +874 T/A locus in this study suggests that distinct haplotypes have been selected and transmitted among individuals of each ethnicity, probably as a result of selective pressures. There is no clear pattern of selective pressure on the *IFNG* locus or other cytokine genes as observed in populations with different genetic backgrounds. Nevertheless, there is a lot of evidence of the divergent evolutionary pathways through which each ethnicity had to interact and adapt to a myriad of pathogens. Incidence rates of tuberculosis in Aboriginal Canadians are ten times higher than non-Aboriginal Canadians [36]. In this context, this population has a very low frequency of the +874T allele (only 3%), suggesting that genetic background of this population was adapted to low immunological responses against intracellular pathogens maybe due to the absence of these microbes in North America [36].

The hypothesis to explain association between the +874T allele and protection against intracellular pathogens suggested that individuals carrying this allele would produce higher IFN γ levels that could, in turn, mount an efficient and protective immune response. The hypothesis suggests that certain stimuli such as purified protein derivative (PPD) from *M.*

tuberculosis or leishmania antigens induce increased levels of IFN γ among carriers of the +874T allele [21,28] although results are controversial. In a study conducted in India in which PBMCs were stimulated with PHA, culture filtrates or live *M. tuberculosis*, no differences were observed in +874T allele versus +874AA allele carriers [37]. Results obtained from ELISPOT detection of IFN γ in PBMC cultures from Turkish tuberculosis patients demonstrated that PPD, but not CFP10 and ESAT6 (two recombinant *M. tuberculosis* proteins) showed an association of the +874TT genotype with higher production [38]. The results concerning mycobacterial antigens indicate that for some stimuli, such as PPD, for example, there is a significant difference in the production of IFN γ , although for other stimuli, such as recombinant proteins or live *M. tuberculosis*, no differences were observed. Also, the method chosen for cytokine detection and the cell type used in the assay can also yield differences in the results obtained by different groups. Curiously, our results pointed to a functional effect in which +874T carriers were also higher IFN γ producers, but only in the absence of any stimuli. This result confirmed the functionality of this SNP in Brazilian subjects as we previously observed for *Leishmania* antigens [28], although the specific enhancement of *IFNG* +874T allele in the presence of *M.leprae* antigens was not observed. We were unable to test PPD, other time points or other IFN γ quantitation methods (like ELISPOT or flow cytometry) which could help to understand the genotype-phenotype correlation in this locus. Also, since the genetic effect was observed among Afro-descendant another issue was that our volunteers were predominantly Euro-Brazilians and that could bias towards the negative results. Further analyses are being conducted to define the functionality of this SNP in response to specific *M. leprae* antigens. Other results using mathematical models have suggested that the functional effect of different polymorphisms can neutralize or interact with each other, leading to a wide range of phenotypes. In the particular case of tuberculosis, combinations between *IFNG* and HLA SNPs were shown to have distinct effects on host susceptibility. These data could explain the discrepancies which are often observed between results from populations with distinct genetic backgrounds [39].

IFN γ is the final product of the IL-12/IL-23 axis of the immune host response, which culminates in macrophage activation and killing of intracellular pathogens such as mycobacteria. The syndrome called “Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases” (MSMD) reinforces the key role for the type 1 cytokine cascade, since this pathology has been consistently associated with loss of function mutations in genes coding for IL-12p40, STAT1, IL-12/IL-23-IFN γ receptors [40]. In all cases, the overall effect observed is a complete inability of the individual to release or respond to IFN γ , leading to lack of control

over infection even when the pathogen is poorly invasive [41]. These data raise the question of to which extent the immune response of an individual would be affected by mutations with less drastic effects on gene function. It is possible that common polymorphisms in these genes would lead to small effects in the type 1 response functionality and, therefore, be associated to the susceptibility/resistance to common diseases. It seems that IFN γ production is regulated by these SNPs, although the exact mechanism that controls the genotype-phenotype relationship is not clearly defined. Nevertheless, our group has consistently demonstrated that *IFNG* polymorphisms such as +874T/A and other SNPs arranged in same bin, participate in the resistance to *M. leprae* (this paper) and *M. tuberculosis* [22] infection. Taken together, these findings suggest that the +874 T/A SNP could be used as a marker for susceptibility to mycobacterial diseases.

References

1. Ridley DS, Jopling WH (1966) Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34(3): 255-273.
2. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, et al. (2005) On the origin of leprosy. *Science* 308(5724):1040-1042.
3. Mira MT (2006) Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect* 8(4): 1124-1131.
4. Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E (2008) Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet* 123(3): 227-235.
5. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG (2006) Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 77(3): 189-202.
6. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, et al. (2001) Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* 2(4): 196-204.

7. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, et al. (2002) Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 186(11):1687-1691.
8. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborcht PR, Nery JA, et al. (2004) Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 5(7): 592-595.
9. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C et al. (2005c) IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 118(2): 295-300.
10. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, et al. (2009) Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun* 10(2): 174-180.
11. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT et al. (2007) Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 39(4): 517-522.
12. Vanderborcht PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, et al. (2007) HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 8(4): 320-324.
13. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, et al. (2008) Human TLR1 Deficiency Is Associated with Impaired Mycobacterial Signaling and Protection from Leprosy Reversal Reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2(5): e231.
14. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75(2):163-189.
15. Agnello D, Gadina M. The Biology of cytokines: general principles, properties, and lessons from animal models. In: *Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions*. p: 3-33.

16. Nathan CF, Murray HW, Wiebl ME, Rubin BY (1983) Identification of interferon- γ , as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 158: 670.
17. Ramasesh N, Adams LB, Franzblau SG, Krahenbuhl JL (1991) Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 59: 2864–2869.
18. Hagge DA, Ray NA, Krahenbuhl JL, Adams LB (2004) An in vitro model for the lepromatous leprosy granuloma: fate of *Mycobacterium leprae* from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages. *J Immunol* 172: 7771–7779.
19. Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, et al. (1994) IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol* 153: 3639–3647.
20. Vandebroek K, Goris A. The *IFNG-IL26-IL22* cytokine gene cluster. **In: Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions.** p: 157-174.
21. López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R et al. (2003) Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(7): 970-975.
22. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO (2008) IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* 123(5): 477-484.
23. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Waungulu LM, Crampin AC, Fine PEM, Hill AVS (2004) Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of Northern Malawi. **Am J Trop Med Hyg** 71(3): 330-340.
24. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, Peixoto PR, Visentainer JE (2009) Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis* 13(4): 493-498.

25. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV (2000) A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 61(9): 863-866.
26. Henri S, Stefani F, Parzy D, Eboumbou C, Dessein A et al. (2002) Description of three new polymorphisms in the intronic and 3'UTR regions of the human interferon gamma gene. *Genes Immun* 3(1): 1-4.
27. R. Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008.
28. Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F et al. (2007) IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 7: 33.
29. Liu M, Cao B, Zhang H, Dai Y, Liu X et al. (2006) Association of interferon-gamma gene haplotype in the Chinese population with hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* 58(11): 859-864.
30. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L et al. (2004) Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 74(1): 106-120.
31. Pacheco AG, Moraes MO (2009) Genetic polymorphisms in case-control studies of infectious diseases. *Dis Markers* 26: 1-14
32. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, et al. (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 177-182.
33. Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA et al. (2003) Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinog* 2(1):3.

34. Delaney NL, Esquenazi V, Lucas DP, Zachary AA, Leffell MS (2004) TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6, and INF-gamma alleles among African Americans and Cuban Americans. Report of the ASHI Minority Workshops: Part IV. *Hum Immunol* 65(12): 1413-1419.
35. Girnita DM, Webber SA, Ferrell R, Burckart GJ, Brooks MM et al (2006) Disparate distribution of 16 candidate single nucleotide polymorphisms among racial and ethnic groups of pediatric heart transplant patients. *Transplantation* 82(12): 1774-1780.
36. Larcombe LA, Orr PH, Lodge AM, Brown JS, Dembinski IJ et al. (2008) Functional gene polymorphisms in canadian aboriginal populations with high rates of tuberculosis. *J Infect Dis* 198(8): 1175-1179.
37. Vidyarani M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, et al. (2006) Interferon gamma (IFNgamma) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 124(4): 403-410.
38. Sallakci N, Coskun M, Berber Z, Gürkan F, Kocamaz H, et al. (2007) Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis* 87(3): 225-230
39. Chang ST, Linderman JJ, Kirschner DE (2008) Effect of multiple genetic polymorphisms on antigen presentation and susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 76(7): 3321-3232.
40. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH (2004) Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 4(12): 739-749.
41. Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, et al. (2002) Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet* 32(1): 97-105.

Figure legends

Figure 1: Interferon- γ (INF γ) production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) according to the +874T/A genotypes. PBMC cultures were performed for 5 days with whole *M. leprae* (8 bacillus per cell), sonicated *M. leprae* antigen (10 $\mu\text{g/ml}$), lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS, 10 $\mu\text{g/ml}$) or phytohemagglutinin-M (PHA, 8 $\mu\text{g/ml}$). Results are shown as mean \pm standard error. N = 19 for +874T carriers (+874TA and TT, gray bars) and 9 for non-carriers (+874AA, white bars). *INF γ levels were significantly higher among +874T carriers when cells were cultivated in absence of any stimulus ($p = 0.02$).

Table 1: Case-control analyses of *IFNG* SNPs in Afro-descendants from Bauru municipality.

SNP	Genotype/allele	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*
<i>IFNG</i> +874	AA	44 ^(0.67)	58 ^(0.45)	-	-
	AT	18 ^(0.27)	49 ^(0.38)	0.48 (0.25 – 0.94; p = 0.03)	0.46 (0.24 – 0.91; p = 0.02)
	TT	4 ^(0.06)	21 ^(0.16)	0.25 (0.08 – 0.78; p = 0.02)	0.25 (0.08 – 0.80; p = 0.02)
	Total	66	128		
	Allele A	106 ^(0.80)	165 ^(0.64)	-	-
	Allele T	26 ^(0.20)	91 ^(0.36)	0.45 (0.22 – 0.90; p = 0.03)	0.44 (0.22 – 0.90; p = 0.02)
	T carriers	22 ^(0.33)	70 ^(0.55)	0.41 (0.22 – 0.77; p = 0.005)	0.40 (0.22 – 0.75; p = 0.004)
<i>IFNG</i> +2109	AA	28 ^(0.53)	89 ^(0.70)	-	-
	AG	22 ^(0.42)	36 ^(0.28)	1.94 (0.98 – 3.83; p = 0.06)	1.94 (0.98 – 3.82; p = 0.06)
	GG	3 ^(0.06)	3 ^(0.02)	3.18 (0.61 – 16.6; p = 0.17)	3.12 (0.59 – 16.4; p = 0.18)
	Total	53	128		
	Allele A	78 ^(0.74)	214 ^(0.84)	-	-
	Allele G	28 ^(0.26)	42 ^(0.16)	1.83 (0.85 – 3.95; p = 0.12)	1.82 (0.84 – 3.93; p = 0.13)
	G carriers	25 ^(0.47)	39 ^(0.30)	2.04 (1.06 – 3.93; p = 0.03)	2.03 (1.05 – 3.92; p = 0.03)
<i>IFNG</i> 3' UTR	TT	38 ^(0.73)	64 ^(0.50)	-	-
	TC	13 ^(0.25)	46 ^(0.36)	0.48 (0.23 – 0.99; p = 0.05)	0.47 (0.22 – 0.99; p = 0.05)
	CC	1 ^(0.02)	17 ^(0.13)	0.10 (0.01 – 0.77; p = 0.03)	0.10 (0.01 – 0.79; p = 0.03)
	Total	52	127		

Allele T	89 ^(0.86)	174 ^(0.69)	-	-
Allele C	15 ^(0.14)	80 ^(0.31)	0.37 (0.16 – 0.87; p = 0.02)	0.37 (0.16 – 0.87; p = 0.02)
C carriers	14 ^(0.27)	63 ^(0.50)	0.37 (0.18 – 0.76; p = 0.006)	0.37 (0.18 – 0.75; p = 0.006)

*OR and p-value adjusted for sex.

Table 2: Case-control analyses of *IFNG* haplotypes in Afro-descendants from Bauru municipality.

Haplotype +874/+2109	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*
A/G	0.26	0.16	1.51 (0.81 – 2.80; p = 0.19)	1.46 (0.78 – 2.73; p = 0.23)
T/A	0.20	0.35	0.47 (0.30 – 0.96; p = 0.04)	0.52 (0.29 – 0.94; p = 0.03)
A/A	0.54	0.48	-	-

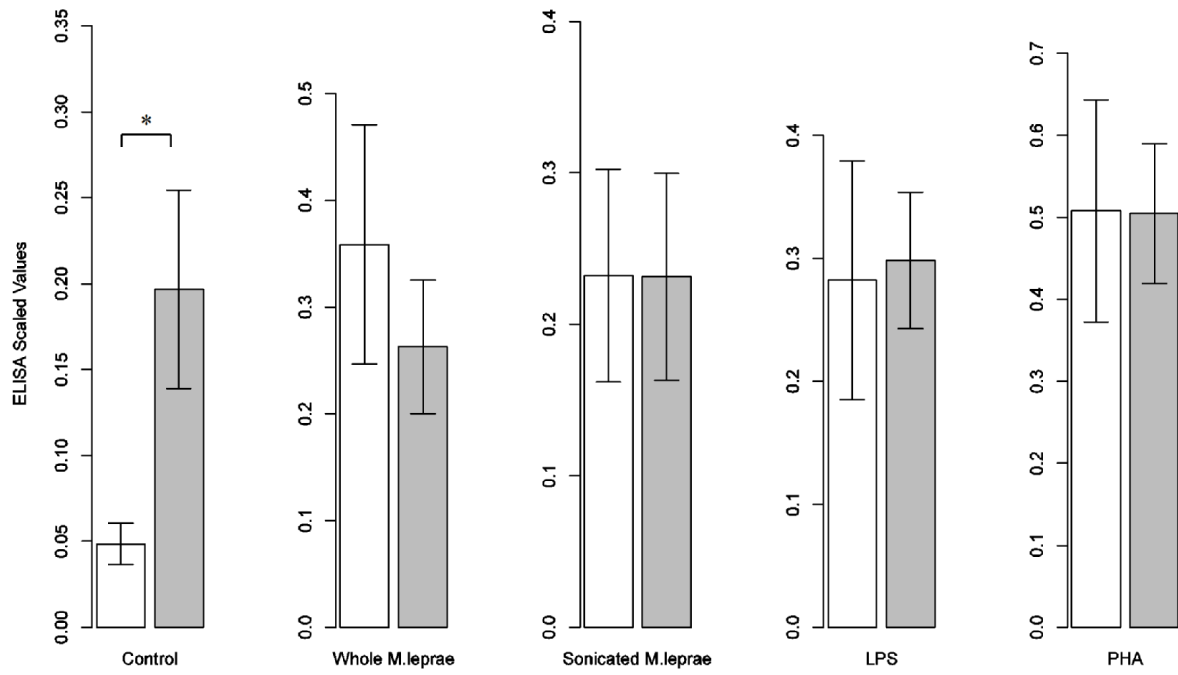
*results adjusted for sex.

Table 3: Case-control analyses of the SNP *IFNG*+874T/A in Afro-descendants from Rio de Janeiro municipality.

<i>IFNG</i> +874	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*
AA	78 ^(0.52)	103 ^(0.38)	-	-
AT	55 ^(0.37)	119 ^(0.44)	0.61 (0.39 – 0.94; p = 0.03)	0.64 (0.41 – 0.99; p = 0.04)
TT	17 ^(0.11)	48 ^(0.18)	0.47 (0.25 – 0.87; p = 0.02)	0.48 (0.26 – 0.90; p = 0.02)
Total	150	270		
Allele A	211 ^(0.70)	325 ^(0.60)	-	-
Allele T	89 ^(0.30)	215 ^(0.40)	0.64 (0.42 – 0.98; p = 0.04)	0.65 (0.42 – 1.0; p = 0.05)
T carriers	72 ^(0.48)	167 ^(0.62)	0.57 (0.38 – 0.85; p = 0.006)	0.59 (0.39 – 0.89; p = 0.01)

*results adjusted for sex.

Figure 1



Supplementary Table 1: General characteristics of the two populations recruited for this study.

		Bauru		Rio de Janeiro	
		Patients	Controls	Patients	Controls
	Age (mean ± SD)	39.5 ± 17.61	35.93 ± 10.75	38.66 ± 16.92	33.49 ± 9.6
Sex	Female	110 ^(0.29)	128 ^(0.34)	239 ^(0.36)	314 ^(0.45)
	Male	265 ^(0.71)	252 ^(0.66)	431 ^(0.64)	386 ^(0.55)
Ethnicity	Euro-descendants	303 ^(0.81)	240 ^(0.65)	305 ^(0.55)	393 ^(0.57)
	Afro-descendants	71 ^(0.19)	132 ^(0.35)	255 ^(0.45)	300 ^(0.43)
OMS classification	Paucibacillary	74 ^(0.22)	-	244 ^(0.36)	-
	Multibacillary	259 ^(0.78)	-	426 ^(0.64)	-

Supplementary Table 2: Case-control analysis of the SNPs at *IFNG* +874, +2109 and rs2069727 in Bauru population.

SNP	Genotype/allele	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*	
<i>IFNG</i> +874	AA	156 ^(0.43)	143 ^(0.39)	-	-	
	AT	145 ^(0.40)	162 ^(0.44)	0.82 (0.60 – 1.13; p = 0.22)	0.73 (0.53 – 1.03; p = 0.07)	
	(T/A)	TT	59 ^(0.17)	64 ^(0.17)	0.84 (0.55 – 1.29; p = 0.43)	0.76 (0.49 – 1.18; p = 0.22)
	Total	360	369			
	Allele A	457 ^(0.63)	448 ^(0.61)	-	-	
	Allele T	263 ^(0.37)	290 ^(0.39)	0.89 (0.66 – 1.20; p = 0.44)	0.83 (0.61 – 1.13; p = 0.25)	
	T carriers	204 ^(0.57)	226 ^(0.61)	0.83 (0.62 – 1.11; p = 0.21)	0.74 (0.54 – 1.01; p = 0.06)	
<i>IFNG</i> +2109	AA	167 ^(0.59)	235 ^(0.63)	-	-	
	AG	105 ^(0.37)	124 ^(0.33)	1.19 (0.86 – 1.65; p = 0.29)	1.17 (0.83 – 1.63; p = 0.37)	
	GG	9 ^(0.03)	15 ^(0.04)	0.84 (0.36 – 1.98; p = 0.70)	0.79 (0.33 – 1.88; p = 0.60)	
	Total	281	374			
	Allele A	439 ^(0.78)	594 ^(0.79)	-	-	
	Allele G	123 ^(0.22)	154 ^(0.21)	1.08 (0.74 – 1.58; p = 0.69)	1.05 (0.71 – 1.55; p = 0.79)	
	G carriers	114 ^(0.41)	139 ^(0.37)	1.15 (0.84 – 1.59; p = 0.38)	1.12 (0.81 – 1.56; p = 0.48)	
<i>IFNG</i> rs2079727	TT	128 ^(0.46)	151 ^(0.41)	-	-	
	TC	109 ^(0.39)	161 ^(0.44)	0.80 (0.57 – 1.12; p = 0.19)	0.70 (0.49 – 0.99; p = 0.05)	
	CC	39 ^(0.14)	56 ^(0.15)	0.82 (0.51 – 1.31; p = 0.41)	0.72 (0.44 – 1.18; p = 0.19)	
	Total	276	368			
	Allele T	365 ^(0.66)	463 ^(0.63)	-	-	
	Allele C	187 ^(0.34)	273 ^(0.37)	0.87 (0.63 – 1.20; p = 0.40)	0.80 (0.57 – 1.12; p = 0.20)	
	C carriers	148 ^(0.54)	217 ^(0.59)	0.80 (0.59 – 1.10; p = 0.18)	0.70 (0.50 – 0.98; p = 0.04)	

*OR and p-value adjusted for sex and ethnicity.

Supplementary Table 3: Case-control analyses of *IFNG* SNPs in the Euro-descendants group of Bauru population.

SNP	Genotype/allele	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*
<i>IFNG</i> +874	AA	110 ^(0.38)	81 ^(0.35)	-	-
	AT	127 ^(0.43)	110 ^(0.47)	0.85 (0.58 – 1.25; p = 0.41)	0.85 (0.58 – 1.25; p = 0.42)
	TT	55 ^(0.19)	42 ^(0.18)	0.96 (0.59 – 1.58; p = 0.88)	0.97 (0.59 – 1.59; p = 0.91)
	Total	292	233		
	Allele A	347 ^(0.59)	272 ^(0.58)	-	-
	Allele T	237 ^(0.41)	194 ^(0.42)	0.96 (0.67 – 1.36; p = 0.80)	0.96 (0.68 – 1.36; p = 0.83)
	T carriers	182 ^(0.62)	278 ^(0.65)	0.88 (0.61 – 1.26; p = 0.49)	0.89 (0.62 – 1.27; p = 0.51)
<i>IFNG</i> +2109	AA	138 ^(0.61)	141 ^(0.59)	-	-
	AG	83 ^(0.37)	85 ^(0.36)	1.0 (0.68 – 1.46; p = 0.99)	0.97 (0.66 – 1.43; p = 0.90)
	GG	6 ^(0.03)	12 ^(0.05)	0.51 (0.19 – 1.40; p = 0.19)	0.50 (0.18 – 1.37; p = 0.18)
	Total	227	238		
	Allele A	359 ^(0.79)	367 ^(0.77)	-	-
	Allele G	95 ^(0.21)	109 ^(0.23)	0.89 (0.57 – 1.38; p = 0.61)	0.88 (0.56 – 1.36; p = 0.55)
	G carriers	89 ^(0.39)	97 ^(0.41)	0.94 (0.65 – 1.36; p = 0.73)	0.92 (0.63 – 1.33; p = 0.65)
<i>IFNG</i> rs2069727	TT	89 ^(0.40)	83 ^(0.36)	-	-
	TC	96 ^(0.43)	112 ^(0.48)	0.80 (0.53 – 1.20; p = 0.28)	0.80 (0.54 – 1.21; p = 0.29)
	CC	38 ^(0.17)	38 ^(0.16)	0.93 (0.54 – 1.60; p = 0.80)	0.94 (0.55 – 1.62; p = 0.83)
	Total	223	233		
	Allele T	274 ^(0.61)	278 ^(0.60)	-	-
	Allele C	172 ^(0.39)	188 ^(0.40)	0.93 (0.64 – 1.35; p = 0.70)	0.93 (0.64 – 1.36; p = 0.72)
	C carriers	134 ^(0.60)	150 ^(0.64)	0.83 (0.57 – 1.21; p = 0.34)	0.84 (0.57 – 1.23; p = 0.36)

*OR and p-value adjusted for the covariate sex.

Supplementary Table 4: Case-control analysis of *IFNG* haplotypes in Bauru population.

+874/+2109	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)**
A/G	0.21	0.20	1.06 (0.78 – 1.45; p = 0.69)	1.00 (0.72 – 1.37; p = 0.99)
T/A	0.37	0.39	0.87 (0.69 – 1.11; p = 0.27)	0.81 (0.63 – 1.04; p = 0.10)
A/A	0.42	0.41	-	-

*OR and p-value adjusted for sex and ethnicity.

Supplementary Table 5: Case-control analyses of *IFNG* haplotypes in the Euro-descendants group of Bauru population

Haplotype +874/+2109	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*
A/A	0.39	0.36	1.15 (0.87 – 1.53; p = 0.32)	1.15 (0.87 – 1.53; p = 0.32)
A/G	0.20	0.22	1.00 (0.70 – 1.43; p = 0.99)	0.99 (0.69 – 1.41; p = 0.94)
T/A	0.41	0.41	-	-

*results adjusted for the covariate sex.

Supplementary Table 6: Case-control analyses of the SNP *IFNG*+874 in Rio de Janeiro population.

<i>IFNG</i> +874	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*
AA	187 ^(0.45)	224 ^(0.37)	-	-
AT	172 ^(0.42)	273 ^(0.45)	0.75 (0.57 – 0.99; p = 0.04)	0.70 (0.50 – 0.99; p = 0.04)
TT	55 ^(0.13)	112 ^(0.18)	0.59 (0.40 – 0.86; p = 0.006)	0.74 (0.47 – 1.17; p = 0.20)
Total	414	609		
Allele A	546 ^(0.66)	721 ^(0.59)	-	-
Allele T	282 ^(0.34)	497 ^(0.41)	0.75 (0.58 – 0.97; p = 0.03)	0.81 (0.59 – 1.12; p = 0.21)
T carriers	227 ^(0.55)	385 ^(0.63)	0.71 (0.55 – 0.91; p = 0.007)	0.71 (0.52 – 0.98; p = 0.04)

*OR and p-value adjusted for sex and ethnicity.

Supplementary Table 7: Case-control analyses of the SNP *IFNG*+874 in the Euro-descendants group of Rio de Janeiro population.

<i>IFNG</i> +874	Cases	Controls	OR (95% CI; p-value)	OR (95% CI; p-value)*
AA	77 ^(0.38)	118 ^(0.35)	-	-
AT	90 ^(0.44)	152 ^(0.46)	0.91 (0.62 – 1.34; p = 0.62)	0.88 (0.60 – 1.31; p = 0.54)
TT	36 ^(0.18)	63 ^(0.19)	0.88 (0.53 – 1.44; p = 0.60)	0.87 (0.53 – 1.45; p = 0.60)
Total	203	333		
Allele A	244 ^(0.60)	388 ^(0.58)	-	-
Allele T	162 ^(0.40)	278 ^(0.42)	0.93 (0.65 – 1.32; p = 0.67)	0.92 (0.64 – 1.32; p = 0.65)
T carriers	126 ^(0.62)	215 ^(0.65)	0.90 (0.63 – 1.29; p = 0.56)	0.88 (0.61 – 1.27; p = 0.50)

*results adjusted for the covariate sex.

Capítulo 4

Avaliação do polimorfismo de base única *TNF* -308G/A como um marcador específico de suscetibilidade à hanseníase em brasileiros.

Conforme descrito ao longo dos capítulos anteriores o componente genético na suscetibilidade à hanseníase inclui a participação de vários genes. A hipótese mais provável sugere que cada uma das variações genéticas envolvidas exerça um efeito sutil, de modo que a interação entre os diferentes polimorfismos tenderia a gerar padrões diferenciados de resposta ao *M. leprae* em cada subgrupo de indivíduos.

Os dados acumulados até então sugerem que o cromossomo 6 concentre o maior número de genes associados à doença. Os diferentes estudos de ligação desenvolvidos obtiveram picos de ligação nas regiões 6q25 e 6p21. A partir de análises mais aprofundadas, os genes *PARK2* e *PACRG* foram associados ao efeito da região 6q25, enquanto o gene *LTA* parece ser o principal responsável pela ligação da região 6p21 à hanseníase *per se*. Ao incluirmos estudos em menor escala, os alelos de *HLA* também se mostram importantes para explicar o efeito da região 6p21. A forte ligação da região 6p21 à hanseníase sugeria ainda a participação do gene *TNF* na suscetibilidade à doença. Além disso, a enorme variedade de dados disponíveis a respeito da importância do TNF na suscetibilidade à doença fornecia um suporte importante para a geração de hipóteses a respeito de uma participação do gene *TNF* nos mecanismos de suscetibilidade à doença. Por esta razão, este gene tem sido alvo constante de estudos de caso-controle em hanseníase, geralmente utilizando o SNP *TNF* -308G/A como marcador. Até o presente momento, este polimorfismo foi contemplado com um total de 6 estudos, dos quais 5 foram populacionais e apenas 1 utilizou amostras de famílias. Os resultados obtidos a partir destes estudos confirmam a participação do SNPs de *TNF* na hanseníase. Entretanto, o enorme contraste entre os resultados dos estudos sugeria fortemente a necessidade de estudos adicionais a fim de definir o real efeito deste marcador na suscetibilidade à doença.

Na primeira fase deste subprojeto, foram desenvolvidos três estudos de associação utilizando amostras da população brasileira com o objetivo de melhor definir a

participação do SNP *TNF* -308G/A nos mecanismos de suscetibilidade à doença. Os primeiros dois estudos tiveram como base o desenho de famílias. Os resultados obtidos a partir das famílias do Rio de Janeiro não sugeriam qualquer associação este SNP e a hanseníase. Os dados da Colônia do Prata, por sua vez, sugeriam a associação do alelo -308A a um fenótipo protetor. De forma semelhante, os resultados do estudo de caso-controle da população de Bauru sugeriam um efeito protetor deste mesmo alelo, embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos em ambos os casos. Dada a inabilidade de resolver esta questão a partir dos estudos de replicação, optamos por conduzir também uma meta-análise, a fim de obter uma medida de associação que resumisse os resultados de todos os estudos desenvolvidos até então. Neste caso, foi empregada uma metodologia um pouco diferente da utilizada no projeto de IL-10, de modo a permitir a inclusão dos estudos familiares no cálculo da estimativa de associação. Os resultados obtidos a partir da meta-análise não indicaram associação entre o SNP *TNF* -308G/A e a hanseníase nem mesmo após a inclusão dos três novos estudos de associação desenvolvidos. Entretanto, a tendência de uma associação com proteção em todos os estudos em brasileiros sugeria que este marcador poderia ser informativo especificamente no caso desta população. Partindo desta hipótese, nós conduzimos uma análise de subgrupo em que foram incluídos apenas os estudos da população brasileira. Os resultados obtidos demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre o alelo -308A e a proteção contra o desenvolvimento da hanseníase. Estes dados não só reforçam a participação do gene *TNF* na suscetibilidade à hanseníase, mas também sugerem que o SNP -308G/A atue como um marcador do efeito deste gene na população brasileira. Os resultados que nos permitiram gerar tais conclusões foram descritos em detalhes no artigo que se segue, o qual se encontra em fase final de preparação para ser submetido para publicação.

***TNF -308G/A* single nucleotide polymorphism as a population specific marker of leprosy susceptibility among Brazilians: an genetic epidemiological and meta-analysis study**

Cardoso CC^{1*}, Pereira AC^{*2}, Brito-de-Souza VN², Duraes S³, Dias-Baptista IM², Francio AS⁴, Parelli FPC^{2,5}, Venturini J^{2,3}, Villani-Moreno FR¹, Sarno EN¹, Oliveira MLWR⁶, Mira MT⁴, Pacheco AG⁷, Moraes MO¹

1 Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

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

3 Departamento de Medicina Clínica, Serviço de Dermatologia da Universidade Federal Fluminense - UFF

4 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição, 1155, CEP 80215-901, Curitiba, Paraná, Brasil

5 Tropical Diseases Area, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

6 Pós-Graduação em Dermatologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro

7 Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde (DEMQS) - Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)/PROCC - FIOCRUZ - Rio de Janeiro, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

corresponding author: Milton Ozório Moraes
Leprosy Laboratory - FIOCRUZ
Av. Brasil 4365 - Manguinhos
Rio de Janeiro - RJ
CEP: 21040-360
Phone: (21) 25984467
Fax: (21) 22709997
e-mail: mmoraes@fiocruz.br

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* infection, in which host and environmental factors play an important role in disease outcome. Tumor necrosis factor (TNF) plays a key role in the host response, mediating granuloma formation after mycobacterial infections. Several case-control and family-based association studies have implicated the *TNF* gene, especially the single nucleotide polymorphism (SNP) at the -308 site (*TNF* -308G/A) in leprosy susceptibility. Nevertheless, these data are controversial and, therefore, the influence of this SNP in leprosy still needs clarification. Thus, the aim of this study was to provide new data along with careful evaluation of the literature to elucidate the effect of -308G/A in leprosy outcome *per se*. First, we conducted three association studies (two family-based and one case-control) which suggested a role of the -308A allele in protection against leprosy enrolling a total of 1,200 individuals. Then, a meta-analysis was conducted to define a consensus risk estimates and, as a result, no association was found when all published data were analyzed, either including or excluding our present data (9 and 6 studies, respectively). In contrast, when a subgroup of Brazilian studies were analyzed in the meta-analysis, a statistically significant result was obtained, indicating that the -308A allele plays a role in protection against leprosy among Brazilians (pooled OR = 0.6; $p = 0.003$ for the random effects model). These results reinforce the role of *TNF* SNPs in leprosy outcome and suggests the *TNF* -308G/A SNP as a marker of disease susceptibility/protection among Brazilians.

Introduction

Leprosy is a human infectious disease which affects more than 200.000 individuals per year worldwide (WHO, 2008), caused by *Mycobacterium leprae*, which is an obligate intracellular bacterium with a unique tropism for macrophages in skin and Schwann cells in peripheral nerves (Britton and Lockwood, 2004). The clinical spectrum is correlated to the cellular immune response of the host and includes two polar forms - tuberculoid (TT) and lepromatous (LL) – separated by three intermediate forms called “borderline” (Ridley-Jopling, 1966). At the tuberculoid pole, the patients develop a cellular immune response effective enough to control bacterial growth and limit the disease to a localized form. Conversely, lepromatous patients exhibit a disseminated disease, with low levels of an antigen-specific cellular immunity and, therefore, an uncontrolled proliferation of the bacilli which leads to extensive infiltration of the skin and nerves (Britton and Lockwood, 2004).

Although *M. leprae* is the primary cause of the disease, it is well known that leprosy outcome depends on additional risk factors related either to the host and/or to the environment, in a way that only about 1-3% of the exposed individuals develop clinical disease (Moraes et al., 2006). Furthermore, the recently described low variability of *M. leprae* (Monot et al., 2005) contrasts with the complexity of the clinical spectrum, suggesting that the disease variation could be attributed to genetic variations of the host.

The evidence of a genetic component in leprosy has been extensively studied and was definitely proved by twin studies, familial clustering of disease and segregation analyses. The subsequent development of association and linkage studies has implicated several candidate genes and chromosomal regions in leprosy development. On this issue, the genes *HLADRB1*, *PARK2/PACRG*, *IL10* and *LTA* and the chromosomal region 10p13 have the most consistent results, as their association/linkage have been replicated in independent studies (see Moraes et al., 2006 and Alter et al., 2008 for detailed reviews).

Curiously, most the regions consistently associated with leprosy are clustered in the 6p21 region. The TNF/LTA genes are located within the class III region of the highly polymorphic human leukocyte antigen (HLA) complex. The *TNF* gene codes for tumor necrosis factor (TNF), a pro-inflammatory cytokine with a pleiotropic effect on a wide

range of biological processes. In the leprosy context, TNF is involved in inflammatory response in the skin (Groves et al., 1995) and granuloma formation after mycobacterial infection (Kindler et al., 1989). Furthermore, TNF production *in vitro* was shown to be enhanced in tuberculoid when compared to lepromatous patients, supporting a role for TNF in the maintenance of a localized disease (Barnes et al., 1992).

The importance of the TNF locus in leprosy susceptibility has been demonstrated by using different genetic study designs (Moraes et al., 2006). At first, the role of this locus was reported by linkage studies and then both family-based and case-control analyses have been developed to define the association between genetic variations in the *TNF* gene sequence and leprosy susceptibility. In this context, the single nucleotide polymorphism (SNP) located at the -308 site of the *TNF* promoter region (*TNF* -308G/A) was the most common target of the association studies. Nevertheless, these studies have provided contradictory results and thus, the association between this SNP and leprosy susceptibility remains to be determined.

Materials and methods

Subjects and study design: this paper reports three association analyses between the SNP *TNF* -308G/A and leprosy susceptibility using both the family-based (2 studies) and case-control study designs. The family-based studies included initially a total of 65 nuclear families (195 individuals) recruited from Duque de Caxias, a hyper endemic municipality of the Rio de Janeiro State, also located in the Brazilian Southeast region. Then, additional 62 pedigrees (comprising 76 nuclear families, 262 individuals) were selected from the Prata colony, located at the Pará State, in the North region of Brazil. For the case-control analysis, a total of 368 cases were selected from an Out-Patient Unit at Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, located at the São Paulo State, in the Southeast region of Brazil. The control population (375 individuals) was selected among blood donors from the same geographic area. Leprosy diagnosis was determined by experienced professionals according to Ridley and Jopling classification (1966) Patients were classified as pauci (PB) or multibacillary (MB) and treated according to the World Health Organization (WHO) specifications. All individuals were ethnically classified after careful inspection of facial morphological features, hair type and skin color of the individual and his/her family. Written informed consent was obtained from

all individuals included in this project, as approved by the local ethical committees. General characteristics of three populations are described in Supplementary Tables 1 and 2.

SNP genotyping: DNA extraction was performed by the “salting-out” method. The *TNF* -308G/A SNP was genotyped by real-time PCR using a TaqMan “Assay by Design” (Applied Biosystems, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. Briefly, amplifications were carried out in a final volume of 5 µL containing 2.5 µL of the TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 0.125 µL of the TaqMan mix (primers and probes) and 10-50 ng of template. The forward and reverse primers used for amplification were 5’-CCA AAA GAA ATG GAG GCA ATA GGT T-3’ and 5’- GGA CCC TGG AGG CTG AAC-3’, respectively. Allelic discrimination was enabled by the use of the TaqMan probes 5’- CCC GTC CCC ATG CC-3’ (specific for the -308G allele, labeled with VIC fluorophores), and 5’- CCC GTC CTC ATG CC-3’ (specific for -308A, labeled with FAM, fluorophores). PCR reactions were performed in the ABI Prism 7000 and 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, CA, USA).

Literature review and identification of eligible studies for the meta-analysis: we searched for studies that examined the association of the SNP *TNF* -308G/A with susceptibility to leprosy using both case-control and family-based association analyses. Literature search was made in MEDLINE using PubMed citations to identify all available articles up to September 2009. Related articles to the selected papers (using PubMed search) and references in the studies were also reviewed to identify additional studies. The keywords “TNF”, “polymorphism”, “SNP” and “leprosy” were entered as text words. No language restrictions were applied. Inclusion and exclusion criteria were applied as described by Pacheco and colleagues (2008), with some modifications to allow the inclusion of family-based studies. Briefly, a study was included in the analysis if (1) it was published up to September 2009 (2) it was not related to previous publications, and (3) it provided enough data (total counts of each genotype in the case-controls studies and transmissions of each allele in the family-based designs) to determine odds ratios (ORs). We excluded studies (1) that contained overlapping data, (2) in which the number of genotypes and/or transmissions could not be ascertained and

(3) case-control studies in which the control group deviated from the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE).

Statistical analyses:

Case-control study: deviations from HWE were tested with χ^2 tests. Frequencies of each genotype, allele and carriers of the minor allele in cases and controls were compared by using unconditional logistic regression models controlling for gender, ethnicity and age. All analyses were performed using the statistical software R for Windows version 2.9.2 (R Development Core Team, 2008) and the packages “genetics” and “haplo.stats”.

Family-based studies: association with leprosy in the family-based design was assessed by the transmission-disequilibrium test (TDT), which considers the transmission of a marker allele from heterozygous parents to the affected offspring. Briefly, the transmission probability of each allele is tested to determine the deviation from the expected frequency of 50%. Sib pairs were used to estimate parental genotypes when these data were missing. All analyses were performed with the software FBAT, version 1.7.3.

-

Meta-analysis: the meta-analysis of case-control and family-based studies was based on a method proposed in 2005, according to which an OR can be estimated from a TDT study using the proportion T of the transmitted high-risk allele (Kazeem and Farrall, 2005). For the case-control studies, frequencies of each allele were determined by the allele counting method and a χ^2 -test was used to determine if the observed frequencies of genotypes conformed to HWE. For the TDT studies, total counts of the transmitted and non-transmitted risk alleles were determined. All comparisons were in respect to the minor frequency allele. In order to test for publication bias, a modification of Egger’s test was performed to provide statistical evidence for funnel plot asymmetry as previously described (Pacheco et al., 2008). Heterogeneity across studies was assessed through Cochran’s Q-statistic. Pooled estimates of risk (OR) were obtained by using the DerSimonian and Laird method in the random effects model (Nicodemus et al., 2008). Briefly, published studies were analyzed including or not the present data. Next, a new meta-analysis was performed including only the studies conducted among Brazilian subjects. All analyses were carried out with R for Windows 2.9.2 with the packages “tdthap”, “catmap” and “meta”.

Results

Results of the family-based analyses conducted among individuals from Rio de Janeiro (RJ) and Prata are shown in Table 1. As observed, no association was found when the frequencies of transmitted and non-transmitted alleles were compared by TDT in the RJ population ($p = 0.55$). In the particular case of the Prata Colony, despite the lack of statistical significance, the frequency of transmissions of each allele suggested that the affected individuals were less likely to carry the -308A variant (8 transmitted vs 15 non-transmitted; $p = 0.18$). Similar results were observed in the case-control analysis (Table 2). In this particular case, in spite of the difference between the frequencies of the -308A allele in cases (0.09) and controls (0.12) and the OR values suggesting protection, results of the logistic regression models did not reach statistical significance (OR = 0.74; $p = 0.12$ for -308A carriers vs non-carriers comparisons).

Next, we conducted a meta-analysis to define a consensus risk estimates of the effect of the SNP *TNF* -308G/A in leprosy susceptibility. After a careful literature review, we found a total of seven studies in which the association between this SNP and leprosy susceptibility was analyzed. From these, six were population-based studies (case-control) conducted among Indians (Roy et al., 1999), Brazilians (Santos et al 2000, Santos et al., 2002; Franceschi et al., 2009), Malawians (Fitness et al., 2004) and Thais (Vejbaesya et al., 2007) and one study used the family-based design (Shaw et al., 2001) to define the association between this SNP and leprosy in Brazilian families. Since data of Santos 2000 and Santos 2002 were partially overlapped we excluded the former study. All other studies were considered eligible for meta-analysis according to our established criteria and results of the 6 studies selected for meta-analysis are summarized in Supplementary Table 3 where no statistical evidence of publication bias was detected when the Egger's test for funnel plot asymmetry was applied ($p = 0.32$).

Results of the meta-analyses are summarized in Table 3 and Figures 1 and 2. Pooled risk estimates were defined using the random effects model due to the statistically significant evidence of heterogeneity across studies. As observed, although the risk estimates suggested a protective effect for the -308A allele, results were not statistically significant either before (pooled OR = 0.77; $p = 0.34$) or after (OR = 0.76; $p = 0.12$) inclusion of the three additional studies reported here (Figures 1A and B, respectively).

In contrast, when the meta-analysis was repeated including only studies of the Brazilian population (Figure 2), a significant association between the -308A allele and protection against leprosy was observed (pooled OR = 0.60; $p = 0.003$), suggesting that this SNP is a marker of disease susceptibility/resistance in this population.

Discussion

Linkage studies have strongly suggested the genetic influence of the 6p21 region especially the *TNF/LTA* locus in leprosy susceptibility (Shaw et al., 2001; Mira et al., 2003). Nevertheless, results of association analysis have provided inconclusive and even contradictory results. The first study of the *TNF* -308G/A SNP in leprosy susceptibility reported an association between the -308A allele and susceptibility to lepromatous leprosy among Indians (Roy et al., 1999). Subsequent analyses have rejected this hypothesis, and showed that the -308A allele confers protection against leprosy *per se* in Brazilians using family-based (Shaw et al., 2001) and also the case-control study design (Santos et al., 2002; Franceschi et al., 2008). An additional group detected no association between this marker and leprosy susceptibility in Malawians (Fitness et al., 2004) and, more recently, results of Roy and colleagues (1999) were corroborated in a study conducted among Thais (Vejbaysya et al., 2009), in which the -308A allele was associated to multibacillary disease.

Given the strong suggestion of an association between this SNP and leprosy susceptibility, we conducted three additional association studies to assess the effect of this SNP in leprosy outcome. Despite the lack of statistical significance, the lower frequency of -308A transmissions in the Prata Colony (Table 1) suggested an association between this allele and protection against disease. A population-based study was also conducted and, similarly, the risk estimates indicated a protective effect for the -308A allele but, once again, results could not reach statistical significance probably due to the low power (not shown) according to the sample size use (Table 2).

Since there was several papers already available in the literature we decided to combine with our new data from replication studies. We used a meta-analysis approach to increase the sample size as well as the statistical power and, therefore, enable the calculation of consensus risk estimates. When the meta-analyses of all published data

was performed (N ~ 1,431), the SNP *TNF* -308G/A was not associated to leprosy *per se*, regardless the inclusion of the additional 1,200 individuals from the case-control and family studies (total N ~ 2,631). On the other hand, since stratification for Brazilian population studies suggested a role for the -308A allele in protection against leprosy (Shaw et al., 2001; Santos et al., 2002; Franceschi et al., 2008), we hypothesized that this SNP could be a marker of disease susceptibility/protection specifically in this population. A subgroup meta-analysis was conducted including only Brazilian subjects. As a result, using a sample size (N ~ 1,966) the pooled ORs indicated a protective effect of the -308A allele in leprosy susceptibility among Brazilians.

Functional analyses of this SNP have also provided conflicting results. To date, some reports have associated the -308A allele carriers to higher TNF releases while other studies indicated the -308A carriers as the lower TNF producers (Moraes et al., 2006). Specifically in leprosy we also found that *TNF* -308A allele carriers was associated with a stronger inflammatory response to *M. leprae* antigens in the skin (Moraes et al., 2001). Even so, the divergence in the results of the physiological analyses could provide an alternative hypothesis, under which the *TNF* -308G/A would not be the functional variant. In this case, this marker would be associated to a disease and/or a functional effect only in individuals/populations in which this SNP and the functional variant belong to the same bin. Indeed, extended haplotype analyses have provided evidence of important variations in the *TNF* haplotype blocks of different populations, suggesting that the different SNP combinations could be attributed to distinct selection patterns (Baena et al., 2002; Posch et al., 2003; Valente et al., 2009).

The present study, together with a previously reported definitive role of the SNP *IL10* -819T/C in leprosy susceptibility (Pereira et al., 2008), suggest that the genetic studies can provide enough evidence to support the use of genetic polymorphisms as markers of disease susceptibility in the clinical routine. Despite the clear evidence of a genetic heterogeneity component, our data showed an evident role of *TNF* variations in leprosy outcome. The complete elucidation of this question requires the study of extended haplotypes in different populations, so as to define which SNP actually exerts the functional effect. Nevertheless, results of our meta-analysis suggested an association between *TNF* -308G/A and leprosy susceptibility among Brazilians, supporting the use of the SNP *TNF* -308G/A as a tag for the disease susceptibility effect.

References

Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Hum Genet.** 2008 Apr;123(3):227-35.

Baena A, Leung JY, Sullivan AD, Landires I, Vasquez-Luna N, Quiñones-Berrocal J, Fraser PA, Uko GP, Delgado JC, Clavijo OP, Thim S, Meshnick SR, Nyirenda T, Yunis EJ, Goldfeld AE. TNF-alpha promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. **Genes Immun.** 2002 Dec;3(8):482-7.

Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infect Immun.** 1992 Apr;60(4):1441-6.

Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. **Lancet.** 2004 Apr 10;363(9416):1209-19.

Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, Fine PE, Hill AV. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **Am J Trop Med Hyg.** 2004 Sep;71(3):330-40.

Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, Peixoto PR, Visentainer JE. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **Int J Infect Dis.** 2009 Jul;13(4):493-8.

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 U S A.** 1995; 92(25): 11874-11878.

Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassali P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell.** 1989; 56(5): 731-740.

Mira MT, Alcaïs 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; 4 (1): 67-73.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée 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, Rasolofoa V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. **Science**. 2005 May 13;308(5724):1040-2.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev**. 2006 Sep;77(3):189-202.

Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JA, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. **Immunogenetics**. 2001; 53(1):45-7.

Nicodemus KK. Catmap: case-control and TDT meta-analysis package. **BMC Bioinformatics**. 2008 Feb 28;9:130.

Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Hum Genet**. 2008 Jun;123(5):477-84.

Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, Villani-Moreno FR, Pacheco AG, Moraes MO. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. **Genes Immun**. 2009 Mar; 10(2):174-80.

Posch PE, Cruz I, Bradshaw D, Medhekar BA. Novel polymorphisms and the definition of promoter 'alleles' of the tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha loci: inclusion in HLA haplotypes. **Genes Immun**. 2003 Dec;4(8):547-58.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.

R. Development Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, Vienna, Austria, 2008.

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.

Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, Moraes MO, Filho VF, Mattos HJ, Nery JA, Cabello PH, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seemed to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. **Int J Lepr** 2000; 68: 325-7.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis.** 2002 Dec 1;186(11):1687-91.

Valente FP, Tan CR, Temple SE, Phipps M, Witt CS, Kaur G, Gut I, McGinn S, Allcock RJ, Chew CS, Price P. The evolution and diversity of TNF block haplotypes in European, Asian and Australian Aboriginal populations. **Genes Immun.** 2009 Jun 18.

Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool P, Sermduangprateep C (2007) NRAMP1 and TNF-alpha polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. **Respirology.** 2007; 12(2):202-206.

World Health Organization. Global leprosy situation, beginning of 2008. **Weekly epidemiological record.** 2008 Aug; 33 (83): 293-300.

Figure legends

Figure 1: Meta-analysis of the association studies in which the association between the SNP *TNF* -308G/A and leprosy susceptibility was assessed. Meta-analysis was performed using the random-effects model. Bars represent 95% CI and boxed represent OR values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled results. Meta-analysis was performed using only published data (A) and also including the present data (B). CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Figure 2: Subgroup analysis including only the brazilian association studies in which the association between the SNP *TNF* -308G/A and leprosy susceptibility was assessed. Analysis was performed using the random-effects model. Bars represent 95% CI and boxed represent OR values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled results. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Table 1: Summary of the results obtained from the family-based association studies.

Population	Allele	Frequency	Transmitted	Not-transmitted	Z (p-value)*
Rio de Janeiro	A	0.12	19	20	-0.6 (0.55)
	G	0.88	20	19	0.6 (0.55)
Prata Colony	A	0.08	8	15	-1.347 (0.18)
	G	0.92	15	8	1.347 (0.18)

*results are shown for the additive model.

Table 2: Summary of the results obtained from the case-control study.

Genotype/ allele	N (frequency)		OR (p-value)*	
	Cases	Controls	Crude	Adjusted**
AA	3 (0.01)	3 (0.01)	0.96 (0.96)	0.71 (0.68)
AG	63 (0.17)	82 (0.22)	0.74 (0.10)	0.74 (0.13)
GG	302 (0.82)	290 (0.77)	reference	reference
	368	375		
Allele A	69 (0.09)	88 (0.12)	0.78 (0.30)	0.77 (0.28)
Allele G	667 (0.91)	662 (0.88)	-	-
A carriers	66 (0.18)	85 (0.23)	0.75 (0.11)	0.74 (0.12)

*Overall p-value equal to 0.26 and 0.21 for genotype comparisons before and after adjustment for the covariates, respectively. OR and p-value adjusted for the covariates sex, ethnicity and age.

Table 3: Summary of the meta-analyses results according to the included studies.

Included studies*	Meta-analysis			Heterogeneity	
	Pooled OR	95% CI	p-value	χ^2	p-value
Only published studies	0.77	0.45; 1.31	0.34	22.98	0.0003
Published studies and present data	0.76	0.54; 1.07	0.12	24.18	0.002
Only Brazilian studies**	0.60	0.43; 0.85	0.003	10.81	0.05

Results are shown for the random-effects model. *N = 6, 9 and 6 studies and ~1,431, 2,631 and 1,996 individuals, respectively. **Pooled OR: 0.65, 95% CI: 0.53-0.80 and $p = 7^{-5}$ for the fixed-effects model.

Figure 1

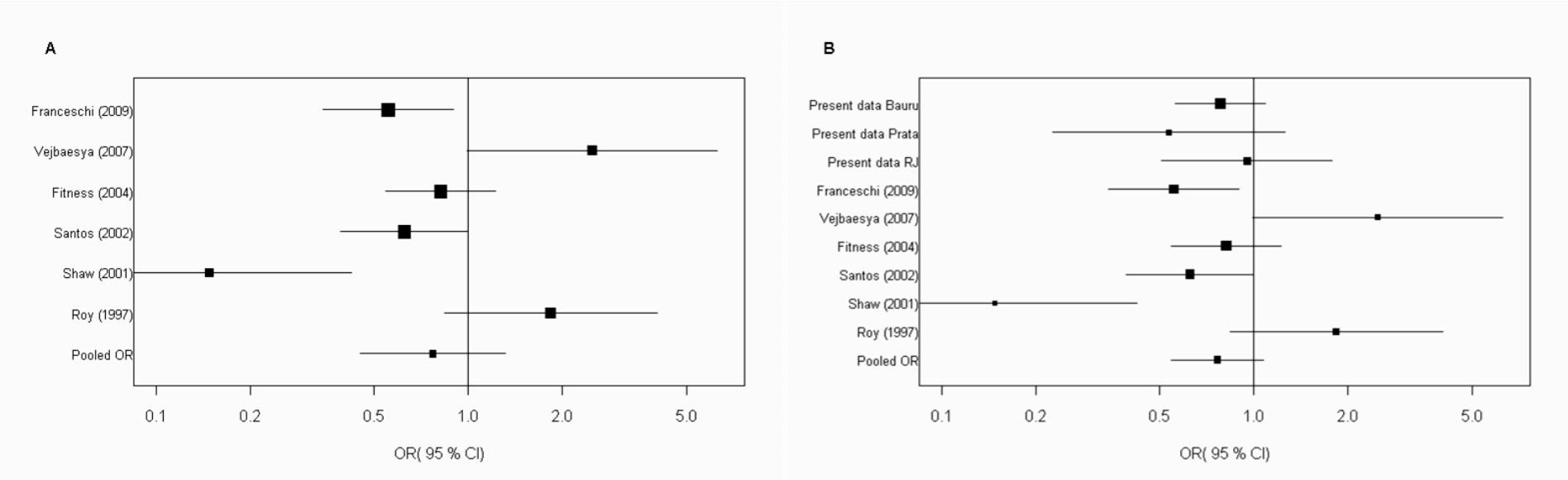
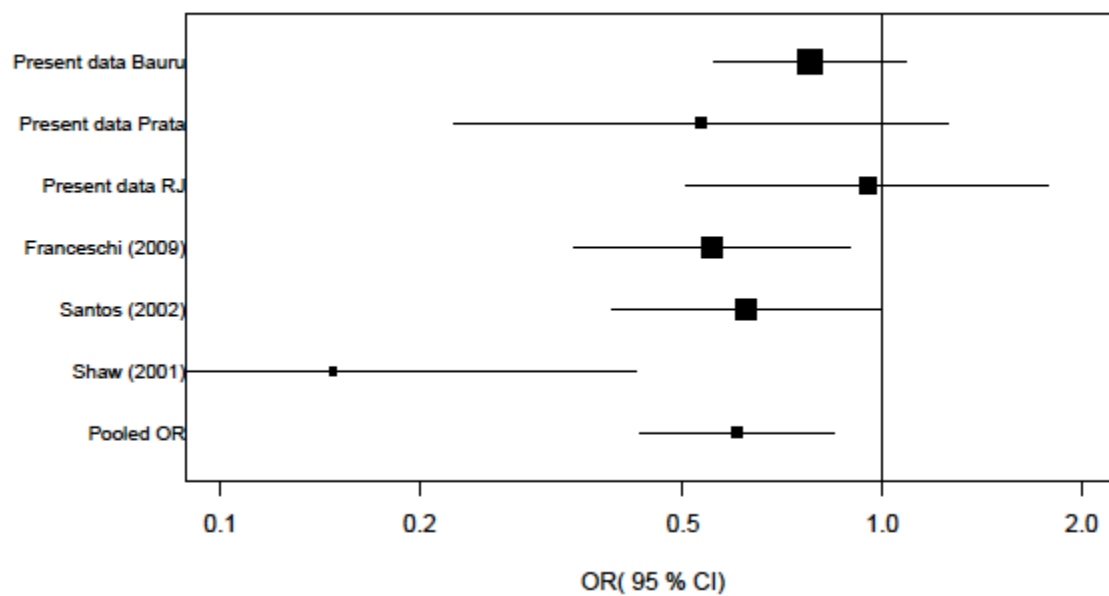


Figure 2



Supplementary table 1: General characteristics of the individuals included in the family-based analyses.

		Rio de Janeiro		Prata Colony	
		Affected	Unaffected	Affected	Unaffected
Sex*	Female	106 ^(0.50)	440 ^(0.53)	96 (0.43)	838 (51.03%)
	Male	105 ^(0.50)	389 ^(0.47)	129 (0.57)	804 (48.97%)
Ethnicity*	Caucasoids	87 ^(0.32)	210 ^(0.25)	20 (0.09)	167 (0.10)
	Mestizoes	108 ^(0.40)	423 ^(0.51)	161 (0.71)	1290 (0.79)
	Blacks	74 ^(0.28)	196 ^(0.24)	44 (0.20)	185 (0.11)
WHO classification*	Paucibacillary	142 ^(0.45)	-	n.a	-
	Multibacillary	176 ^(0.55)	-	n.a	-

*Results are shown as N (frequency) for the whole sample, and not only for the informative families included in the TDT analysis. N.a. = non-available.

Supplementary table 2: General characteristics of the leprosy patients and healthy controls included in the population-based study.

		Patients	Controls
	Age (mean ± SD)	39.5 ± 17.61	35.93 ± 10.75
Sex	Female	110 ^(0.29)	128 ^(0.34)
	Male	265 ^(0.71)	252 ^(0.66)
Ethnicity	Caucasoids	303 ^(0.81)	240 ^(0.65)
	Mestizoes	48 ^(0.13)	104 ^(0.28)
	Blacks	23 ^(0.06)	28 ^(0.07)
WHO classification	Paucibacillary	74 ^(0.22)	-
	Multibacillary	259 ^(0.78)	-

Results are shown as N ^(frequency).

Supplementary table 3: Summary of the data obtained from the papers selected for the meta-analysis.

	Population	Study design	Family-based studies*		Case-control studies*			
			-308A	-308A	Cases		Controls	
			transmitted	not-transmitted	-308A	-308G	-308A	-308G
Roy et al., 1999	Indian	Case-control	-	-	23	433	9	311
Shaw et al., 2001	Brazilian	Family-based	4	27	-	-	-	-
Santos et al., 2002	Brazilian	Case-control	-	-	65	535	30	145
Fitness et al., 2004	Malawian	Case-control	-	-	44	388	63	453
Vejbaesya et al., 2007	Thai	Case-control	-	-	8	66	13	267
Franceschi et al., 2009	Brazilian	Case-control	-	-	26	304	64	414

*Results are shown as total counts of each allele.

Capítulo 5

I. DISCUSSÃO

Ao longo do primeiro capítulo deste manuscrito foi apresentado o panorama atual dos estudos de suscetibilidade genética à hanseníase, bem como a situação atual dos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* neste contexto. As questões ainda em aberto motivaram o desenvolvimento de três objetivos da pesquisa, cujos resultados foram apresentados e discutidos no segundo, terceiro e quarto capítulos desta tese. De uma maneira geral, os resultados obtidos sugerem que estes genes de fato contribuam para a suscetibilidade genética à hanseníase. Tendo em vista o modelo adotado, em que cada manuscrito foi adicionado à tese na íntegra, uma discussão pontual a respeito de cada um dos resultados ficaria redundante. Por esta razão, o texto que se segue teve por objetivo apresentar uma discussão mais ampla a respeito da participação dos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* no modelo de suscetibilidade à hanseníase. Inicialmente será apresentado um panorama geral dos modelos de suscetibilidade genética e, em seguida, serão discutidos os modelos atuais em hanseníase, incluindo os dados aqui apresentados.

Uma das características mais intrigantes da patogenia de doenças infecciosas em todo o mundo consiste na enorme heterogeneidade entre os indivíduos, variando desde um fenótipo assintomático até desfechos extremos e por diversas vezes letais. A primeira evidência que forneceu o suporte científico a uma teoria genética para a suscetibilidade/resistência a doenças infecciosas foi fornecida pela agregação étnica e familiar de algumas patologias raras e outras comuns, que pareciam seguir um padrão de herança Mendeliana em determinadas famílias (revisto por Alcaïs e col., 2009). Atualmente, a teoria da participação dos genes humanos na suscetibilidade ou resistência a infecções já é amplamente aceita, embora poucas doenças tenham sido devidamente caracterizadas neste aspecto.

A visão dominante em se tratando de genética de doenças infecciosas humanas prevê a existência de imunodeficiências monogênicas primárias raras capazes de gerar um perfil de suscetibilidade a numerosos agentes infecciosos (um gene, múltiplas infecções), ao passo que as doenças infecciosas comuns estariam associadas à herança de numerosos genes de suscetibilidade. Entretanto, estudos mais recentes acrescentaram duas outras condições a este modelo, de acordo com as quais (1) algumas imunodeficiências gerariam suscetibilidade a infecções específicas e (2) alguns genes em especial seriam considerados os principais

responsáveis pela suscetibilidade a determinadas doenças infecciosas (Casanova & Abel, 2007). A literatura científica descreve tais genes utilizando a expressão “major genes”. Na ausência de uma tradução adequada, esta expressão será substituída por “genes-chave”.

A hanseníase foi a primeira doença para a qual foram descritos genes-chave a partir de estudos de clonagem posicional (Mira e col., 2004). Esta doença foi ainda a primeira a ser caracterizada no que diz respeito à sua predisposição multigênica. Os resultados publicados até hoje sugerem que a hanseníase seja uma doença oligogênica, ou seja, uma patologia em que poucos genes contribuem de maneira importante para a incidência da doença, enquanto outros exercem uma influência mais sutil (Alcais e col., 2009). Tendo como base os estudos de rastreamento genômico, pode-se assumir a existência de três genes-chave participando da suscetibilidade à hanseníase, localizados nas regiões 10p13, 6q25 e 6p21. Dois destes genes, *PARK2* e *LTA*, atuam de forma independente na suscetibilidade à hanseníase *per se* (Mira e col., 2004; Alcais e col., 2007). Um terceiro gene localizado na região 10p13, mas ainda não identificado, apresenta um efeito importante na suscetibilidade às diferentes formas clínicas (Siddiqui e col., 2001; Mira e col., 2003b). Dada a incapacidade de detecção de efeitos sutis a partir de estudos em larga escala, a caracterização dos demais genes que participam da suscetibilidade a esta doença tem ficado a cargo dos estudos em menor escala, utilizando genes e regiões candidatas. Neste contexto, os resultados apresentados no presente estudo podem contribuir para uma expansão do modelo atual de suscetibilidade genética à hanseníase, ao permitirem a inclusão de novos genes que participem dos mecanismos de suscetibilidade à doença.

No que diz respeito à IL-10, os dados obtidos a partir de diferentes estudos caso-controle sugeriam fortemente uma participação deste gene no contexto da suscetibilidade à hanseníase (revisto por Moraes e col., 2006). A questão mais atual, de certa forma, incluía a definição de um marcador deste efeito, uma vez que o objetivo final deste tipo de estudo seria identificar marcadores de suscetibilidade que pudessem ser úteis para o acompanhamento clínico de contatos domiciliares no sentido de definir valores preditivos ao desenvolvimento da doença e, conseqüentemente, justificar a uso quimioprofilaxia. Neste sentido, embora o SNP -819C/T não represente uma etiqueta verdadeira, ou seja, um marcador definido de acordo com o desequilíbrio de ligação (que resumiria o genótipo dos polimorfismos localizados ao longo do promotor do gene), os resultados obtidos a partir da meta-análise nos permitem sugerir o uso deste SNP como um marcador do efeito do gene *IL10* na suscetibilidade à hanseníase. Embora o número de estudos incluídos tenha sido reduzido, os resultados obtidos geraram

uma medida resumo que reflete um consenso entre os dados de populações etnicamente distintas ao reunir estudos do Brasil (Santos e col., 2002; Moraes e col., 2004 e dados do presente estudo), Índia (Malhotra e col., 2005a) e Malauí (Fitness e col., 2004). Retornando ao raciocínio de um modelo composto por poucos genes com função primordial, reunidos a uma maior variedade de genes com efeitos mais sutis, os resultados obtidos sugerem que o gene *IL10* pertença a esta segunda classe de genes, atuando, a princípio, na suscetibilidade à hanseníase *per se*.

Os resultados da validação funcional do marcador *IL10* -819C/T sugerem que o alelo -819T, associado à suscetibilidade, implique em níveis reduzidos de IL-10 em células mononucleares de sangue periférico, o que aparentemente representa um efeito contrário ao que seria esperado, já que IL-10 é uma citocina imunorreguladora com papel central na inibição da resposta Th1. Portanto, a hipótese inicial seria que o alelo -819T induzisse uma produção aumentada de IL-10. Conforme discutido no Capítulo 2, estes resultados podem sugerir a participação da IL-10 ao longo de todo o curso da infecção, de modo que níveis reduzidos, porém constantes, culminariam com o estabelecimento de uma infecção crônica. Estes resultados parecem corroborar dados haplotípicos descritos anteriormente, em que os polimorfismos de IL-10 contribuiriam também para a suscetibilidade à forma multibacilar da doença (Moraes e col., 2004; Malhotra e col., 2005a). Em ambos os estudos, haplótipos carreadores do alelo -819C foram associados à proteção contra a hanseníase *per se*. Em contrapartida, uma vez que a infecção esteja instalada, o mesmo alelo passa a conferir suscetibilidade ao desenvolvimento de formas multibacilares. Embora estes dados sejam de difícil interpretação no que diz respeito ao efeito do polimorfismo nos níveis de IL-10, ao menos no contexto da associação genética, estes dados fornecem o suporte para incluir o gene *IL10* em ao menos duas fases do modelo de suscetibilidade à hanseníase: em primeiro lugar, na doença *per se* e, em seguida, no desenvolvimento das diferentes formas clínicas.

Os resultados expostos no Capítulo 3 sugerem ainda uma participação do gene *IFNG* na suscetibilidade genética à hanseníase. O fato da associação do SNP *IFNG* +874T/A à hanseníase ter sido étnico-específica sugere que este efeito seja dependente da contribuição de mais de um polimorfismo, ou ainda, que o SNP da posição +874 seja apenas um marcador para o efeito de um polimorfismo distinto. Desta forma, este SNP estaria associado à hanseníase apenas nas populações em que estivesse em desequilíbrio de ligação com a variante funcional. Embora o presente estudo tenha considerado também os polimorfismos +2109 e rs2069727, localizados no intron 3 e na região 3' não traduzida deste gene,

respectivamente, aparentemente o efeito observado se deve a uma variação adicional, que não foi avaliada neste estudo. A completa elucidação desta questão requer, portanto, uma análise mais detalhada utilizando uma maior densidade de polimorfismos deste gene. Entretanto, os dados aqui apresentados demonstram claramente uma associação entre polimorfismos no gene *IFNG* e o desenvolvimento da hanseníase *per se*, reforçando a importância deste gene na resposta a infecções por micobactérias.

Embora o efeito deste marcador sobre os níveis de IFN γ já tenha sido demonstrado em diferentes estudos (Pravica e col., 2000; López-Maderuelo e col., 2003), os resultados descritos no Capítulo 3 sugerem que a produção deste mediador em resposta ao *M. leprae* dependa da atuação conjunta de um maior número de variações. De fato, um estudo de rastreamento genômico desenvolvido com o objetivo de verificar a ligação de regiões genômicas a resultados funcionais, detectou uma ligação entre os cromossomos 6, 7, 10, 12 e 14 e a produção de IFN γ em resposta a antígenos solúveis de *M. leprae* (Wheeler e col., 2006). Visto que o cromossomo 6 compreende todo o complexo HLA, é possível que esta resposta se deva à ligação da própria região do HLA com a doença.

A ligação do cromossomo 10 aos níveis de IFN γ em resposta ao *M. leprae* (Wheeler e col., 2006) reforça a hipótese de participação importante dos receptores celulares, uma vez que este cromossomo abriga o gene *MRC1*, que codifica o receptor de manose, um dos responsáveis pelo reconhecimento do *M. leprae* e ativação da resposta protetora (revisado por Blackwell, 2001). Este efeito funcional pode ainda sugerir um mecanismo através do qual a região 10p13 tenha sido ligada à suscetibilidade genética à hanseníase (Siddiqui e col., 2001; Mira e col., 2003b). Embora seja apenas uma sugestão, variações na região codificante de *MRC1* poderiam estar associadas à suscetibilidade à doença (Hill, 2006; Cooke & Hill, 2008). Desta maneira, a variação entre os padrões de resposta ao *M. leprae* poderia ter início no momento em que o patógeno é reconhecido. Mais especificamente, os diferentes perfis genotípicos do gene *MRC1* poderiam influenciar a taxa de fagocitose, o que se refletiria nos níveis de IFN γ .

Resultados obtidos a partir de estudos do gene do receptor de IL-12, que se encontra em um momento anterior à liberação do IFN γ na cascata de sinalização, reforçam a importância do reconhecimento específico do *M. leprae* na ativação desta via (Kim e col., 2001). Mais especificamente, a análise dos padrões de expressão dos genes das cadeias $\beta 1$ e $\beta 2$ que compõem este receptor demonstrou uma incapacidade dos pacientes lepromatosos de ativar a expressão do gene da cadeia $\beta 2$ em resposta ao *M. leprae*, mas não ao *M. tuberculosis* (Kim e

col., 2001). Situação semelhante foi observada durante estudos do gene do receptor de vitamina D (Liu et al, 2008). Embora estes resultados demonstrem a existência de padrões diferentes de ativação da resposta a micobactérias, de certa forma eles evidenciam uma convergência entre as vias. Desta maneira, ainda que os receptores celulares responsáveis pelo reconhecimento de cada micobactéria sejam distintos, a cascata de sinalização culminaria, em última análise, na ativação do eixo IL-12/IL-23/IFN γ .

A associação genética do locus *TNF* com a suscetibilidade à hanseníase, por sua vez, parece transcender os limites da seqüência deste gene. Análises de segregação e ligação desenvolvidas por Shaw e col. (2001) já sugeriam a existência de mais de um locus de suscetibilidade à hanseníase no complexo HLA. Nesse estudo, foi observada uma forte influência também dos genes *TNF*, além dos alelos do HLA de classe II, sobre o desenvolvimento de hanseníase em famílias do norte do Brasil. A participação do alelo *TNF* -308G na suscetibilidade à doença foi demonstrada utilizando estratégias de estudo de associação e ligação. As análises de desequilíbrio de ligação indicaram uma forte associação entre os alelos dos genes *TNF* e *LTA*. A incorporação de polimorfismos do gene *LTA* nos testes de desequilíbrio de transmissão permitiu ainda que fosse demonstrada a associação entre o haplótipo composto pelos alelos *TNF* -308A e *LTA* +252G e a proteção contra a hanseníase *per se*, embora este segundo gene não estivesse associado à doença quando avaliado fora do contexto de haplótipo. (Shaw e col., 2001). Estudos posteriores desenvolvidos por Mira e col. (2003a), demonstraram uma co-segregação entre os alelos de *TNF* e HLA em famílias vietnamitas. O principal resultado deste estudo foi a identificação de segregação não-aleatória de haplótipos *HLA/TNF* em pacientes com diferentes formas clínicas. Embora a forte ligação entre os genes HLA (classes I e II) e *TNF* não permitisse uma conclusão definitiva a respeito do gene responsável pelo efeito observado, os autores sugeriram a participação primordial dos genes HLA em virtude dos resultados não significativos obtidos a partir da análise do SNP *TNF* -308G/A (Mira e col., 2003a). Estudos subseqüentes descreveram ainda uma forte influência do gene *LTA* no desenvolvimento de hanseníase em indivíduos menores de 15 anos (Alcaïs e col., 2007).

Conforme descrito, o gene *TNF* tem sido alvo constante de estudos de associação em hanseníase. Estes estudos, em sua grande maioria, têm utilizado como marcador o SNP *TNF* -308G/A, em virtude dos constantes relatos de associação deste SNP a diferentes moléstias infecciosas (revisto por Moraes e col., 2006). Entretanto, os seis estudos de associação desenvolvidos até o presente momento apresentaram resultados contraditórios a respeito da

associação deste marcador com a doença. Conforme descrito no Capítulo 4, este cenário ainda incerto motivou o desenvolvimento de três novos estudos de associação utilizando amostras da população brasileira. Esta iniciativa gerou novos resultados sugestivos de um efeito protetor do alelo -308A. Entretanto, a ausência de significância estatística permanecia como um empecilho para a elaboração de conclusões definitivas. Por esta razão, a etapa seguinte do trabalho consistiu no uso da ferramenta de meta-análise, de modo a obter uma medida de associação que representasse um consenso entre os estudos. Os resultados indicam uma medida de associação de efeito protetor do alelo -308A (OR = 0,77). Entretanto, a significância estatística só foi alcançada a partir da análise do subgrupo de estudos da população brasileira, o que provavelmente se deve a um incremento na força de associação (OR = 0,6).

A obtenção de um efeito específico para a população brasileira, entretanto, não exclui uma participação do gene *TNF* na suscetibilidade à hanseníase em geral. Dada a característica altamente polimórfica dos genes *TNF*, *LTA* e HLA, as diferentes combinações haplotípicas de cada população podem fornecer a explicação para o efeito observado. De fato, resultados de uma análise detalhada da estrutura dos haplótipos dos genes *TNF*, *LTA* e HLA em populações etnicamente distintas, sugeriram que a maior parte dos alelos segregasse de maneira independente dos demais SNPs do mesmo gene, bem como dos SNPs localizados nos genes adjacentes (Posch e col., 2003). Outros estudos descreveram ainda a existência de haplótipos diferenciados de *TNF* em populações etnicamente distintas, refletindo a seleção de diferentes haplótipos ao longo da história evolutiva de cada população (Baena e col., 2002; Valente e col., 2009). Sendo assim, a análise dos resultados de Shaw e col. (2001), Mira e col. (2003a), Alcais e col. (2007), bem como dos novos dados apresentados no Capítulo 4, sugerem que o efeito da região 6p21 provenha da atuação combinada de vários genes e polimorfismos, em um modelo que inclua não só os haplótipos de *HLA* e *LTA*, mas também os do gene *TNF*.

O modelo de suscetibilidade genética à hanseníase proposto por Schurr e col. (2006), sugeria a participação apenas dos genes *PARK2* e *PACRG* na suscetibilidade à hanseníase *per se* e incluía os genes do complexo HLA em conjunto com a região 10p13, como importantes para o desenvolvimento das formas pauci e multibacilares, tendo como base os resultados observados nas famílias vietnamitas (Mira e col., 2003a e b). Os estudos publicados em seguida, somados aos dados aqui apresentados, sugerem uma ampliação deste modelo de modo a incluir o gene-chave *LTA* (Alcais e col., 2007), e também alguns genes com participação menos intensa, em virtude de seu efeito moderado no desenvolvimento do

desfecho. Nesse caso, esta segunda classe compreenderia os haplótipos de *HLADRBI* (Vanderborght e col., 2007) em conjunto aos polimorfismos nos genes *IL10*, *TNF* e *IFNG*. A Figura 4 apresenta uma versão ampliada do modelo de suscetibilidade genética à hanseníase, incluindo tanto os genes-chave já descritos quanto os genes de efeito moderado, cuja participação foi investigada ao longo do presente estudo.

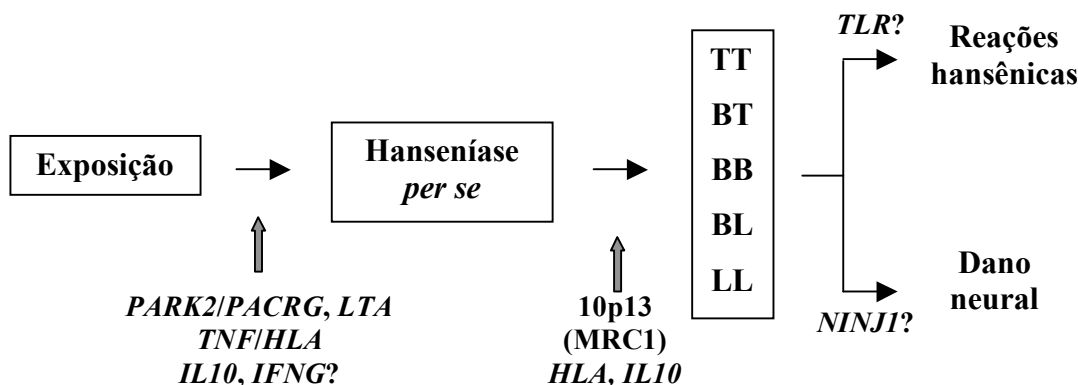


Figura 4: Participação de genes e regiões cromossômicas nos diferentes estágios da hanseníase. Na primeira fase da resposta, o desenvolvimento da hanseníase *per se* sofre uma influência predominante dos genes *PARK2/PACRG* e *LTA*, enquanto os genes do *HLA*, *TNF*, *IL10* e *IFNG* exerceriam um efeito moderado sobre o desfecho. Durante o curso da infecção, a suscetibilidade às diferentes formas clínicas ficaria a cargo de um gene ainda não identificado na região 10p13 (provavelmente *MRC1* segundo Cooke & Hill, 2008), com a atuação paralela dos genes *HLA* e *IL10*. Os dados acumulados na literatura sugerem ainda uma participação dos genes dos receptores Toll na suscetibilidade ao desenvolvimento de reações hansênicas (Misch e col., 2008; Bochud e col., 2008; Schuring e col., 2009), enquanto o gene da molécula de adesão ninjurina-1 mostrou-se associado ao desenvolvimento de dano neural (Cardoso e col., 2007).

Conforme observado na Figura 4, o modelo proposto inclui ainda a participação de polimorfismos genéticos no desenvolvimento de agravamentos do quadro clínico tais como as reações hansênicas e o dano neural. Uma vez que a associação dos genes de receptores Toll e da molécula de adesão ninjurina-1 ao desenvolvimento de reações hansênicas e dano neural, respectivamente, ainda necessita de investigações mais aprofundadas, incluindo estudos de replicação, a participação destes genes no modelo ainda não pode ser considerada definitiva. O mesmo pode ser dito a partir dos resultados do gene *IFNG*. Ainda que o presente estudo tenha incluído também uma análise de replicação, as duas amostras analisadas foram obtidas na população brasileira. A confirmação da participação deste gene, portanto, requer ainda estudos de replicação em populações etnicamente distintas.

A análise detalhada deste modelo torna ainda mais evidente a dinâmica do processo de resposta ao *M. leprae*. Conforme observado, os genes incluídos no modelo codificam receptores celulares e citocinas que atuam em vias de sinalização distintas. O grande desafio deste modelo, portanto, consiste em compreender de que maneira cada uma destas variações contribui para a suscetibilidade à doença. Uma das hipóteses para explicar esta interação seria um efeito aditivo de diferentes polimorfismos. Neste caso, a participação concomitante de diferentes vias de sinalização superpostas e por vezes até redundantes seria, em última análise, responsável pelo fenótipo observado.

Seguindo esta hipótese, um estudo recente utilizou modelos matemáticos para prever a eficiência da resposta a antígenos de *M. tuberculosis* na presença de polimorfismos em diferentes genes (Chang e col., 2008). Os resultados obtidos sugeriam que os polimorfismos afetavam o processo de apresentação de antígenos em uma mesma intensidade, o que significa que a presença de uma variação poderia neutralizar o efeito de outra. A expressão aumentada de IFN γ , mais especificamente, foi capaz de compensar o efeito de uma apresentação de antígeno pouco eficiente e manter a resposta imune celular em níveis equivalentes aos obtidos após a ativação por um antígeno que se ligue à molécula de HLA com alta afinidade. Em contrapartida, quando a indução desta citocina foi menos intensa, não foi observado qualquer efeito que compensasse a apresentação pouco eficiente do antígeno (Chang e col., 2008). Embora o modelo tenha sido específico para os antígenos de *M. tuberculosis*, estes resultados refletem a dinâmica da relação entre os diferentes polimorfismos, o que pode explicar as discrepâncias observadas entre os diferentes estudos epidemiológicos e funcionais não só em tuberculose, mas também em outras patologias com predisposição poligênica. Além disso, a interação observada entre os genótipos de HLA e *IFNG* (Chang e col., 2008) pode ser verdadeira também no caso de outros receptores celulares, tais como os receptores Toll e o próprio receptor de manose, como comentado anteriormente.

Os resultados de Alcaïs e col. (2007) geram ainda um novo questionamento no que diz respeito à participação dos genes na suscetibilidade à doença, visto que o SNP *LTA* +80 foi fortemente associado à doença, especificamente em indivíduos com idades até 15 anos. Os resultados obtidos demonstraram ainda tendência de queda na força de associação com o aumento da idade. Dados obtidos a partir de estudos de tuberculose, uma outra micobacteriose importante no contexto da saúde pública no Brasil, demonstram a participação de polimorfismos distintos dependendo da faixa etária do paciente e sugerem que a tuberculose

se manifeste de maneira diferente em crianças e adultos (Alcaïs e col., 2005). Resultados semelhantes foram observados em polimorfismos nos genes da cascata IL-12/IL-23/IFN γ , dado que a penetrância do efeito destas variações apresenta uma forte tendência de queda à medida que a idade aumenta (Alcaïs e col., 2009). Estes dados, em conjunto, sugerem que a idade seja uma das variáveis não genéticas mais importantes a serem incluídas em modelos preditivos.

De certa forma, a hipótese da participação de eixos superpostos da resposta pode contribuir para o entendimento deste processo. Conforme descrito, tanto o TNF quanto a linfotoxina são essenciais para a evolução da resposta granulomatosa. Entretanto, enquanto o TNF parece ser essencial para a eliminação do bacilo e organização do granuloma, a linfotoxina parece estar associada ao recrutamento dos linfócitos para o local da inflamação e à síntese de citocinas, dentre as quais estão incluídas a IL-12 e o IFN γ (Hagge e col., 2009). Estas observações evidenciam a participação concomitante dos eixos TNF/LTA e IL-12/IL-23/IFN γ na resposta ao *M. leprae*.

Ao retomarmos a questão da idade, poderíamos supor que o efeito do gene *LTA* se deva a uma atuação desta citocina no desenvolvimento e organização do microambiente dos órgãos linfóides (Ware, 2005). Entretanto, a influência da variável idade de maneira tão intensa também no caso do eixo IL-12/IL-23/IFN γ sugere que talvez a atuação conjunta dos dois eixos seja essencial para a geração de uma resposta eficiente em crianças. Em contrapartida, no caso de indivíduos adultos, em que o sistema imunológico já foi plenamente desenvolvido, a atuação destes eixos pode se tornar de fato redundante, de modo que as variações em genes de apenas um dos eixos passariam a ter efeito mais sutil. A elucidação desta questão tanto no que diz respeito à idade quanto à hipótese de um modelo aditivo dependeria do desenvolvimento de estudos com populações muito numerosas e também heterogêneas em termos de idade, de modo que todos os estratos estivessem igualmente representados. Em um modelo deste porte, a IL-10 participaria provavelmente como moduladora da atividade de ambos os eixos.

Variáveis ambientais tais como a vacinação por BCG também devem ser consideradas na construção de tais modelos, dada a sua comprovada eficácia na prevenção da hanseníase (Duppre e col., 2008). De fato, análises funcionais têm demonstrado uma importante ativação da resposta Th1 após a vacinação por BCG, resultando em uma intensa liberação de IFN γ e IL-2 (Soares e col., 2008). Assumindo um modelo em que as vias estejam superpostas, a

vacinação por BCG acarretaria uma ativação da via IL-12/IL-12/IFN γ , que compensaria possíveis falhas na via TNF/LTA. De fato, a deficiência completa de linfotoxina resultou em níveis 50 vezes menores de citocinas tais como a IL-12, IL-2 e IFN γ em modelos animais (Hagge e col., 2009). Desta maneira, a administração da vacina BCG poderia compensar o efeito deletério da variação *LTA* +80, seja regulando positivamente a liberação da própria LT- α , ou estimulando uma resposta mais eficiente na via do IFN γ . A Figura 5 resume a hipótese de eixos sobrepostos na resposta imune ao *M. leprae*, incluindo os efeitos da idade e do ambiente.

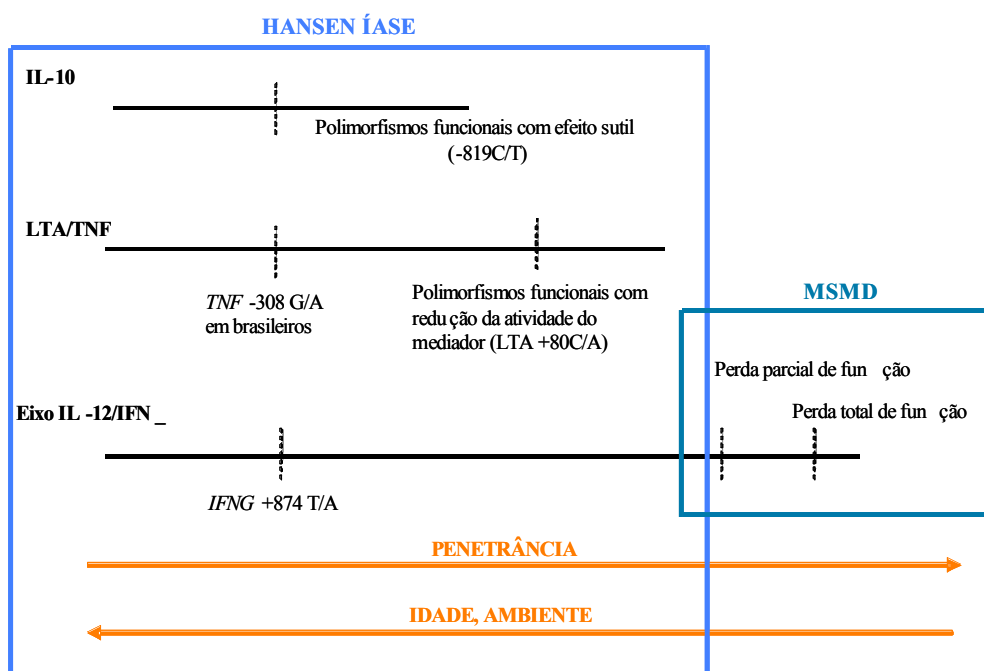


Figura 5: Sobreposição de eixos na resposta imune a doenças micobacterianas. Variações de perda parcial ou total na função de um gene teriam penetrância alta (se não completa) gerando infecções severas como no caso da Suscetibilidade Mendeliana a Doenças Micobacterianas (MSMD) ainda na infância. Variáveis com efeito sutil a moderado teriam penetrância mais baixa e influenciada por fatores como a idade e o ambiente, estando associadas a micobacterioses mais comuns, como a hanseníase.

Por último, os resultados do presente estudo contribuem para a inclusão de um número ainda maior de variáveis no modelo de suscetibilidade à doença. Os dados do gene *IFNG* demonstram claramente uma participação da variável etnia (medida através de caracteres fenotípicos) na associação do polimorfismo da posição +874 ao desfecho. O SNP da posição -308, por sua vez, foi associado à hanseníase de maneira significativa apenas na população brasileira. Conforme descrito anteriormente nesta seção, a especificidade do efeito observado

provavelmente se deve ao fato de o polimorfismo sob análise refletir o efeito de um outro SNP com o qual esteja em desequilíbrio de ligação. Independentemente disso, no caso específico do polimorfismo *IFNG* +874T/A, por exemplo, qualquer modelo preditivo de risco que utilize este marcador deveria também incluir a variável etnia. No caso do gene *TNF*, aparentemente a inclusão do SNP da posição -308 em modelos preditivos de risco só seria informativa em estudos da população brasileira.

Retornando ao contexto de doenças infecciosas em geral, os resultados acumulados na literatura demonstram a existência de níveis diferentes de suscetibilidade a tais patologias (Casanova e Abel., 2007). Uma das teorias mais atuais sugere que determinadas imunodeficiências podem conferir suscetibilidade a uma patologia em particular ou a uma classe de doenças intimamente relacionadas. A síndrome da Suscetibilidade Mendeliana a Doenças Micobacterianas (MSMD) consiste em um exemplo claro desta teoria, uma vez que a deficiência na via de sinalização do $IFN\gamma$ gera suscetibilidade quase que especificamente a doenças causadas por micobactérias (Alcaïs e col., 2009).

No caso específico da tuberculose, embora a doença infantil pareça sofrer fortemente o efeito de tais variações mendelianas, a mesma doença em adultos parece ser controlada pela atuação conjunta de uma maior variedade de genes (Alcaïs e col., 2005). O estudo desenvolvido por Shaw e col. (1997) demonstrou a presença de um controle oligogênico da suscetibilidade também a esta infecção. Os estudos de rastreamento genômico desenvolvidos até o presente momento sugerem a participação das regiões 15q11 (Bellamy e col., 2000), 17q11-22 (Jamieson e col., 2004) e 8q12-q13 (Baghdadi e col., 2006) na suscetibilidade à tuberculose. Embora a região 8q12 tenha apresentado os resultados mais consistentes, com dados estatisticamente significativos (Baghdadi e col., 2006), os resultados de um mapeamento fino da região 15q11 sugerem que o gene *UBE3A*, responsável pela codificação de uma ubiquitina ligase, seja responsável pelo fenótipo observado (Cervino e col., 2002). A posterior identificação dos genes *PARK2/PACRG* como genes-chave no contexto da hanseníase (Mira e col., 2004) nos permite levantar a hipótese de uma participação importante do sistema de ubiquitinação no contexto de micobacterioses em geral.

A participação comum de determinados genes ou classes de genes na suscetibilidade à hanseníase e à tuberculose pode ser facilmente exemplificada pelos estudos do gene *NRAMP1*. Conforme citado no Capítulo 1, a participação deste gene na suscetibilidade à hanseníase foi demonstrada utilizando estudos de associação e ligação (revisto por Moraes e

col., 2006). Estudos em tuberculose, observaram uma ligação entre a região do cromossomo 2 que abriga este gene e a suscetibilidade à doença (Greenwood e col., 2000). Em contrapartida, estudos de rastreamento genômico não detectaram ligação entre esta mesma região e a suscetibilidade à tuberculose (Cervino e col., 2002; Jamieson e col., 2004; Baghdadi e col., 2006), sugerindo que, assim como na hanseníase, o gene *NRAMP1* provavelmente exerce um efeito moderado no desenvolvimento da tuberculose, o que não nos permite caracterizá-lo como um gene-chave.

Desta forma, pode-se dizer que a análise conjunta dos dados de tuberculose e hanseníase sugere fortemente a participação de genes comuns na regulação da resposta imune a ambas as patologias. Ainda no contexto dos genes e variações com efeito moderado, estudos de associação utilizando desenhos de estudo populacionais têm sugerido uma participação de diversos genes do sistema imune na suscetibilidade à tuberculose, dentre os quais podem ser citados os genes *IFNG*, *IL10* e *TNF* (Quirico-Santos e col., 2006). Entretanto, assim como no caso da hanseníase, a variabilidade entre os resultados dos diferentes estudos dificulta a elaboração de hipóteses e conclusões definitivas a respeito da participação destes genes no contexto da tuberculose.

A hipótese de uma participação de genes comuns na suscetibilidade a micobacterioses em geral estimulou o desenvolvimento de um estudo em paralelo utilizando a tuberculose como um segundo modelo. Os dados referentes a este projeto adicional foram descritos por Pacheco e col. (2008) em um artigo publicado no ano de 2008 no periódico “Human Genetics” (Anexo II). Embora este artigo não tenha sido incluído como parte integrante desta tese, os resultados do mesmo serão avaliados em conjunto aos dados apresentados no segundo, terceiro e quarto capítulos, a fim de permitir um melhor entendimento da participação dos genes *IL10*, *TNF* e *IFNG* na suscetibilidade a esta classe de patologias.

Durante este estudo, foi realizada uma meta-análise com o objetivo de obter medidas de associação que pudessem refletir um consenso entre os diferentes estudos caso-controle que avaliaram a associação entre SNPs nos genes *TNF*, *IL10* e *IFNG* e o desenvolvimento de tuberculose. Com exceção do gene *IL10*, os marcadores utilizados na meta-análise foram os mesmos avaliados no contexto da hanseníase, o que facilitou a interpretação dos resultados. Os resultados obtidos a partir deste estudo reforçam o efeito protetor do alelo +874T, uma vez que este mesmo alelo também foi associado a uma menor chance de desenvolvimento de

tuberculose. As análises dos SNPs de *IL10* e *TNF*, por sua vez, não resultaram em associação estatisticamente significativa apesar do elevado tamanho amostral alcançado.

No caso específico da *IL-10*, entretanto, a análise estratificada utilizando apenas dados de tuberculose pulmonar sugere uma participação deste gene no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da tuberculose (Pacheco e col., 2008). Embora esta associação não tenha sido estatisticamente significativa, os dados obtidos a partir de estudos haplotípicos em hanseníase sugerem que este gene de fato participe da suscetibilidade a diferentes formas clínicas (Moraes e col., 2004; Malhotra e col., 2005a). Dado que os polimorfismos avaliados em ambas as patologias foram distintos, os dados negativos obtidos a partir da análise do SNP da posição -1082 não excluem por completo a participação deste locus na suscetibilidade à tuberculose. Entretanto, a elucidação desta questão requer o desenvolvimento de novos estudos de meta-análise em tuberculose utilizando o SNPs -819C/T como um marcador.

Assim como no caso da *IL10*, as análises do SNP *TNF* -308G/A sugerem que este gene não participe da suscetibilidade à tuberculose. Entretanto, dada a associação deste SNP à proteção contra a hanseníase *per se* especificamente em brasileiros, não há como excluir a hipótese da existência de uma associação equivalente no contexto desta segunda micobacteriose. De fato, dados recentes de uma meta-análise dos estudos de associação entre o gene *NRAMP1* e a tuberculose detectaram um importante componente de heterogeneidade entre os estudos, o qual pôde ser explicado ao menos em parte pelas variáveis idade e etnia (Li e col., 2006).

No que diz respeito ao gene *IFNG*, dados da literatura sugerem uma participação deste gene no contexto de diversas outras doenças causadas por patógenos intracelulares, incluindo leishmaniose (Matos e col., 2006) e hepatite (Liu e col., 2006). A avaliação conjunta dos resultados de Pacheco e col. (2008) e dos dados apresentados no terceiro capítulo desta tese, sugere uma participação do gene *IFNG* no desenvolvimento de micobacterioses em geral, o que estaria de acordo com a comprovada participação da via *IL-12/IL-23/IFN γ* na suscetibilidade a esta classe de patologias (Casanova & Abel, 2007; Alcaïs e col., 2009). Embora o efeito deste marcador tenha sido sutil em ambas as doenças ($OR \sim 0,7$), o que não nos permite caracterizar o *IFNG* como um gene-chave, os dados apresentados sugerem que o SNP *IFNG* +874T/A possa de fato ser utilizado em modelos preditivos de suscetibilidade a micobacterioses em geral.

II. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de suscetibilidade genética à hanseníase. Mais especificamente, os dados obtidos nos permitem concluir que:

- O SNP *IL10* -819C/T representa um marcador para a associação do gene *IL10* à hanseníase em diferentes populações.
- O gene *IFNG* mostrou-se associado à hanseníase na população brasileira. O alelo +874T confere proteção contra a hanseníase *per se* especificamente em afro-descendentes.
- O SNP *TNF* -308G/A parece resumir o efeito do gene *TNF* especificamente na população brasileira.
- O SNP *IFNG* +874T/A parece atuar como um marcador do efeito deste gene na suscetibilidade a micobacterioses em geral.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet* 1988 Feb;42(2):256-66.

Abel L, Sanchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis* 1998 Jan;177(1):133-45.

Abel L, Vu DL, Oberti J, Nguyen VT, Van VC, Guilloud-Bataille M, et al. Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. *Genet Epidemiol* 1995;12(1):63-82.

Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. *Infect Immun* 1993 Oct; 61(10):4173-81.

Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Nakata N, et al. Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. *J Bacteriol* 2009 May;191(10):3321-7.

Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest* 2009 Sep;119(9):2506-14.

Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 2007 Apr;39(4):517-22.

Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med* 2005 Dec;202(12):1617-21.

Alcaïs A, Sanchez FO, Thuc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, 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 Jan;181(1):302-8.

Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet* 2008 Apr;123(3):227-35.

Alves L, de Mendonca Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, et al. Mycobacterium leprae infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. FEMS Microbiol Lett 2004 Sep;238(2):429-37.

Baena A, Leung JY, Sullivan AD, Landires I, Vasquez-Luna N, Quiñones-Berrocal J, et al. TNF-alpha promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. Genes Immun 2002 Dec;3(8):482-7.

Baghdadi JE, Orlova M, Alter A, Ranque B, Chentoufi M, Lazrak F, et al. An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. J Exp Med 2006 Jul;203(7):1679-84.

Barnette 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.

Bekker LG, Freeman S, Murray PJ, Ryffel B, Kaplan G. TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. J Immunol 2001 Jun;166(11):6728-34.

Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, Ruwende C, Gie R, Samaai P, et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Jul;97(14):8005-9.

Blackwell JM. Modern genetics and leprosy susceptibility. Lepr Rev 2001 Sep;72(3):352-6.

Bleharski JR, Li H, Meinken C, Graeber TG, Ochoa MT, Yamamura M, et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. Science 2003 Sep;301(5639):1527-30.

Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. J Infect Dis 2008 Jan;197(2):253-61.

Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009 Sep;28(9):1055-65.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet* 2004 Apr;363:1209-1219.

Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis* 2006 Oct;6(10):653-63.

Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 2005 Sep;366(9489):941-51.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001 Feb;2(2):91-9.

Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003 Feb;361:598-604.

Cardoso CC, Martinez AN, Guimarães PE, Mendes CT, Pacheco AG, de Oliveira RB, et al. Ninjurin 1 asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol* 2007 Oct;190(1-2):131-8.

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002;20:581-620.

Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J* 2007 Feb;26(4):915-22.

Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol* 2004 Jan;4(1):55-66.

Cervino AC, Lakiss S, Sow O, Bellamy R, Beyers N, Hoal-van Helden E, et al. Fine mapping of a putative tuberculosis-susceptibility locus on chromosome 15q11-13 in African families. *Hum Mol Genet* 2002 Jul;11(14):1599-603.

Chang ST, Linderman JJ, Kirschner DE. Effect of multiple genetic polymorphisms on antigen presentation and susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2008 Jul;76(7):3221-32.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001 Feb;409(6823):1007-11.

Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001 Dec;2(12):967-77.

Cooke G, Hill A. Tuberculosis, leprosy and other mycobacterial diseases. In: Kaslow RA, McNicholl JM, Hill AVS, eds. *Genetic susceptibility to infectious diseases*. New York:Oxford University Press, Inc. 2008. p.333-51.

de Messias-Reason I, Kreamsner PG, Kun JF. Functional Haplotypes that Produce Normal Ficolin-2 Levels Protect against Clinical Leprosy. *J Infect Dis* 2009 Mar;199(6):801-4.

Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, et al. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect Immun* 1996 Oct;64(10):4385-9.

Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, et al. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect Immun* 1996 Oct;64(10):4385-9.

Düppre NC, Camacho LA, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JA, et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008 Jul;102(7):631-8.

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 Dec;72(4):457-67.

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 Sep;71(3):330-40.

Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis* 2009 Jul;13(4):493-8.

Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for *Mycobacterium leprae*-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol Lett* 2007 May;110(1):82-5.

Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JA, Moraes MO, Antunes SL, Pessolani MCV, et al. Hanseníase: Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. Em: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Vol. II. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2005. p. 1383-94.

Greenwood CM, Fujiwara TM, Boothroyd LJ, Miller MA, Frappier D, Fanning EA, et al. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet* 2000 Aug;67(2):405-16.

Hagge DA, Ray NA, Krahenbuhl JL, Adams LB. An in vitro model for the lepromatous leprosy granuloma: fate of *Mycobacterium leprae* from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages. *J Immunol* 2004 Jun;172(12):7771-9.

Hagge DA, Robinson SO, Scollard D, McCormick G, Williams D. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on schwann cell and neuron interactions. *J Infect Dis* 2002 Nov;186:1283-96.

Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton WJ, et al. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol* 2009 Apr;174(4):1379-89.

Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol* 2008 Dec;130(6):856-64.

Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, et al. Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*.

J Bacteriol 2009 Oct;191(19):6067-74.

Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet* 2006; 40:469-86.

Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000 Aug;50(3):184-95.

Jamieson SE, Miller EN, Black GF, Peacock CS, Cordell HJ, Howson JMM, et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazillians. *Genes Immun* 2004 Jan;5(1):46-57.

Jardim MR, Antunes SL, Santos AR, Nascimento OJ, Nery JA, Sales AM, et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol* 2003; 250(7):806-9.

Johnson CM, Traherne JA, Jamieson SE, Tremelling M, Bingham S, Parkes M, et al. Analysis of the BTNL2 truncating splice site mutation in tuberculosis, leprosy and Crohn's disease. *Tissue Antigens* 2007 Mar;69(3):236-41.

Joplin WH, McDougall AC. *Handbook of leprosy*. 4th Ed. Heinmann Professional Publishing, Oxford. 1988.

Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, et al. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* 2005;202(7):987-99.

Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* 2004 Aug;112(4):674-80.

Kaplan G, Cohn ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr Rev* 1986;57(Suppl 2):199-202.

Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol* 1995 Feb;99(2):196-202.

Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, et al. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol* 2001 Jul;167(2):779-86.

Knight JC, Keating BJ, Kwiatkowski DP. Allele-specific repression of lymphotoxin-alpha by activated B cell factor-1. *Nat Genet* 2004 Apr;36(4):394-9.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* 2003 May; 9(5):525-32.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 2005 Jun;11(6):653-60.

Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994 Sep;265(5181):2037-48.

Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004 Dec;202:96-105.

Lee SB, Kim BC, Jin SH, Park YG, Kim SK, Kang TJ, 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 Jun;55(3):177-81.

Li HT, Zhang TT, Zhou YQ, Huang QH, Huang J. SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006 Jan;10(1):3-12.

Liu M, Cao B, Zhang H, Dai Y, Liu X, Xu C. Association of interferon-gamma gene haplotype in the Chinese population with hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* 2006 Nov;58(11):859-64.

Liu PT, Modlin RL. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 2008 Aug;20(4):371-6.

Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, et al. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1995;181(3):839-44.

López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Apr;167(7):970-5.

Malhotra D, Darvishi K, Lohra M, Kumar H, Grover C, Sood S, 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* 2006 Apr;14(4):438-42

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* 2005a Nov;118(2):295-300.

Malhotra D, Relhan V, Reddy BSN, Bamezai R. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum Genet* 2005b Apr;116(5):413-5.

Marquet S, Schurr E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. *Drug Metab Dispos* 2001;29:479-83.

Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 2006;44:3154-9.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2009a;47(7):2124-30.

Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, et al. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 2007 Apr;7:33.

Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AVS. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *Am J Trop Med Hyg* 2001 Dec;65(6):733-5.

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 Jan;5(1):63-7.

Ministério da Saúde. Boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Brasília. 2008.

Mira MT, Alcais A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun* 2003a;4(1):67-73.

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* 2003b Mar;33:412-5.

Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004;427(6975):636-40.

Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect* 2006 Apr;8(4):1124-31.

Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 Deficiency Is Associated with Impaired Mycobacterial Signaling and Protection from Leprosy Reversal Reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2008 May;2(5):e231.

Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology* 1995 Sep;86(1):97-103.

Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science* 2005 May;308(5724):1040-2.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006;77(3):189-202.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, et al. 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 MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BCC, Nery JAC, Martins RCL, et al. Cytokine mRNA Expression in Leprosy: a Possible Role for Interferon- γ and Interleukin-12 in Reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 1999;50:541-9.

Morahan G, Kaur G, Singh M, Rappaport CC, Kumar N, Katoch K, et al. Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens* 2007 Apr;69(Suppl 1):234-6.

Mörmann M, Rieth H, Hua TD, Assouhou C, Roupelieva M, Hu SL, et al. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun* 2004 Jun;5(4):246-55.

Nakamura K, Akama T, Bang PD, Sekimura S, Tanigawa K, Wu H, et al. Detection of RNA expression from pseudogenes and non-coding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. *Microb Pathog* 2009 Sep;47(3):183-7.

Nathan CF, Murray HW, Wiebl ME, Rubin BY. Identification of interferon- γ , as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158:670.

Neill MA, Klebanoff SJ. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J Exp Med* 1988 Jan;167(1):30-42.

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.

Ng, V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic-glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* 2000 Oct;103(3):511-24.

Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, 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 Jul;58(7):740-3.

Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al. 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.

Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F, Teles RM, Silva TP, Oliveira AL, et al. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005 Oct;64(10):882-90.

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.

Ottenhoff THM, Converse PJ, Gebre N, Wondimu A, Ehrenberg JP, Kiessling R. T cell responses to fractionated *Mycobacterium leprae* antigens in leprosy. The lepromatous nonresponder defect can be overcome *in vitro* by stimulation with fractionated *M. leprae* components. *Eur J Immunol* 1989;19:707-13.

Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* 2008 Jun;123(5):477-84.

Pacheco AGF, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease Markers* 2009. In press.

Pauling L, Itano HA, et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 1949 Nov;110(2865):543-8.

Pessolani MCV, Marques MAM, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes Infect* 2003; 5(7):677-84.

Pisa P, Gennene M, Söder O, Ottenhoff T, Hansson M, Kiessling R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990 May;161(5):988-91.

Posch PE, Cruz I, Bradshaw D, Medhekar BA. Novel polymorphisms and the definition of promoter 'alleles' of the tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha loci: inclusion in HLA haplotypes. *Genes Immun* 2003 Dec;4(8):547-58.

Prado-Montes de Oca E, Velarde-Félix JS, Ríos-Tostado JJ, Picos-Cárdenas VJ, Figuera LE. SNP 668C (-44) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy. *Infect Genet Evol* 2009;9(4):617-25.

Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61(9):863-6.

Quirico-Santos T, Da-Cruz AM, Kubelka CF, Lannes-Vieira J, Moraes MO. Tropical infectious diseases. In: Koen Vandebroek ed. *Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions*, vol 28. Boca Raton: CRC LLC Press, 2006. p.413-429.

Ramasesh N, Adams LB, Franzblau SG, Krahenbuhl JL. Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 1991 Sep;59(9):2864-9.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science* 2002 May;296:927-31.

Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:21-7.

Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Curr Opin Immunol* 2004;16(4):511-8.

Ranque B, Alter A, Mira M, Thuc NV, Thai VH, Huong NT, et al. Genomewide linkage analysis of the granulomatous mitsuda reaction implicates chromosomal regions 2q35 and 17q21. *J Infect Dis* 2007 Oct;196(8):1248-52.

Rea TH, Sieling PA. Delayed-type hypersensitivity reactions followed by erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr* 1998;66:316-27.

Ress RFW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed). *Leprosy*, 1st ed. New York: Churchill Livingstone Inc. 1985. p. 31-52.

Reynard MP, Turner D, Junqueira-Kipnis AP, Ramos de Souza M, Moreno C, Navarrete CV. Allele frequencies for an interferon-gamma microsatellite in a population of Brazilian leprosy patients. *Eur J Immunogenet* 2003 Apr;30(2):149-51.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev* 1962;33:119-28.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000 Jun;405(6788):847-56.

Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Neupane KD, Theuvenet WJ. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993 Mar;61(1):35-43.

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 Aug;176(2):530-2.

Sampaio EP, Moraes MO, Pessolani MCV, Sarno EN. Role of Th1 cytokines in host defenses against *Mycobacterium leprae*. In: Kotb M, Kallindra T, eds. *Cytokines and Chemokines in infectious diseases handbook*. Totowa: Humana Press; 2003. p. 1-24.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002;186:1687-91.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LMM, Nery JAC. Serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991;84:103-8.

Sarno EN, Santos AR, Jardim MR, Suffys PN, Almeida AS, Nery JAC, et al. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF α . *Lepr Rev* 2000;71(Suppl.):S154-60.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN- γ activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol* 1991 Sep;147(6):1983-94.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004 Feb;75(2):163-89.

Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* 2009 Jun;199(12):1816-9.

Scollard DM, McCormick G, Allen JL. Localization of *Mycobacterium leprae* to endothelial cells of epineurial and perineurial blood vessels and lymphatics. *Am J Pathol* 1999;154(5):1611-20.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006 Apr;19(2):338-81.

Shaw MA, Collins A, Peacock CS, Miller EN, Black GF, Sibthorpe D, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNFA. *Tuber Lung Dis* 1997;78(1):35-45.

Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* 2001 Jun;2(4):196-204.

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-Kda surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Nat Acad Sci* 1999;96:9857-62.

Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility locus for leprosy on chromosome 10p13. *Nat Genet* 2001 Apr;27(4):439-41.

Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol* 1994 Oct;153(8):3639-47.

Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, Harbacheuski R, Murray RA, Gelderbloem SJ, et al. Bacillus Calmette-Guérin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. *J Immunol* 2008 Mar;180(5):3569-77.

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993 Mar;52(3):506-16.

Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff THM. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. *Immunol Cell Biol* 2000 Aug;78(4):349-55.

Strachan T, Read AP. Mapeamento genético de caracteres complexos. Em: *Genética Molecular Humana*. 2. ed. São Paulo: ArtMed. 2002. p. 283-93.

Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Jun;102(26):9188-93.

Teare MD, Barret JH. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005;366:1036-44.

Thole JE, Janson AA, Cornelisse Y, Schreuder GM, Wieles B, Naafs B, et al. HLA-class II-associated control of antigen recognition by T cells in leprosy: a prominent role for the 30/31-kDa antigens. *J Immunol* 1999 Jun;162(11):6912-8.

Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR, Balakrishnan K, Ghei S, Golding M, et al. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J Infect Dis* 2002 Oct;186(8):1190-3.

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.

Valente FP, Tan CR, Temple SE, Phipps M, Witt CS, Kaur G, Gut I, McGinn S, Allcock RJ, Chew CS, Price P. The evolution and diversity of TNF block haplotypes in European, Asian and Australian Aboriginal populations. *Genes Immun* 2009. In press.

Vanderborcht PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 2007 Jun;8(4):320-4.

Vejbaesya S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thai* 2007 Jun;90(6):1188-92.

Velarde-Félix JS, Cázarez-Salazar SG, Castro-Velázquez R, Rendón-Maldonado JG, Rangel-Villalobos H. Association between the TaqI polymorphism of the vitamin D receptor gene

and lepromatous leprosy in a Mexican population sample. *Salud Publica Mex* 2009 Jan-Feb;51(1):59-61.

Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001;2(8):REVIEWS1023.

Volk H, Asadullah, Gallagher G, Sabat R, Grutz G. IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol* 2001;22(8):414-17.

Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* 2005;23:787-819.

Wheeler E, Miller EN, Peacock CS, Donaldson IJ, Shaw MA, Jamieson SE, et al. Genome-wide scan for loci influencing quantitative immune response traits in the Belém family study: comparison of methods and summary of results. *Ann Hum Genet* 2006 Jan;70(Pt 1):78-97.

WHO. Global leprosy situation, beginning of 2008. [online]. *Weekly epidemiological record Geneva*, 2008; Disponível em: <http://www.who.int/wer/2008/wer8333/en/>

WHO. World Health Organization Leprosy Elimination Project. **Who reports** [online]. Geneva, 2004; [acessado em 12 ago. 2004]. Disponível em: <http://www.who.int/lep/reports/s20042.pdf>.

Williams DL, Slayden RA, Amin A, Martinez AN, Pittman TL, Mira A, et al. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC Genomics* 2009;10:397.

Yamamura M, Uyemura U, Deans R, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991 Oct;254(5029):277-9.

Young D. Genomics: Leprosy – a degenerative disease of the genome. *Curr Biol* 2001;11:381-3.

ANEXO I:

Genética da resposta imune na hanseníase

O artigo que se segue foi publicado no periódico “Leprosy Review”, no ano de 2006, poucos meses após o início deste projeto. Trata-se de um artigo de revisão em que foram abordados temas referentes à suscetibilidade genética à hanseníase, tendo como base os dados disponíveis na literatura até o momento da publicação. O texto fornece uma revisão das principais características que sugeriam a existência de um componente genético bem como um resumo geral dos resultados de estudos observacionais que confirmaram esta teoria. Em seguida, foram revistos os principais resultados dos estudos genéticos que vieram a comprovar a participação de diferentes genes e regiões cromossômicas no desenvolvimento da hanseníase. Ao longo do manuscrito, foram revistos os principais estudos de associação utilizando genes candidatos tais como os do complexo HLA, *TNF*, *LTA*, *IL10*, *SLC11A1*, *VDR*, entre outros. Foram descritos ainda os principais estudos de rastreamento genômico que resultaram na identificação de regiões cromossômicas ligadas ao desenvolvimento da hanseníase *per se* e suas variações. Por fim, foram discutidos ainda os resultados do estudo de clonagem posicional que levou à identificação dos genes *PARK2* e *PACRG* como os principais responsáveis pela suscetibilidade à hanseníase *per se*.

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.

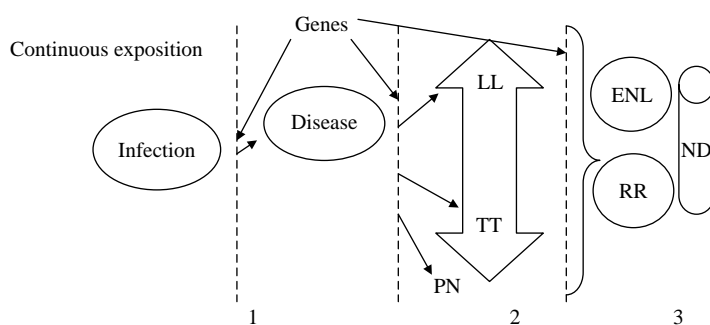


Figure 1. Natural history of leprosy: stages of infection and disease. Genetic factors can contribute to: outcome of the disease (1); severity of clinical forms (2); and occurrence of reactional episodes and nerve damage (3). LL = lepromatous; TT = tuberculoid; PN = pure neural; ENL = erythema nodosum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

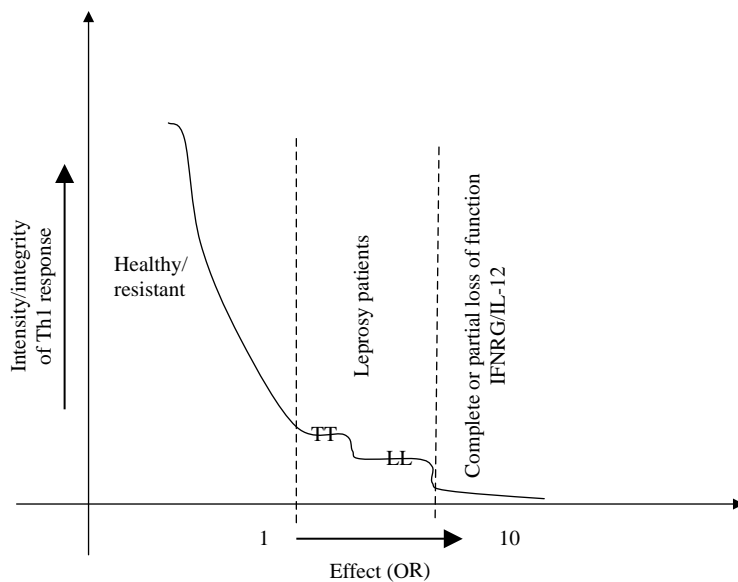


Figure 2. Genetic influence on immunological responses and resistance to intracellular pathogens, using leprosy as an example. According to the level of Th1 responses there are healthy individuals able to mount strong Th1 responses. At the other extreme, there are patients who develop infections caused 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
	Brazil	-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.

ANEXO II:

Polimorfismos *IFNG* +874T/A, *IL10* -1082G/A e *TNF* -308G/A em associação com a suscetibilidade à tuberculose: um estudo de meta-análise.

A questão da suscetibilidade genética a doenças infecciosas tem sido alvo constante de estudos epidemiológicos. De acordo com uma das hipóteses mais atuais, polimorfismos em determinados genes podem conferir suscetibilidade a uma patologia em particular ou a uma classe de doenças intimamente relacionadas. A síndrome da Suscetibilidade Mendeliana a Doenças Micobacterianas consiste em um exemplo claro desta teoria, uma vez que a deficiência na via de sinalização do $IFN\gamma$ gera suscetibilidade quase que especificamente a micobacterioses. As características desta síndrome, associadas à existência de outros mediadores comuns as respostas às diferentes micobactérias, sugere que outros genes, que não os da cascata $IL-12/IL-23/IFN\gamma$, possam estar associados concomitantemente a toda esta classe de infecções.

Sendo assim, finalizada a etapa experimental do presente projeto, em que foi determinado o efeito de SNPs nos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* na suscetibilidade genética à hanseníase, restou ainda a hipótese de que a associação a esta doença pudesse refletir um efeito comum a doenças micobacterianas em geral. A fim de testar esta hipótese, optamos por analisar também a influência destes genes no desenvolvimento da tuberculose. Dado que a hanseníase era de fato o único modelo experimental disponível, optamos pelo uso de uma abordagem essencialmente epidemiológica no caso deste segundo modelo. Sendo assim, os estudos desta segunda patologia consistiram essencialmente na revisão dos dados da literatura e posterior combinação dos mesmos em uma meta-análise. Os resultados obtidos a partir deste estudo foram descritos em detalhes no artigo de Pacheco e col. (2008), publicado no periódico “Human Genetics” e anexado nas páginas que se seguem.

IFNG +874T/A, *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study

Antonio Guilherme Pacheco ·
Cynthia Chester Cardoso · Milton Ozório Moraes

Received: 12 February 2008 / Accepted: 30 March 2008 / Published online: 15 April 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Susceptibility to infectious diseases is influenced by genetic background and efficient cellular immune activation is responsible for protection. In tuberculosis (TB), interferon-gamma (IFN γ) is crucial to control intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* while interleukin-10 (IL-10) has an antagonistic role. Tumor necrosis factor (TNF) is a central mediator of granuloma formation and control of bacilli spread synergizing with IFN γ to hamper *M. tuberculosis* infection. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at these genes could influence cytokine levels and regulate resistance and susceptibility to TB. The aim of this study was to determine the association of the interferon-gamma gene (*IFNG*) +874T/A, interleukin-10 gene (*IL10*) -1082G/A and tumor necrosis factor gene (*TNF*) -308G/A SNPs with TB in several populations using meta-analysis. We searched for association studies correlating these polymorphisms and TB using pre-established keywords in Medline. Meta-analysis was conducted with random effects models to account for heterogeneity between studies. Eleven studies were included in the *IFNG*

+874T/A meta-analysis, while eight were used for the *IL10* -1082G/A, and 10 were employed for *TNF* -308G/A. Data were analyzed in respect to associations between alleles, genotypes and minor allele carriers. Statistically significant results were found only for *IFNG*. The +874T allele of *IFNG* showed a protective significant association (OR = 0.75; 95% CI, 0.634–0.887; $P = 0.0008$). Though not significant, *IL10* presented a trend towards protection when only studies with pulmonary TB patients were considered. This data reinforces the critical importance of *IFNG* +874T/A as a genetic marker for TB resistance and this information can be used for better design of a TB vaccine.

Introduction

Tuberculosis (TB) is a high burden disease, especially in developing countries. According to the World Health Organization, in 2006, there were 9.2 million new TB cases, 86% being in Asia and Africa. The death toll reached 1.7 million people, including 200,000 HIV-infected patients (World Health Organization and Global Tuberculosis Programme 2008). The infectious agent of TB, *Mycobacterium tuberculosis*, is an alternative intracellular pathogen that infects mainly macrophages in the lungs. Even though *M. tuberculosis* can infect several organs, in adults around 85% of cases are pulmonary.

The influence of host genetics on resistance to infectious diseases has been suggested through several different approaches. Family studies using twins, sib pairs, trios (parents and child) and even complex families provided clues towards this question. Whenever the development of clinical disease after infection is clearly more frequent between parents and offspring than between spouses, one

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00439-008-0497-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. G. Pacheco
Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde (DEMQS), Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)/ PROCC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

C. C. Cardoso · M. O. Moraes (✉)
Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ,
Av. Brasil 4365, CEP 21040-360 Manguinhos,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil
e-mail: mmoraes@fiocruz.br

can suggest that susceptibility to that disease depends, at least in part, on an inherited component of the host (Beiguelman 1981). Epidemiological studies, such as genetic case–control studies, can also provide this kind of information when the frequency of patients developing clinical disease is very small (around 0.1–1%) in relation to the total number of exposed people. One of the best examples of host resistance controlled by genes was the administration of *M. tuberculosis* accidentally mixed to a vaccine strain of bacilli Calmette-Guerin (BCG) to an infant German population in 1927 (revised by Cooke and Hill 2001), which resulted in some individuals remaining unaffected while others developed the disease and some evolved to death.

Genetic susceptibility to mycobacterial infections is suggested by diseases caused by nonvirulent pathogens, such as *Mycobacterium bovis*, that show a Mendelian mode of transmission. Extensive genetic search has led to the identification of several mutations in genes responsible for host immunity to intracellular pathogens (for a detailed review, see van de Vosse et al. 2004; Alcaïs et al. 2005; Moraes et al. 2006). As a result, it is now clear that susceptibility to virulent intracellular pathogens, like *M. tuberculosis*, is influenced by host genetic background as well, and it is supposed that efficient activation of cellular immune response, specifically interferon-gamma (IFN γ), might play a key role in protection (van de Vosse et al. 2004; Ottenhoff et al. 2002). Likewise, other immunological genes such as tumor necrosis factor gene, formerly tumor necrosis factor-alpha gene (*TNF*), and interleukin-10 gene (*IL10*) are involved in this protective network of activation leading to control of *M. tuberculosis* intracellular growth.

IFNG is highly conserved and few single nucleotide polymorphisms (SNPs) are found in the intragenic region. Even so, some allelic variants in the *IFNG* have been reported, where the most studied one is located in the first intron, at the 5' end adjacent to a CA repeat region, *IFNG* +874T/A (Pravica et al. 2000). The results obtained for the *IFNG* +874A allele suggest, in one hand, association with susceptibility to TB, being independently confirmed in different populations like South Africans, Spanish and Chinese (Rossouw et al. 2003; López-Maderuelo et al. 2003; Tso et al. 2005). On the other hand, other studies evaluating Colombian, Malawian, West African and American populations did not replicate the association (Henao et al. 2006; Fitness et al. 2004; Cooke et al. 2006; Moran et al. 2007). A study with a Turkish population found borderline results (Oral et al. 2006).

Data on *IL10* SNPs are very inconsistent. Some studies in Turkish, Italian and Korean populations found association of *IL10* -1082G/A with susceptibility to TB, while other studies (Tso et al. 2005; López-Maderuelo et al. 2003; Henao et al. 2006) did not find any association for the

IL10 -1082G/A SNP. Concerning *TNF* -308G/A, only borderline results for few studies were found (Correa et al. 2005; Oral et al. 2006). Meta-analysis is the method of choice to deal with these ambiguities and also overcome the problem of small sample sizes and inadequate statistical power of genetic studies of complex traits. It has been used to clarify controversial results in VDR and NRAMP SNPs in TB (Li et al. 2006; Lewis et al. 2005) and other autoimmune diseases (Nath et al. 2005; Lee et al. 2005). Here, we used this approach to investigate the association of the most studied SNPs from *IFNG*, *TNF* and *IL10* in respect to tuberculosis susceptibility.

Material and methods

Identification of eligible studies and data extraction for meta-analysis

We searched for studies that examined the association of the *IFNG* +874T/A, *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A SNPs with tuberculosis. Literature search was made in MEDLINE using PubMed citations to identify available articles (from 1998 to August 2007) in which the *IFNG* +874T/A, *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A SNPs were tested for association with tuberculosis in population-based studies (case–control designs). Related articles to the selected papers (using PubMed search) and references in the studies were also reviewed to identify other studies. Keywords used were “interferon,” “IFN,” “TNF,” “Interleukin-10,” “IL-10,” “polymorphism,” “SNP,” “tuberculosis” and “TB”, entered as text words. No language restrictions were applied. A study was included in the analysis if (1) it was published up to August 2007, (2) it was not related to previous publications and (3) it provided enough (basically genotypic) data to calculate odds ratios (OR). We excluded studies (1) that contained overlapping data, (2) in which the number of genotypes could not be ascertained and (3) studies in which the control population deviated from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE).

Statistical analysis

Allele frequencies at the *IFNG* +874T/A, *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A SNPs from the respective studies were determined by the allele counting method. A χ^2 -test was used to determine if observed frequencies of genotypes conformed to HWE. All comparisons were in respect to the minor frequency allele. Odds ratios (ORs) were used as the point estimates of risk, and were calculated along with their 95% confidence intervals (CIs) for each study. To test for publication bias, a modification of Egger's test was

performed to provide statistical evidence for funnel plot symmetry.

Heterogeneity across studies was assessed through Cochran's Q -statistic. We also quantified the effect of heterogeneity using the I^2 -statistic, which measures the degree of inconsistency in the studies by calculating what percentage of the total variation across studies is due to heterogeneity rather than by chance. Finally, the overall or pooled estimate of risk (OR) was obtained by using Mantel–Haenszel method in both the fixed effect model and by DerSimonian and Laird method in the random effects model. Pooled OR in the meta-analysis was performed weighting individual ORs by the inverse of their variance.

All analyses were carried out in respect to allele counts, allele carrier counts (genotypes carrying the allele, including heterozygotes and homozygotes) and genotype counts. A subanalysis was also carried out excluding all studies that either mixed pulmonary and extrapulmonary TB patients or when it was not clear that only pulmonary TB patients were used. Such studies were those by Fitness et al. 2004, Moran et al. 2007, Oral et al. 2006, Rossouw et al. 2003 and Tso et al. 2005. All analyses were carried out with R for Windows 2.4.1 with the package “meta” (R Development Core Team 2008).

Results

Among the 13 studies to evaluate *IFNG* +874T/A SNP found in our search, two of them (Etokebe et al. 2006; Amim et al. 2008) were excluded due to deviation from HWE in the control group (Supplementary Table 2). The remaining 11 studies were conducted on Americans, Africans, Europeans and Asians, more specifically African-Americans, Caucasians and Hispanics, Italians, Spanish, Chinese, South Africans (Coloreds), Colombians, Malawians, West Africans, Indians and two Turkish populations. The study with the American population (Moran et al. 2007) was composed of three different ethnicities, which were analyzed separately to avoid deviations from HWE. The number of patients and controls for each genotype as well as other features to each population can be verified on

Supplementary Table 2. We have tested the effect of *IFNG* polymorphisms as +874TT (Table 1, Supplementary Figure 1A), +874T allele or +874T carrier (Table 1, Fig. 1a). No clustering of studies according to ethnicity was performed, since few studies were conducted in populations with the same ethnic background. Even though the Q -test indicated heterogeneity across studies (P value = 0.001), there was no significant differences between the fixed- and random-effects models (Fig. 1a). The results depicted in Table 1 and Fig. 1a clearly indicate the protective effect of +874T allele in every combination tested: genotype, carrier, allele, with random-effects pooled ORs of 0.75 (95% CI = 0.63–0.88; P value = 0.008); 0.76 (95% CI = 0.60–0.94; P value = 0.01) and 0.59 (95% CI = 0.45–0.78; P value = 0.0002) for the T allele, T carrier and TT genotype, respectively. The inclusion of the study deviating from HWE did not affect the results (data not shown). The modified Egger's test provided no significant evidence for publication bias (data not shown).

When we performed the subanalysis excluding extrapulmonary cases, which also meant the exclusion of the most influential study by Tso et al. 2005, the analyses lost a lot of power (over half of the sample size was excluded) and the carrier comparison became nonsignificant. Nonetheless, the odds ratios remain virtually the same for all three comparisons (Supplementary Table 1).

To evaluate *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A SNPs, a total of 11 relevant papers was selected. Then, one study (Delgado et al. 2002) was excluded from the analysis of both SNPs and the papers from Scola et al. (2003) and Amirzargar et al. (2006) were excluded from *IL10* meta-analysis due to deviation from HWE (Supplementary Tables 3, 4). As a result, eight and ten studies of *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A SNPs were included, respectively. We found no evidence of association of the *IL10* -1082G allele, *IL10* -1082G carrier and *IL10* -1082G/G genotype with TB in a world-wide pooled population—random-effects pooled ORs 0.92 (95% CI = 0.67–1.26; P value = 0.59); 0.94 (95% CI = 0.62–1.43; P value = 0.78) and 0.85 (95% CI = 0.56–1.28; P value = 0.44), respectively (Table 2, Fig. 1b and Supplementary Figure 1B). Nonetheless, these results were modified when extrapulmonary cases

Table 1 Summary of meta-analysis of 11 studies of *IFNG* +874

	Meta-analysis ^a					Homogeneity		
	TB	Controls	OR	95% CI	P value	Q	P value	I^2 (%)
T allele	1532	1559	0.7506	[0.6348; 0.8875]	0.0008	38.89	0.0001	69.1
T carrier	1299	1297	0.7571	[0.6054; 0.9467]	0.0147	40.74	<0.0001	70.5
T/T genotype	233	262	0.5917	[0.4492; 0.7795]	0.0002	20.57	0.0571	41.7

Results are shown for random effects models

^a $N = 3,124$ for patients and 2,869 for controls

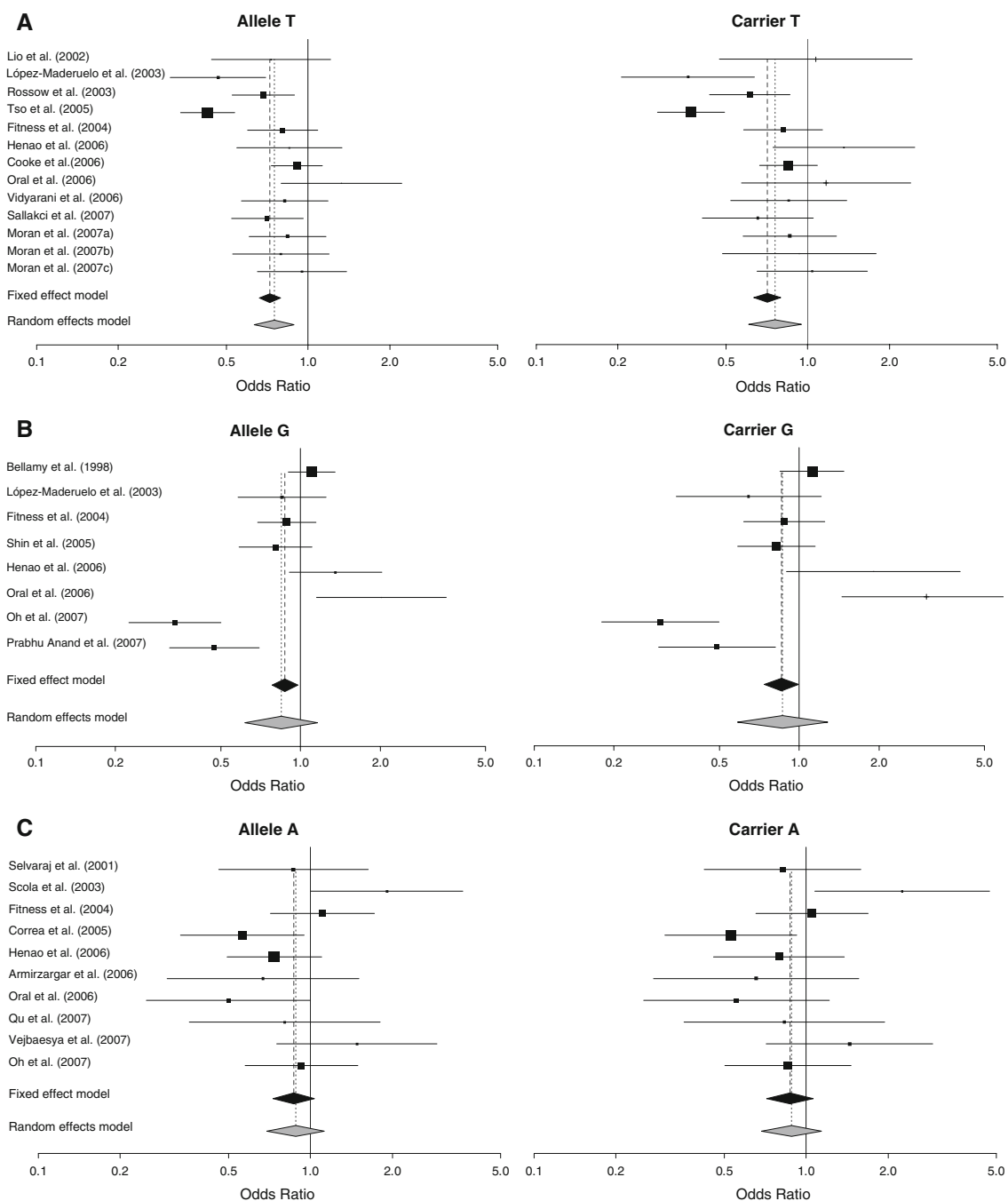


Fig. 1 Graphic representation of meta-analysis using allele frequency and carriers of the minor allele. Meta-analysis was performed under both fixed-effect and random models. Bars represent 95% CI and boxes represent OR values. The size of each box indicates the weight of the

study in the pooled results. **a**, **b** and **c** represent allele and carrier for each SNP: *IFNG* +874T/A (**a**), *IL10* +1082G/A (**b**) and *TNF* -308G/A (**c**)

were excluded, remaining nonsignificant, but with a clear trend of the OR towards zero (Supplementary Table 1).

Likewise, none of the analyses of *TNF* -308G/A SNP reach statistical significance for association with TB, even though the point estimates suggested a modest protection, with random-effects pooled ORs of 0.88 (95% CI = 0.69–1.12; P value = 0.31); 0.88 (95% CI = 0.69–1.14; P value =

0.34) and 0.74 (95% CI = 0.42–1.32; P value = 0.31) for the A allele, A carrier and AA genotype, respectively (Table 3, Fig. 1c and Supplementary Figure 1C). These results were basically the same in respect to excluding extrapulmonary cases. Although statistically nonsignificant, the ORs were slightly deviated towards the null hypothesis for the allele and carrier analyses and slightly

Table 2 Summary of meta-analysis of eight studies of *IL10*-1082

Results are shown for random effects models

^a *N* = 1,631 patients and 2,328 controls

	Meta-analysis ^a					Homogeneity		
	TB	Controls	OR	95% CI	<i>P</i> value	<i>Q</i>	<i>P</i> value	<i>I</i> ² (%)
G allele	943	1252	0.8464	[0.6169; 1.1613]	0.3015	49.93	<0.0001	86
G carrier	752	1006	0.8665	[0.5859; 1.2813]	0.4726	41.05	<0.0001	82.9
G/G genotype	191	246	0.6890	[0.4220; 1.1250]	0.1364	25.08	0.0007	72.1

Table 3 Summary of meta-analysis of ten studies of *TNF*-308

Results are shown for random effects models

^a *N* = 1,167 patients and 1,720 controls

	Meta-analysis ^a					Homogeneity		
	TB	Controls	OR	95% CI	<i>P</i> value	<i>Q</i>	<i>P</i> value	<i>I</i> ² (%)
A Allele	285	408	0.8824	[0.6928; 1.1239]	0.3106	15.6	0.0758	42.3
A Carrier	260	378	0.8847	[0.6864; 1.1404]	0.3444	13.82	0.1289	34.9
A/A Genotype	25	30	0.7433	[0.4174; 1.3236]	0.3136	7.7	0.565	0

deviated towards zero for the genotype analysis (Supplementary Table 1).

Discussion

Several epidemiological studies have strongly suggested genetic influence on tuberculosis (Marquet and Schurr 2001). Genomic scans have linked novel regions such as 8q12–q13, 17q11–22 and 15q11 (Jamieson et al. 2004; Cervino et al. 2002) to the disease, while studies using population-based designs with candidate genes have implicated genes responsible for immunological pathways such as *IFNG*, *IL10* or *TNF* (Quirico-Santos et al. 2006).

The importance of tumor necrosis factor (TNF) is also stated in two studies with experimental models using either thalidomide, a selective inhibitor of TNF (Aaestrup et al. 1995), or knockout animals for *TNF* (Kindler et al. 1989). In both studies, the experimental group presented no mature granulomas and increased numbers of mycobacteria after BCG-induced infection, compared to controls. Moreover, the introduction of specific TNF inhibitors for the treatment of chronic inflammatory diseases has provided a new angle to the role of TNF on resistance against infection. In spite of the significant clinical improvement observed among patients affected with Crohn's disease or rheumatoid arthritis (Breedveld et al. 2004; Mouser and Hyams 1999), the use of infliximab or etanercept (specific TNF blockers) has also favored the occurrence of opportunistic infections including mycobacterial infections (Scollard et al. 2006; Winthrop 2005). These data provided rather convincing evidence for the role of TNF in restricting intracellular pathogens. Despite this evidence, genetic data are controversial showing either no linkage in family-based studies (Blackwell et al. 1997; Shaw et al. 1997) or a weak association with tuberculosis development in a case–control design (Correa et al. 2005). As a way to solve this question, we used a

meta-analysis approach to evaluate *TNF* association with tuberculosis. The *TNF* -308G/A meta-analysis results indicate that this SNP is not associated with TB. Data put together suggest that, indeed, no genetic variations on the *TNF* locus is predisposing to TB, after analyzing ten studies with a pooled sample size of 2,887 subjects, which remained virtually unchanged even when considering pulmonary patients only. A subtle and nonsignificant, protective effect is observed in the pooled ORs and due to the complex arrangements of block/bins haplotypes of the region, it is possible that associations otherwise observed are indeed in other genes in this region like the lymphotoxin-alpha gene (*LTA*), probably in linkage disequilibrium with *TNF* -308G/A in different populations. Recently, Alcaïs (2007) detected an association of *LTA* +80A/C SNP with leprosy. A dissection of the structure of *TNF/LTA* region in linkage disequilibrium could contribute to the genetic influence of *TNF* on TB. Curiously, in leprosy, which is caused by a less virulent mycobacteria, the 6p21 region, specifically human leukocyte antigen class II gene (*HLA*), *TNF* and *LTA* seem to contribute to genetic susceptibility of the patients (Alter et al. 2008; Alcaïs et al. 2007; Santos et al. 2000; Moraes et al. 2001; Vanderborgh et al. 2007).

Similar to *TNF* -308G/A, no associations were observed for *IL10* -1082G/A SNP with TB after meta-analysis. In this case, the pooled sample size achieved a very good level (3,959 subjects), but still the pooled ORs remained nonsignificant and very close to one, indicating that, even if we had a very large sample size, the detected effect would still be very limited, but when pulmonary TB cases are considered separately, despite remaining statistically nonsignificant, there is a clear trend of the ORs towards zero for all three comparisons—from 0.85 to 0.75, 0.87 to 0.73 and 0.69 to 0.57 for alleles, carriers and genotypes, respectively (Table 2 and Supplementary Table 1), suggesting that, unlike *TNF* and *IFNG*, *IL10* indeed has some specific effect on TB, determining the disease form and/or severity, but

not with susceptibility per se. Nevertheless, more studies with pulmonary and extrapulmonary TB patients are needed to confirm this hypothesis. The individual results observed have implicated *IL10* -1082G/A in TB susceptibility among Turkish and Cambodians, but the data in Cambodians were deviating very importantly from HWE. The literature on the *IL10* locus describes other proximal SNPs, especially *IL10* -819T/C and *IL10* -592C/A as associated with TB. However, meta-analysis for this SNP is difficult to test, since few studies were conducted.

Interleukin-10 (IL-10) is responsible for the expansion of interleukin-4 (IL-4)-producing T cells (Volk et al. 2001) and exhibit strong anti-inflammatory properties. In leprosy, *IL10* -819T was associated in Brazilians with susceptibility per se (Santos et al. 2002; Moraes et al. 2004), which was replicated in Indians (Malhotra et al. 2005). Moreover, IL-10-producing regulatory T cells (T-reg) are constitutively present in anergic tuberculosis patients even after long-term TB treatment, where they have been implicated in suppression of T cell proliferation and activation of immune responses (Boussiotis et al. 2000). Hence, although meta-analysis indicates that *IL10* -1082G/A is not important for TB susceptibility per se, it does not exclude the relevance of the locus and other SNPs in regulating IL-10 levels and, consequently, TB outcome and possibly the severity of the clinical presentation. Again, similar to *TNF* locus, it seems that haplotype analysis would help to understand the association of *IL10* with TB.

Our meta-analysis demonstrated a significant protection of the *IFNG* +874T/A polymorphism to tuberculosis on populations from different ethnicities throughout the world. Despite the relatively modest protection of 32% for the T/T genotype, the pooled sample size in this case (5,993) was enough to demonstrate this effect, which remained virtually unchanged when all the studies with extrapulmonary TB cases, including the most influential study (Tso et al. 2005) were removed from the analysis. The only consequence was a clear loss of power, due to the decrease in the sample size (five studies were excluded and the total sample size dropped to 2,506 individuals), which caused the carrier analysis to become not statistically significant; the ORs changed only slightly (Table 1 and Supplementary Table 1), which indicate that no differential bias was introduced by the mixture of pulmonary and extrapulmonary cases for *IFNG*. Common complex diseases are genetically heterogeneous and likely to be influenced by several genotypes at different loci that have modest effects, combined or not.

Meta-analysis is a powerful tool when correctly used and can provide a consensus answer using available data from different sources that study the same phenomenon, treating each study as a cluster. Of course, the results will be more accurate as more data is available and this underscores the

need for publication of even nonsignificant results to avoid publication bias in meta-analysis studies.

In our case, we verified that *IFNG* +874T/A is a very good candidate as a major genetics marker for tuberculosis resistance. Yet, no clear physiological mechanism has been suggested, although López-Maderuelo (2003) and Sallakci (2007) provided convincing evidence that the *IFNG* +874 T allele is associated with a stronger IFN γ response in TB, while for leishmania antigens (Matos et al. 2007), *IFNG* +874T allele also showed an induction of IFN γ production. Perhaps, the increased levels of IFN γ in the early events during infection could be controlling the replication and spread of *M. tuberculosis* or other intracellular pathogen impeding disease outcome.

References

- Aarestrup FM, Goncalves-da-Costa SC, Sarno EN (1995) The effect of thalidomide on BCG-induced granulomas in mice. *Braz J Med Biol Res* 28:1069–1076
- Alcais A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL (2005) Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med* 202(12):1617–1621
- Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, Vanderborgh PR, Katoch K, Mira MT, Vu HT, Ngyuen TH, Nguyen NB, Moraes M, Mehra N, Schurr E, Abel L (2007) Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 39(4):517–522
- Alter A, Alcais A, Abel L, Schurr E. (2008) Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet* 123(3):227–35
- Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loreda CS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Mello FC, Oliveira MM, Lapa e Silva JR, Ottenhoff TH, Kritski AL, Santos AR (2008) Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep* (in press)
- Amirzargar AA, Rezaei N, Jabbari H, Danesh AA, Khosravi F, Hajabdolbaghi M, Yalda A, Nikbin B (2006) Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 17(2):84–89
- Beiguelman B (1981) Genetic polymorphic systems and Hanseniasis. *Hansenol Int* 6(2):105–108
- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV (1998) Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 79(2):83–89
- Blackwell JM, Black GF, Peacock CS, Miller EN, Sibthorpe D, Gnanaandha D, Shaw JJ, Silveira F, Lins-Lainson Z, Ramos F, Collins A, Shaw MA (1997) Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352(1359):1331–1345
- Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE (2000) IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 105(9):1317–1325
- Breedveld FC, Emery P, Keystone E, Patel K, Furst DE, Kalden JR, St Clair EW, Weisman M, Smolen J, Lipsky PE, Maini RN (2004) Infliximab in active early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63:149–155
- Cervino AC, Lakiss S, Sow O, Bellamy R, Beyers N, Hoal-van Helden E, van Helden P, McAdam KP, Hill AV (2002) Fine mapping of

- a putative tuberculosis-susceptibility locus on chromosome 15q11–13 in African families. *Hum Mol Genet* 11(14):1599–1603
- Cooke GS, Campbell SJ, Sillah J, Gustafson P, Bah B, Sirugo G, Bennett S, McAdam KP, Sow O, Lienhardt C, Hill AV (2006) Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am J Crit Care Med* 174(3):339–343
- Cooke GS, Hill AV (2001) Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2(12):967–977
- Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM (2005) Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 32(2):219–224
- Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfeld AE (2002) Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 186(10):1463–1468
- Etokebe GE, Bulat-Kardum L, Johansen MS, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Matanic D, Flego V, Pavelic J, Beg-Zec Z, Dembic Z (2006) Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *Scand J Immunol* 63(2):136–141
- Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Malema S, Crampin AC, Fine PE, Hill AV (2004) Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 71:341–349
- Henaio MI, Montes C, Paris SC, Garcia LF (2006) Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 86:11–19
- Jamieson SE, Miller EN, Black GF, Peacock CS, Cordell HJ, Howson JMM, Shaw MA, Burgner D, Xu W, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM (2004) Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11–q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun* 5:46–57
- Kindler V, Sappin AP, Grau GE, Piguat PF, Vassali P (1989) The inducing role of tumor necrosis factor in the development of the bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56:731–740
- Lee YH, Harley JB, Nath SK (2005) CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet* 116:361–367
- Lewis SJ, Baker I, Davey Smith G (2005) Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. *Int J Tuberc Lung Dis* 9(10):1174–1177
- Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, Forte GI, Colonna-Romano G, Candore G, Caruso C (2002) Genotype frequencies of the +874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet* 29(5):371–374
- Li HT, Zhang TT, Zhou YQ, Huang QH, Huang J (2006) SLC11A1 (formerly NRAMPI) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 10(1):3–12
- López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, Vázquez JJ, Montiel C (2003) Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:970–975
- Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, Reddy BS, Bamezai RN (2005) IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 118(2):295–300
- Marquet S, Schurr E (2001) Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. *Drug Metab Dispos* 29:479–483
- Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, Amato VS, Oliveira-Neto MP, Mattos Mda S, Pirmez C, Sampaio EP, Moraes MO, Da-Cruz AM (2007) *IFNG* +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 7:33
- Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JA, Sampaio EP, Sarno EN (2001) Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 53:45–47
- Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborgh PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN (2004) Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 5(7):592–595
- Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborgh PR, Pacheco AG (2006) Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 7:189–202
- Moran A, Ma X, Reich RA, Graviss EA (2007) No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. *Int J Tuberc Lung Dis* 11(1):113–115
- Mouser JF, Hyams JS (1999) Infliximab: a novel chimeric monoclonal antibody for the treatment of Crohn's disease. *Clin Ther* 21:932–942
- Nath SK, Harley JB, Lee YH (2005) Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Genet* 118:225–234
- Oh JH, Yang CS, Noh YK, Kweon YM, Jung SS, Son JW, Kong SJ, Yoon JU, Lee JS, Kim HJ, Park JK, Jo EK, Song CH (2007) Polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology* 12(4):594–598
- Oral HB, Budak F, Uzaslan EK, Baştürk B, Bekar A, Akalin H, Ege E, Ener B, Göral G (2006) Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine* 35(3/4):143–147
- Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, van Dissel JT (2002) Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet* 32(1):97–105
- Prabhu Anand S, Selvaraj P, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR (2007) Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 126:135–138
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV (2000) A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum Immunol* 61:863–866
- Quirico-Santos T, Da-Cruz AM, Kubelka CF, Lannes-Vieira J, Moraes MO (2006) Tropical infectious diseases. In: Koen Vandembroeck (org.) (ed) Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions, vol 28. CRC LLC Press, Boca Raton, pp 413–429
- Qu Y, Tang Y, Cao D, Wu F, Liu J, Lu G, Zhang Z, Xia Z (2007) Genetic polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. *Int J Hyg Environ Health* 210(6):679–689
- R Development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.Rproject.org>
- Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG (2003) Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet* 361:1871–1872
- Sallakci N, Coskun M, Berber Z, Gürkan F, Kocamaz H, Uysal G, Bhujji S, Yavuzer U, Singh M, Yeğin O (2007) Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis* 87(3):225–230
- Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, Moraes MO, Filho VF, Mattos HJ, Nery JA, Cabello PH, Sampaio EP, Sarno EN (2000) 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* 68(3):325–327
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TJW, Ottenhoff THM, Sampaio EP, Sarno EN (2002) Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 186:1687–1691
- Scola L, Crivello A, Marino V, Gioia V, Serauto A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C, Lio D (2003) IL-10 and TNF- α polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech Ageing Dev* 124:569–572
- Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP (2006) Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis* 43(2):19–22
- Selvaraj P, Sriram U, Mathan Kurian S, Reetha AM, Narayanan PR (2001) Tumor necrosis factor alpha (–238 and –308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes. *Tuberculosis* 81:335–341
- Shaw MA, Collins A, Peacock CS, Miller EN, Black GF, Sibthorpe D, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM (1997) Evidence that genetic susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNF. *Tuber Lung Dis* 78(1):35–45
- Shin HD, Park BL, Kim YH, Cheong HS, Lee IH, Park SK (2005) Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp Mol Med* 37(2):128–132
- Tso HW, Ip WK, Chong WP, Tam CM, Chiang AK, Lau YL (2005) Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun* 6(4):358–63
- van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH (2004) Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 4:739–749
- Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Schurr E, Sarno EN, Moraes MO. (2007) HLA-DRB1(*04 and DRB1(*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 8:320–324
- Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool P, Sermduangprateep C (2007) NRAMP1 and TNF- α polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. *Respirology* 12(2):202–206
- Vidyanani M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR (2006) Interferon gamma (IFN γ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Ind J Med Res* 124(4):403–410
- Volk H, Asadullah K, Gallagher G, Sabat R, Grutz G (2001) IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol* 22(8):414–417
- Winthrop KL (2005) Update on tuberculosis and other opportunistic infections associated with drugs blocking tumour necrosis factor {alpha}. *Ann Rheum Dis* 64(4):29–30
- World Health Organization, Global Tuberculosis Programme (2008) Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing WHO report. Global Tuberculosis Programme: Geneva. WHO/HTM/TB/2008.393

Supplementary table 1: Papers selected for meta-analysis of the SNP at +874 position of *IFNG* gene.

	<i>IFNG</i> +874	First author (year)						
		Lio (2001)	López-Maderuelo (2003)	Rossouw (2003)	Fitness (2004)	Tso (2005)	Henao (2006)	Cooke (2006)
Population		Italian	Spanish	South African [coloureds]	Malawian	Chinese	Colombian	West Africans
Patients	AA	11 (24%)	62 (55%)	186 (59%)	151 (71%)	267 (69%)	65 (46%)	488 (73%)
	AT	30 (67%)	40 (35%)	102 (33%)	60 (28%)	101 (26%)	59 (42%)	159 (24%)
	TT	4 (9%)	10 (10%)	25 (8%)	2 (1%)	17 (5%)	16 (13%)	20 (3%)
	Total	45	113	313	213	385	140	667
	A	52 (58%)	164 (73%)	474 (76%)	362 (85%)	635 (82%)	189 (68%)	1135 (85%)
	T	38 (42%)	62 (27%)	152 (24%)	64 (15%)	135 (18%)	91 (32%)	199 (15%)
	T carriers	34 (76%)	50 (45%)	127 (41%)	62 (29%)	118 (31%)	75 (54%)	179 (27%)
	T non-carriers	11 (24%)	62 (55%)	186 (59%)	151 (71%)	267 (69%)	65 (46%)	488 (73%)
	Pass H&W test?	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Controls	AA	25 (26%)	31 (31%)	111 (47%)	467 (66%)	206 (46%)	33 (41%)
AT		47 (48%)	50 (50%)	98 (42%)	219 (31%)	190 (42%)	32 (39%)	166 (28%)
TT		25 (26%)	19 (19%)	26 (11%)	17 (3%)	55 (12%)	16 (19%)	13 (2%)
Total		97	100	235	703	451	81	594
A		97 (50%)	112 (56%)	320 (68%)	1153 (82%)	602 (67%)	98 (60%)	996 (83%)
T		97 (50%)	88 (44%)	150 (32%)	253 (18%)	300 (33%)	64 (40%)	192 (16%)
T carriers		72 (74%)	69 (69%)	124 (53%)	236 (34%)	245 (54%)	48 (59%)	179 (29%)
T non-carriers		25 (26%)	31 (31%)	111 (47%)	467 (66%)	206 (46%)	33 (41%)	415 (70%)
Pass H&W test?		Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Cases vs. controls		χ^2 test (P-value)	6.193 (0.0452)	13.602 (0.0011)	8.101 (0.0174)	2.685 (0.2612)	50.245 (<0.0001)	2.917 (0.2326)

Supplementary table 1: *continued.*

	IFNG +874	First author (year)							
		Vidyarani (2006)	Etokebe (2006)*	Oral (2006)	Salikci (2007)	Amim (2007)*	Moran (2007a)**	Moran (2007b)**	Moran (2007c)**
Population		Indians	Croatian	Turkish	Turkish	Brazillians	Americans (Africans)	Americans (Caucasians)	Americans (Hispanic)
	AA	61 (47%)	67 (28%)	31 (38%)	115 (36%)	53 (57%)	144 (0.60)	45 (0.28)	199 (62%)
	AT	54 (42%)	122 (51%)	29 (36%)	157 (49%)	25 (27%)	87 (0.36)	92 (0.57)	96 (30%)
	TT	14 (11%)	51 (21%)	21 (26%)	47 (15%)	15 (16%)	9 (0.04)	24 (0.15)	24 (8%)
	Total	129	240	81	319	93	240	161	319
	A	176 (68%)	256 (53%)	91 (63%)	387 (61%)	131 (70%)	375 (78%)	182 (57%)	494 (77%)
	T	82 (32%)	224 (47%)	71 (37%)	251 (39%)	55 (30%)	105 (22%)	140 (43%)	144 (23%)
Patients	T carriers	68 (53%)	173 (72%)	50 (62%)	204 (64%)	40 (43%)	96 (40%)	116 (72%)	120 (38%)
	T non-carriers	61 (47%)	67 (28%)	31 (38%)	115 (36%)	53 (57%)	144 (60%)	45 (28%)	199 (62%)
	Pass H&W test?	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
	AA	55 (43%)	134 (26%)	21 (42%)	31 (27%)	109 (41%)	98 (0.56)	17 (0.27)	62 (63%)
	AT	52 (41%)	282 (54%)	21 (42%)	58 (50%)	88 (33%)	65 (0.37)	31 (0.48)	26 (27%)
	TT	20 (16%)	103 (20%)	8 (16%)	26 (26%)	67 (25%)	11 (0.07)	16 (0.25)	10 (10%)
	Total	127	519	50	115	264	174	64	98
	A	162 (64%)	550 (53%)	63 (63%)	120 (52%)	306 (58%)	261 (75%)	65 (51%)	150 (77%)
	T	92 (36%)	488 (47%)	16 (37%)	110 (48%)	222 (42%)	87 (25%)	63 (49%)	46 (23%)
Controls	T carriers	72 (57%)	385 (74%)	29 (58%)	84 (73%)	155 (59%)	76 (44%)	47 (73%)	36 (37%)
	T non-carriers	55 (43%)	134 (26%)	21 (42%)	31 (27%)	109 (41%)	98 (56%)	17 (27%)	62 (63%)
	Pass H&W test?	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Cases vs. controls	χ^2 test (P-value)	1.391 (0.4987)	0.8103 (0.6669)	5.22 (0.0735)	1.795 (0.4075)	7.202 (0.0273)	1.648 (0.4386)	3.291 (0.1929)	0.9954 (0.6079)

Results are shown in absolute numbers (frequency). *The papers Etokebe et al., 2006 and Amim et al., 2007 were excluded due to deviations from H&W equilibrium. **The three different ethnicities in the paper Moran et al., 2007 were not grouped to avoid deviations from HWE.

Supplementary table 2: Papers selected for meta-analysis of the SNP at -1082 position of *IL10* gene.

		First author (year)										
	<i>IL10</i> -1082	Bellamy (1998)	Scola (2001)*	Delgado (2002)*	López- Maderuelo (2003)	Fitness (2004)	Shin (2005)	Henao (2006)	Amirzargar (2006)*	Oral (2006)	Oh (2007)	Prabhu Anand (2007)
Population		Gambian	Italians	Cambodians	Spanish	Malawian	Korean	Colombian	Iranian	Turkish	Korean	Indian
Patients	GG	51 (13%)	6 (13%)	11 (3%)	33 (29%)	23 (13%)	2 (0.4%)	65 (46%)	2 (5%)	10 (12%)	4 (3%)	3 (2%)
	GA	185 (46%)	22 (50%)	259 (73%)	47 (41%)	78 (46%)	53 (11.8%)	59 (42%)	31 (77.5%)	41 (51%)	43 (30%)	55 (42%)
	AA	165 (41%)	17 (37%)	86 (24%)	33 (29%)	69 (41%)	394 (87.8%)	16 (13%)	7 (17.5%)	30 (37%)	98 (67%)	74 (56%)
	Total	401	45	356	113	170	449	140	40	81	145	132
	G	287 (36%)	34 (38%)	281 (40%)	113 (50%)	124 (36%)	57 (6%)	189 (68%)	35 (44%)	61 (38%)	51 (18%)	61 (23%)
	A	515 (64%)	56 (62%)	431 (60%)	113 (50%)	216 (64%)	841 (94%)	91 (32%)	45 (56%)	101 (62%)	239 (82%)	203 (77%)
	G carriers	236 (59%)	28 (62%)	270 (76%)	80 (71%)	69 (41%)	55 (12%)	124 (89%)	33 (82.5%)	51 (63%)	47 (32%)	58 (44%)
	G non-carriers	165 (41%)	17 (38%)	86 (24%)	33 (29%)	101 (59%)	394 (88%)	16 (11%)	7 (17.5%)	30 (37%)	98 (67%)	74 (56%)
Pass H&W test?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
Controls	GG	45 (11%)	13 (11%)	3 (3%)	29 (29%)	87 (2%)	9 (1%)	33 (41%)	5 (5%)	5 (10%)	19 (16%)	6 (4%)
	GA	184 (45%)	77 (68%)	64 (60%)	50 (50%)	251 (31%)	124 (14%)	32 (39%)	79 (77%)	13 (26%)	53 (45%)	61 (44%)
	AA	179 (44%)	24 (21%)	39 (37%)	21 (21%)	203 (66%)	781 (85%)	16 (19%)	18 (18%)	32 (64%)	45 (39%)	73 (52%)
	Total	408	114	106	100	541	914	81	102	50	117	140
	G	274 (34%)	103 (45%)	70 (67%)	108 (54%)	425 (39%)	142 (8%)	98 (60%)	89 (44%)	23 (23%)	91 (39%)	73 (26%)
	A	542 (66%)	125 (55%)	142 (33%)	92 (46%)	657 (61%)	1686 (92%)	64 (40%)	115 (56%)	77 (77%)	143 (61%)	207 (74%)
	G carriers	229 (56%)	90 (79%)	67 (63%)	79 (79%)	203 (38%)	133 (15%)	65 (80%)	84 (82%)	18 (36%)	72 (62%)	67 (48%)
	G non-carriers	179 (44%)	24 (21%)	39 (37%)	21 (21%)	338 (62%)	781 (85%)	16 (20%)	18 (18%)	32 (64%)	45 (39%)	73 (52%)
Pass H&W test?	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Cases vs controls	χ^2 test (P-value)	0.887 (0.642)	5.404 (0.067)	6.627 (0.036)	2.232 (0.327)	0.869 (0.647)	1.990 (0.369)	2.917 (0.232)	0.0009 (0.999)	9.443 (0.009)	27.793 (<0.0001)	1.083 (0.58)

Results are shown in absolute numbers (frequency). *The papers Scola (2001), Delgado (2002) and Amirzargar (2006) were not included in meta-analysis due to deviations from H&W equilibrium.

Supplementary table 3: Papers selected for meta-analysis of the SNP at -308 position of *TNFA* gene.

	<i>TNFA</i> -308	First author (year)										
		Selvaraj (1998)	Scola (2001)	Delgado (2002)*	Fitness (2004)	Correa (2005)	Henao (2006)	Amirzargar (2006)	Oral (2006)	Qu (2007)	Vejbaesya (2007)	Oh (2007)
Population		Indian	Italian	Cambodian	Malawian	Chilean	Colombian	Iranian	Turkish	Chinese	Thai	Korean
Patients	GG	185 (88%)	27	323	132	118	65	32 (80%)	63	52	128	105
	GA	24 (11.5%)	17	6 (2%)	27	16	59	8 (20%)	18	9 (15%)	20	37 (26%)
	AA	1 (0.5%)	1 (2%)	29 (8%)	2 (1%)	1 (1%)	16	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.7%)	3 (2%)
	Total	210	45	358	161	135	140	40	81	61	149	145
	G	394 (94%)	71	652	291	252	189	72 (90%)	144	113	279	247
	A	26 (6%)	19	64 (9%)	31	18 (7%)	91	8 (10%)	18	9 (7%)	22 (7%)	43 (15%)
	A carriers	25 (12%)	18	35	29	17	75	8 (20%)	18	9 (15%)	21 (14%)	40 (28%)
	carriers	185 (88%)	27	323	132	118	65	32 (80%)	63	52	128	105
	Pass H&W test?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	GG	103 (86%)	88	95	344	338	33	89	33	101	132	81
GA	17 (14.2%)	24	2 (2%)	71	87	32	33	14	20	15 (10%)	35 (30%)	
AA	0 (0%)	2 (2%)	9 (8%)	1	5 (1%)	16	1 (0.8%)	3 (6%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (0.8%)	
Total	120	114	106	416	430	81	123	50	122	147	117	
G	223 (93%)	200	192	759	763	98	211	80	222	264	197	
A	17 (7%)	28	20 (9%)	73 (9%)	97	64	35 (14%)	20	22 (9%)	15 (5%)	37 (16%)	
A carriers	17 (14%)	26	11	72	92	48	34 (28%)	17	21	15 (10%)	36 (31%)	
carriers	103 (86%)	88	95	344	338	33	89 (72%)	33	101	132	81 (69%)	
Pass H&W test?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
Cases	χ^2 test	1.077	4.856	0.03955	2.254	5.117	2.917	1.122	5.868	0.5984	1.762	1.173
vs	(P-value)	(0.5836)	(0.0882)	(0.9804)	(0.3240)	(0.0774)	(0.2326)	(0.5705)	(0.0532)	(0.7414)	(0.4143)	(0.5562)

Results are shown in absolute numbers (frequency). *The paper Delgado (2002) was excluded from meta-analysis due to deviations from H&W equilibrium in both patients and controls groups.

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](#)