

**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

**Papel de polimorfismos genéticos nos
genes IL10, TNF e LTA na hanseníase**

Francisco Paulo Contador Parelli

**Botucatu-SP
2011**

Francisco Paulo Contador Parelli

Papel de polimorfismos genéticos nos genes IL10, TNF e LTA na hanseníase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, para obtenção do título de Mestre em doenças tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carla Pereira
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a Vânia Nieto Brito de Souza

Botucatu-SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Parelli, Francisco Paulo Contador.

Papel de polimorfismos genéticos nos genes IL10, TNF e LTA na hanseníase /
Francisco Paulo Contador Parelli. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu, 2011

Orientador: Ana Carla Pereira

Capes: 20202008

1. Hanseníase. 2. Genética molecular. 3. Microrganismos - Aspectos
genéticos.

Palavras-chave: Estudo de associação; Hanseníase; Polimorfismo de base única.

*Posso não concordar com nenhuma das palavras que você disser,
Mas defenderei até o fim de minha vida o teu direito de dizê-las.*

François Marie Arouet (Voltaire)

Dedicatórias

*À minha família, em especial a
Meu Pai **Francisco**, minha Mãe **Dorami**
Meu irmão **Rodrigo**,
Pelos bons exemplos e ensinamentos que fizeram me tornar quem eu sou,
Pelo apoio incondicional nos momentos de adversidades,
Pelo amor e carinho e confiança sempre recebidos.*

*À minha melhor amiga, companheira e namorada
Patricia Frascareli, por tornar vil
Todos os dissabores e anseios de minha vida,
Comparado a alegria de estar ao seu lado.*

Agradecimientos

*À minha Orientadora Prof^ª Dr.^a Ana Carla Pereira,
E minha Co-Orientadora Prof^ª Dr.^a Vânia Nieto Brito de Souza,
Pela oportunidade de trabalhar sob suas orientações,
Por acreditarem em mim e me mostrarem o caminho da ciência,
Por serem exemplos de profissionais e pessoas que são.*

*A todos os Pesquisadores e funcionários
Do Instituto Lauro de Souza Lima,
Que de maneira direta ou indireta contribuíram,
fazendo parte deste trabalho e de minha vida.*

*Aos **pacientes**, objetivo maior desta atividade científica.*

Sumário

Dedicatórias	3
Agradecimentos	6
Sumário	10
Lista de Abreviaturas.....	13
Introdução	16
1.1 Características Biológicas do <i>Mycobacterium leprae</i>	17
1.2 Imunologia e Classificação Clínica da Hanseníase.....	19
1.3 Reações Hansênicas.....	25
1.4 Epidemiologia	27
1.5 Estudos Genéticos.....	28
1.6 Epidemiologia Genética.....	32
1.6.1 Desenhos de Estudos	32
1.6.2 Marcadores Genéticos.....	33
1.6.3 Estratégias de varredura genômica.....	34
1.6.4 Genes candidatos	37
Objetivos	43
2.1 Objetivos específicos.....	42
Casuística e Métodos.....	43
3.1 População analisada	44
3.2 Extração de DNA	47
3.3 Genotipagem.....	48
3.4 Análises Estatísticas.....	53
Resultados.....	63
4.1 Polimorfismos dos Genes TNF e LTA	55
4.2 Polimorfismos do Gene IL10	58
Discussão	62
5.1 Análise dos polimorfismos TNF-308, LTA+252 e LTA+80	63
5.2 Análises dos polimorfismos na região promotora do gene IL10	66
Conclusões.....	70

<i>Referências Bibliográficas</i>	73
<i>Resumo</i>	74
<i>Abstract</i>	87
<i>Anexo-1</i>	89
<i>Anexo-2</i>	97

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

AICD	Apoptose induzida por ativação
BAAR	Álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DD	Dimorfo-dimorfo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DT	Dimorfo-tuberculóide
DV	Dimorfo-virchowiano
DZ	Dizigóticos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ENH	Eritema nodoso hansênico
GM-CSF	Fator estimulação de colônia granulócito macrófago
GWA	<i>Genome-Wide Association</i>
HI	Hanseníase indeterminada
HLA	Human Leukocyte Antigen (Complexo principal de
histocompatibilidade)	
IFN- γ	Interferon-Gama
IL	Interleucina
ILSL	Instituto Lauro de Souza Lima
LAM	Lipoarabinomanana
LOD	logarithm of odd
LT- α	Linfotoxina-alfa
LTA	Gene da Linfotoxina-alfa
M	Molar
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mb	Mega base
MB	Multibacilar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MH	<i>Morbus Hansen</i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MRC	Receptor de manose
MZ	Monozigóticos
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
NH	Neuropatia Hansênica
NK	<i>Natural killers</i>
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
PACRG	Gene parkina co-regulado
PARK2	Gene parkina
PB	Paucibacilar
PCR	<u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PGL-I	Glicolípido fenólico I

Lista de Abreviaturas

pH	Potencial hidrogeniônico
PQT	Poliquimioterapia
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismos de base única)
STR	<i>Short tandem repeat</i> (repetições curtas em tandem)
Taq	<i>Thermos aquáticos</i>
TDT	Teste de desequilíbrio de transmissão
Th	T helper
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris-HCl	Tris Hidrocloreto
TT	Tuberculóide
VNTR	<i>Variable number of tandem repeat</i> (número variável de repetições em tandem)
VV	Virchowiano
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

A hanseníase é considerada uma das primeiras doenças infecciosas descritas, com referência aos seus aspectos mais característicos sendo relatados em documentos datados de 1500 a.C., na Índia. Há também referências à doença na literatura chinesa (600 a.C) e egípcia, bem como nos livros bíblicos do antigo e novo testamento. Especula-se que a hanseníase tenha se espalhado pelo mundo por meio de migrações, cruzadas e tráfico de escravos.^{1,2} Como uma doença infecciosa ela é principalmente transmitida por contato íntimo e prolongado com doentes sem tratamento. Seu período de incubação é longo, podendo variar entre 2 e 5 anos.³

O agente infeccioso causador da hanseníase é o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e, devido a sua predileção por macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos, lesões de pele, mucosas e nervos estão entre as principais manifestações clínicas da hanseníase, sendo esta última a responsável pela perda de sensibilidade local, típica da doença.⁴ As deformidades decorrentes das lesões de nervos constituem a principal causa de morbidade entre os pacientes bem como do estigma historicamente relacionado à doença.²

1.1 Características Biológicas do *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* foi identificado pela primeira vez por Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873 em lesões de pacientes. Em homenagem ao descobridor, a doença foi inicialmente denominada *Morbus Hansen (MH)* ou “Doença de Hansen”,⁵ sendo a primeira bactéria relacionada a uma doença humana.

O bacilo tem entre 1,0 a 8,0 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro,⁶ sua replicação é lenta, fazendo uma divisão binária a cada 12 a 21 dias.⁷ Apresenta a característica de ser álcool-ácido resistente (BAAR) e pode ser observado em esfregaços de linfa ou cortes histológicos, isolados ou agrupados de várias formas em arranjos denominados globias, que é peculiar do *M. leprae*.⁸

A parede celular do *M. leprae* é composta por um complexo formado por ácido micólico, peptideoglicana e arabinogalactana, comum entre micobactérias.⁹⁻

¹¹ Na camada externa do bacilo estão agrupados componentes lípidicos, entre eles

o glicolípido fenólico I (PGL-I), exclusivo desta espécie, e a lipoarabinomanana (LAM).¹²⁻¹⁴ Estudos sugerem que o PGL-I esteja envolvido na interação do *M. leprae* com a laminina das células de Schwann, sugerindo um importante papel na interação nervos periféricos-bacilo.¹⁵

Apesar de ser considerada uma das primeiras doenças infecciosas já descritas, ainda não há um método capaz de obter o crescimento do bacilo *in vitro*, sendo que o cultivo do *M. leprae* está restrito a modelos animais.¹⁵ Shepard foi pioneiro na área da hanseníase experimental, em 1960 foi o responsável pela primeira inoculação, bem sucedida, em coxim plantar de camundongo onde foi possível obter granulomas localizados de hanseníase.¹⁶ Tatus também foram utilizados para inoculação do bacilo com resultados positivos apresentando lesões de pele, nervos periféricos e outros órgãos.¹⁷ Até hoje o método de inoculação em animais é utilizado como forma de obtenção de bacilos.

O *M. leprae* teve seu genoma completo publicado em 2001. Este estudo caracterizou o genoma do patógeno como tendo 3,27Mb, 1.604 genes e conteúdo médio de G+C de 57,8%. Apresenta ainda 1.116 pseudogenes, o equivalente a 27% do seu genoma total. Em uma comparação detalhada entre *M. leprae* e *M. tuberculosis* foi possível perceber uma maciça perda de genes pelo *M. leprae*, mostrando que este sofreu uma evolução reducional. Isto poderia explicar tanto a lenta taxa de crescimento do bacilo quanto sua incapacidade de crescimento *in vitro*.¹⁸

Em 2005, um estudo demonstrou claramente a reduzida variabilidade do *M. leprae*. Utilizando sete cepas referências de diferentes países, o estudo foi capaz de construir um perfil de variabilidade utilizando marcadores do tipo VNTR. Este ainda revelou um padrão de agrupamento filogenético lançando mão de polimorfismos de base única (SNPs), como marcadores moleculares, por meio da análise de 175 amostras clínicas e de laboratórios provenientes de 25 países. Esta análise não apenas detectou diferenças entre as cepas como também forneceu evidências para a formulação de hipóteses a respeito da disseminação da doença pelo mundo.¹⁹

1.2 Imunologia e Classificação Clínica da Hanseníase

As manifestações clínicas e histopatológicas da hanseníase variam de acordo com a habilidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune celular frente ao bacilo.²⁰ Sendo a hanseníase uma doença infecto-contagiosa de manifestações contrastantes, seu estudo torna-se fundamental para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da doença²¹

Como parasita intracelular obrigatório a resposta imunológica frente à infecção depende principalmente daquela mediada por células, representada pela fagocitose dos bacilos pelos macrófagos, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T helpers (Th). Esta resposta é mediada por diversos fatores, entre eles, as citocinas. Um desequilíbrio nessa interação ou ineficiência desta resposta pode favorecer a multiplicação do bacilo, contribuindo para o estabelecimento da doença.²²

Receptores das células do hospedeiro responsáveis por reconhecer padrões moleculares da micobactérias são a primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem. Esses receptores são chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), um exemplo são receptores do tipo *Toll-like* (TLRs), que são fundamentais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta imune inata. Dentre os TLRs já identificados, os heterodímeros TLR2-TLR1-TLR6 e os homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser importantes para o reconhecimento de micobactéria.²³

Para o caso específico do *M. leprae* foi demonstrado que o homodímero TLR2 bem como o heterodímero TLR2-TLR1-TLR6 foram os únicos capazes de promover a ativação celular na presença do *M. leprae*.²⁴ Posteriormente, foi também demonstrada a capacidade do TLR de promover a diferenciação de monócitos tanto em macrófagos quanto em células dendríticas.²⁵

Além dos receptores *Toll-like*, uma miríade de citocinas também está envolvida na montagem de uma resposta imune efetiva frente ao *M. leprae*. A

capacidade de linfócitos Th (CD4+), em desenvolver uma resposta imune celular ou humoral está intimamente relacionada com o padrão de citocinas que será secretado, proporcionando o desenvolvimento de um padrão imunológico predominantemente Th1 em pacientes tuberculóides ou Th2 em virchowianos, respectivamente.²⁶

No perfil imunológico Th1 existe uma predominância das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. A IL-2 tem a função de ativar os receptores dos linfócitos CD4+, estimulando a proliferação de linfócitos T ativados que serão responsáveis pela manutenção da produção de citocinas, concomitantemente estimulam células *natural killers* (NK), e são responsáveis pela apoptose induzida por ativação (AICD) em linfócitos continuamente estimulados.^{15,21}

As citocinas IFN- γ e TNF- α apresentam uma função pró-inflamatória agindo de maneira simultânea e cíclica. O IFN- γ age sobre macrófagos estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular elevando assim a produção de TNF- α que, por sua vez, incrementa a ativação macrofágica. Em pacientes TT a resposta imune celular se apresenta de forma vigorosa contra a micobactéria, macrófagos sob influência destas citocinas juntamente com os linfócitos são responsáveis pela ativação celular e formação do granuloma, onde existe uma predominância de linfócitos CD4+ na área central e CD8+ na periferia.^{6,27,28} Nesses pacientes a formação do granuloma também está relacionada à destruição tecidual associada aos surtos reacionais.^{29,30}

As citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10 estão predominantemente presentes no perfil de resposta imunológica Th2. Agindo como citocinas anti-inflamatórias, elas são supressoras da atividade macrofágica, produzindo bloqueio da estimulação de macrófagos. Adicionalmente, a IL-4 estimula os linfócitos B, tornando-os assim produtores de imunoglobulinas, e os mastócitos, que passam a produzir mais IL-4, incrementando a resposta supressora de macrófagos.^{15,21}

Em contraste aos pacientes tuberculóides, os que apresentam a forma virchowiana têm um perfil de resposta imunológica humoral predominante, onde as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 estão elevadas e há uma pobre produção de granulomas. Já foi descrito que, para este perfil, a IL-4 diminui a expressão de TLR2 em monócitos e a IL-10 age suprimindo a IL-12, o que está relacionado com a predominância de linfócitos CD8+ nas lesões.³¹⁻³³ A relação entre CD4+/CD8+, demonstrada por meio de técnica de imunoistoquímica, é de 1,9:1 em lesões de pacientes TT, enquanto que para os VV a razão é de 0,6:1.^{28,34} Adicionalmente, nesta última forma os subtipos de células dendríticas, como as células de Langherhans, responsáveis por iniciarem a resposta imune na pele, estão reduzidas nas lesões de pele em comparação à forma TT.³⁵ De maneira geral uma resposta efetiva ou ineficiente frente ao *M. leprae* irá depender da sub-população de células T que entrarão em atividade durante a resposta imune, bem como a produção de mediadores de oxidação, como reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), fundamentais na destruição bacilar. Contudo, o *M. leprae* apresenta componentes micobacterianos, tais como PGL-1 e LAM, que podem funcionar como mecanismos de escape à oxidação intra-macrofágica suprimindo a ativação de macrófagos e proporcionando condições para que o bacilo fique protegido no citoplasma destas células, formando assim as células de Virchow.³⁶ A Figura 1 ilustra as principais vias de interação entre *M. leprae* e as células do sistema imune do hospedeiro evidenciando genes já associados com hanseníase por estudos de epidemiologia genética.

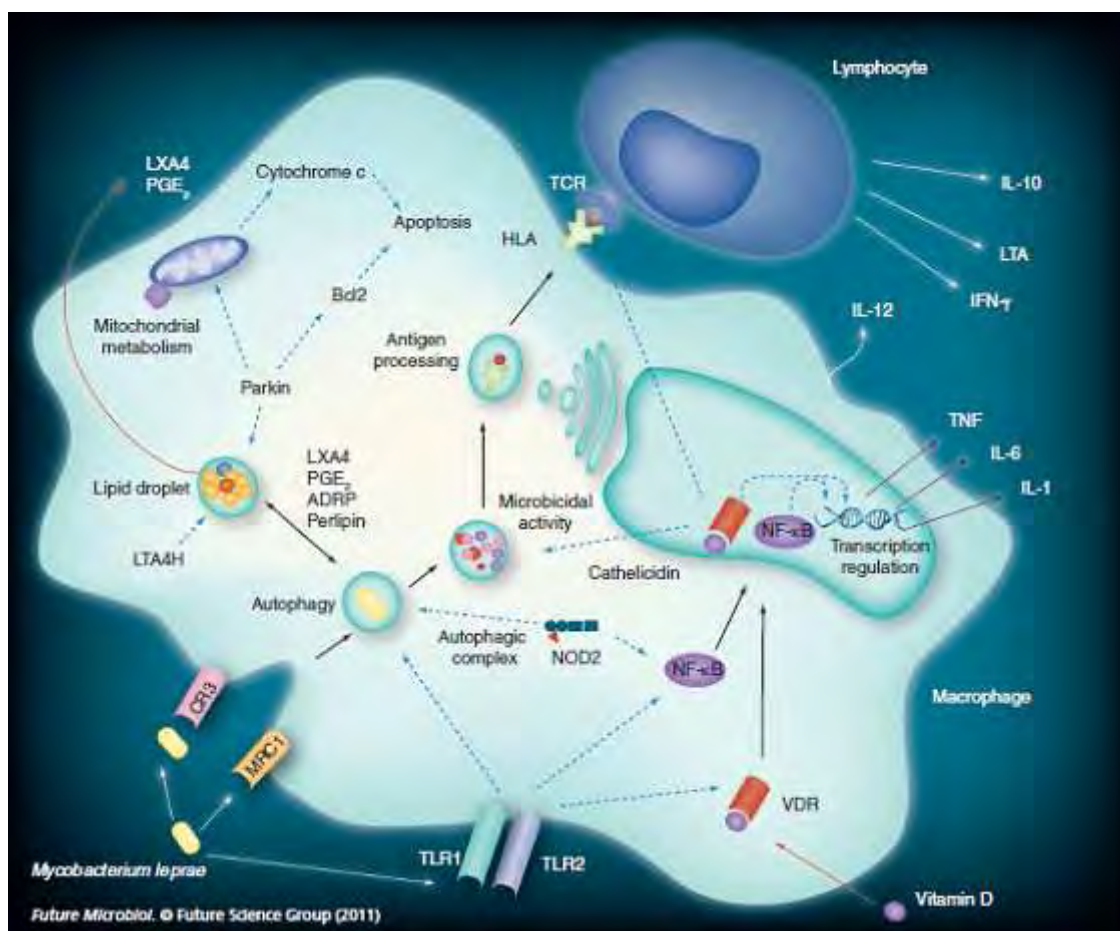


Figura 1 – Principais vias de interação e resposta imune frente ao *M. leprae* envolvendo genes já associados com hanseníase. Fonte: Cardoso et al. 2010³⁷

Ao longo da história, diversas foram as propostas para a classificação das formas clínicas apresentadas pela doença. Os critérios auxílio para esta classificação são clínicos, baciloscópicos, histopatológicos e imunológicos. Um dos primeiros antígenos a ser utilizado na prática laboratorial foi o antígeno de Mitsuda ou lepromina, que consiste em um antígeno bruto, não purificado, preparado a partir de hansenomas obtidos de pacientes bacilíferos.^{38,39} É utilizado, até hoje, para avaliar o grau de resposta imune celular do indivíduo frente ao bacilo por meio de inoculação intradérmica do preparado e avaliação da reação de hipersensibilidade tipo IV que reflete a capacidade do organismo em eliminar o bacilo.⁴⁰ Por se tratar de um antígeno rudimentar, os pesquisadores têm se empenhado na obtenção de antígenos específicos tanto para auxílio diagnóstico e classificação da doença, como para detectar a infecção assintomática ou permitir o diagnóstico precoce com finalidade de prevenção de seqüelas.⁴⁰

Em síntese, temos três classificações mais utilizadas para a doença. A primeira delas foi instituída no Congresso Internacional de Madrid em 1953⁴¹, seguida pela proposta por Ridley & Jopling⁵, em 1966, e OMS, em 1982.⁴²

No Brasil, a classificação mais utilizada na prática clínica é a de Madrid. Esta adota critérios de polaridade dividindo a doença em dois pólos estáveis e opostos (tuberculóide e virchowiano) e dois grupos instáveis (indeterminado e dimorfo). Os grupos instáveis caminhariam para um dos pólos de acordo com a evolução da doença em cada paciente.^{41,43} Esta classificação baseia-se em aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos.⁴⁴

A classificação proposta por Ridley & Jopling⁵ atende às necessidades dos pesquisadores na investigação da doença e é baseada em critérios clínicos, imunológicos, baciloscópicos e histopatológicos. Esta dividiu a doença em seis grupos: os polares tuberculóides (TT) e virchowianos (VV), e os intermediários, denominados dimorfos, subdivididos em: dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV).^{5,15,20} Há ainda a hanseníase indeterminada (HI), considerada a fase inicial da doença, que se caracteriza por máculas hipocrômicas, geralmente pequenas, atingindo principalmente face, superfície da extensão dos membros, tronco e nádegas. O principal sintoma para o diagnóstico da doença neste estágio é o comprometimento sensitivo na lesão ou uma biópsia que demonstre uma infiltração de filetes nervosos com bacilos em seu interior, já que neste grupo a baciloscopia é frequentemente negativa.²⁰

No que tange às formas polares mais estáveis da doença, o pólo tuberculóide é considerado o que apresenta intensa resposta imune celular frente ao bacilo, é caracterizado por apresentar poucas lesões, muitas vezes única. Estas são máculas ou placas com bordas bem definidas. Danos aos nervos periféricos são caracterizados por anestésias ou parestesias devido à destruição das fibras nervosas dérmicas. Apresenta uma baixa carga de bacilos devido à eficiente imunidade celular. A reação de Mitsuda é positiva nesses pacientes.^{5,16,45,46} Este pólo da doença mantém suas características estáveis e o paciente tende a evoluir para cura mesmo sem tratamento.^{20,47}

Em oposição, o pólo virchowiano é caracterizado por uma resposta do tipo Th2 e baixa resposta imune celular frente ao bacilo, por vezes, até inexistente. Apresenta muitas lesões cutâneas amplamente distribuídas, mal definidas e com leve hipopigmentação. Podem apresentar perda de pêlos nas regiões afetadas, principalmente cílios e sobrancelhas (madarose). A mucosa nasal é particularmente comprometida pela infiltração ao nível do septo nasal podendo evoluir para perfuração ou ainda desabamento do mesmo. Ossos e articulações são comumente comprometidos. Há um importante comprometimento sistêmico nesta forma, onde os órgãos mais frequentemente atingidos são fígado, baço, glândulas suprenais e testículos. O globo ocular é também comumente comprometido, acarretando diminuição de acuidade visual podendo evoluir para cegueira. Raros são os danos neurais, apesar da alta carga bacilífera encontrada neste pólo. A reação de Mitsuda é negativa nesses pacientes.^{5,15,20,46}

Entre os pólos mais estáveis da doença estão os dimorfos, divididos em três grupos de acordo com a proximidade em que as manifestações estão das formas polares. Não tende à cura espontânea e, ao contrário, a tendência do paciente é que suas manifestações caminhem para o pólo virchowiano caso não receba tratamento.²⁰

Em 1982, a OMS, a fim de simplificar a classificação da hanseníase para fins de tratamento, agrupou as classificações anteriormente propostas em dois grandes grupos de acordo com o índice baciloscópico: paucibacilares (PB) para os que apresentarem índice menor que dois e multibacilares (MB) aqueles com valores iguais ou maiores que dois. Posteriormente, a OMS adotou ainda uma classificação essencialmente clínica tomando como divisor o número de lesões no paciente. Foram classificados como PBs os que apresentarem até cinco lesões e/ou apenas um tronco nervoso acometido, e MBs os casos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido.⁴⁸ Por razões operacionais o Ministério da Saúde adotou o critério do número de lesões para classificação e tratamento dos pacientes.⁴⁹

1.3 Reações Hansênicas

A resposta imune não é somente responsável por influenciar na hanseníase *per se*, isto é, o desfecho de doença, ou nas formas clínicas que cada indivíduo poderá desenvolver, mas pode ainda determinar os episódios reacionais decorrentes da doença. Da perspectiva da eliminação do bacilo a resposta inflamatória pode ser considerada benéfica, entretanto, pode trazer como consequência mais importante os danos neurais devido à presença do bacilo nos nervos, que podem resultar em seqüelas permanentes e incapacitantes para os pacientes. A este processo de dano neural dá-se o nome de “Neuropatia Hansênica (NH)”.

A NH é alvo de grande atenção dos especialistas, não só por ser a causa de deformidades físicas, mas também devido ao pouco conhecimento sobre sua fisiopatologia e a dificuldade de estabelecimento de um tratamento efetivo. A NH pode ser graduada de acordo com a gravidade do quadro e a extensão dos danos na arquitetura neural. Vários são os mecanismos que podem desencadear os danos neurais, que são distintos de acordo com a forma clínica e período de evolução da doença. Num primeiro momento, apresentam-se processos inflamatórios específicos para cada forma clínica. Numa fase mais avançada, podem surgir as NH decorrentes de processos inflamatórios agudos chamados de reações hansênicas.⁵⁰

Denominam-se reações os fenômenos decorrentes da evolução da doença que acometem todas as formas clínicas da hanseníase, exceto o grupo indeterminado. Essas reações podem ser predominantemente mediadas por uma resposta imune celular, chamada reação tipo 1 ou reação reversa, ou por uma resposta imune humoral, denominada reação tipo 2 ou reação de eritema nodoso hansênico (ENH).^{20,45}

A reação tipo 1 acomete os pacientes TT, DT, DD e DV,⁵¹ e é caracterizada pela exacerbação de lesões pré-existentes e pelo aparecimento de novas, podendo ser estas, lesões de pele, nervos ou ambos. Os surtos reacionais têm uma duração de 4 a 6 meses e frequentemente são recorrentes, podendo levar a um maior

número de danos neurais. Reações tipo 1 podem ocorrer a qualquer momento, no entanto são mais observadas durante o tratamento.^{20,45}

Do ponto de vista imunológico as reações tipo 1 são reações de hipersensibilidade tardia (tipo IV), onde antígenos do *M. leprae* estão presentes nos nervos e pele de doentes em reação.⁵² Estudos demonstram que durante esta reação ocorre um aumento da proliferação de linfócitos, bem como o número e porcentagem de células T CD4⁺ em lesões de pele.¹⁵ Há uma mudança com sentido de aumento da imunidade Th1 com elevação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-12, IL-2 e TNF em lesões e em nível sistêmico.^{6,15,53}

Reações do tipo 2 caracterizam-se por um fenômeno sistêmico podendo apresentar sintomas como febre, mal estar, artralguas, neurites, artrites e outros sintomas que levam a uma piora do quadro geral do paciente.²⁰ Estudos apontam o mediador pró-inflamatório TNF como a principal responsável pelos sintomas observados em pacientes com esta reação.^{53,54}

A reação de ENH atinge cerca de 60% dos pacientes DV e VV e, assim como a reação de tipo 1, pode ocorrer a qualquer momento, mas, comumente, aparece após o 4° ou 6° mês de tratamento. Com menor duração que a reação tipo 1, esta tem uma duração média de 15 a 20 dias ocorrendo de maneira irregular ou periódica, podendo em alguns casos se apresentar de maneira contínua.^{20,45}

Admitindo que o ENH seja causado pela destruição bacilar e conseqüente liberação de antígenos. Apesar de ser uma reação mediada por uma resposta imune humoral, existem evidências de que nela possa haver uma contribuição de resposta imune celular.^{15,55} demonstraram a expressão de RNAm das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-10 e TNF- α tanto em pacientes com reações do tipo 1 quanto naqueles com ENH.

1.4 Epidemiologia

Apesar dos esforços da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a eliminação da hanseníase, sendo esta traduzida como a redução da prevalência para menos de 1 caso por 10.000 habitantes, a doença ainda é considerada como problema de saúde pública em diversos países de baixo nível sócio-econômico.⁵⁶

Dados recentemente publicados pela OMS mostram que desde 2002 um constante declínio de casos novos vem sendo registrados. Apesar disso, a hanseníase apresenta ainda um registro global de 211.903 casos até o final do 1º trimestre de 2010. Em 2009, dezesseis países registraram mais de 1.000 novos casos da doença, o que corresponde a 93% dos casos novos registrados no mundo neste período. Dentre estes, destaca-se a Índia e o Brasil com os maiores índices de prevalência da doença no globo.⁵⁷

Como segundo país em números de casos e também de casos novos, o Brasil apresentava um total de 38.179 casos da doença até o 1º trimestre de 2010. No que tange ao número de casos novos, em 2009, 37.610 novos casos foram registrados no país, sendo de 56,3% multibacilares e mais de 6% dos pacientes apresentando grau dois de incapacidade.⁵⁷

Mais de 7% do número total de novos casos ocorreram entre crianças até quinze anos de idade. Segundo Cunha et al.,⁵⁸ valores de coeficiente acima de 5% para detecção em menores de quinze anos, podem sinalizar um certo grau de endemia na região.

Como já citado, a hanseníase é uma doença que está intimamente relacionada às condições sócio-econômicas da população.^{59,60} Dos cem municípios que apresentaram os mais elevados índices de exclusão social no país, treze apresentaram prevalência maior que 10 casos/10.000 habitantes entre 1998 e 2002, em quatorze a prevalência variou entre 5,14 e 8,74 casos/ 10.000 habitantes, enquanto trinta e dois apresentaram prevalência entre 1,05 e 4,94 casos/10.000 habitantes.⁶¹

No Brasil, a atual estratégia para controle e prevenção da hanseníase baseia-se em dois princípios básicos. O primeiro deles é a detecção precoce dos novos casos e o segundo é o tratamento imediato de todos os casos com a poliquimioterapia (PQT). Adicionalmente, é realizado o exame de contatos intradomiciliares para um diagnóstico precoce, já que estes apresentam maiores chances de doença. Há ainda uma medida complementar recomendada pelo Ministério da Saúde que é a vacinação com o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) dos contatos, porém não realizada em todo país. Além disso, campanhas de eliminação da hanseníase são implantadas a fim de incentivar a prática destas medidas.^{62,63}

Apesar de a OMS adotar a redução da taxa de prevalência como indicador de controle da doença, este ainda é assunto controverso, já que alguns autores defendem que o coeficiente de detecção seria um melhor indicador para medir os progressos em direção a eliminação.⁶⁴

1.5 Estudos Genéticos

Não é recente a idéia de que fatores genéticos humanos devam contribuir com a susceptibilidade às doenças infecciosas ou então com o curso destas. Já no século XVIII acreditava-se que a susceptibilidade para doenças infecciosas estaria ligada a fatores do hospedeiro. Doenças como tuberculose e hanseníase já eram relacionadas com fatores hereditários.⁶⁵

Com a descoberta do *M. leprae* em 1873, imediata foi a rejeição sobre a teoria da hereditariedade desta moléstia, que era defendida por importantes estudiosos do século XIX. Entretanto esta descoberta não foi suficiente para afetar a aceitação, baseada em fatos empíricos, de que a infecção e suas manifestações eram decorrentes da predisposição individual.⁶⁶

No início da década de 30 vários autores voltaram a chamar a atenção para a importância de estudos genéticos na hanseníase. Contudo a pesquisa genética só foi iniciada de maneira sistemática e intensificada, no Brasil, no início da década de 60. Obviamente, nesta época estudos genéticos careciam de metodologias para

investigação de componentes genéticos humanos na participação de doenças infecciosas. Esta necessidade fez com que uma gama de linhas de abordagens surgisse para avaliar a contribuição da genética humana para a ocorrência de doenças infecciosas.⁶⁶

As investigações que objetivam explicar como os mecanismos genéticos estão envolvidos na susceptibilidade ou resistência de doenças como a hanseníase esbarram em certas dificuldades, pois nelas, a variabilidade genética tanto do hospedeiro quanto do agente infeccioso, somado a variação ambiental, dificulta a comprovação de que componentes genéticos estão sendo relevantes na instalação e curso da doença.

A existência de indivíduos que, mesmo após exposição prolongada ao agente infeccioso, não adoecem, é fator fundamental para se pensar em componentes genéticos envolvidos na doença. A hanseníase é um exemplo disto já que estudos experimentais *in anima nobile*, realizados em meados do século XIX, falam a esse favor. Nestes, indivíduos foram submetidos ao contato com fragmentos de hansenoma em áreas escarificadas de seus corpos. Um único indivíduo demonstrou sinais da forma virchowiana da doença.⁶⁶ Este, por sua vez, um presidiário do Hawai de 48 anos idade, era parente consanguíneo de hanseniano.⁶⁷⁻⁷⁰ estudou uma amostra de cônjuges não afetados de pacientes hansenianos que apresentavam a forma virchowiana da doença, e que tiveram uma convivência com estes pacientes por um período maior que 5 anos. Dos 430 cônjuges estudados, apenas 13,3% apresentaram sinal da moléstia, ou seja, 86,7% dos estudados demonstraram uma resistência natural para a doença.

Com a intenção de investigar a correlação da genética, do contato domiciliar e da distribuição espacial com o risco para a hanseníase,⁷¹ conduziram um estudo na ilha de Kembanglemari construindo *pedigrees* das famílias de afetados, testando a soropositividade para anticorpos anti-PGL-1 e construindo um mapa com a distribuição dos domicílios dos doentes. Esta ilha é parte de uma província na Indonésia e apresenta características peculiares por ser uma região com alta endemicidade para a doença e ter sofrido um forte efeito fundador em

sua população. Como resultado o estudo demonstrou que a concordância para hanseníase *per se*, bem como para a forma multibacilar, pode ser melhor explicada pela genética, enquanto que a soropositividade pela distribuição espacial. O autor ainda conclui que a forma paucibacilar apresentou distribuição aleatória.

Estudos de genética clássica, como os estudos de análise de segregação complexa, têm avançado no entendimento da base genética de doenças complexas. Investigações realizadas em populações afetadas pela hanseníase utilizando amostras de diferentes etnias vêm objetivando identificar o modelo de herança que apresenta o melhor ajuste para os fenótipos da hanseníase. Eles apontam um modelo de gene principal (*major gene*) como sendo o que melhor explica a segregação familiar da doença, onde um gene teria uma maior importância, porém não seria suficientemente importante para controlar a susceptibilidade da doença por si só.⁷² A hipótese de um *major gene* recessivo estar atuando no controle de susceptibilidade da doença já foi descrita para hanseníase virchowiana,⁷³ não virchowiana^{74,75} e para hanseníase *per se*.^{75,76} Outros dois estudos também apontam em favor do modelo *major gene* atuando no controle da doença, mas estes indicaram a existência de um padrão dominante ou de co-dominância influenciando a susceptibilidade à hanseníase *per se* em famílias da Tailândia e Vietnã.^{77,78} Ainda neste mesmo sentido, um estudo realizado na Colônia Santo Antônio do Prata (Colônia do Prata) também fala em favor da genética influenciando no curso da doença, apontando um modelo de herança *major gene* co-dominante para hanseníase *per se*, no entanto os resultados não se mantiveram distantes de um modelo recessivo. Este mesmo estudo levanta outro dado que fala a favor da influência da genética sobre a doença, indicando uma prevalência da doença de 12,82%, ou seja, mesmo em uma região isolada onde todos os moradores estão expostos ao *M. leprae*, apenas uma parte da população adoeceu.⁷²

Estudos de distribuição familiar têm como objetivo investigar a concordância da doença entre indivíduos que possam partilhar tanto de mesma genética quanto de mesmo ambiente. As investigações de distribuição familiar da hanseníase passaram por duas fases distintas, a primeira delas teve como preocupação

primordial demonstrar a importância das formas da doença em relação à taxa de contágio. Como resposta aos estudos observou-se que pacientes consanguíneos de pacientes virchowianos têm maiores chances de apresentarem a mesma forma da moléstia que os não-consanguíneos.⁶⁶ Em outra fase os estudos de distribuição familiar tiveram como foco principal demonstrar que a doença exibe uma agregação familiar.⁷⁹⁻⁸²

Contudo, apesar da demonstração da agregação familiar se mostrar necessária, não é suficiente para a comprovação da influência da genética na transmissão da doença, já que pode haver fatores de confundimento entre genética e ambiente, sendo assim, desenhos de estudos com gêmeos e de adoção são necessários para melhor identificar a influência genética e ambiental na doença.⁶⁶

Estudos que partem da premissa que gêmeos partilham de uma influência ambiental muito semelhante tomam como base uma análise de concordância de fenótipos entre gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ). Esta análise se torna ainda mais importante na demonstração de fatores genéticos influenciando a patogenia de doenças complexas.⁸³ Entretanto, alguns destes estudos são contestados, já que critérios importantes neste tipo de desenho, por vezes, não foram obedecidos, como por exemplo, levar em consideração que tanto os pares MZ quanto os DZ devem ter as mesmas chances de contato com o *M. leprae*. Ainda deve-se respeitar a proporção de formas clínicas e de gênero para ambos os grupos (MZ e DZ). De qualquer modo, às investigações sobre a concordância da hanseníase em gêmeos não contrariaram a hipótese de que os elementos dos pares monozigóticos são mais propensos a manifestar a mesma forma da doença.⁶⁶

Em suma, a demonstração crescente de que fatores genéticos estão relacionados com a patogenia desta doença vem incentivando os estudos moleculares a encontrarem precisamente os genes humanos de susceptibilidade para a doença.

1.6 Epidemiologia Genética

1.6.1 Desenhos de Estudos

As estratégias de estudos de distribuição familiar, estudos com gêmeos e ainda análise de segregação complexa, são amplamente empregados em doenças complexas como a hanseníase. Entretanto essas estratégias não fornecem informações exatas sobre a natureza do componente genético em questão como, por exemplo, localização, número e quais genes estão envolvidos com a doença. Neste aspecto a adoção de estudos com análises de associação ou ligação envolvendo marcadores moleculares é fundamental para se chegar ao exato componente genético envolvido.⁸⁴ Este processo de identificação do marcador molecular envolvido com a doença pode ser afetado por vários fatores como baixa penetrância do alelo variante, desequilíbrio de ligação e a possibilidade da doença apresentar mais de um marcador.⁸⁵

Estudos de ligação são conduzidos com famílias e têm como objetivo localizar regiões cromossômicas responsáveis por um determinado efeito num menor intervalo cromossômico possível. Normalmente, o resultado deste tipo de estudo é expresso em LOD score, onde a região cromossômica passará a ser candidata se apresentar um LOD score maior que três. São poderosos no mapeamento de genes com efeitos moderados a intensos, contudo não tem poder de resolução capaz de implicar um único gene, pois localizam uma região a partir de análise de co-segregação do *locus* da doença com marcadores de local conhecido.⁸⁴

Ao contrário dos estudos de ligação, estudos de associação apresentam alto poder de detecção de efeitos genéticos de moderado a fraco sendo capazes de identificar com precisão o gene responsável pelo efeito detectado e, geralmente, são utilizados na estratégia de análise de genes candidatos ou ainda como desdobramento dos estudos de ligação.⁸⁴

Estudos de associação podem ser conduzidos a partir de amostragens familiares ou populacionais. Estudos baseados em populações adotam mais comumente o desenho caso-controle, já os baseados em famílias são conduzidos a partir de análise de trios. Nas amostragens populacionais deve-se ter a cautela de que não exista parentesco entre os indivíduos.

O teste de desequilíbrio ou distorção de transmissão (TDT) é mais eficaz em situações de alta heterogeneidade genética, penetrância diminuída e expressividade variável. O TDT requer a composição de trios chamados informativos formados por um ou mais filhos afetados e pais heterozigotos para o marcador a ser testado. O teste compara o número de vezes que os pais heterozigotos transmitem o suposto alelo marcador de associação ao filho afetado e o número de vezes que transmite o alelo alternativo, permitindo a medição da significância estatística do marcador associado com a doença. Porém, não permite determinar a magnitude desta associação.⁸⁶⁻⁸⁸

Já o desenho de estudo em caso-controle é ideal para verificar a homogeneidade de frequências de um determinado marcador em indivíduos afetados e não afetados. Como resultado pode ser observado uma frequência aumentada de um determinado alelo dentre os afetados caracterizando susceptibilidade, ou em controles caracterizando resistência.

1.6.2 Marcadores Genéticos

No genoma humano podem-se encontrar diversos tipos de marcadores genéticos. Para fazer um mapeamento gênico é possível lançar mão de marcadores no genoma humano como repetições curtas em tandem (STR - *short tandem repeat*), número variável de repetições em tandem (VNTR - *variable number of tandem repeat*) ou ainda de polimorfismos de base única (SNPs - *single nucleotide polymorphism*). Todos apresentam relevâncias importantes em estudos genéticos, entretanto os STRs e VNTRs são multialélicos refletindo uma região mais ampla do genoma e mais aplicados em estudos de ligação. Já os SNPs são, em sua maioria, bialélicos podendo precisar dentro de um *locus* gênico uma posição pontual.²⁶

Os SNPs são alterações de um único nucleotídeo que ocorrem em uma frequência maior que 1% na população. Acredita-se que os SNPs possam ser a verdadeira fonte da variabilidade entre os seres humanos, especialmente quando se encontram em regiões traduzidas do DNA.²⁶

Alterações presentes em regiões codificadoras são classificadas em sinônimas ou não-sinônimas. As não-sinônimas resultam em uma substituição de aminoácido na sequência protéica, podendo ser conservativas ou não conservativas em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, a presença do polimorfismo pode levar a uma mudança estrutural da proteína codificada e, conseqüentemente, a uma possível alteração da sua função. Por outro lado, alterações do tipo sinônimas são aquelas nas quais a presença do polimorfismo não causa alteração do aminoácido codificado. Embora as alterações sinônimas não alterem a sequência protéica, elas podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida.⁸⁹

Os SNPs podem também estar situados em regiões reguladoras ou promotoras do gene, e podem alterar a ligação dos fatores de transcrição e a quantidade de proteína produzida. Apesar das regiões intrônicas não serem codificantes, SNPs nessas regiões podem apresentar desequilíbrio de ligação com outros em regiões codificantes, tornando-se informativo para associação com doenças.⁹⁰⁻⁹²

Com ampla distribuição no genoma, os SNPs são facilmente identificados podendo constituir marcadores para estudos de associação. Isto pode ser observado pelo crescente número de SNPs que vem sendo associados a doenças complexas, como as infecciosas e as auto-imunes.^{26,93,94}

1.6.3 Estratégias de varredura genômica

Os estudos de varredura, comumente chamados de *scans* genômicos ou ainda *genome wide*, são reconhecidos como estudos geradores de hipóteses, onde

uma grande quantidade de marcadores moleculares, distribuídos por todo o genoma, é interrogada com a finalidade de encontrar regiões genômicas que possam estar ligadas a determinada doença.

Em hanseníase, o primeiro estudo de *scan* genômico de ligação foi realizado com a população indiana o qual evidenciou um pico de ligação na região cromossômica 10p13 para hanseníase *per se*. Contudo, os indivíduos afetados eram em sua grande maioria paucibacilares o que embutiu um viés nos resultados, qual seja o de implicância no risco de doença ou da forma clínica.⁹⁵ Posteriormente, um estudo realizado com a população vietnamita, com distribuição de forma clínica homogênea, também demonstrou um pico de ligação nesta região para a forma paucibacilar, confirmando que a amostra do estudo anterior estaria enviesando o resultado.⁹⁶ Importante ressaltar que o gene do receptor de manose do tipo C1 (MRC1) está localizado na região cromossômica 10p13. Alter et al.⁹⁷, em estudo com amostra familiar do Vietnam e amostra caso-controle brasileira, puderam associar dois SNPs do gene MRC1 com hanseníase *per se* e com a forma multibacilar

O mesmo estudo de *scan* genômico, que utilizou o painel de famílias vietnamitas, identificou picos de ligação em outras duas regiões cromossômicas: a região 6q25-26 onde posterior clonagem posicional e mapeamento fino revelaram dois alelos associados à doença, localizados nos genes da parkina (PARK2) e no gene co-regulado (PACRG);^{96,98} a região 6p21, também submetida a mapeamento fino, onde foram identificados marcadores de associação no gene de linfotoxina- α (LTA), localizado na região do HLA de classe III. Dentre oito SNPs de LTA associados à doença na população do Vietnam, sete estão em desequilíbrio de ligação, sendo o SNP LTA+80G>A o mais provável para representar a informação de associação da região nesta população.^{93,99}

Na população brasileira Miller et al.¹⁰⁰, por meio de um estudo de *scan* genômico de ligação, identificaram picos de ligação nas bandas cromossômicas 17q22 e 20p13 para hanseníase multibacilar. Importante ressaltar que estão localizados nessa região do cromossomo 17 importantes genes candidatos, como iNOS, genes de quimiocinas e fatores de transcrição. Este estudo ainda confirma os

achados sobre a região cromossômica 6p21, porém não encontra picos de ligação nas regiões 6q25-q27 e 10p13.

O primeiro estudo do tipo *genome-wide association* (GWA) em hanseníase foi conduzido na China e publicado em 2009.¹⁰¹ Estes são ainda pouco utilizados para doenças infecciosas, pois devem ser aplicados em grandes amostras e, portanto, de custo bastante elevado. Este estudo contou com 706 pacientes e 1225 controles testados para 500.000 SNPs na busca de associação com a doença. Três painéis de replicação foram investigados perfazendo no estudo um total de 3254 pacientes e 5955 controles. Como resultado o estudo confirma a associação do HLA de classe II, mas não valida as associações dos genes PARK2/PACRG e LTA. Entre os genes não relacionados ao HLA, este identificou dois polimorfismos (rs42490 e rs40457) associados com proteção à doença no gene RIPK2, envolvido com a via de sinalização de NOD2. Na região intragênica entre NOD2 e SNX20 outros dois polimorfismos (rs9302752 e rs7194886) foram associados com aumento do risco para hanseníase. Foram ainda associados com susceptibilidade para a doença, três polimorfismos no gene TNFSF15 (rs4574921, rs10114470 e rs6478108), dois no gene CCDC122 (rs9533634 e rs3088362) e outros dois em uma sequência aberta de leitura no cromossomo 13, C13orf31 (rs3764147 e rs10507522).¹⁰¹

Na tentativa de replicação dos dados encontrados no estudo chinês, Wong et al.¹⁰² conduziram estudo de associação com a população indiana. Confirmando os dados prévios os SNPs rs3764147 e rs9533634, em C13orf31 e CCDC122, foram associados com susceptibilidade para a doença. No entanto, os demais não tiveram os dados replicados.

Um estudo subsequente, realizado com as populações da Índia e Mali, empregou um microarranjo para tipagem de 50.000 SNPs com avaliação de 2.092 genes. Na região *HLA-DBR1/DQA1* dois polimorfismos (rs1071630 e rs9270650) foram fortemente associados com susceptibilidade à hanseníase. Contrariamente, uma associação significativa com proteção para doença foi observada para o polimorfismo rs5743618 (I602S) no gene TLR1 para a população indiana, que se mostrou marginal quando testada em estudo de TDT. Adicionalmente, os

polimorfismos rs12660741 no gene MICA e rs3093662 no gene TNF, ambos localizados no cromossomo 6, foram associados com susceptibilidade para hanseníase *per se*, o que permaneceu significativo mesmo após correção para variantes do HLA.¹⁰³

1.6.4 Genes candidatos

Dentro da abordagem de genes candidatos, os genes de citocinas têm sido bastante estudados devido à atuação no controle da natureza (celular ou humoral), intensidade e duração da resposta contra o agente infeccioso, que tornam tais moléculas importantes alvos para os estudos de associação.

Dentre os estudos de associação com abordagem de investigação de genes candidatos podemos destacar os genes que influenciam o eixo de resposta imune Th1 e Th2 na doença. SNPs nos genes TNF (fator de necrose tumoral), IL10 (interleucina-10), LTA (linfotóxina-alfa) e IFN- γ (interferon-Gama) têm sido associados com susceptibilidade ou resistência à hanseníase.^{37, 104-107}

A região 6p21 vem sendo sistematicamente envolvida com hanseníase, não só pela associação positiva de genes do HLA de classe II, como também pelos estudos de SNPs nos genes TNF e LTA, que têm sido associados com a doença em diversas populações, incluindo a brasileira.^{104-106, 109-111} Em investigação detalhada desta região, Alcais et al.⁹⁹ relataram a associação entre marcadores no gene LTA e hanseníase para as populações do Vietnã e da Índia, mas não obtiveram a replicação dos dados para o *locus* LTA+80 na população brasileira, o que foi explicado pela idade de manifestação mais tardia da doença nesta população.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos, com efeitos que incluem a estimulação na atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos e a liberação de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio com atividade microbicida. É também um importante modulador da produção de citocinas necessárias para a migração celular e formação de granuloma.¹¹² Uma alteração neste gene poderia diminuir a produção desta citocina resultando numa

ineficaz ativação de macrófagos e consequente inabilidade na morte da micobactéria.¹¹³

O SNP localizado na posição -308 da região promotora do gene TNF tem sido importante alvo de estudos de associação com este gene candidato. O primeiro estudo de associação em hanseníase que investigou este polimorfismo foi conduzido na população indiana, onde o alelo TNF-308A foi significativamente associado à forma multibacilar.¹⁰⁴ Contrariamente, na população brasileira, este alelo mostrou-se associado com proteção à doença.¹¹⁴ Shaw et al.¹⁰⁶ em análise de TDT, também na população brasileira, identificaram maior transmissão do alelo TNF-308G em afetados que foi associado a hanseníase *per se* bem como a hanseníase multibacilar. Recentemente um estudo de associação conduzido no estado do Paraná, identificou uma forte associação de susceptibilidade para o genótipo TNF-308GG e efeito de proteção do alelo TNF-308A.¹¹¹ Por fim, este mesmo efeito de proteção foi identificado na população do Nepal.¹¹⁵

O efeito funcional do polimorfismo TNF-308G>A, bem como para outros na região promotora do gene TNF, ainda são desconhecidos. Assim como nos estudos genéticos, estudos funcionais acerca deste polimorfismo também apresentam resultados controversos. Estão descritos resultados que identificam aumento da atividade transcricional na presença do alelo TNF-308A,^{95,116} enquanto em outros estudos nenhuma relação entre a presença deste alelo e qualquer alteração funcional foi encontrada.^{117,118}

Também com uma ação pró-inflamatória a LT- α apresenta algumas ações redundantes com TNF, já que compartilham um mesmo receptor. Ambos localizados na região cromossômica 6p21.3, situam-se geneticamente muito próximos.¹¹⁹ Knight et al. 2003¹¹⁸ observaram que a combinação de certos SNPs nos dois genes resulta em alteração na modulação da transcrição de TNF decorrente de uma mudança na ligação da RNA polimerase na região promotora do LTA.

Combinada a outros fatores de risco genéticos e/ou ambientais a escassez de LTA pode precipitar uma deficiência na resposta frente a uma infecção por

micobactéria, enquanto seu excesso pode levar a um episódio cardíaco potencialmente fatal. Os grandes impactos desta proteína e suas vias destacam a LTA como uma molécula efetora crítica na patogênese de doenças infecciosas e não infecciosas.¹²⁰

Shaw et al.¹⁰⁶ demonstrou na população brasileira a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os *loci* TNF-308 e LTA+252, bem como a associação dos haplótipos -308G/+252A e -308A/+252A com susceptibilidade e proteção para hanseníase, respectivamente. Adicionalmente, este estudo não verificou correlação do SNP LTA+252A>G isolado com hanseníase.

Ao contrário das citocinas anteriores, a IL-10 apresenta um efeito antiinflamatório e imuno-regulatório sendo secretada principalmente por linhagens de monócitos e macrófagos. A IL-10 é caracterizada pelo efeito supressor sobre a resposta Th1, principalmente agindo sobre IFN- γ , TNF e GM-CSF.¹²¹⁻¹²⁵ Alguns estudos têm sugerido que 75% da variação na produção de IL-10 seja geneticamente determinada e que este controle ocorre em nível transcricional.^{126,127}

A intensidade com que infecções podem progredir tem sido associadas aos níveis séricos de IL-10.¹²⁸ Westendorp et al.¹²⁶ observaram altos níveis desta citocina em pacientes que apresentaram uma baixa resistência para meningite meningocócica, enquanto que com níveis mais baixos de IL-10 um bom prognóstico foi observado. Na hanseníase, esta citocina está envolvida com a evolução da doença, já que uma alta razão TNF/IL-10 está associada a um melhor prognóstico em contatos saudáveis. Adicionalmente, foi verificado um aumento nos níveis de IL-10 em pacientes que apresentaram a forma multibacilar da doença.¹²⁴

O gene IL10 está localizado na região cromossômica 1q32, que abriga outros importantes genes de citocinas imuno-regulatórias (IL-19, IL-20 e IL-24) já associadas a outras doenças dermatológicas como psoríase e lúpus eritematoso sistêmico.^{129,130} A região promotora do gene IL10 é polimórfica apresentando SNPs proximais (-592, -819 e -1082) e distais (-2763, -2849 e -3575).¹³¹⁻¹³³

Isoladamente, os SNPs nas posições -592 e -819 foram associados com hanseníase na população indiana.¹⁰⁸ Santos et al.¹¹⁴ encontraram susceptibilidade para a doença associada ao alelo -819T na população do Rio de Janeiro. Entretanto, na população de Malaui, Fitness et al.¹⁰⁹ não encontraram associação de nenhum destes SNPs da porção proximal com hanseníase. Em análise de haplótipos na população brasileira, Franschechi et al.¹⁰⁹ observaram uma associação do haplótipo -1082G/-819C/-592C com hanseníase virchowiana.

Outras associações foram ainda demonstradas em análise estendida de haplótipos para as populações brasileira e indiana. Formado por SNPs distais, o haplótipo -3575A/-2849G/-2763C foi associado com resistência, enquanto o haplótipo -3575T/-2849A/-2763C com susceptibilidade à hanseníase na população do Rio de Janeiro.¹⁰⁷ Na população indiana, Malhotra et al.¹⁰⁸ descreveram a associação do haplótipo estendido -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C com resistência para a hanseníase *per se* e forma multibacilar da doença, enquanto o haplótipo -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819T/-592A foi associado ao risco de ocorrência da forma multibacilar.

Recentemente, genes de receptores que atuam na imunidade inata, tiveram também a candidatura reforçada por resultados positivos oriundos de estudos em larga escala. Dentre estes, associações têm sido descritas para os genes TLR1, TLR2, TLR4, NOD2, VDR e MRC1.¹³⁴

Os estudos genéticos de associação frequentemente geram resultados controversos ou com associações espúrias devido a fatores tais como estratificação populacional, tamanho amostral reduzido e seleção inadequada dos controles. Sendo assim, a confirmação dos achados em diferentes populações se faz de suma importância para a melhor definição de marcadores genéticos associados com a doença.

Investigar o papel de polimorfismos genéticos do tipo SNPs localizados nas regiões promotoras dos genes IL10 e TNF e no gene LTA na hanseníase *per se*.

2.1 Objetivos específicos

Conduzir estudo de associação em hanseníase do tipo caso-controle comparando as frequências de alelos, genótipos, carreadores e haplótipos para os seguintes SNPs:

- TNF-308G>A na região promotora do gene TNF;
- LTA+252A>G e LTA+80C>A no gene LTA;
- IL10 -819C>T, -1082A>G, -2763A>C, -2849A>G, -3575T>A na região promotora do gene IL10.

3.1 População analisada

Tratou-se de um estudo retrospectivo de desenho caso-controle. Os casos foram provenientes do atendimento ambulatorial de Hanseníase do Instituto Lauro de Sousa Lima (Bauru-SP). A forma clínica de hanseníase foi determinada segundo os critérios de Ridley e Jopling⁵ e, segundo a OMS, para multibacilar e paucibacilar.¹³⁵ O grupo controle foi constituído por 380 indivíduos candidatos a doador de sangue do Hemonúcleo de Bauru, os quais foram selecionados respeitando as características do grupo de pacientes com relação às variáveis gênero, etnia e idade.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética local (CEP/ILSL 0087), e a anuência em termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes.

Para a tipagem dos SNPs TNF-308G>A e LTA+252A>G maior amostra de casos, composta por 545 indivíduos, foi analisada. Nesta amostra ampliada foram incluídas amostras de DNA provenientes de sangue total (n=369) e de biópsias de pele (n=176) do arquivo do serviço de patologia do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL). As amostras de DNA obtidas a partir de biópsias apresentaram restrições com relação a repetidas amplificações, de forma que a partir destas somente foi possível extrair dados acerca dos SNPs TNF-308G>A e LTA+252A>G. Tal dificuldade provavelmente ocorreu devido ao processo de fixação da biópsia que levou ao impedimento da amplificação do DNA repetidamente.¹³⁶ Pela razão supracitada, a tipagem dos SNPs na região promotora do gene IL10 e do polimorfismo LTA+80A>C só foi possível para amostras de DNA obtidas a partir de sangue total. Sendo assim, a população para este estudo foi composta por 375 casos.

Como critério de inclusão para ambos os grupos foi estabelecido que nenhuns dos indivíduos apresentassem relação genética, bem como fossem residentes no estado de São Paulo. Ainda para o grupo controle a negativa para doença na família ou história pessoal de hanseníase foi observada.

As características dos grupos analisados para os genes TNF e LTA e para a região promotora do gene IL10 encontram-se, respectivamente, nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Características dos grupos de pacientes e controles analisados para os polimorfismos TNF-308G>A e LTA+252A>G.

Característica	Categorias	Casos (n=545)	Controles (n=380)
Idade (média±DP)		45,3±16,4	35.9±10.7
Etnia	Caucasóide	446	240
	Pardo	69	104
	Negro	29	28
	Indígena	-	04
	Amarelo	01	-
	Não Disponível	-	04
Razão entre gêneros (homem/mulher)		2.26	1.95
Forma clínica segundo OMS	Paucibacilar	155	
	Multibacilar	358	
Forma clínica segundo Ridley e Jopling	MHV	204	
	MHDV	73	
	MHDD	85	
	MHDT	63	
	MHT	79	
	HNP	01	
	MHI	03	
Episódio reacional	Reação reversa	78	
	ENH	131	
	Ambas	13	

MHV - Hanseníase Virchowiana. MHDV - Hanseníase Dimorfo-Virchowiana. MHDD- Hanseníase Dimorfo-Dimorfo. MHDT - Hanseníase Dimorfo-Tuberculóide. MHT - Hanseníase Tuberculóide. HNP - Hanseníase Neural Pura. MHI - Hanseníase Indeterminada. ENH - eritema nodoso hansênico.

Quadro 2 Características dos grupos de pacientes e controles analisados para os polimorfismos da região promotora do gene IL10 e LTA+80A/C

Característica	Categorias	Casos (n=545)	Controles (n=380)
Idade (média±DP)		40,7±17,5	35.9±10.7
Etnia	Caucasóide	303	240
	Pardo	48	104
	Negro	23	28
	Indígena	-	04
	Amarelo	1	-
	Não Disponível	-	04
Razão entre gêneros (homem/mulher)		2.40	1.95
Forma clínica segundo OMS	Paucibacilar	31	
	Multibacilar	300	
Forma clínica segundo Ridley e Jopling	MHV	25	
	MHDV	79	
	MHDD	43	
	MHDT	45	
	MHT	11	
	HNP	01	
	MHI	01	
Episódio reacional	Reação reversa	105	
	ENH	164	
	Ambas	15	

MHV - Hanseníase Virchowiana. MHDV - Hanseníase Dimorfo-Virchowiana. MHDD- Hanseníase Dimorfo-Dimorfo. MHDT - Hanseníase Dimorfo-Tuberculóide. MHT - Hanseníase Tuberculóide. HNP - Hanseníase Neural Pura. MHI - Hanseníase Indeterminada. ENH - eritema nodoso hansênico.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA a partir de sangue total foi realizada pela técnica de “*salting out*”. O sangue total coletado foi submetido a centrifugação por 15 minutos a 1500 rpm para separação do anel de leucócitos (*buffycoat*) que foi submetido a lavagens consecutivas com tampão de lise de hemácias e posteriormente com água tipo I. O *pellet* obtido foi ressuspenso em solução com proteinase K e SDS, para degradação das proteínas e lipídeos e lise celular, mantida em banho-maria por 1 hora a 56°C. Posteriormente, foi adicionado 100 µl de solução saturada de NaCl, com agitação para precipitação das proteínas, e nova centrifugação a 12.000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante obtido foi recuperado e mesmo volume de etanol absoluto foi adicionado para precipitação do DNA genômico, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 6 minutos e descarte do sobrenadante. Por fim, uma última lavagem foi realizada com 1000 µl de etanol 70% (centrifugação a 13.000 rpm por 6 minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, após secagem em temperatura ambiente por 15 minutos, foi ressuspenso em 100 µl de água estéril e armazenado a -80°C.

A extração de DNA a partir de biópsias parafinadas partiu de cinco secções de 20 µm, que foram colocadas em microtubos contendo 500 µl de tampão de Britton & Robinson em pH 9,0 e submetidos à autoclavação (120°C por 20 minutos), de acordo com o método proposto por Shi et al.¹³⁷ Após resfriamento, foram adicionados 500 µl de solução tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM pH 8,0), 100 µl SDS 10% e 1 mg/ml de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), sendo feita a digestão a 56°C por 72 horas ou até a clarificação da amostra. Subseqüentemente, foi feita a inativação da proteinase K por aquecimento em 95°C por 10 minutos. O DNA foi extraído adicionando-se a esta solução o mesmo volume de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Esta mistura foi agitada em *vortex*, centrifugada por 5 minutos a 8.000 rpm e a fase aquosa recuperada, onde foi adicionado 1 ml de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido do procedimento anteriormente descrito para recuperação da fase aquosa. Nesta solução foram então acrescentados 100 µl de acetato de sódio 3 M e 1 ml de isopropanol

resfriado, seguido de agitação vigorosa e armazenamento a -20°C por 24 horas, para otimização da precipitação do DNA. Esta solução foi centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O pellet obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70% refrigerado, centrifugado 15 minutos em 15.000 rpm e, após evaporação do etanol em temperatura ambiente, reconstituído em 50 µl de água estéril.

A quantificação do DNA destas soluções foi feita por meio de leitura em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) em 260 nm, 280 nm e 320 nm com estimativa da pureza da solução. Após a quantificação foram preparadas soluções de trabalho com concentração de 100 ng/µl

3.3 Genotipagem

As genotipagens dos polimorfismos nos *loci* TNF-308, LTA+252, LTA+80, IL10 -819, IL10 -1082, IL10 -2763, IL10 -2849 e IL10 -3575 foram realizados empregando o método de PCR-RFLP (Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). Adicionalmente para os polimorfismos nos *loci* IL10 -2763 e IL10 -2849 foi realizado um *nested*-PCR (ou seja, duas etapas de amplificação) antes da reação de digestão.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 (MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA). As sequências de oligonucleotídeos e os métodos utilizados para cada amplificação encontram-se discriminados no Quadro 3. De maneira geral, as reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µl contendo tampão para *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) na concentração 1X, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) a 0,2 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 0,3µM de cada oligonucleotídeo (reverso e direto), MgCl₂ a 2,5 mM, 1 unidade de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e aproximadamente 100 ng de DNA.

Após as reações, foram aplicados 3 µl de produto amplificado juntamente com 2 µl de tampão de corrida (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25%) em gel de agarose 1,5% para checagem de amplificação.

Na etapa seguinte foi feita a digestão de 5 µl de produto amplificado com emprego de enzimas de restrição específicas (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) para cada SNP. As enzimas utilizadas bem como os tamanhos dos fragmentos resultantes da digestão estão descritos no Quadro 3. As amostras, após digestão, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em uma concentração variando de 2% a 3% de acordo com a região analisada e os padrões de bandas foram visualizados e fotografados em transiluminador (Multi Doc-It digital Imaging System, Upland, USA). As figuras representativas dos resultados obtidos em gel de agarose após digestão com enzima de restrição se encontram nas figuras 2 a 9.

Quadro 3. Sequência de oligonucleotídeos, enzimas de restrição e padrão de fragmentos utilizados para determinação dos genótipos nos sistemas de PCR-RFLP.

SNP	Primers	Método	Enzima de Restrição	Fragmentos da Digestão
TNF -308 G/A	Direto: 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' Reverso: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'	PCR RFLP	<i>Nco I</i>	AA: 107pb GA: 107, 87 e 20pb GG: 87 e 20 pb
LTA+252 A/G	Direto: 5'- CCGTGCTTCGTGTTTGGACTA -3' Reverso: 5'- AGAGGGGTGGATGCTTGGGTTC -3'	PCR RFLP	<i>Nco I</i>	AA: 782pb AG: 782, 586 e 196pb GG: 586 e 196 pb
LTA+80 A/C	Direto : 5'- AAGGTGAGCAGAGGGAGACA -3' Reverso : 5'- GCTTCGTGCTTTGGACTACC -3'	PCR RFLP	<i>Bse YI</i>	CC: 246pb CA: 246, 220 e 26pb AA: 220 e 26 pb
IL10 -819 C/T	Direto: 5' - CCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTGAGGA -3' Reverso: 5'- AGGTAGTGCTCACCATGACC -3'	PCR RFLP	<i>Msl I</i>	TT: 359pb TC: 359, 295 e 65pb AA: 295 e 65 pb
IL10 -1082 A/G	Direto: 5'- CCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTGAGGA -3' Reverso: 5'- AGGTAGTGCTCACCATGACC -3'	PCR RFLP	<i>Bse RI</i>	AA: 359pb AG: 359, 318 e 41pb AA: 318 e 41 pb
IL10 -2763 A/C	Direto : 5' – CTGTAATCTCAGCACTCTGG -3' Reverso1: 5'-TATGGTACCAAGTCTGGCCCTTGGA -3' Reverso2 : 5' – AGTTCAAGCCATTCTCCTGC -3'	NESTED PCR RFLP	<i>Dde I</i>	AA: 185pb AC: 185, 114 e 8pb CC: 114 e 8 pb
IL10 -2849 A/G	Direto 5'– CTGTAATCTCAGCACTCTGG -3' Reverso1: 5'-TATGGTACCAAGTCTGGCCCTTGGA -3' Reverso2: 5' – AGTTCAAGCCATTCTCCTGC -3'	NESTED PCR RFLP	<i>Alw I</i>	AA: 195pb CA: 195, 151 e 44pb AA: 151 e 44 pb
IL 10 -3575 T/A	Direto: 5'- GGTTTTCTTCATTTGCAGC-3' Reverso : 5'-ACACTGTGAGCTTCTTGAGG-3'	PCR RFLP	<i>Tsp509I</i>	AA: 231pb TA: 231, 121 e 110pb TT: 121 e 110 pb

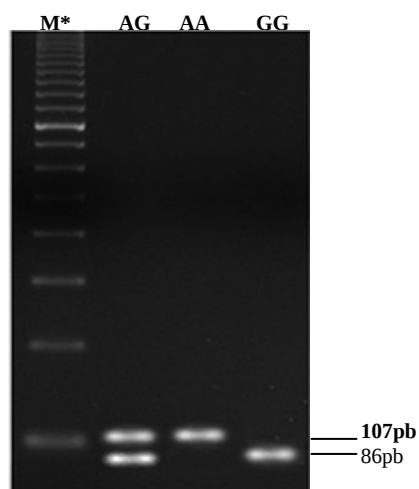


Figura 2 – Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo TNF-308G>A após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

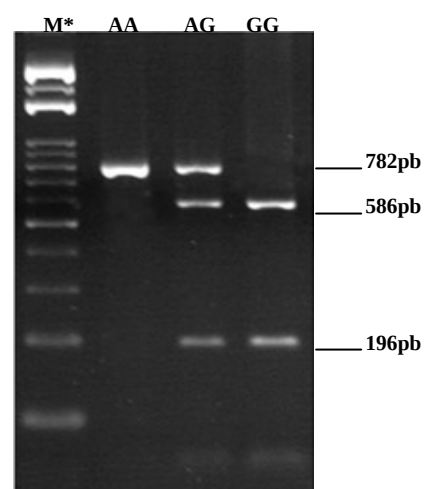


Figura 3 – Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo LTA+252A>G após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

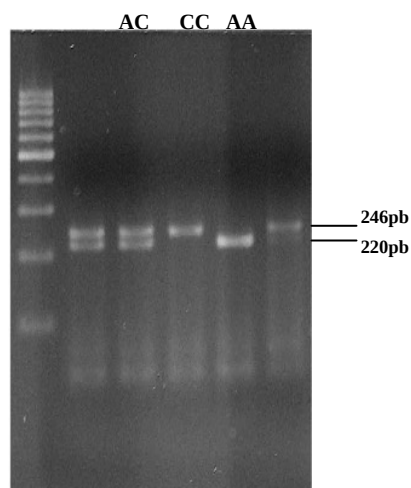


Figura 4 – Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo LTA+80C>A após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

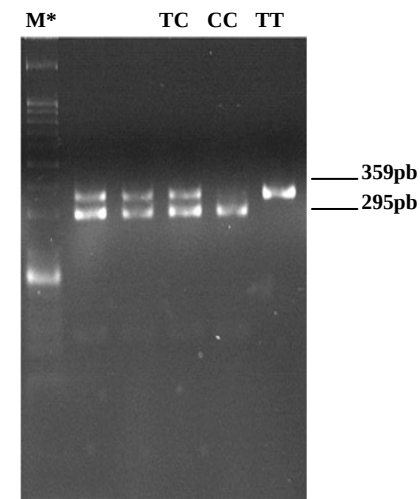


Figura 5 – Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo IL10-819C>T após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

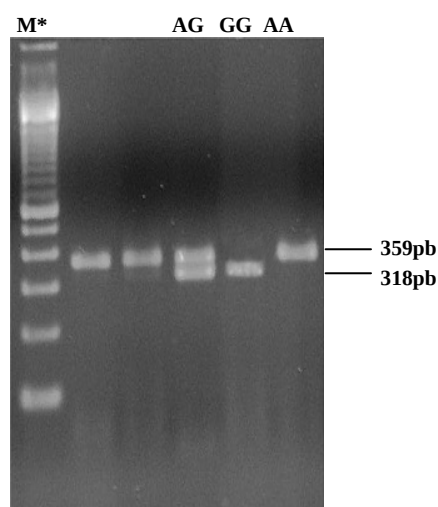


Figura 6 – Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo IL10-1082A>G após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

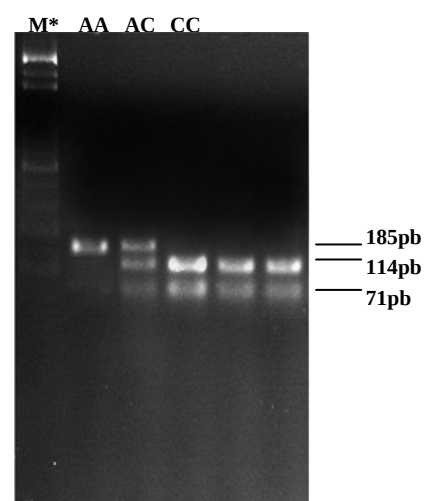


Figura 7 – Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo IL10-2763A>C após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

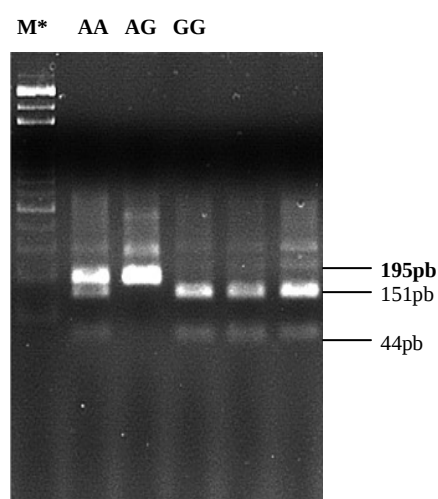


Figura 8 – Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo IL10-2849A>G após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

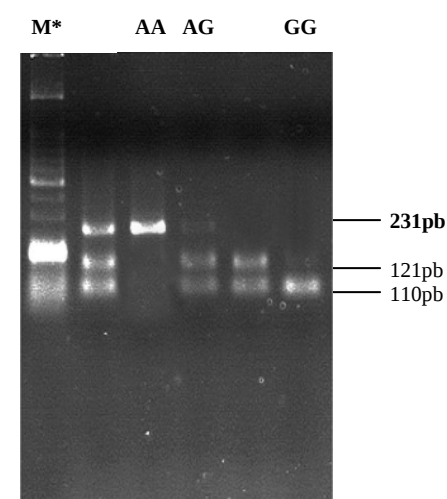


Figura 9 – Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para tipagem do polimorfismo IL10-3575T>A após digestão do segmento gênico de interesse. * Marcador de Peso Molecular 100pb.

3.4 Análises Estatísticas

Foram calculadas as frequências alélicas (números de alelos/número de cromossomos analisados), frequências genótípicas (número de indivíduos com um determinado genótipo/número de indivíduos total estudado) e frequências de portadores (soma do número de indivíduos homozigotos e heterozigotos para o alelo/número total de indivíduos analisados) para cada polimorfismo analisado.

Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram testados para cada um dos SNPs estudados comparando as frequências de genótipos observadas com as esperadas pela lei de Hardy-Weinberg utilizando o teste de Qui-quadrado.

As frequências de haplótipos foram estimadas por meio do método de máxima verossimilhança.

Para comparações das frequências de genótipos, alelos, carreadores e haplótipos nos grupos de casos e controles foram empregados modelos de regressão logística, com cálculo de *odds ratio* (OR) e *p*-valor, adotando como medida de significância estatística *p*-valor<0,05, e ajustes para as co-variáveis gênero e etnia.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico R para windows, na versão 2.6.1 com os pacotes “genetics” e “haplo.stats”.

Resultados

4.1 Polimorfismos dos Genes TNF e LTA

Para o polimorfismo TNF-308G>A as análises contaram com uma população de 375 controles e 533 pacientes. As frequências dos alelos A e G foram respectivamente, 0,12 e 0,88 no grupo controle e 0,09 e 0,91 no grupo de pacientes. Para o polimorfismo da posição LTA+252A>G foram genotipados 373 controles e 526 pacientes ficando as frequências alélicas dos alelos A e G, respectivamente, em 0,34 e 0,66 para os controles e 0,32 e 0,68 para o grupo de pacientes. No caso do polimorfismo LTA+80C>A as análises de 374 controles e 365 pacientes mostraram frequências alélicas para os alelos C e A de 0,65 e 0,35 em controles 0,69 e 0,31 em pacientes, respectivamente (Tabela 1).

Quanto à distribuição dos alelos, ambos os grupos obedeceram à lei do EHW.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que para os *loci* TNF-308 e LTA+252 as frequências em controles e pacientes são próximas, de forma que as análises alélicas, genotípicas e de carreador não apresentam significância estatística.

Para o polimorfismo LTA+80C>A, as análises de genótipos com correção mostraram que os genótipos AA e CA apresentam OR de proteção à hanseníase de 0,68 e 0,80 com significância estatística marginal idêntica (p -valor=0,07). A análise dos carreadores do alelo LTA+80A confirma a associação de proteção, também com significância estatística marginal (OR= 0,78; p -valor= 0,09). Já a análise com correção fortaleceu o efeito deste alelo o tornado significativamente associado com proteção à hanseníase *per se* (OR=0,73; p -valor = 0,04).

Tabela 1. Frequências de alelos, genótipos e carreadores dos SNPs nos *loci* TNF-308, LTA+252 e LTA+80 nos grupos controle e caso e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências com e sem correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em casos	OR (<i>p</i> -valor)	OR (<i>p</i> -valor)**
TNF-308 G>A	A	0,12	0,09	0,76 (0,22)	0,76 (0,23)
	G*	0,88	0,91	*	*
	AA	3 (1%)	3 (1%)	0,66 (0,61)	0,51 (0,41)
	GA	82 (22%)	92 (17%)	0,74 (0,08)	0,76 (0,12)
	GG*	290 (77%)	438 (82%)	*	*
	Carreador A			0,74 (0,07)	0,75 (0,10)
		n= 375	n= 533		
LTA+252A>G	G	0,34	0,32	0,93 (0,62)	0,95 (0,63)
	A*	0,66	0,68	*	*
	GG	41 (11%)	51 (9%)	0,84 (0,47)	0,87 (0,56)
	GA	171 (46%)	238 (46%)	0,94 (0,69)	0,98 (0,89)
	AA*	161 (43%)	237 (45%)	*	*
	Carreador G			0,93 (0,57)	0,96 (0,76)
		n= 373	n= 526		
LTA+80C>A	A	0,35	0,31	0,82 (0,20)	0,78 (0,13)
	C*	0,65	0,69	*	*
	AA	46 (12%)	35 (10%)	0,68 (0,12)	0,63 (0,07)
	CA	172 (46%)	155 (42%)	0,80 (0,16)	0,75 (0,07)
	CC*	156 (42%)	175 (48%)	*	*
	Carreador A			0,78 (0,09)	0,73 (0,04)
		n= 374	n= 365		

*categoria referência

** valores calculados com correção para as co-variáveis gênero e etnia

Após as análises destes polimorfismos de forma isolada, foi conduzida uma análise de haplótipos, de modo a verificar se, em conjunto, os polimorfismos TNF-308G>A, LTA+252A>G e LTA+80C>A apresentam associação com a doença.

Conforme apresentado na Tabela 2, apenas um, dentre os oito haplótipos testados, formado por LTA+80A/LTA+252A/TNF-308G foi representativo apresentando uma OR de proteção à doença (OR=0,77) com significância estatística

(p -valor =0,05). Ao aplicarmos o teste com correção, a OR foi pouco alterada (OR=0,74), contudo esta análise forneceu um p -valor de maior significância (p =0,02). Não foram calculadas OR para haplótipos de frequências raras.

Tabela 2. Frequências estimadas de haplótipos formados pelos polimorfismos nos *loci* LTA+80, LTA+251 e TNF-308 nos grupos controle e caso, e dados de OR e p -valor da análise comparativa destas frequências, com e sem correção.

Haplótipos LTA +80/ LTA +252 / TNF -308	Frequência		OR (p - valor)	
	Controles	Pacientes	Valor sem correção	Valor corrigido**
C – A – G*	0,31	0,34	*	*
C – A – A	0,003	0,004	--	--
C – G – A	0,11	0,09	0,72 (0,09)	0,70 (0,07)
A – A – A	Raro	Raro	--	--
A – G – A	0,004	Raro	--	--
C – G – G	0,23	0,26	1,06 (0,66)	1,07 (0,65)
A – A – G	0,35	0,30	0,77 (0,05)	0,74 (0,02)
A – G – G	Raro	0,007	--	--
	N=380	N=375		

*categoria referência

** valores calculados com correção para as co-variáveis gênero e etnia

4.2 Polimorfismos do Gene IL10

As análises da região promotora do gene IL10 incluíram polimorfismos da região proximal -819C>T e -1082G>A e distal -2763A>C, -2849A>G e -3575A>T. As frequências alélicas de cada polimorfismo nos grupos de controles e casos, bem como as análises genotípicas e de carreadores encontram-se descritas na Tabela 3. No que tange a distribuição de genótipos, todos obedeceram à lei do EHW, exceto no grupo de controles para o SNP -1082A>G, o que levou a exclusão deste no estudo de haplótipos.

Para as comparações utilizando o modelo de regressão logística, apenas os SNPs da região proximal demonstraram resultados significantes para os testes sem e com correção para as co-variáveis gênero e etnia. Na análise genotípica, ambos os polimorfismos, -819C>T e -1082G>A, mostraram resultados significantes (Tabela 3). O polimorfismo -819C>T mostrou-se associado com susceptibilidade à hanseníase para os genótipos TT (OR=1,58; p -valor=0,05) e CT (OR=1,36; p -valor=0,05). Ao aplicarmos o teste com correção apenas o genótipo CT manteve-se significativo estatisticamente (OR= 1,34; p -valor=0,05), enquanto para o genótipo TT houve um sutil aumento no p -valor dando ao resultado uma tendência à significância (OR=1,60; p -valor=0,07). Esta associação de susceptibilidade ligada ao alelo -819T foi confirmada na análise de carreador sem correção (OR= 1,40; p -valor=0,02) e com correção (OR=1,39; p -valor=0,03).

Uma associação de susceptibilidade à doença foi também identificada para o genótipo GG do polimorfismo -1082G>A (OR=1,99; p -valor=0,02), que foi sutilmente mais forte na análise com correção (OR=2,12; p -valor=0,01). No entanto, este dado deve ser avaliado com cautela já que para este SNP o grupo controle não esteve de acordo com o EHW.

As frequências alélicas, genotípicas e análise de carreador para os polimorfismos da região distal -2763A>C, -2849A>G e -3575A>T não apresentaram diferenças significantes entre os grupos de controles e casos (Tabela 3).

Da mesma forma, para os polimorfismos da região promotora do gene IL10, após análise isolada, foi conduzida a análise de haplótipos, apresentada na Tabela 4. Dezesesseis haplótipos tiveram frequência estimada e foram analisados, dos quais dois foram associados significativamente com susceptibilidade para a doença (Tabela 4). Os haplótipos -819C/-2763A/-2849A/-3575T (OR=2,63; p -valor=0,016) e -819T/-2763C/-2849G/-3575T (OR=1,40; p -valor=0,01) tiveram maior frequência no grupo de casos que em controles indicando uma associação de susceptibilidade para a doença. Da mesma forma que nas análises isoladas, o alelo -819T manteve-se associado com susceptibilidade à doença.

Tabela 3. Frequências de alelos, genótipos e carreadores dos polimorfismos da região promotora do gene IL10 investigados nos grupos controle e caso e dados de OR e p -valor da análise comparativa destas frequências, com e sem correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em casos	OR (p -valor)	OR (p -valor)**
IL10 - 819C>T	T	0,34	0,39	1,28 (0,10)	1,28 (0,11)
	C*	0,66	0,61	*	*
	TT	43 (12%)	54 (15%)	1,58 (0,05)	1,60 (0,07)
	CT	165 (44%)	178 (49%)	1,36 (0,05)	1,34 (0,05)
	CC*	165 (47%)	131 (36%)	*	*
	Carreador T			1,40 (0,02)	1,39 (0,03)
		n= 373	n=363		
IL10 -1082G>A	G	0,30	0,33	1,15 (0,37)	1,15 (0,37)
	A*	0,70	0,67	*	*
	GG	20 (5%)	38 (10%)	1,99 (0,02)	2,12 (0,01)
	AG	186 (50%)	166 (46%)	0,94 (0,70)	0,92 (0,59)
	AA*	166 (45%)	158 (44%)	*	*
	Carreador G			1,02 (0,85)	1,00 (0,99)
		n= 372	n=362		
IL10 -2763A>C	A	0,25	0,27	1,12 (0,53)	1,13 (0,51)
	C*	0,75	0,73	*	*
	AA	23 (6%)	30 (8%)	1,36 (0,29)	1,66 (0,14)
	CA	141 (38%)	141 (39%)	1,04 (0,77)	0,99 (0,94)
	CC*	204 (55%)	195 (53%)	*	*
	Carreador A			1,09 (0,55)	1,04 (0,76)
		n= 368	n= 366		

Resultados

IL10 -2849A>G	A	0,17	0,19	1,09 (0,65)	1,07 (0,75)
	G*	0,83	0,81	*	*
	AA	9 (2%)	14 (4%)	1,60 (0,28)	1,70 (0,29)
	GA	110 (30%)	108 (29%)	1,00 (0,95)	0,97 (0,87)
	GG*	252 (68%)	245 (67%)	*	*
	Carreador A			1,05 (0,73)	1,02 (0,89)
		n= 371	n= 367		
IL10 - 3575A>T	A	0,27	0,27	1,00 (1,00)	0,94 (0,60)
	T*	0,73	0,73	*	*
	AA	20 (5%)	20 (5%)	1,02 (0,94)	0,86 (0,65)
	AT	166 (44%)	160 (43%)	0,98 (0,94)	0,94 (0,64)
	TT*	194 (51%)	189 (51%)	*	*
	Carreador T			0,97 (0,92)	1,12 (0,72)
		n=380	n=369		

*categoria referência

** valores calculados com correção para as co-variáveis gênero e etnia

Tabela 4. Frequências estimadas de haplótipos formados pelos polimorfismos na região promotora do gene de IL10 nos grupos controle e caso e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências, com e sem correção.

Haplótipos - 819/-2763/-2849/-3575	Frequência		OR (<i>p</i> - valor)	
	Controles	Pacientes	Valor sem correção	Valor corrigido**
C – C – G – T*	0,37	0,30	*	*
C – A – A – A	0,12	0,12	1,14 (0,51)	1,03 (0,89)
C – A – A – T	0,02	0,04	2,63 (0,016)	2,63 (0,02)
C – A – G – A	0,08	0,08	1,15 (0,52)	1,09 (0,71)
C – A – G – T	0,02	0,02	1,00 (0,99)	1,08 (0,87)
C – C – A – A	0,01	0,008	--	--
C – C – A – T	0,009	0,01	--	--
C – C – G – A	0,032	0,032	1,06 (0,88)	0,93 (0,84)
T – A – A – A	raro	0,009	--	--
T – A – A – T	0,005	Raro	--	--
T – A – G – A	raro	0,005	--	--
T – A – G – T	0,005	0,009	--	--
T – C – A – A	0,004	Raro	--	--
T – C – A – T	0,005	0,002	--	--
T – C – G – A	0,019	0,022	1,48 (0,37)	1,32 (0,54)
<u>T</u> – C – G – T	0,30	0,35	1,40 (0,01)	1,37 (0,02)

*categoria referência

** valores calculados com correção para as co-variáveis gênero e etnia

Os resultados dos estudos de associação até então publicados vem sendo amplamente discutidos no que tange a validação dos dados, que com frequência não são replicados em diferentes populações. Sendo assim, a medida adotada para a validação destes resultados consiste na tentativa de replicação dos dados em estudos de associação independentes, para populações ainda não investigadas. Nesta tendência, este trabalho objetivou a investigação do papel dos polimorfismos nos genes TNF, LTA e IL10 em hanseníase, como tentativa de replicação dos dados já descritos em outras populações.

O recrutamento dos indivíduos na formação de uma amostra caso-controle para estudos de associação consiste em um dos pontos chave para o impedimento da ocorrência de viés nos resultados. Nesse contexto, a construção da amostra para este trabalho adotou critérios no sentido de manter a proporcionalidade entre os grupos para as co-variáveis gênero e etnia. Outro critério chave para inclusão no banco foi que tanto pacientes quanto controles tivessem procedência de uma mesma região geográfica (estado de São Paulo), já que regiões distintas apresentam taxas de prevalência e, conseqüentemente, níveis de exposição diferentes para a doença. Adicionalmente, os indivíduos para ambos os grupos não deveriam apresentar relação de consangüinidade entre si, a fim de possibilitar uma análise caso-controle clássica, sem que fossem necessárias correções no modelo estatístico de acordo com o grau de parentesco.

5.1 Análise dos polimorfismos TNF-308, LTA+252 e LTA+80

A primeira etapa deste estudo objetivou conduzir estudo de associação para os polimorfismos TNF-308G>A, LTA+252A>G e LT+80C>A presentes na região cromossômica 6p21 de maneira isolada e, posteriormente, sob forma de haplótipos. Além do papel funcional já descrito e associações com doenças como sarcoidose, tuberculose e psoríase já relatadas,^{54,138,139} estes polimorfismos já foram associados à hanseníase em algumas populações.¹³⁴

Diversos estudos demonstram que esta região do cromossomo 6, que alberga os genes HLA, apresenta ligação e associação com hanseníase. No entanto, os polimorfismos e os alelos associados são controversos para cada população, o que já é denotado desde a discordância entre os dados do alelo TNF-308A, uma vez que este foi associado com resistência nas populações da Indonésia e Brasil^{105,111,114,115} e com susceptibilidade na população indiana.^{104,140} Franceschi et al.¹¹¹ também encontram resultados que concordam parcialmente com os dados que sugerem proteção associado ao alelo TNF-308A, já que na população brasileira encontraram associação de susceptibilidade para o alelo TNF-308G. Em nosso estudo a OR encontrada em todas as análises para o alelo TNF-308A concorda com os dados previamente achados para a população brasileira indicando uma associação de resistência, contudo os resultados não alcançaram significância estatística, sendo que apenas os dados de carreadores mostram significância marginal (OR=0,74; *p*-valor=0,07) (Tabela 1).

Esta discordância nos resultados entre as populações pode estar associada à constituição alélica de cada uma delas, essa idéia fica reforçada se compararmos as freqüências do alelo TNF-308A nos controles dos estudos que o associam à resistência na população brasileira e à susceptibilidade na população indiana, já que esta freqüência esteve sensivelmente mais baixa entre os controles na população asiática (2,8% e 4,6%)^{104,140} que na brasileira (16,3% e 13,4%).^{105,111} A falta de significância estatística em nosso estudo pode ser explicada pelo tamanho amostral do mesmo. De acordo com Moraes et al.,²⁶ em estudo que visa discutir alguns conceitos de epidemiologia genética, considerando os dados de freqüência alélica e OR aqui obtidos, para que possamos ter uma análise mais informativa o tamanho da amostra deveria ser ampliado. Um estudo de meta-análise, que reuniu dados de artigos publicados acerca do polimorfismo TNF-308G>A e que incluiu os dados encontrados em nosso estudo, reforça esta idéia. Neste, quando os dados obtidos para a população brasileira foram analisados isoladamente, um resultado significativo para resistência foi encontrado (OR=0,60; *p*-valor=0,05). Por outro lado, quando incluído os dados envolvendo todas as populações, nenhuma associação foi observada, indicando que esta associação alélica deva ser específica da população brasileira (artigo no prelo)³⁷

No caso do polimorfismo LTA+252A>G, nossas análises não mostraram associação com hanseníase isoladamente. Esta ausência de associação replica o dado do estudo publicado por Shaw et al. também para a população brasileira.¹⁰⁶

Os dados encontrados de associação dos genótipos LTA+80AA e LTA+80CA com resistência para hanseníase, e replicado na análise de carreadores do alelo A, contrasta com o previamente relatado por Alcais et al.⁹⁹, onde este alelo foi associado com susceptibilidade para a doença na população vietnamita e indiana. Entretanto, nesta mesma publicação os dados não foram replicados com a população brasileira, onde a idade de manifestação mais tardia pareceu explicar a ausência de associação. Esta observação parcialmente explica esta controvérsia, já que a média da idade de manifestação da doença em nosso grupo, de 41 anos, é ainda mais alta que a da população brasileira investigada no estudo de Alcais et al.⁹⁹ (38 anos). Estes dados revelam ainda diferenças importantes quanto aos marcadores informativos da associação desta região gênica com hanseníase de acordo com a população estudada. Esta associação de proteção aqui encontrada para o alelo LTA+80A discorda também dos dados disponíveis acerca do efeito funcional deste alelo, já que para este, um menor nível de expressão da citocina é pressuposto.¹⁴¹

Para análise de haplótipos formados pelos *loci* LTA+80/LTA+252/TNF-308 foram utilizadas as amostras de DNA provenientes de sangue. Os dados aqui obtidos mostram uma associação significativa com resistência à doença para o haplótipo LTA+80A/LTA+252A/TNF-308G (OR=0,77; p -valor=0,05), o que também pôde ser observado, com significância marginal, para o haplótipo LTA+80C/LTA+252G/TNF-308A em análise com correção (OR=0,70; p -valor=0,07). A associação deste primeiro haplótipo é provavelmente dada pelo alelo LTA+80A, enquanto que para o segundo seria um efeito do alelo TNF-308A, já detectados nas análises isoladas. Em favor dessa interpretação temos que na população de controles aqui estudada os polimorfismos nos genes LTA e TNF não se encontram em desequilíbrio de ligação ($r^2 < 0,5$), de forma que os efeitos de proteção observados para TNF-308 e LTA+80 seriam independentes. Ainda nesse contexto, Hagge et al.¹⁴² descreveram, empregando modelo experimental para a doença,

que, embora LT- α seja um membro da superfamília TNF, estes possuem papéis distintos no que tange a formação e manutenção do granuloma e contenção do crescimento bacilar.

Um provável efeito aditivo com sentido de proteção para doença era esperado para os haplótipos compostos pelos alelos TNF-308A e LTA+80A, no entanto as frequências destes foram raras em nossas análises, impossibilitando a avaliação deste efeito.

Da mesma forma, quando excluímos o *locus* LTA+80 e conduzimos a análise para haplótipos formados apenas por TNF-308G>A e LTA+252A>G, com *n* amostral ampliado pelas amostras provenientes de biopsia, o resultado mostrou uma associação com proteção, de significância marginal, para o haplótipo formado por TNF-308A/LTA+252G (OR=0,73; *p*-valor=0,07).

Estes resultados possivelmente refletem uma estrutura complexa de variantes de susceptibilidade nesta região que poderia ser mais bem esclarecida com análise de um número maior de polimorfismos na região com definição do perfil de desequilíbrio de ligação que melhor represente a população brasileira, bem como quais são os marcadores informativos de associação com a doença.⁹⁹

5.2 Análises dos polimorfismos na região promotora do gene IL10

As análises de forma isolada para os polimorfismos proximais na região promotora do gene IL10 revelou que, tanto na análise de genótipos para -819CT e -819TT, quanto na análise de carreadores, o alelo T está associado com susceptibilidade à hanseníase *per se* (Tabela 3). Esses dados confirmam os de estudos anteriores que também associam este alelo com risco nas populações brasileira e indiana.^{105,108} Esta idéia é reforçada por um estudo de meta-análise envolvendo cinco populações distintas, três brasileiras, dentre estas a amostra caso-controle aqui estudada, uma indiana e uma de Malaui, no qual o alelo -819T foi associado com susceptibilidade para hanseníase *per se*.¹⁴³

Dados funcionais produzidos por nosso grupo indicam que há uma diferença significativa na produção *in vitro* desta citocina, após estímulos com antígenos de *M. leprae*, de acordo com a presença do alelo -819T, que foi relacionado com menor produção de IL-10.¹⁴³ Este resultado foi inesperado, já que níveis mais altos desta citocina são correlacionados com as formas mais graves da doença, o que ainda está de acordo com seu papel anti-inflamatório,¹⁴⁴ de tal sorte que a susceptibilidade associada ao alelo -819T não é convencionalmente fundamentada por esses achados funcionais. No entanto, este estudo funcional avaliou voluntários saudáveis, o que não garante que este padrão de produção de IL-10 se daria da mesma forma em indivíduos, sabidamente, de *background* genético de susceptibilidade para a doença. Uma baixa, porém constante, produção de IL-10 foi relatada como sendo crucial para a cronificação de lesões de leishmaniose.¹⁴⁵ Assim, esses achados podem trazer uma nova compreensão para o papel da IL-10 na hanseníase onde, talvez, baixos níveis desta citocina na fase inicial da doença sejam necessários para levar a doença a um estado crônico e de baixa resposta. Os dados acerca do papel da IL-10 na hanseníase estão descritos para um microambiente de doença já instalada, já os dados funcionais obtidos por nosso grupo são oriundos de uma fase precoce de interação do bacilo com a célula do sistema imune (48 horas de estímulo), o que pode denotar uma diferença no padrão de resposta de acordo com a fase de interação. Ou seja, considerando a hanseníase como doença inflamatória crônica cuja gravidade está relacionada à resposta imune do hospedeiro, não só a quantidade, mas também o momento e a fonte da produção de IL-10 devem ser cruciais para definir o seu papel no desfecho da doença.¹⁴⁶ Nesse contexto, Hagge et al. 2009¹⁴², de forma interessante, observaram que ainda não é sabido se a diferença no perfil de citocinas entre as formas clínicas de hanseníase é causa ou consequência da doença.¹⁴³

O *locus* -819 deve ser considerado como forte candidato na regulação de produção da IL-10, já que está localizado em um sítio de ligação de elementos regulatórios positivos.¹⁴⁶ A baixa produção de IL-10 na presença do alelo -819T também foi reportada por Belkaid et al.,¹⁴⁵ relatando que a troca do nucleotídeo alterou a afinidade de ligação de fatores de transcrição nuclear.

Com relação ao polimorfismo -1082A/G, o genótipo GG foi associado com susceptibilidade à hanseníase *per se* com significância estatística (Tabela 3), contudo o grupo de controles para este polimorfismo não obedece à lei do ERW, o que tornou este resultado não confiável e exigiu a exclusão deste polimorfismo das análises de haplótipos. O mesmo desequilíbrio para este polimorfismo foi relatado para a população brasileira em estudo que visava descrever as frequências de genótipos e haplótipos de polimorfismos no gene IL10 nas populações brasileira e holandesa, o que denota algum tipo de estratificação da nossa população considerando este *loci*, ou ainda alguma falha no sistema de genotipagem empregado.¹⁴⁷

Isoladamente, os SNP distais -2763A>C, -2849A>G e -3575A>C, da região promotora do gene IL10 não foram associados com hanseníase na nossa população (Tabela 3). Os dados já publicados para a população brasileira também não descrevem associações para nenhum destes SNPs isoladamente, somente em haplótipos.¹⁰⁷

A análise final de haplótipos na região promotora do gene IL10 confirma os dados encontrados para o alelo -819T, já que o haplótipo -819T/-2763C/-2849G/-3575T foi também associado com susceptibilidade para a doença com um *p*-valor ainda mais significativo para ambas as análises, com e sem correção (*p*-valor de 0,01 e de 0,02, respectivamente) (Tabela 4). No mesmo sentido, este haplótipo foi ainda associado à susceptibilidade para a doença por Malhotra et al.⁹¹ para a população indiana, e por Moraes et al.¹⁰⁷ para a população brasileira, que descreveu proteção associada com -819C/-1082G/-2763C/-2849G/-3575A e susceptibilidade com -819T/-1082G/-2763C/-2849A/-3575T. É importante ressaltar que, em todos estes estudos, os haplótipos mantêm o alelo -819T como determinante de susceptibilidade. Sendo assim, em conjunto, estes dados reforçam a existência de associação desta região gênica, e do *locus* -819, com a ocorrência de hanseníase.

As análises estendidas também revelaram uma forte associação do haplótipo -819C/-2763A/-2849A/-3575T com susceptibilidade a doença com uma chance de risco aumentada em mais de 100%, que manteve a significância mesmo após

correção (Tabela 6). No entanto, este dado deve ser interpretado com cautela devido à baixa frequência estimada para este haplótipo nos dois grupos, onde a variação foi de apenas de 2%.

Os dados oriundos deste estudo reafirmam a importância dos genes aqui estudados no contexto da susceptibilidade genética para hanseníase. Desdobramentos deste devem abranger a ampliação do n amostral com investigação em populações distintas, bem como maior densidade de polimorfismos investigados nas regiões com vistas a busca do marcador mais informativo da associação destas com a doença em difere diferentes populações. A importância destes dados pode ainda ser avaliada tomando como prerrogativa a idéia de que o caráter de doença complexa da hanseníase é inquestionável, e que os estudos que almejam a descoberta de marcadores de risco genético para o adoecimento devem contribuir sobremaneira para o aperfeiçoamento do manejo dos acometidos e da tomada de medidas de profilaxia para os contatos.

Conclusões

Os dados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- 1) No estudo acerca do polimorfismo TNF-308G>A as análises de carreador mostraram uma associação de susceptibilidade à hanseníase *per se* para o alelo TNF-308A com significância estatística marginal, que corrobora com resultados de estudo de meta-análise descritos para população brasileira.
- 2) Nas análises de carreador do *locus* LTA+80 foi possível observar a associação do alelo LTA+80A com susceptibilidade a hanseníase *per se*.
- 3) Análises isoladas para o polimorfismo LTA+252A>G não apresentaram nenhuma associação estatisticamente significativa.
- 4) No estudo de haplótipos formados pelos polimorfismos dos genes LTA e TNF, os haplótipos LTA+80A/LTA+252A/TNF-308G e LTA+80C/LTA+252G/TNF-308A foram associados com susceptibilidade para hanseníase *per se*, corroborando com os achados de maneira isolada.
- 5) Isoladamente, os resultados para os polimorfismos na região promotora do gene IL10 mostraram uma associação significativa, com sentido de proteção, para os genótipos -819TT e -819CT, bem como para os carreadores do alelo T.
- 6) Análises relacionadas aos polimorfismos -1082G>A, -2763A>C, -2849A>G e -3575A>T não apresentaram resultados estatisticamente significantes em análises isoladas.
- 7) Confirmando os achados em análise isolada para o *locus* -819 da região promotora do gene IL10, o haplótipo -819T/-2763C/-2849G/-3575T também foi associado com proteção para hanseníase *per se*

Referências Bibliográficas

1. Naafs B, Silva E, Vilani-Moreno FR, Marcos EC, Nogueira ME, Opromolla DVA. Factors influencing the development of leprosy: Int J Lepr 2001; 69: 26-33.
2. Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações. In: Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000; p.1-4.
3. Talhari, S.; Neves R. G. Dermatologia tropical: hanseníase, 3ª ed., Gráfica Tropical Manaus, 1997; p.97-101.
4. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. Lancet. 2004; 10: 1209-1219.
5. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five groups system. Int J Lepr 1966; 34: 255-273.
6. Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. Infect Immun 2001; 69: 3413-3417.
7. Pfaltz RE, Bryceson A. Clinical Leprosy. Hastings RC Leprosy , 1985; 1: 31-52.
8. Ress RFW. The microbiology of leprosy. Hastings RC Leprosy 1985; 1: 31-52.
9. Daffe M, McNeil M, Brennan PJ. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of Mycobacterium, Rhodococcus, and Nocardia spp. Carbohydr Res 1993; 249: 383-98.
10. Draper P, Kandler O, Darbre A. Peptidoglycan and arabinogalactan of Mycobacterium leprae. J Gen Microbiol 1987; 133: 1187-94.
11. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. Genome Biol 2001; 2: 1023.
12. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Brazilian Leprosy Study Group. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. J Infect Dis 2003; 188: 1024-1031.
13. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol 2008; 214: 149-160.
14. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumor necrosis factor and tuberculosis. J Investig Dermatol Symp Proc 2007; 12: 22-25.
15. Scollard DM, Adams L B, Gillis T P, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin. Microbiol. Rev. 2006; 19: 338–381.
16. Shepard CC. Multiplication of mycobacterium leprae in the foot-pad of the mouse. International journal of leprosy 1962; 3: 291-306.

17. Kirchheimeir WF, Storrs EE. Attempts to stablish the armadillo (*Dasypus novencinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. *International journal of Leprosy. Tropical and Geographical Medicine*. 1971; 3: 693-702.
18. Cole S, Eiglmeier K, Parkhill J, James K, Thomson N, Wheeler P, Honoré N, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus *Nature*. 2001; 409: 1007-1011.
19. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C et al. On the origin of leprosy. *Science* 2005; 308: 1040-1042
20. Opromolla DVA. História. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.51-58
21. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina de Ribeirão Preto*. 1997; 30: 335-339
22. Modlin RL, Mehra V, Wong L, Fujimiya Y, Chang W-C, Horwitz DA, et al. Supressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. *J Immunol* 1986; 137: 2831-2834.
23. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999;285:732-736.
24. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003;9:525-532.
25. 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; 11(6): 653-60.
26. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght, PR, Pacheco AG, Genetics of host response in leprosy. *Leprosy Review*. 2006; 77: 189-202.
27. Algood HM, Lin PL, and Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin. Infect. Dis*. 2005; 41:S189-S193.
28. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SMM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:1213-1217.
29. Sarno EN, Grau GE, Vieira LMM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor- α and interleukin-1 during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol*. 1991;84:103-108
30. Foss NT, Oliveira EB, Silva CL. Correlation between TNF production, increase of plasma- C- reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to Concanavalin A during erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr*. 1993;61:218-226.

31. Beiguelman B, Quagliato R. Nature and familial character of the lepromin reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1965;33:800–807.
32. 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;153:3639-3647.
33. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH, et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J Clin Invest*. 1997;99:336-341.
34. Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 1983;8:182-189
35. Mehra V, Modlin RL. T-lymphocytes in leprosy lesions. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990;155:97-110
36. Murray HW, Spitalny GL and Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol*. 1985; 134: 1619-1622.
37. Cardoso CC, Pereira AC, Marques CS, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol*. 2011; 6:533-549
38. Hayashi Y. On a pure culture of leprosy bacilli and skin reaction by means of the pure culture suspensions. *Int J Lepr* 1933; 1: 31-38.
39. Mitsuda K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprous nodules. *Int J Lepr* 1953; 21: 347-358.
40. Nogueira MES, Vilani-Moreno FR, Silva EA, Arruda MSP. Imunologia. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 2 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.27-42.
41. Congresso Internacional de Leprologia, 6, Madrid, 1953. *Memória Association International de la Lepra*, 1953: p.1344.
42. Opromolla DVA. História. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.47-49.
43. Pavani RAB, Tonolli ER, D'avilla SCGP. Classificação histopatológica e correlação clínica de 50 casos de hanseníase diagnosticados em um hospital-escola, São José do Rio Preto, SP. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2008; 41:188-1895.
44. Languillon J, and Carayon A. Lésions cutanées. In: *Précis de léprologie MASSON*. 1986, 2: 62-101.

45. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *British Medical Bulletin* 2006; 77-78: 103-21.
46. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 828-32.
47. Fleury RN. Patologia e Manifestações Viscerais. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 2 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.63-71.
48. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO Technical Report Series. 1982; 675: 37
49. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para Controle da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
50. Opromolla DVA. História. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.79-84.
51. Van Brakel WH, Khawas IB, Lucas SB. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in West Nepal. *Lepr Rev* 1994; 65: 190-203.
52. Lockwood DNJ, Colston MJ, Khanolkar-Young SR. The detection of *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 409-515.
53. Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) synthesis is associated with skin and nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 196-202.
54. Sharma S, Ghosh B, Sharma SK: Association of TNF polymorphisms with sarcoidosis, its prognosis and tumour necrosis factor (TNF)-alpha levels in Asian indians. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 251-259.
55. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. 1999; 50: 541-549.
56. World Health Organization. Global leprosy situation, 2005. *Weekly Epidemiol Rec* 2005; 80: 289-96.
57. World Health Organization. Global leprosy situation, 2005. *Weekly Epidemiol Rec* 2010; 85: 337-348
58. Cunha MD, Cavaliere FAM, Hércules FM, Oliveira MLW, Matos HJ. Os indicadores da hanseníase e as estratégias de eliminação da doença, em município endêmico do Estado do Rio de Janeiro Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2007; 23: 1187-1197.

59. Kerr-Pontes LR, Montenegro AC, Barreto ML, Werneck GL, Feldmeier H. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. *Int J Epidemiol* 2004; 33: 262–269.
60. Martelli CM, Moraes OL, Andrade AL, Silva SA, Silva IM, Zicker F. Spatial patterns of leprosy in an urban area of central Brazil. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 315–9.
61. Magalhães MCC, Rojas LI. Diferenciação Territorial da Hanseníase no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2007; 16: 75-84.
62. Van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: Implicações for future control. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 1999; 67: 119-128
63. Cunha SS, Rodrigues LC, Duppre NC. Current strategy for leprosy control in Brazil: time to pursue alternative preventive strategies? *Rev Panam Salud Publica*. 2004; 16: 362-365.
64. Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bulletin of the World Health Organization* 2005; 83: 230-235.
65. Burgnera D, Jamiesonb SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis*. Vev. 2006; 6: 653–663.
66. Beiguelman, Bernardo. Genética e Hanseníase. *Ciência & Saúde Coletiva*, vol.7, no.1. Rio de Janeiro, 2002.
67. Miguez-Alonso, A. *Lepra dimorfa. Fundamentos de sua conceituação*. Editora Livro S.A., Rio de Janeiro, 1966.
68. Peterson, L.W. & Skinsnes, O.K. Photographic gallery of contributors of the century. *Int. J. Lepr*. 1973; 41: 156- 176.
69. Beiguelman, B. An appraisal of genetic studies on leprosy. *Acta Genet. Med. Gemellol*. 1972; 21: 21-52.
70. Beiguelman, B. Lepromin reaction. Genetic studies including twin pair analysis. *Acta Leprol*. 1971; 44: 5-65.
71. Bakker MI, May L, Hatta M, Kwenang A, Klatser PR, Oskam L, Houwing-Duistermaat JJ. Genetic, household and spatial clustering of leprosy on an island in Indonesia: a population-based study. *BMC Med Genet*. 2005; 24: 6-40.
72. Lazaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis* 2001: 1598-605.

73. Smith DG. The genetic hypothesis for susceptibility to lepromatous leprosy. *Hum Genet* 1979; 50: 163–177.
74. Haile RW, Iselius L, Fine PE, Morton NE. Segregation and linkage analysis of leprosy pedigrees. *Hum Hered* 1985; 35: 43–52.
75. Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1179–1185.
76. Abel L, Demenais F. Detection of MGs for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 256–266.
77. Wagener DK, Schauf V, Nelson KE, Scollard D, Brown A, Smith T. Segregation analysis of leprosy in families of northern Thailand. *Genet Epidemiol* 1988; 5:95–105.
78. 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: 63–82.
79. Elston RC & Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Human Heredity*. 1971; 21: 523-542.
80. Morton NE & MacLean CJ. Analysis of family resemblance.III. Complex segregation analysis of quantitative traits. *American Journal of Human Genetics*. 1974; 26: 489-503.
81. Lalouel JM & Morton NE. Complex segregation analysis with pointers. *Human Heredity*. 1981; 31: 312-321.
82. Lalouel JM, Rao DC, Morton NE & Elston RC. A unified model for complex segregation analysis. *American Journal of Human Genetics*. 1983; 35:816-826.
83. Vallada Filho HP, Samaia H. Esquizofrenia: aspectos genéticos e estudos de fatores de risco. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2000; 22: 2-4.
84. Prevedello FC & Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? *Anais brasileiro de Dermatologia*. 2007; 82: 451-9.
85. Koeleman BP, Dudbridge F, Cordell HJ, Todd JA. Adaptation of the extended transmission/disequilibrium test to distinguish disease associations of multiple *loci*: the Conditional Extended Transmission/Disequilibrium Test. *Annals of human genetics*. 2000; 67: 207-13.
86. Spileman 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; 52: 506-516.
87. Spileman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 1996; 64: 983-989.

88. Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart, AM, Schearer H, Shiang R, et al. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J*, Pittsburgh, 1997; 34: 1-6.
89. Stitzel NO, Binkowski TA, Tseng YY, Kasif S, Liang J. Toposnp: A topographic database of non-synonymous single nucleotide polymorphisms with and without known disease association. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 520–522.
90. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997; 94: 3195-3199.
91. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur. J. Immunogenet*. 1997; 24: 1-8.
92. Fishman D, Faulds G, Jaffery R, Mahamedali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest*. 1998; 102: 1369-1376.
93. Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases, *Human Genetics* 2008; 227–235.
94. Bayley JP, Ottenhoff THM, Verweij CL, Is there a future for TNF promoter polymorphisms?. *Genes and Immunity*. 2004; 5: 315–329.
95. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility *locus* for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet*. 2001; 27: 439-441.
96. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet*. 2003; 33: 412-415.
97. Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum. Genet*. 2010; 127: 337–348.
98. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*; 2004 427: 636-40.
99. 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; 39: 517-22.
100. Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun*. 2004; 5: 63–67.

101. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 2609–2618.
102. Wong SH, Hill AV, Vannberg FO. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 2010; 62: 1446–1447.
103. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, Rautanen A, et al. Leprosy and the Adaptation of Human Toll-Like receptor 1. *PLoS Pathog.* 2010; 6: 1-6.
104. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1997; 176: 530-5322.
105. 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.
106. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and link age of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001; 2: 196-204.
107. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR et al. Interleukin-10 promoter singlenucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 2004; 5: 592–595.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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; 13: 493-498.
112. Knight JC, Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 290–298.

113. Engele M, Stössel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bölskei P, et al. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002; 168: 1328–1337.
114. Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, Moraes MO, Filho VF, Mattos HJ, 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
115. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit C, Siddiqui MR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol.* 2010; 71: 992-998.
116. Kroeger KM, CarvilleKS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol. Immunol.* 1997; 34: 391–399.
117. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor α (TNF α) -308 promoter polymorphism in TNF α gene regulation. *J. Inflamm.* 1995; 46: 32–41.
118. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP: In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nat Genet* 2003; 33: 469-475.
119. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF- α . *Immunol Ser.* 1992; 56: 30-34.
120. Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome.* Epub 2010; 22: 19-31
121. 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: 2008; 208–226.
122. 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.
123. 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.
124. Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, Sampaio EP, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol* 2000; 51: 419-28.
125. 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*. *Immunol* 1995; 86: 97-103

-
126. Westendorp RGJ, Langermans JAM, Huizinga TWG, Elouali AH, Verweij CL, Vandenbroucke JP. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170–173.
 127. Bienvenu J, Doche C, Gutowski MC et al. Production of proinflammatory cytokines and cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 80–84.
 128. Derkx B, Marchant A, Goldman M, Bijlmer R, de Ventner S. High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. *J Infect Dis* 1995; 171: 229–239.
 129. Kõks S, Kingo K, Vabrit K, Ra˘tsep 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.
 130. 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
 131. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
 132. Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) *locus*. *Genes Immun*. 1999; 1: 151-155.
 133. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly R. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2001; 166: 3915-22.
 134. Misch EA, Berrington WR, Vary JC Jr, Hawn TR.. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 7: 589-620.
 135. World Health Organization. Global leprosy situation, 2007. *Weekly Epidemiol Rec* 2007; 82: 225-32.
 136. Schewe C, Inter-laboratory validation of PCR-based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch*. 2005; 447: 573-585.
 137. Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffinembedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem*. 2002 50:1005-1111.

138. Fan HM, Wang Z, Feng FM, Zhang KL, Yuan JX, Sui H, et al. Association of TNF- α -238G/A and 308 G/A gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among patients with coal worker's pneumoconiosis. *Biomed Environ Sci*. 2010; 23: 137-45.
139. Settin A, Hassan H, El-Baz R, Hassan T. Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile Delta of Egypt. *Acta Dermatovenereol Alp. Panonica Adriat*. 2009; 18: 105-12.
140. Vejbaesya S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. TNF α and NRAMPI polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thai*. 2007; 90: 1188—1192.
141. Knight, J.C., Keating, B.J. & Kwiatkowski, D.P. Allele-specific repression of lymphotoxin- α by activated B cell factor-1. *Nat. Genet*. 2004; 36:394–399
142. Deanna A, Hagge, Bernadette M, Saunders, Gigi J. Ebenezer, Nashone A et al. Lymphotoxin- α and TNF Have Essential but Independent Roles in the Evolution of the Granulomatous Response in Experimental Leprosy. *Immunopathology and Infectious Diseases*. 2009; 174: 1379-1389
143. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, et al. 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; 10: 174-80.
144. Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serumcytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol* 1998; 37: 733-740.
145. 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.
146. Kube D, Platzer 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.
147. 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.

Resumo

Visando contribuir para o melhor entendimento do papel dos polimorfismos em genes de citocinas na susceptibilidade para hanseníase, foi conduzido um estudo de associação do tipo caso-controle investigando polimorfismos de base única (SNPs) nas regiões promotoras dos genes IL10 (-819C>T, -1082A>G, -2763A>C, -2849A>G e -3575T>A) e TNF (TNF-308G>A) e no gene LTA (LTA+80C>A e LTA252A>G). Amostras de DNA genômico foram obtidas de 545 pacientes com hanseníase e 380 controles, provenientes do Estado de São Paulo. As genotipagens foram feitas pelas técnicas de PCR e polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). Para as análises estatísticas foram calculadas as frequências alélicas, de genótipos e de portadores para cada polimorfismo avaliado. As frequências de haplótipos foram estimadas por meio do método de máxima verossimilhança. Desvios da lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados empregando testes de Qui-quadrado. Modelos de regressão logística com cálculo de odds ratio (OR) e *p*-valor com ajustes para as co-variáveis gênero e etnia foram utilizados nas comparações das frequências entre casos e controles. Em análise isolada, os polimorfismos TNF-308G>A e LTA252A>G não apresentaram associação significativa com a doença, já para o polimorfismo LTA+80C>A, os genótipos AA e CA mostraram-se marginalmente associados com OR de proteção (0,68 e 0,80, respectivamente e mesmo *p*-valor corrigido=0,07) para hanseníase *per se*. Confirmando ainda o sentido desta associação, a análise de carreador para o polimorfismo no *locus* LTA+80 mostrou associação com proteção para hanseníase *per se* para os carreadores do alelo A (OR=0,78; *p*-valor corrigido=0,04). Na análise de haplótipos, LTA+80A/LTA+252A/TNF-308G foi também associado com proteção (OR=0,74; *p*-valor corrigido=0,02). Para a região promotora do gene IL10, o SNP -819C>T foi associado com suscetibilidade para hanseníase *per se* para os genótipos TT (OR=1,58; *p*-valor=0,05) e CT (OR=1,36; *p*-valor=0,05). Esta associação foi confirmada na análise de carreadores para o alelo -819T sem correção (OR=1,40; *p*-valor=0,02) e com correção (OR=1,39; *p*-valor=0,03). Nas análises haplotípicas da região promotora do gene IL10, os haplótipos 819C/-2763A/-2849A/-3575T e -819T/-2763C/-2849G/-3575T apresentaram maior frequência entre pacientes indicando associação de susceptibilidade significativa para a doença (OR=2,63; *p*-valor=0,016 e OR=1,40; *p*-valor=0,01, respectivamente). Os dados oriundos deste estudo indicam que: o alelo LTA+80A deve estar associado com proteção para

hanseníase *per se* na população estudada, efeito este que pôde ser confirmado para o haplótipo LTA+80A/LTA+252A/TNF-308G; isoladamente, os *loci* TNF-308 e LTA+252 não foram associados com a doença; o alelo -819T da região promotora do gene IL10 está associado com suscetibilidade para hanseníase em análise de genótipo e carreadores, confirmado na análise de haplótipos por 819T/-2763C/-2849G/-3575T.

Abstract

To the better understanding of the role of genetic polymorphisms at cytokines genes on leprosy susceptibility, we conducted a case-control association study investigating single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at promoter region of IL10 (-819C>T, -1082A>G, -2763A>C, -2849A>G and -3575T>A) and TNF genes (TNF-308G>A) and LTA gene (LTA+80C>A e LTA252A>G) gene. Genomic DNA samples were obtained from 545 leprosy patients and 380 controls, from State of São Paulo. Genotyping were done by PCR followed by restriction fragments length polymorphisms (RFLP) analyses. For statistical analyses were calculated allelic, genotypes and carriers frequencies for each polymorphism. The haplotypes frequencies were estimated using maximum-likelihood estimation method. Chi-square tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were also performed. Logistic regression models for odds ratio (OR) and *p*-value calculations, with adjusting for the ethnicity and gender covariates, were performed in comparisons of frequencies. Isolated, TNF-308G>A and LTA252A>G were not significantly associated to the disease, while the CC and CA genotypes to LTA+80C>A locus were marginally associated with protection (0.68 e 0.80, respectively and identical corrected *p*-value=0.07) for leprosy *per se*. In the same line, carrier analysis for LTA+80 *locus* showed association with protection for leprosy *per se* for allele A carriers (OR=0.78; corrected *p*-value=0.04). In the haplotype analysis, LTA+80A/LTA+252A/TNF-308G was also associated to protection (OR=0.74; corrected *p*-value=0.02). From IL10 promoter region analysis, -819C>T SNP was associated with susceptibility to leprosy *per se* to TT (OR=1.58; *p*-value=0.05) and CT genotypes (OR=1.36; *p*=0.05). This association could be confirmed in the carriers analysis for -819T allele (OR=1.40; *p*-value=0.02 and OR=1.39; corrected *p*-value= 0.03). From haplotypic analysis for IL10 promoter region, 819C/-2763A/-2849A/-3575T and -819T/-2763C/-2849G/-3575T haplotypes showed higher frequencies in patients indicating a significant susceptibility for leprosy (OR=2.63; *p*-valor=0.016 and OR=1.40; *p*-valor=0.01, respectively). Data from this study show that: LTA+80A allele might be associated with protection for leprosy in this population and this effect was confirmed by analysis for LTA+80A/LTA+252A/TNF-308G haplotype; isolated, TNF-308 and LTA+252 *loci* were not associated with the disease; -819T allele at IL10 promoter region was associated to leprosy susceptibility in the genotype and carriers analysis, confirmed in haplotype analysis by 819T/-2763C/-2849G/-3575T.

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, São 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 (2009) 10, 174–180; doi:10.1038/gene.2008.97; published online 25 December 2008

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/HLA-DRB1*, *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

⁵These authors contributed equally to this work.

Received 16 September 2008; revised and accepted 18 November 2008; published online 25 December 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 Caucasoïd 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	1.28 (0.10)	1.28 (0.11)
		C ^b	0.66		
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		
		A	0.70		
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	1.11 (0.53)	1.07 (0.67)
		C ^b	0.75		
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	1.1 (0.65)	1.07 (0.76)
		G ^b	0.83		
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	0.99 (0.99)	0.93 (0.69)
		T ^b	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.

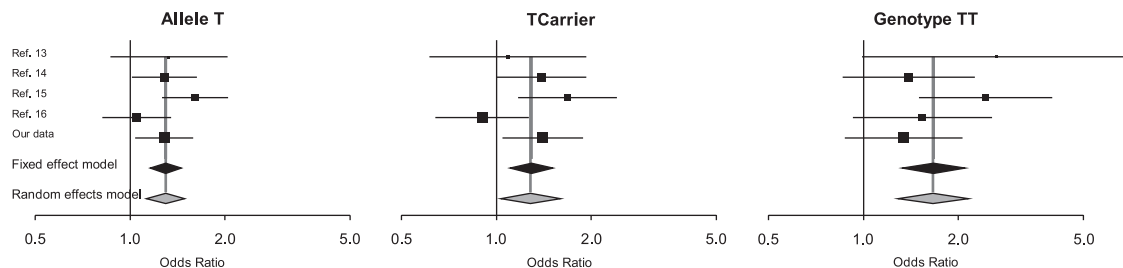


Figure 1 Meta-analysis of five leprosy case-control studies using the SNP IL-10 -819T/C including present data. Meta-analysis was performed under both fixed-effect and random models. Bars represent 95% CI and boxes represent OR values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled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

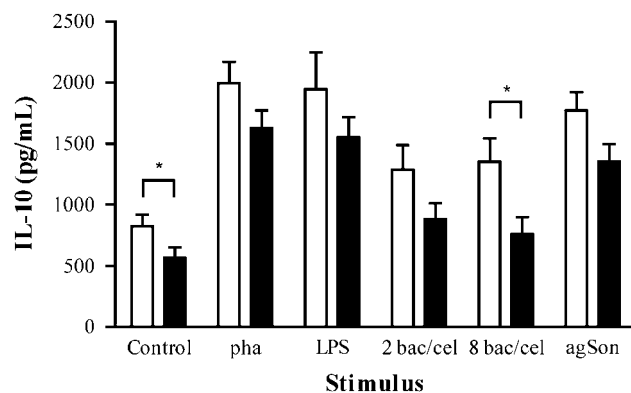


Figure 2 IL-10 production by PBMC according to the -819C/T individual genotypes. PBMC cultures were performed for 48 h with $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phytohemagglutinin-M (PHA), $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS), whole *M. leprae* at two bacilli per cell (Ag2) or eight 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, mestizos 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 μl 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, 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; **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>)

***TNF* -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among
Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis and functional study**

**Cynthia C Cardoso^{1*}, Ana Carla Pereira^{2*}, Vânia N Brito-de-Souza², Sandra MB
Duraes³, Marcelo Ribeiro-Alves¹, José Augusto C Nery¹, Ângela S Francio⁴,
Patrícia R Vanderborght¹, Francisco PC Parelli^{2,5}, Andrea Alter⁶, Jorge Luís
Salgado⁷, Elizabeth P Sampaio¹, Adalberto R Santos⁷, Maria Leide WR Oliveira⁸,
Euzenir N Sarno¹, Erwin Schurr⁶, Marcelo T Mira⁴, Antônio G Pacheco⁹, Milton O
Moraes¹**

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 Research Institute of the McGill University Health Center, McGill Center for the Study of Host Resistance, Departments of Medicine and Human Genetics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

7 Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

8 Pós-Graduação em Dermatologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

9 Programa de computação Científica (PROCC) - FIOCRUZ - Rio de Janeiro, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Milton Ozório Moraes
Laboratório de Hanseníase - FIOCRUZ
Av. Brasil 4365 - Manguinhos
Rio de Janeiro – RJ - CEP: 21040-360
Phone: (21) 25621556 - Fax: (21) 22709997
e-mail: mmoraes@fiocruz.br

Footnotes

We would like to thank FIOCRUZ, CNPq, CAPES and FAPESP for financial support.

The authors declare no conflicts of interest.

Abstract (145 words)

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Tumor necrosis factor (TNF) plays a key role in the host response. Some association studies have implicated the single nucleotide polymorphism *TNF* -308G>A in leprosy susceptibility, but these results are still controversial. Here, we first conducted four association studies (2,639 individuals) which showed a protective effect of the -308A allele (OR=0.77; p=0.005). Next, results of a meta-analysis reinforced this association after inclusion of our new data (OR=0.74; p=0.04). Furthermore, a subgroup analysis including only Brazilian studies suggested that the association is specific of this population (OR=0.63; p=0.005). Finally, functional analyses using whole blood cultures showed that patients carrying the -308A allele produced higher TNF levels after LPS (6h) and *M. leprae* (3h) stimulation. These results reinforce the association between *TNF* and leprosy and suggest the -308A allele as a marker of disease resistance especially among Brazilians.

Keywords: TNF, leprosy, SNPs, meta-analysis.

Introduction (3,496 words until the end of discussion)

Leprosy is a human infectious disease which affects more than 200.000 individuals per year worldwide [1]. It is caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular bacterium with a unique tropism for macrophages in skin and Schwann cells in peripheral nerves [2]. 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 [3]. Furthermore, the recently described low variability of *M. leprae* [4] contrasts with the wide range of susceptibilities from the successful blockage of *M.leprae* uptake to a clinical form exhibiting high bacillary loads, suggesting that disease variation could be mainly attributed to the genetic diversity of the host.

Leprosy has been extensively studied including twins and families, which have confirmed the genetic component in leprosy [5-7]. Subsequent association and linkage studies have implicated several genes such as *HLADRB1*, *PARK2/PACRG*, *IL10* and *LTA* and also chromosomal regions such as 10p13 in the susceptibility to leprosy *per se* [8-10]. Meanwhile, genes coding for ninjurin and toll-like receptors were implicated with disease phenotypes such as neuritis and leprosy reactions [11,12]. In a matter of fact, most of the genes consistently associated with leprosy *per se* until today are clustered in the 6p21 region [3,13-14]. The importance of the *TNF* locus in leprosy susceptibility has been demonstrated both by family or population-based studies [3] and afterwards, genome-wide association (GWA) studies confirmed the previously reported associations of the HLA/TNF genes in the Chinese [15] and Indian populations [16].

The TNF/LTA genes are juxtaposed within class III HLA and code for the cytokines tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin-alpha (LTA), which were clearly implicated in immunity against *M. leprae*. A recent study using knockout mice showed that these cytokines have complementary roles in the granuloma formation and maintenance. More specifically, LTA seems to regulate granuloma formation while TNF is responsible for its integrity [17]. In a *Mycobacterium marinum* granuloma model, TNF abrogation caused increased mortality either when innate or adaptive immunity is at work [18].

The single nucleotide polymorphism (SNP) located at the -308 site of the *TNF* promoter region (*TNF* -308G>A), has been the most common target of the association studies. Nevertheless, these results are controversial, and the association between this SNP and leprosy still needs further investigation [3]. The present study provide new evidence of an association between *TNF* -308A and protection against leprosy especially among Brazilians. Functional studies also showed that the -308A carriers produced higher TNF levels in cultures stimulated with *M. leprae* or LPS.

Materials and methods

Subjects and study design: four association studies between the SNP *TNF* -308G>A and leprosy susceptibility using both family-based and case-control study designs were conducted. 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 (RIO), located in the Brazilian Southeastern region. Then, additional 42 pedigrees (comprising 54 nuclear families, 168 individuals) were recruited

from the Prata colony, located in the Pará State, North region of Brazil. For the case-control analyses, two independent populations from the Southeast region of Brazil were selected. The first study was an extension of the case-control study reported by Santos and colleagues (2002) and included a total of 778 leprosy cases diagnosed and treated at the Souza Araújo Clinic at Fiocruz, also located in RIO. The control group comprised 661 unrelated individuals selected among blood donors who lived in the same endemic area as the cases. The second case-control study included 368 cases selected from an Out-Patient Unit at Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, located in São Paulo State. The control population (375 individuals) was selected following the same criteria described for the RIO study. All studies were conducted concomitantly. Leprosy diagnosis was determined by experienced professionals according to Ridley and Jopling classification [19]. The patients were also 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 the populations are described in Table 1. All samples were genotyped for the SNP *TNF* -308G>A and the control populations were also genotyped for *LTA* +80C>A and *LTA* +252A>G to define the linkage disequilibrium patterns. All analyses were performed using leprosy *per se* as outcome regardless the clinical form. Results of the four studies were represented independently and also combined in an overall analysis.

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 (F) and reverse (R) 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’ (-308G, labeled with VIC), and 5’-CCC GTC CTC ATG CC-3’ (-308A, labeled with FAM). PCR reactions were performed in the ABI Prism 7000 and 7500 Sequence Detection Systems using the standard cycling conditions (Applied Biosystems, CA, USA). The SNPs at *LTA* +80 and +252 sites were genotyped by PCR-RFLP. PCR reactions were conducted in a final volume of 25 µL containing 1U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA) in 1X of the supplied buffer, 0.3 uM of each primer, 0.2mM of dNTPs, 1.5mM of MgCl₂, and 50-100 ng of genomic DNA. The primers used for the amplification were 5’-AAG GTG AGC AGA GGG AGA CA-3’ (*LTA*+80F), 5’-GCT TCG TGC TTT GGA CTA CC-3’ (*LTA*+80R), 5’-CCG TGC TTC GTG TTT GGA CTA-3’ (*LTA*+252F) and 5’-AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT C-3’ (*LTA*+252R). The cycling conditions were: 94°C (3’) followed by 35 cycles of 94°C (45’’); 62°C for *LTA* +252 or 53°C *LTA* +80 (45’’) and 72°C (1’) and 72°C (5’). PCR products were digested *overnight* with 3U of the restriction enzymes *Bse*YI and *Nco*I (New England Biolabs), which cleaves the +80A and +252G alleles, respectively. SNP genotyping was performed by restriction fragment analysis in a 3.5% agarose gel.

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 July 2010. 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 et al [20], 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 July 2010 (2) it was not related to previous publications, and (3) it provided enough data (total counts of each genotype in the case-control 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).

Functional analyses of TNF secretion according to -308G>A genotypes

A total of 30 borderline tuberculoid (BT) patients was included in the functional analysis. Whole blood was diluted 1:4 and 1 mL was plated in 24-well plates in duplicates. The cultures were stimulated with LPS (1 ng/ml) and whole irradiated *M. leprae* (1 µg/ml) kindly provided by Dr. Patrick Brennan (Colorado State University, Fort Collins, USA). Cultures were incubated for 1h, 3h, 6h, 12h and 20h. Then, cellular suspensions were transferred to eppendorf tubes and harvested by centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes at 4°C. Cell-free supernatants were stored at –20°C until further use. The TNF concentration in culture supernatants were determined using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to manufacturer specifications.

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. Linkage disequilibrium was measured by the r^2 statistics [21]. All analyses were performed using the statistical software R for Windows version 2.9.2 [22] with 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 was 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 [23]. 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 [20]. 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 [24]. First, we have performed a meta-analysis including only published studies. Then, we conducted a new meta-analysis including the data of the four additional studies described in this paper. Next, a subgroup analysis was performed including only Brazilian subjects. This subgroup analysis was also conducted including or not the present data. All analyses were carried out with R for Windows 2.9.2 with the packages "tdthap", "catmap" and "meta".

Functional Data Analysis: Welch Two Sample t-tests were applied for differences of means of TNF production by whole blood cells between SNP -308A carriers (GA+AA, n=14), and non-carriers (GG, n=16), after stimulation by LPS or whole *M. leprae*. Statistical significance was set to p-value ≤ 0.05 . Data are represented by Mean $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean).

Results

Case-control studies

Results of the family-based analyses are shown in Table 2. No association was found when the frequencies of the alleles transmitted and non-transmitted to the affected individuals were compared by TDT in the RIO population ($p = 0.55$). Nevertheless, results of the Prata Colony demonstrated an association between -308A and protection against leprosy (5 transmitted vs 14 non-transmitted; $p = 0.04$). Similar results were

observed in the case-control studies (Table 3). In the RIO population, the OR values suggested a protective effect for -308A in all comparisons performed, especially for the -308A carriers (OR = 0.75; $p = 0.02$). However, these results did not reach statistical significance after adjustment for non-genetic covariates. In the particular case of the Bauru case-control, despite the higher frequency of the -308A allele in the control population and the OR values suggesting protection, results were not statistically significant either before or after adjustment. On the other hand, when the data of the four studies were analyzed together using a meta-analysis model, the statistical power was increased and the association between the -308A allele and protection against leprosy was clearly observed, with a pooled OR of 0.77 (95% CI = 0.65 - 0.92; $p = 0.005$).

Systematic review and meta-analysis

We found a total of nine studies in which the association between the *TNF* -308G>A SNP and leprosy susceptibility was analyzed. From these, seven were population-based studies (case-control) conducted among Indians [25], Brazilians [26-28], Malawians [29], Thais [30] and Nepalese [31] and two studies used the family-based design [32,33] to define the association between this SNP and leprosy in Brazilian families. Since the previous data of our group [26, 27] were partially overlapped, the study by Santos et al 2000 [26] was excluded. The Indian TDT study [33] was also excluded because the crude data were not available. All other studies were considered eligible for meta-analysis according to our established criteria and results of the 7 selected studies are summarized in Supplementary Table 1. No statistical evidence of publication bias was detected when the Egger's test for funnel plot asymmetry was applied ($p=0.28$).

Results of the meta-analysis are summarized in Table 4 and Figure 1. 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, the results were not statistically significant (pooled OR = 0.72; $p=0.16$; Figure 1A). Next, the meta-analysis was repeated including data from the four additional studies reported here. Since the present case-control of the RIO population was designed as an extension of the study by Santos and colleagues (2002), this study [27] had to be excluded to avoid the analysis of overlapping data. Results of this meta-analysis confirmed the protective effect of the -308A allele (Figure 1B), with statistically significant OR values showing an association of the -308A allele with protection against leprosy (OR = 0.55; $p = 0.04$). When a subgroup analysis was conducted using only studies of the Brazilian population (Table 4), a significant association between the -308A allele and protection against leprosy was observed either before (pooled OR = 0.44; $p=0.009$; Figure 1C) or after inclusion of the present data (OR = 0.63; $p = 0.005$; Figure 1D).

Results of the pairwise linkage disequilibrium analysis conducted in the control groups of Bauru and RIO populations indicated that the SNPs *TNF* -308, *LTA* +80 and *LTA* +252 belong to different bins ($r^2 < 0.5$ in all pairwise comparisons). Similar results were found in the family-based designs. Furthermore, results of multivariate logistic regression models including *LTA* +80 and *TNF* -308 also indicated that these SNPs have independent effects (data not shown).

Finally, we tested the functionality of *TNF* -308G>A SNP to affect TNF secretion in vitro. We stimulated whole blood samples from BT patients and found that the -308A carriers produced higher TNF levels in cultures stimulated with either LPS at 6h ($3,982 \pm 717$ vs $2,053 \pm 310$ pg/mL; $p = 0.02$; Figure 2A) or *M. leprae* at 3h (544 ± 67 vs 357 ± 53 pg/mL; $p = 0.04$; Figure 2B).

Discussion

TNF exhibits a broad range of actions participating either in the resistance or in the immunopathology observed in leprosy. While a high TNF/IL-10 ratio was shown to be higher among resistant household contacts, supporting a role for TNF in the resistance to *M. leprae* [34], exacerbated TNF levels were also correlated with inflammatory reactions and neuropathy along the natural course of the disease [35, 36].

Linkage studies have strongly suggested the genetic influence of the 6p21 region, especially the *TNF/LTA* locus in leprosy susceptibility [32, 37]. Despite the conflicting results obtained from candidate-gene approaches, results of the two GWA studies performed in leprosy [15,16] showed that the HLA/TNF region provided the highest number of associated SNPs in both screenings. Nevertheless, no information about the *TNF* -308G>A SNP (rs1800629) was available in these studies.

The main objective of the present paper was to clarify the ambiguity and describe a definitive role for the SNP *TNF* -308G>A in leprosy outcome. For this purpose, we have developed four independent association studies using not only different populations, but also different study designs as a way to validate our results. As a matter

of fact, case-control studies frequently have higher statistical power as compared to family-based studies simply because it is easier to collect samples from unrelated individuals and also because a family is not informative for the TDT test unless the parents are heterozygotes. This latter issue is particularly challenging when the SNP under investigation has a low frequency, as -308G>A. On the other hand, the results of a case-control study are more prone to selection bias, especially because the definition of the control population is not always clear. Thus, as a general rule, when the same effect is observed in both case-control and family-based designs, this concordance improves the reliability of the results.

Although the association of -308A allele was more prominent in the Prata Colony, the estimates showed a protective effect for the allele in almost all samples analyzed. The only exception was the TDT analysis from RIO, in which no association was observed. Despite this discrepant result, the risk estimates obtained from an overall analysis of the four studies indicated a clear protective effect for -308A. Then, a meta-analysis was conducted to combine all published data ($N \sim 3,599$). After the inclusion of the 2,639 individuals from our case-control and family-based studies ($N \sim 5,843$ after exclusion of the data by Santos [27]), results of the meta-analysis confirmed the protective effect, with a p-value of 0.04. Nevertheless, the majority of Brazilian studies provided OR-values pointing towards protection in the meta-analysis, suggesting a population-specific effect. Thus, we conducted a subgroup analysis including only Brazilian subjects and found a clear protective effect of the -308A allele before and after inclusion of the present data. In our experience meta-analysis is a very important tool to decrease ambiguity of underpowered studies [20, 38].

We recently demonstrated that the *IFNG* +874T allele is important to leprosy resistance [39], and now we show that *TNF* -308A also has a protective effect. Although there are different genes associated to leprosy outcome, it seems that they are clustered in overlapping pathways (*TNF/LTA* or *IFN- γ /IL-12* axis) indicating that protective responses to different infectious diseases share the same evolutionary strategies.

A possible explanation for the -308A association with leprosy could be the LD with another causative SNP. Indeed, the variation *LTA* +80C>A was associated with early-onset leprosy in different populations [40]. Nevertheless, our LD analyses showed that the *TNF* and *LTA* SNPs are not in the same bin, indicating that the -308G>A association with leprosy is independent.

In tuberculosis it is suggested that children and adults exhibit different diseases. In this scenario, a different set of SNPs in genes of the same pathways could be playing different roles in each disease outcome [41]. The age-specific effect of *LTA* +80A associated with leprosy was not detected among Brazilians [40] probably because most of case-control studies in Brazil recruit few young individuals. In fact, a review of the studies used in our meta-analysis showed that the mean age of subjects among Brazilian studies was around 40 y/o. Thus, assuming an age-dependent model similar to the observed in tuberculosis, if the age indeed influences the effect of the SNPs at *TNF/LTA* locus, the more prominent effect observed among Brazilians could be attributed to the mean age of the populations under analysis. In this case, the *TNF* -308A SNP might be a marker of leprosy resistance among adults while *LTA* +80A exerts its effect among children.

The functional analyses using whole blood cells from BT patients showed higher TNF levels among -308A carriers after *M.leprae* and LPS stimulus. To date, some reports have associated the -308A allele with higher TNF releases while other studies indicated the -308A allele had no effect [3, 42-44]. Nevertheless, it has been suggested that *TNF* -308A may affect the binding of transcription factors [44-47]. Despite the clear limitations of the functional studies using single *TNF* promoter SNPs, especially considering the LD between *TNF*, *LTA* and HLA alleles, it is clear that the -308A allele is a marker for higher levels of TNF secretion in some *in vitro* assays such as ours. Moreover, we had previously demonstrated that *TNF* -308A carriers had a stronger inflammatory response to *M. leprae* antigens in the skin [48]. Thus, it is likely that a genetic variation slightly increasing TNF levels could be advantageous by maintaining granulomas and restricting *M. leprae* growth [49].

The genetic and epidemiological results presented here indicate consistent protective effect of the -308A allele in leprosy, denoted by an association with resistance and increased production among patients. Despite the clear evidence of a genetic heterogeneity component in leprosy susceptibility, our data showed an evident role of *TNF* variations in leprosy outcome.

Figure legends

Figure 1: Meta-analysis of the studies in which the association between the SNP *TNF* -308G>A and leprosy susceptibility was assessed. First, a meta-analysis was performed including all published data (A) and also the present data (B). Then, a subgroup analysis was conducted including the Brazilian studies available in the literature either alone (C) or combined with the present data (D). Results are shown for the random effects model. Bars represent 95% CI and boxes represent the OR values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled results. CI = confidence interval; OR, odds ratio. Fb = family-based. Pb = population-based.

Figure 2: TNF production by whole blood cells (WB) in -308A carriers and non-carriers. WB was cultured for 3-20h with: (A) lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* (LPS, 1 ng/mL) or, (B) sonicated *M. leprae* antigen (1 µg/mL). Results were represented as the TNF concentration in pg/mL. Bars represent the mean value + standard error of each group. *TNF* -308A carriers (G/A+A/A, white bars, n = 14) and non-carriers (G/G, black bars, n = 16) were tested. Statistically significant differences were observed 6h after LPS stimulation and 3h after *M. leprae* stimulation. *p < 0.05 according to the Welch Two Sample t-test.

References

1. Global leprosy situation, 2009. *Wkly Epidemiol Rec* **2009**;84:333-40.
2. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* **2004**;363:1209-19.
3. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR and Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* **2006**;77:189-202.
4. Monot M, Honoré N, Garnier T, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* **2009**;41:1282-9.
5. 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**;42:256-66.
6. Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B and Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet* **1995**;56:1179-85.
7. Lazaro FP, Werneck RI, Mackert CC, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis* **2010**:1598-605.
8. Alter A, Alcais A, Abel L and Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet* **2008**;123(3):227-35.
9. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, et al. 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**;10:174-80.
10. Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet* **2010**;127:337-348.

11. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis* **2008**;197:253-61.
12. Cardoso CC, Martinez AN, Guimaraes PE, et al. NINJURIN 1 Asp110Ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol* **2007**;190:131-8.
13. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* **2007**;8:320-4.
14. Alter A, Huong NT, Singh M, et al. Human Leukocyte Antigen Class I Region Single-Nucleotide Polymorphisms are Associated with Leprosy Susceptibility in Vietnam and India. *J Infect Dis* **2011**; 203(9):1274-81.
15. Zhang FR HW, Chen SM, Sun LD, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* **2009**; 361:2609-18.
16. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* **2010**;6:e1000979.
17. Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, et al. Lymphotoxin- α and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol* **2009**;174:1379-89.
18. Clay H, Volkman HE and Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* **2008**;29:283-94.
19. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1966**;34:255-73.

20. Pacheco AG, Cardoso CC and 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**;123:477-84
21. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* **1995**;29:311-22.
22. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, **2008**.
23. Kazeem GR, Farrall M. Integrating case-control and TDT studies. *Ann Hum Genet* **2005**;69:329-35.
24. Nicodemus KK. Catmap: case-control and TDT meta-analysis package. *BMC Bioinformatics* **2008**;9:130.
25. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* **1997**;176:530-2.
26. 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**;68:325-7.
27. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* **2002**;186:1687-91.
28. Franceschi DS MP, 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**;13:493-498.
29. 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**;71:330-40.

30. Vejbaesya S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P and Sermduangprateep C. TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thai* **2007**;90:1188-92.
31. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol* **2010**;71(10):992-8.
32. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS and Lins-Lainson Z. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* **2001**; 2:196-204.
33. Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AV and Pitchappan R. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet* **2006**;15:2880-7.
34. Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol* **2000**;51:419-28.
35. Moraes MO, Sarno EN, Teles RM, et al. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. *J Invest Dermatol* **2000**;115:935-41.
36. Smith WC, Nicholls PG, Das L, et al. Predicting neuropathy and reactions in leprosy at diagnosis and before incident events-results from the INFIR cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**;3:e500.
37. Mira MT, Alcais A, di Pietrantonio T, et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun* **2003**;4:67-73.
38. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* **2009**;27:173-86.

39. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet* **2010**;128(5):481-90.
40. Alcais A, Alter A, Antoni G, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* **2007**;39:517-22.
41. Alcais A, Fieschi C, Abel L and Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med* **2005**;202:1617-21.
42. Gallagher G, Moraes MO, Anaya JM. Tumor Necrosis Factor and Related Genes In: R K, ed. *Genetic Susceptibility to Infectious Diseases*. 1st ed. Vol 1. New York: OXFORD UNIVERSITY PRESS, **2007**:190-207.
43. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA and Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nat Genet* **2003**;33:469-75.
44. Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK and Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet* **2009**;17:1454-62.
45. Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* **2000**; 12:110-9.
46. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* **1997**; 34:391-9.

47. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**; 94: 3195-9.
48. Moraes MO, Suffys PN, Santos AR, et al. 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**; 53:45-7.
49. Cardoso, CC, Pereira AC, Marques SM, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity and disease outcome. *Fut Microbiol.* (in press)

Table 1: General characteristics of the individuals included in the association studies.

	Family-based studies				Case-control studies			
	RIO		Prata Colony		RIO		Bauru	
	Affected	Unaffected	Affected	Unaffected	Cases	Controls	Cases	Controls
Age (mean ± SD)	32 ± 16	-	21 ± 15	-	38.7 ± 16.9	33.5 ± 9.6	39.5 ± 17.6	35.9 ± 10.7
<u>Sex</u> ^a								
Female	109 (0.54)	122 (0.57)	95 (0.55)	43 (0.50)	288 (0.37)	294 (0.44)	110 (0.29)	128 (0.34)
Male	94 (0.46)	93 (0.43)	77 (0.45)	43 (0.50)	490 (0.63)	367 (0.56)	265 (0.71)	252 (0.66)
<u>Ethnicity</u> ^a								
Caucasoids	81 (0.48)	75 (0.35)	16 (0.11)	12 (0.17)	307 (0.52)	372 (0.56)	303 (0.81)	240 (0.65)
Mestizoes	50 (0.30)	64 (0.30)	108 (0.71)	42 (0.61)	221 (0.37)	189 (0.29)	48 (0.13)	104 (0.28)
Blacks	37 (0.22)	75 (0.35)	28 (0.18)	15 (0.22)	66 (0.11)	100 (0.15)	23 (0.06)	28 (0.07)
<u>WHO classification</u> ^a								
Paucibacillary	76 (0.61)	-	94 (0.62)	-	300 (0.40)	-	74 (0.22)	-
Multibacillary	48 (0.39)	-	57 (0.38)	-	451 (0.60)	-	259 (0.78)	-

^a Results are shown as N (frequency). The number of individuals in each parameter may be different from the total number of genotyped patients due to

Table 2: Summary of the results obtained from the family-based association studies.

Population	Allele	Frequency	Transmitted	Not-transmitted	Z (p-value) ^a
RIO	A	0.12	19	20	-0.6 (0.55)
	G	0.88	20	19	0.6 (0.55)
Prata Colony	A	0.07	5	14	-2.065 (0.04)
	G	0.93	14	5	2.065 (0.04)

^a results of the transmission-disequilibrium tests are shown for the additive model.

Table 3: Case-control analyses of the SNP *TNF* -308G>A in Rio de Janeiro (RIO) and Bauru populations.

<i>TNF</i> -308G>A	RIO				Bauru			
	Cases ^a	Controls ^a	OR (p-value)	OR (p-value) ^b	Cases ^a	Controls ^a	OR (p-value)	OR (p-value) ^b
AA	13 (0.02)	12 (0.02)	0.86	0.53	3 (0.01)	3 (0.01)	0.96 (0.96)	0.71 (0.68)
AG	137 (0.18)	148 (0.22)	0.74	0.78	63 (0.17)	82 (0.22)	0.74 (0.10)	0.74 (0.13)
GG	628 (0.81)	501 (0.76)	reference	reference	302 (0.82)	290 (0.77)	reference	reference
	778	661	(p = 0.07) ³	(p = 0.20) ³	368	375	(p = 0.26) ³	(p = 0.21) ³
Allele A	163 (0.10)	172 (0.13)	0.78 (0.14)	0.76 (0.19)	69 (0.09)	88 (0.12)	0.78 (0.30)	0.77 (0.28)
Allele G	1393 (0.90)	1150 (0.87)	reference	reference	667 (0.91)	662 (0.88)	reference	reference
A carriers	150 (0.19)	160 (0.24)	0.75 (0.02)	0.76 (0.09)	66 (0.18)	85 (0.23)	0.75 (0.11)	0.74 (0.12)

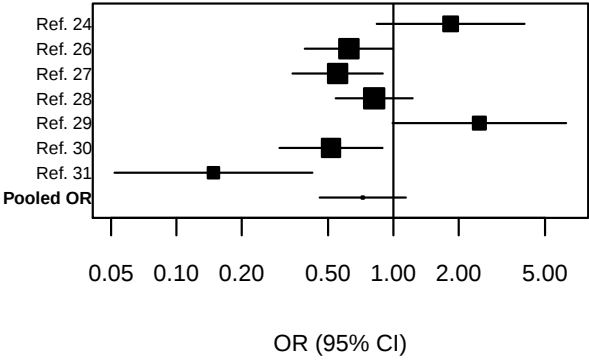
^a Results are shown as total counts (frequency). ^b OR and p-value calculated by logistic regression models and adjusted for the covariates gender, ethnicity and age. ³ Overall p-values for genotype comparisons (2 degrees of freedom).

Table 4: Summary of the results of the meta-analyses and subgroup analyses.

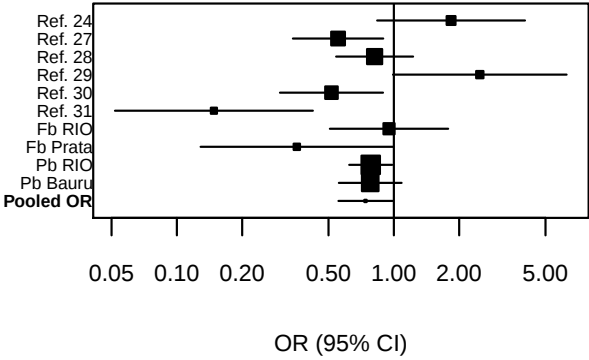
Studies included in the analysis ^a	Meta-analysis			Heterogeneity	
	Pooled OR	95% CI	p-value	χ^2	p-value
Published studies	0.72	0.46; 1.14	0.16	24.39	0.0004
Published studies and present data	0.74	0.55; 0.99	0.04	26.94	0.001
Brazilian studies (only published)	0.44	0.38; 0.71	0.009	6.13	0.05
Brazilian studies including present data	0.63	0.45; 0.87	0.005	13.14	0.02

Results are shown for the random-effects model. N = 7, 10, 3 and 6 studies and ~ 3,599, 5,846, 1,172 and 3,419 individuals, respectively. ^a When the present data were included, the study by Santos et al. (2002) had to be excluded to avoid the inclusion of overlapping data.

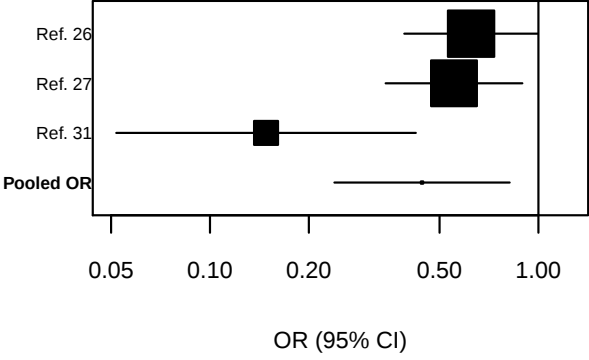
A



B



C



D

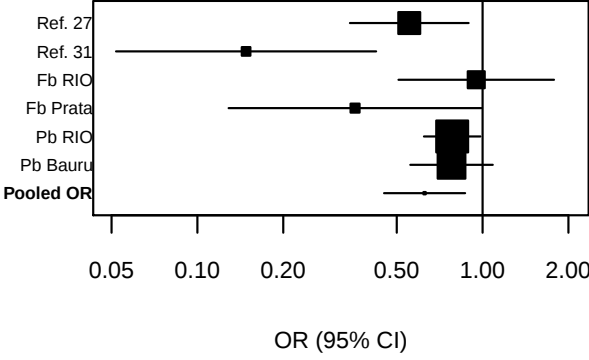
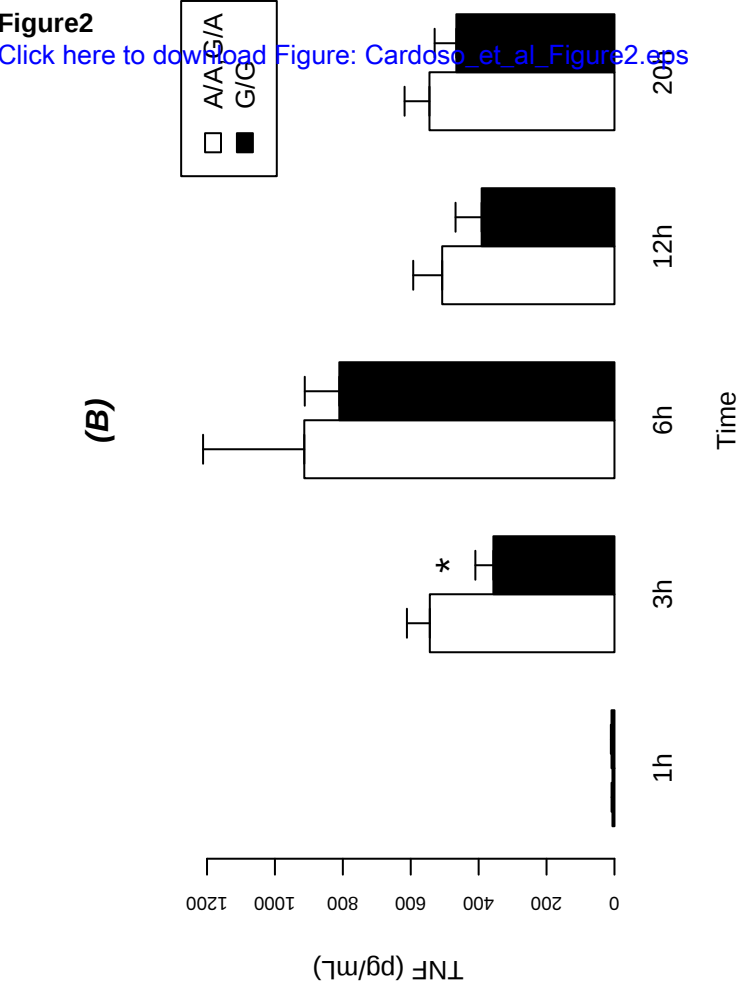
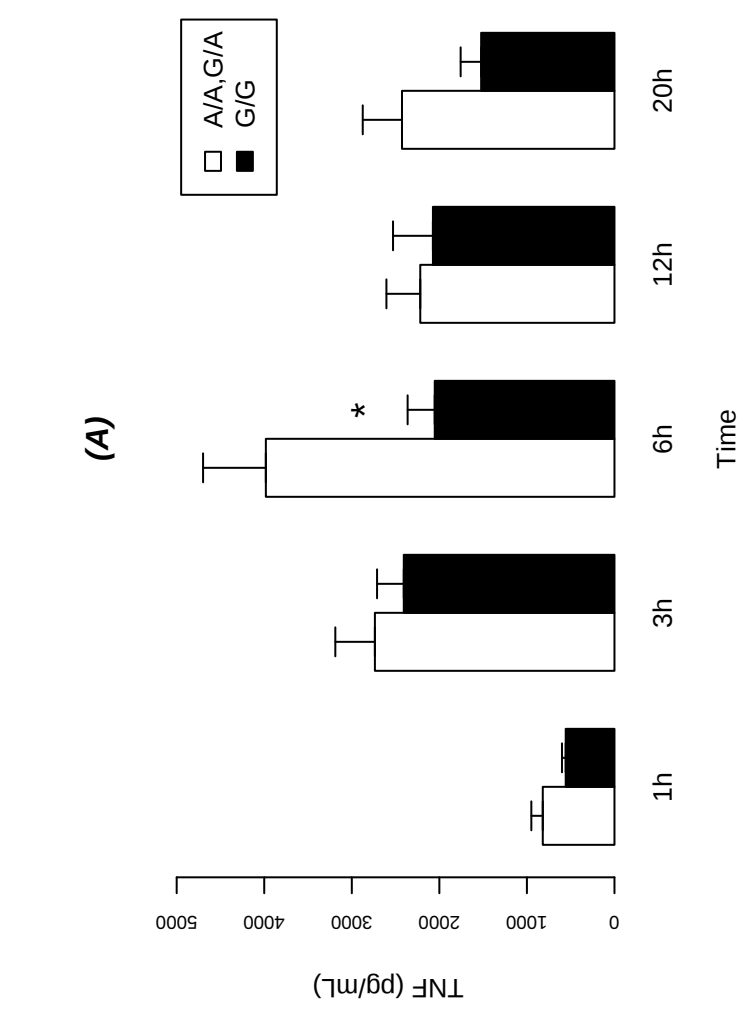


Figure2
[Click here to download Figure: Cardoso_et_al_Figure2.eps](#)



Supplementary table 1: Summary of the data obtained from the papers selected for the meta-analysis.

	Population	Study design	Sample size	Family-based studies ^b		Case-control studies ^b			
				-308A	-308A	Cases		Controls	
				transmitted	not-transmitted	-308A	-308G	-308A	-308G
Roy et al., 1999	Indian	Case-control	388	-	-	23	433	9	311
Shaw et al., 2001	Brazilian	Family-based	~ 376 ^a	4	27	-	-	-	-
Santos et al., 2002	Brazilian	Case-control	392	-	-	65	535	30	154
Fitness et al., 2004	Malawian	Case-control	948	-	-	44	388	63	453
Vejbaesya et al., 2007	Thai	Case-control	177	-	-	8	66	13	267
Franceschi et al., 2009	Brazilian	Case-control	404	-	-	26	304	64	414
Sapkota et al., 2010	Nepalese	Case-control	914	-	-	80	1560	17	171

^a The total number of individuals included in the TDT analysis was not clearly defined in the paper by Shaw and colleagues (2001). ^b Results are shown as total counts of each allele. When the present data were included, the study by Santos et al. (2002) had to be excluded to avoid the inclusion of overlapping data.