

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular

**ASSOCIAÇÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE
E EPISÓDIOS REACIONAIS**

Carolinne de Sales Marques

Rio de Janeiro

2014

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

M357 Marques, Carolinne de Sales

Associação de genes da resposta imune na Hanseníase e episódios reacionais / Carolinne de Sales Marques. – Rio de Janeiro, 2014.

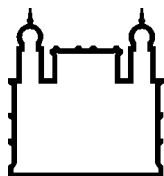
xvi, 160 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 112-125

1. Hanseníase. 2. Susceptibilidade genética. 3. Polimorfismos. 4. Citocinas. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular

Autora: Carolinne de Sales Marques

ASSOCIAÇÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE E EPISÓDIOS REACIONAIS

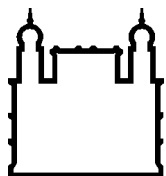
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Guilherme Pacheco

Rio de Janeiro

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Carolinne de Sales Marques

ASSOCIAÇÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE E EPISÓDIOS REACIONAIS

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Guilherme Pacheco

Aprovada em: 16/06/2014

EXAMINADORES:

Dra. Joseli Lannes-Vieira – IOC/Fundação Oswaldo Cruz – Presidente

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

Dr. Flávio Alves Lara – IOC/Fundação Oswaldo Cruz – Titular

Dra. Danuza Esquenazi – IOC/Fundação Oswaldo Cruz – Suplente

Dra. Cynthia Chester Cardoso – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Suplente

Rio de Janeiro, Junho de 2014

Aos meus pais Washington e Célia, pelo apoio e amor infinitos.

Agradecimentos

À minha família. Aos meus pais por constituírem o meu alicerce, e o maior exemplo de vida que me guia em todas as decisões. Sem o incentivo de vocês jamais teria alcançado esse objetivo. Aos meus irmãos Cari, Gui e Gu, que são meu grande tesouro. Levo-os comigo sempre. Espero que a minha trajetória sirva como guia para que possam trilhar um caminho maravilhoso, seja ele qual for.

Ao meu querido orientador Dr. Milton Moraes, pela confiança, oportunidade e pelo exemplo como cientista. Agradeço por todo o apoio na realização desse trabalho, e espero que seja apenas mais um dentre os muitos que ainda virão. Agradeço também pela atenção e amizade, e pela contribuição imensurável no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Antonio Pacheco, pela orientação e por toda contribuição que foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço especialmente pelo auxílio nos desenhos de estudo, nas análises estatísticas, nas revisões cuidadosas dos artigos, e pelos ensinamentos em epidemiologia genética e grupos de estudos voltados para o ambiente R (“R-ando que se aprende”).

À Cynthia Chester pela tamanha colaboração direta nesse trabalho, especialmente por ter revisado de maneira tão especial todo esse manuscrito. Agradeço pela imensa paciência em tentar sempre esclarecer/discutir todas as minhas dúvidas, até mesmo naquelas que considera “pergunta de prova”. Obrigada também pela amizade, e pelos momentos de “grupo de auto-ajuda do R”.

À Dra Euzenir Sarno e a toda a equipe do Ambulatório Souza Araújo, pelo recrutamento de pacientes, disponibilização de amostras e informações, sem os quais seria impossível realizar esse trabalho.

À Dra Ana Carla Pereira e demais integrantes do Instituto Lauro de Sousa Lima agradeço pela colaboração e participação direta nos artigos. Ana obrigada pelos momentos de discussão que acrescentaram muito na minha formação, e pela parceria proveitosa e gratificante nas publicações.

Ao grupo do Dr. Marcelo Mira da PUC-Paraná, especialmente à Heloísa Salomão. Essas colaborações contribuíram de maneira crucial para fortalecer os resultados, e forneceram o suporte para a publicação dos trabalhos.

Da mesma forma, agradeço aos colaboradores Dr. Erneto Caffarena e Dr. João Hermínio (PROCC/FIOCRUZ) pela contribuição com os ensaios *in silico* de modelagem molecular, e aos Dr. Francisco Lana e Dr. Evaldo Amaral (UFMG) agradeço pela parceria e experimentos/resultados na população de Almenara-MG.

Um agradecimento especial à Lucia Elena, por todas as contribuições diretas e indiretas nesse trabalho, estando sempre disposta a discutir e ajudar em todos os aspectos. Obrigada pela sua parceria agradável de sempre, e sobretudo pela grande amizade que conquistamos e que espero ter pra vida inteira. Sem você finalizar esse trabalho seria certamente muito mais difícil.

Às amigas de laboratório Suelen, Paula e Fernanda Manta, agradeço pelo apoio de sempre, pelas conversas e momentos de alegria, como é bom poder contar com vocês! Aos demais amigos do Laboratório de Hanseníase, incluindo Alexandre, Valcemir, Thiago, Ohanna, Carolzinha, Lívia, Rafaela e aos agregados da sala 27, agradeço pelos ótimos momentos de convívio, tanto no laboratório quanto fora dele...foram muitos congressos e muitos brindes durante esse tempo.

Aos demais colegas e funcionários do Pavilhão de Hanseníase, em especial a Cristiane, Augusto e Andrea Sousa, cujas atividades são essenciais para viabilizar o desenvolvimento das atividades de pesquisa no nosso grupo.

Ao Dr. Erwin Schurr (McGill University Health Centre, Human Genetics, Montreal, Canadá) por ter me recebido de maneira tão atenciosa no seu grupo de pesquisa, e pela orientação durante a realização da minha etapa de Doutorado Sanduiche. Todos os conhecimentos adquiridos durante essa etapa contribuíram enormemente para a minha formação. Quanto ao crescimento pessoal, posso resumir a minha passagem por Montreal como fantástica, um capítulo a parte na minha vida. Agradeço a todos os colegas do laboratório, especialmente ao Vinícius Fava e à Marianna Orlova, pela orientação na condução dos experimentos e pela atenção dedicada a mim durante todo esse período no Canadá.

Às minha amigas do Rio, Renata, Luana, Vivi e demais da “Turma do Funil”, por todo o apoio e compreensão nos momentos difíceis durante essa jornada, e é claro por todos momentos bons em que brindamos juntos. Aos meus amigos da Bahia, posso dizer que cada um de vocês contribuiu de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

Ao CNPQ pelo suporte.

Seria impossível citar todos nesse espaço, assim gostaria de agradecer carinhosamente a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para esta conquista.

Por fim, agradeço especialmente ao meu grande amor Fabrício, pela felicidade que é ter você ao meu lado SEMPRE.

Índice

Lista de siglas e abreviaturas.....	x
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tabelas.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
 CAPÍTULO I - Introdução, Justificativa e Objetivos.....	1
I. INTRODUÇÃO.....	2
1. Hanseníase:Aspectos gerais.....	2
1.1. Epidemiologia.....	3
1.2. O <i>Mycobacterium leprae</i>	6
1.3. Transmissão.....	7
1.4. Diagnóstico.....	9
1.5. Formas Clínicas e Classificação.....	11
1.6. Episódios Reacionais e Neuropatia.....	13
1.7. Tratamento.....	16
2. Resposta Imune na Hanseníase.....	17
3. Genética e a Hanseníase.....	26
3.1. Genética e Doenças Infecciosas.....	26
3.2. Estratégias de Estudos Genéticos.....	28
3.3. Influência Genética na Hanseníase.....	31
3.3.1. Genes da Resposta Imune Inata	33
3.3.2. Genes da Resposta Adaptativa	37
3.3.3. Genética e Episódios Reacionais	38
II. JUSTIFICATIVA.....	41

III. OBJETIVOS.....	43
1. Objetivo Geral.....	43
2. Objetivos Específicos.....	43
 <i>CAPÍTULO II: Associação Genética e Funcional entre o Gene TLR1 e a Hanseníase.</i>	 44
 <i>CAPÍTULO III - Associação do Gene NOD2 na Hanseníase per se.....</i>	 58
 <i>CAPÍTULO IV - Susceptibilidade Genética e os Episódios Reacionais na Hanseníase.....</i>	 74
 <i>CAPÍTULO V – Discussão e Conclusões.....</i>	 99
1. Discussão complementar.....	100
1.1 Associação entre o <i>TLR1</i> +743G>A (N248S) e a hanseníase <i>per se</i>	102
1.2 Associação entre o gene <i>NOD2</i> e a hanseníase.....	105
1.3 Episódios reacionais na hanseníase e a associação do gene <i>IL6</i>	107
2. Conclusões.....	111
3. Referências Bibliográficas.....	112
<i>ANEXO I.....</i>	126
I. Artigo de Revisão: “Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity and disease outcome”	127

Lista de siglas e abreviaturas

1,25D₃: do inglês “1,25-dihydroxyvitamin”

25D₃: do inglês “25-dihydroxyvitamin”

3'UTR: região 3' não traduzida de um gene

5'UTR: região 5' não traduzida de um gene

BAAR: bacilo álcool-ácido resistente

BB: borderline-bordeline

BL: borderline-lepromatosa

BT: borderline-tuberculóide

CYP: enzimas da família do Citocromo P450, do inglês “Cytochrome P450”

CDS: sensor citoplasmático de DNA dupla-fita

DDX41: polipeptídeo caixa DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 41

DC-SIGN: receptor de células dendríticas, do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion

DN: dano neural

DNA: ácido desoxiribonucleico

ENH: Eritema Nodoso Hansênico, também denominada Reação do Tipo 2

ESAT-6: antígeno de secreção precoce de 6-kDa

ESX-1: sistema de antígeno de secreção precoce 1

GWAS: do inglês “Genome-Wide Association Studies”

HLA: antígeno leucocitário humano, do inglês “human leukocyte antigen”

HWE: equilíbrio de Hardy & Weinberg

I: hanseníase indeterminada

IFIT1: proteína induzida por interferon com repetições tetrapeptídicas 1

IFN I: interferon do tipo 1

IFN- γ : interferon-gama

IFN- β : interferon-beta

IFN- α : interferon-alfa

IL: interleucina

IL-1 β : interleucina 1 beta

IRF: fator de transcrição regulador de IFN

LAM: lipoarabinomanana

LL: lepromatosa

LPS: lipopolissacarídeo

LT- α : linfotoxina alfa

miRNA : microRNA

MB: multibacilar

MBL: lectina ligadora de manose

MSMD: Suscetibilidade Mendeliana a Doenças Micobacterianas

NRAMP: proteína associada à resistência natural de macrófagos, do inglês “natural resistance associated macrophage protein”

NOD: do inglês “Nucleotide-binding Oligomerization”

OASL: oligoadenilato sintetase “like”

OR: razão de chances, do inglês “Odds Ratio”

OMS: Organização Mundial de Saúde

PACRG: gene que compartilha o promotor do gene PARK2, do inglês “parkin co-regulated gene”.

PAMP: Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês “Pathogen-associated molecular patterns”

PARK2: gene que codifica a proteína parkina

PB: paucibacilar

PBMC: Célula Mononuclear do Sangue Periférico, do inglês “Peripheral Blood Mononucleated Cell”

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGL-1: glicolípídeo fenólico 1

PN: forma neural pura, também conhecida como hanseníase neurítica

PQT: poliquimioterapia

PRRs: Receptor de Reconhecimento de Padrões de Patógenos, do inglês “Pathogen Recognition Receptor”

RNA: ácido ribonucleico

RR: Reação reversa, também denominada Reação do Tipo 1

RXR: Receptor Retinóide X

SLC11A1: gene cuja sigla vem do inglês “Solute Carrier Family 11, Member 1”

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

TBK1: quinase de ligação a TANK1

TDT: Teste de Desequilíbrio de Transmissão

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

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

TDT: teste de desequilíbrio de transmissão

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

NOD: do inglês “Nucleotide-binding Oligomerization Domain Receptor”

TNF: fator de necrose tumoral

TT: tuberculóide

VD: Vitamina D

VDR: receptor da vitamina D

Lista de Figuras

Figura 1: Origem e disseminação da hanseníase no mundo.....	2
Figura 2: Taxas de incidência de hanseníase no mundo.....	4
Figura 3: Taxas de incidência da hanseníase por microregiões brasileiras em 2012.....	5
Figura 4: Formas clínicas da hanseníase.....	12
Figura 5: Principais vias de regulação da resposta imune inata na hanseníase.....	24
Figura 6: Interação hospedeiro-ambiente no curso das doenças infecciosas.....	28
Figura 7: Estratégias de estudos genéticos em doenças infecciosas.....	31
Figura 8: Influência genética no curso da hanseníase.....	32
Figura 9: Principais genes associados à hanseníase incluídos nas vias de resposta à doença.....	111

Lista de Tabelas

Tabela 1: Esquema padrão de tratamento para hanseníase recomendado pela OMS	17
--	----

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ASSOCIAÇÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE E EPISÓDIOS REACIONAIS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Carolinne de Sales Marques

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória. Estudos demonstram que a genética do hospedeiro pode influenciar no desfecho da doença em pelo menos em três etapas distintas: na hanseníase *per se*, no desenvolvimento das formas clínicas e nos episódios reacionais. Genes que participam da via principal de ativação da resposta imune inata a micobactérias tais como *TRL1/2* e *NOD2*, foram apontados como associados à hanseníase em diferentes populações, alguns desses estudos avaliando os episódios reacionais como desfecho. Entretanto, o efeito dessas associações na população brasileira merece maior investigação. Assim o objetivo geral desse projeto foi estudar a associação dos genes *TRL1* e *NOD2* na susceptibilidade à hanseníase *per se*, e a associação de sete genes candidatos da resposta imune nos episódios reacionais. Inicialmente foram realizados estudos caso-controle e em famílias, conduzidos em quatro populações de diferentes regiões do Brasil, para verificar o efeito de SNPs do *TLR1* na hanseníase. Os resultados mostraram a associação entre o *TLR1* +743A>G (equivalente à troca N248S) e risco à hanseníase *per se*, o que foi confirmado em todas as populações estudadas ($OR_{GG} = 1,51$, $p < 0,001$). Em seguida, a correlação genótipo-fenótipo foi avaliada, e o alelo +743G foi relacionado à redução da razão TNF/IL10, bem como à alteração no perfil eletrostático protéico (diminuição da eletronegatividade) em estudos *in silico*. Na segunda etapa do trabalho, foi desenvolvido um estudo multicêntrico incluindo cinco populações brasileiras de regiões distintas, onde foram avaliados genes candidatos à associação com a hanseníase, escolhidos com base no primeiro estudo de associação do genoma completo conduzido em chineses. Dentre os 36 marcadores avaliados, os SNPs rs8057341 no gene *NOD2* e rs4942254 no locus *CCDC-LACC1* exibiram efeito protetor à doença, e a análise combinada confirma a associação com proteção na população brasileira ($OR_{AA} = 0,49$, $p < 0,001$; $OR_{CC} = 0,72$, $p = 0,003$, respectivamente). Por fim, investigamos a associação dos genes *TNF/LTA*, *IFNG*, *IL10*, *TLR1*, *NOD2* e *IL6* com os episódios reacionais ou subtipos (tipo 1 e tipo 2) em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro. Como resultado, observamos a associação do gene *IL6* com reação, indicando que os genótipos rs2069840-GG e rs2069845-AG conferem proteção ($OR = 0,14$, $p = 0,001$) e risco ($OR = 1,78$, $p = 0,01$), respectivamente, ao desfecho reação *per se*. Os resultados do presente estudo confirmam a associação dos genes *TLR1* e *NOD2* na hanseníase *per se*, bem como do gene *IL6* nas reações hanseníase, indicando-os como possíveis marcadores de susceptibilidade a esses desfechos na população brasileira.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ASSOCIATION OF IMMUNE RESPONSE GENES IN LEPROSY AND LEPROSY REACTIONS

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Carolinne de Sales Marques

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligatory intracellular bacterium. Studies have shown that genes are able to influence the disease outcome in at least three distinct steps: leprosy *per se*, clinical forms development, and leprosy reactions. Genes in the major pathway of innate immune response against mycobacteria such as *TRL1/2* and *NOD2*, have been pinpointed as associated with leprosy in different populations, some studies including leprosy reaction as outcome. However, the effect of such associations in Brazilian population deserves further investigation. Therefore, the aim of this project was to study the association of *TRL1* and *NOD2* genes in susceptibility to leprosy *per se* and also the association of seven immune response candidate genes in leprosy reactions. First, case-control and family-based studies were performed in four populations from different regions of Brazil, to investigate the effect of *TLR1* SNPs in leprosy. The results indicated an association between +743A>G (amino acid exchange N248S) and leprosy risk, which was confirmed in all populations used ($OR_{GG} = 1.51$, $p < 0.001$). In addition, we evaluated the genotype-phenotype correlation, and found the +743 G allele related to lower TNF/IL10 ratio, and also modifying the electrostatic profile (reducing the electronegativity) at *TLR1* protein by *in silico* approach. In the second step of our work, we performed a multicentric study including five Brazilian populations, to evaluate the association of candidate genes with leprosy. These genes were selected from the first genome-wide association study in leprosy, performed in Chinese. Among the 36 markers evaluated, both rs8057341 at *NOD2* gene and rs4942254 at *CCDC122-LACC1* gene showed protector effect to leprosy, and the combined analysis confirmed the association with protection in Brazilians ($OR_{AA} = 0.49$, $p < 0.001$; $OR_{CC} = 0.72$, $p = 0.003$, respectively). Finally, we investigated the association between *TNF/LTA*, *IFNG*, *IL10*, *TLR1*, *NOD2* and *IL6* genes and leprosy reactions or subtypes (type 1 and type 2), using a sample of patients from Rio de Janeiro. As result, we observed the association between *IL6* gene and reaction, indicating a protective ($OR = 0.14$, $p = 0.001$) and risk ($OR = 1.78$, $p = 0.01$) effect of rs2069840-GG and rs2069845-AG genotypes, respectively. The results of our study confirm the association of *TLR1* and *NOD2* genes with leprosy *per se*, as well as the *IL6* gene with leprosy reactions, indicating them as potential markers of susceptibility to these outcomes in Brazilians.

Capítulo I: Introdução, Justificativa e Objetivos

I. INTRODUÇÃO

1. Hanseníase: Aspectos Gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos. É considerada uma das mais antigas doenças descritas acometer o ser humano e relatos textuais desde 1.400 a.C. faziam referência à doença conhecida amplamente como "lepra", incluindo descrições de sintomas clínicos característicos tais como perda de sensibilidade, aparecimento de manchas vermelhas, ulceração e deslocamento das articulações (Eidt, 2004). Já as evidências fósseis sugerem a ocorrência da hanseníase na Índia desde 2.000 anos a.C. (Robbins et al., 2009), e a hipótese mais recente sugere que a doença tenha se originado no Leste da África, e se disseminado acompanhando as rotas migratórias humanas e de comércio (Monot et al., 2005). Estudos de genômica comparativa estimaram a rota de disseminação da doença com base na identificação de variantes muito raras no genoma do *Mycobacterium leprae*, bacilo causador da doença, as quais se mostraram específicas de determinadas regiões (Figura 1). Acredita-se que a partir da África a doença tenha sido levada para a Índia, Ásia e Europa. Posteriormente ocorreu a sua disseminação também nas Américas, com a vinda de europeus e africanos durante o período de colonização (Monot et al., 2009).

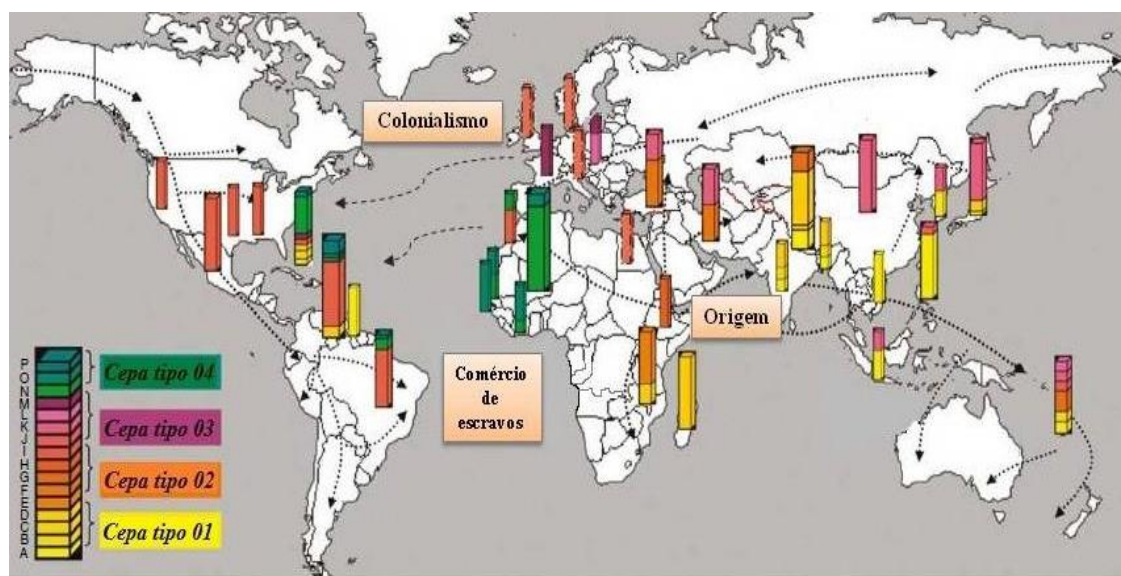


Figura 1. Origem e disseminação da hanseníase no mundo. Estudos de genômica comparativa identificaram 4 diferentes cepas de *M. leprae*, e 16 subtipos (A-P), caracterizados por diferenças polimórficas sutis. A distribuição das cepas sugere que a disseminação da doença seguiu as rotas migratórias humanas (indicadas pelas setas). Adaptado de (Monot et al., 2009).

O *M. leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta preferencialmente macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos, podendo levar ao dano neural e incapacidades, fatos que contribuem para que o estigma relacionado a doença exista ainda hoje. Comparações genômicas mostraram que não existem diferenças importantes entre diferentes isolados do *M. leprae*, especialmente entre cepas antigas e modernas, indicando que a variabilidade do bacilo é muito baixa (Schuenemann et al., 2013).

Na hanseníase o sucesso da infecção se dá pelo balanço entre a resposta imune do hospedeiro e a capacidade do *M. leprae* em burlar essa resposta, levando ao estabelecimento da doença que pode apresentar-se em um espectro de formas clínicas: os pacientes podem apresentar formas mais localizadas e com poucos bacilos, denominadas paucibacilares, ou formas disseminadas com alta carga bacilar, chamadas multibacilares. No entanto, somente uma pequena parcela dos indivíduos expostos é infectada, e considerando a baixa variabilidade do patógeno, já está clara a participação genética do hospedeiro na susceptibilidade à doença (Alter et al., 2011).

Vale ressaltar que a hanseníase é considerada uma doença complexa na qual a exposição ao patógeno é necessária mas não suficiente para levar ao estabelecimento da doença. Assim, fatores tanto ambientais quanto genéticos do hospedeiro podem exercer papel importante no desfecho. Os diferentes perfis genéticos dos indivíduos podem influenciar tanto na ocorrência da doença *per se*, quanto nas várias etapas no curso da infecção (Moraes et al., 2006).

1.1 Epidemiologia

Apesar de ser reconhecida como uma das mais antigas patologias humanas, a hanseníase ainda é considerada um sério problema de saúde pública em alguns países. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013), o total de casos de hanseníase em tratamento em todo o mundo no ano de 2013 foi 189.018, o que representa uma taxa de prevalência de 0,33 (número de casos a cada 10.000 habitantes). Desde a implementação da poliquimioterapia (PQT) no tratamento da doença em 1981, as taxas de prevalência mundial vêm sofrendo importante redução, passando de 52,0 em 1981 (Murthy, 2004) para valores inferiores a 1,0 em 2000.

Em relação às taxas de incidência (número de novos casos em cada 100.000 habitantes), os números continuam preocupantes. Até 2005 houve uma queda expressiva no número de novos casos de hanseníase, caindo apenas sutilmente a partir de então (Talhari et al., 2012). Em 2012, foram registrados 232.857 novos casos da doença no mundo, sendo Índia, Brasil e Indonésia responsáveis por 76% desse número (OMS, 2013) (Figura 2). O Brasil ocupa atualmente o primeiro lugar mundial em taxa de incidência (16,76), seguido pelo Sul do Sudão (16,61) e Índia (10,61), o que indica alto grau de endemicidade nesses países (Figura 2).

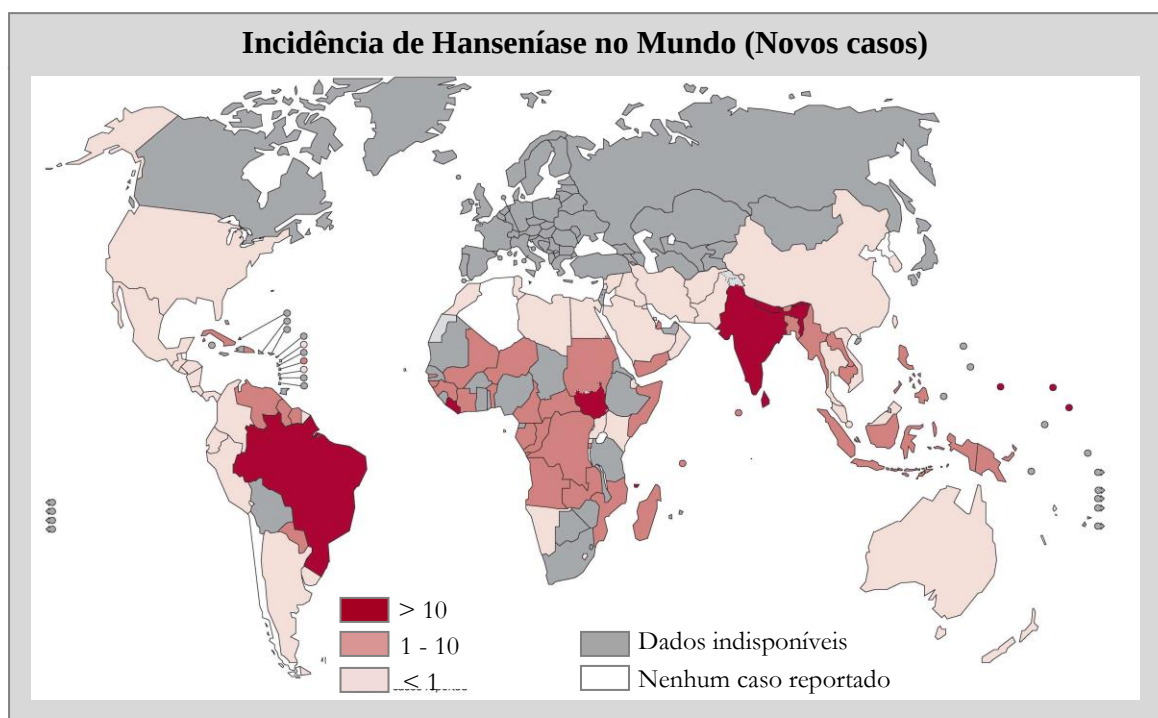


Figura 2- Taxas de incidência de hanseníase no mundo no ano de 2011. As taxas indicam o total de casos a cada 100.000 habitantes. Adaptado da OMS, 2012.

No Brasil um dado que merece atenção em relação à doença diz respeito a alta incidência em crianças de 0 a 14 anos (2.246 novos casos em 2012), que constitui um dos indicadores utilizados para transmissão recente da doença. Outro indicador importante é o alto número de casos diagnosticados com grau 2 de incapacidade (quando já existem incapacidades físicas/neurais irreversíveis), que ocorre em estágio avançado da doença sugerindo diagnóstico tardio. De acordo com a OMS, em 2012 foram detectados 2.234 casos no país já com incapacidades instaladas, o que equivale a

6,7% do total de casos novos. O diagnóstico tardio também é considerado preocupante por possibilitar que a doença continue sendo ativamente transmitida.

A hanseníase possui distribuição heterogênea no Brasil. Enquanto alguns estados já atingiram a meta de baixa endemicidade em algumas cidades, outros apresentam regiões de hiper endemicidade, especialmente nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (Figura 3).

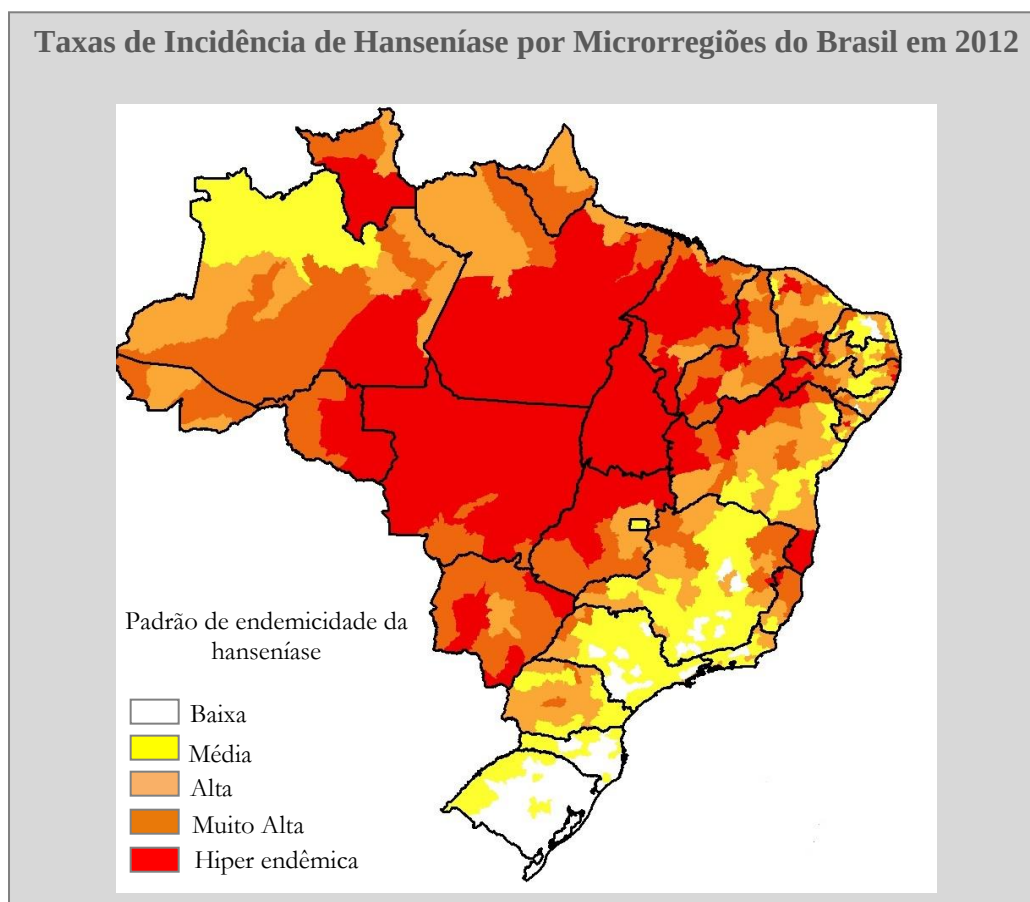


Figura 3- Taxas de incidência da hanseníase por microrregiões brasileiras em 2012. Taxas dadas pelo número de novos casos residentes/população residente a cada 100.000 habitantes. Dados obtidos do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), Ministério da Saúde. Gráfico gerado pelo software TABWIN versão 3.0 (DATASUS, 2014). Padrões de endemicidade: baixa (menor que 2,00), média (2,00 a 9,99), alta (10,00 a 19,99), muito alta (20,00 a 39,99) e situação hiperendêmica (maior ou igual a 40,00).

Observou-se que o Rio Grande do Sul apresentou incidência de 1,31 em 2012, contrastando com incidências de 80,15 no Mato Grosso, 71,67 no Tocantins e 50,00 no Pará (SINAN, 2014). Acredita-se que fatores históricos e socio-econômicos contribuam para explicar a ocorrência desproporcional da hanseníase em determinadas regiões

(Sales et al., 2011). De fato, há uma sobreposição entre as áreas com maior incidência de hanseníase e as áreas mais pobres do Brasil, especialmente em bolsões de pobreza no sul do Pará, no sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais (Penna et al., 2009; Penna and Penna, 2012).

A OMS elaborou uma estratégia global aprimorada para redução do número de casos de hanseníase (OMS, 2009), com foco na busca ativa por casos da doença, no diagnóstico e tratamento com a PQT. Tal estratégia tem como principal meta a redução de novos casos com grau 2 de incapacidade em 35% de 2010 até 2015. No Brasil, as principais estratégias do Ministério da Saúde são a inclusão da hanseníase no plano Brasil Sem Miséria, que visa tanto a eliminação da doença como problema de saúde pública, como também a melhora da qualidade de vida dos pacientes (MS, 2013/2014). As cidades onde a hanseníase possui "clusters" de endemicidade e as antigas Colônias de Hanseníase (antigas colônias de isolamento de pacientes com a doença) são consideradas regiões prioritárias de vigilância epidemiológica. Além disso, treinar as equipes de atenção básica à saúde para a busca de novos casos, e monitorar os contatos intra-domiciliares para evitar possíveis novos casos, são estratégias preconizadas para tentar interromper a cadeia de transmissão da doença (MS, 2013/2014).

1.2 O *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, com tropismo por macrófagos de pele e células de Schwann nos nervos periféricos. Possui crescimento lento (aproximadamente 2 semanas) em temperatura ótima de 33-34°C, o que poderia explicar o seu tropismo por áreas periféricas do corpo. É uma bactéria gram-positiva, com um envelope celular extremamente complexo e com estrutura peculiar rica em lipídeos. Essa estrutura inclui membrana celular, parede celular composta majoritariamente por peptidoglicanos e ácidos micólicos, e uma cápsula rica em glicolípido fenólico I (PGL-I), o qual confere especificidade imunológica (Spencer et al., 2011). Vale ressaltar que as proteínas do envelope celular possuem um papel essencial na patogênese do *M. leprae*. Um bom exemplo disso são as adesinas que participam da interação do bacilo com as células epiteliais e endoteliais, sítios que constituem as fontes primárias de

infecção, e também da interação com as células de Schwann (Silva et al., 2013; Vidal Pessolani et al., 2003).

Até o momento não existe um meio de cultivo no qual o *M. leprae* seja capaz de crescer, o que constitui um fator limitante nos estudos biológicos e bioquímicos, dificultando as pesquisas acerca dos mecanismos de imunopatogênese da hanseníase. Sendo assim, a multiplicação do bacilo para fins experimentais é realizada utilizando modelos animais incluindo camundongos e tatus. A obtenção do *M. leprae* a partir do crescimento do bacilo no coxim plantar de camundongos atímicos (nude), por exemplo, fornece quantidades significativas de bacilos viáveis (Truman and Krahenbuhl, 2001).

Após o sequenciamento completo do *M. leprae*, estudos de genômica comparativa mostraram que o bacilo sofreu extrema redução evolutiva no seu genoma (Cole et al., 2001). Enquanto o *M. tuberculosis* possui 3.993 genes e 6 pseudogenes (genes que sofreram algum tipo de inativação), o *M. leprae* exibe 1.605 genes e o elevado número de 1.133 pseudogenes, levando a perda considerável de genes funcionais, especialmente em vias do metabolismo energético (Marri et al., 2006). Acredita-se que alguns pseudogenes tenham participação em vias de regulação gênica, o que explicaria a capacidade de sobrevivência com um número reduzido de genes (Williams et al., 2009). A redução no genoma do *M. leprae* resultou na eliminação de diversas vias fundamentais, o que pode ter promovido uma evolução adaptativa no bacilo levando-o de um modo de vida livre para um nicho intracelular (Monot e col., 2009).

Uma das vantagens do uso de estudos de genoma completo foi a possibilidade de comparação entre cepas do *M. leprae* isoladas de esqueletos bem preservados com mais de 1.000 anos de idade no norte da Europa, e cepas modernas de diferentes origens geográficas. Com base nesta abordagem, observou-se que a estrutura genômica do bacilo praticamente não sofreu mudanças, apontando para a baixa variabilidade do mesmo. Além disso, não há alterações genéticas que evidenciem qualquer perda de virulência ao longo dos anos (Schuenemann et al., 2013).

1.3 Transmissão

Acredita-se que a transmissão do *M. leprae* ocorra através do trato respiratório superior, provavelmente pela propagação de aerossóis provenientes de secreções orais ou

nasais de indivíduos infectados não tratados, e da captação através da mucosa respiratória (Klatser et al., 1993; Rees and McDougall, 1977). De fato, o bacilo pôde ser detectado em biópsias de mucosa nasal antes mesmo do aparecimento das lesões de pele características da doença, sugerindo que as vias aéreas constituem o sítio primário de infecção (Suneetha et al., 1998). Suportando essa hipótese, estudos identificaram a presença do *M. leprae* majoritariamente a partir de detecção de DNA por PCR, em amostras das mucosas oral e nasal (Morgado de Abreu et al., 2014; Patrocinio et al., 2005), da pele e de secreções nasais (Job et al., 2008) seja de pacientes ou de contatos de áreas endêmicas. Propõe-se que as células epiteliais das vias aéreas possuam um papel central na interação inicial com o bacilo e consequentemente durante o curso natural da doença (Silva et al., 2013).

O contato próximo e contínuo de um indivíduo saudável com um paciente é o principal determinante na transmissão da hanseníase, sendo a proximidade não apenas limitada aos contatos intradomiciliares, mas também a vizinhos e pessoas com relações sociais próximas. A proximidade dos contatos com o caso índice, e a consanguinidade entre eles foram associados ao risco de adoecimento (Sales et al., 2011). Em uma população endêmica da Indonésia, por exemplo, o risco estimado para hanseníase foi cerca de nove vezes maior em famílias de pacientes e quatro vezes maior em pessoas com relações diretas com pacientes (van Beers et al., 1999). Também foi demonstrado que os contatos diagnosticados por meio de vigilância ativa apresentaram menor chance de complicações clínicas quando comparado a contatos detectados de forma passiva (Hacker et al., 2012), reforçando a ideia de que a vigilância nos contatos é uma estratégia poderosa no controle da hanseníase.

Um estudo recente desenvolvido em uma cidade do estado do Pará, hiper endêmica para hanseníase, demonstrou que indivíduos residentes em “clusters” de alta endemicidade para a doença possuem maior risco relativo de desenvolvê-la comparado a outras áreas da cidade (Barreto et al., 2014). Essas regiões tiveram sobreposição com regiões de alta densidade populacional, indicando que aglomerados urbanos facilitam a transmissão da doença.

Outro aspecto importante na transmissão é a forma clínica e a carga bacilar do paciente. Foi demonstrado que contatos com maior risco de contrair hanseníase são aqueles próximos a pacientes que exibem alta carga bacilar (formas clínicas multibacilares) (Moet e col., 2004). No entanto, também é possível que indivíduos com

infecção subclínica tenham um papel relevante na cadeia de transmissão, visto que eles podem carrear o bacilo (Martinez et al., 2010).

Foi observado que tatus silvestres são hospedeiros naturais do *M. leprae* nas regiões da Louisiana, Mississippi e Texas, Estados Unidos (Truman, 2005). Posteriormente o mesmo grupo observou que as cepas de *M. leprae* isoladas dos pacientes eram idênticas às que infectavam os tatus, sugerindo que os tatus possam constituir uma fonte de infecção na região (Truman et al., 2011) e que a hanseníase poderia ser uma zoonose.

Alguns estudos também sugerem que reservatórios no ambiente poderiam participar como fonte de transmissão da doença, o que foi apoiado através da detecção de *M. leprae* em amostras de água (Matsuoka et al., 1999) e do bacilo viável em amostras de solo provenientes de áreas endêmicas (Lavania et al., 2008; Turankar et al., 2014). Uma vertente também levanta a possibilidade da participação de artrópodes vetores na cadeia de transmissão da hanseníase, o que tem sido investigado mais recentemente (Ferreira et al., 2013) após teorias importantes levantadas por Adolfo Lutz e Souza Araújo no início do século XX (Lutz, 1939; Souza-Araujo et al., 1944). A identificação de reservatórios naturais sugere uma explicação, ao menos em parte, a manutenção de casos novos de hanseníase mesmo com o tratamento eficiente e contínuo nos últimos 30 anos.

1.4 Diagnóstico

A hanseníase manifesta-se através de sinais e sintomas dermatológicos e neurológicos, principalmente lesões de pele com diminuição ou ausência de sensibilidade, e/ou lesões nos nervos periféricos, levando a dor, espessamento neural e a perda de sensibilidade nas áreas inervadas. Sendo assim, o diagnóstico da doença é essencialmente clínico.

Em casos de suspeita de hanseníase onde há difícil caracterização clínica, o diagnóstico laboratorial fornece suporte ao diagnóstico clínico, sendo realizados exames complementares para confirmação dos casos. Um dos métodos clássicos mais úteis é a baciloscopia, que consiste em uma avaliação qualitativa e quantitativa dos bacilos em amostras de linfa cutânea, após a coloração com o método Ziehl-Neelsen, que permite corar os bacilos e auxiliar nas classificações clínicas. No entanto, a baciloscopia negativa

não afasta o diagnóstico da doença. A histopatologia em biópsias de pele e nervo dos pacientes também é um exame amplamente utilizado, onde é possível evidenciar a morfologia do tecido, a presença de infiltrado inflamatório e de granulomas, característicos da hanseníase (Antunes et al., 2012).

Uma ferramenta interessante de complementação ao diagnóstico da hanseníase é a utilização de técnicas sorológicas para identificação do *M. leprae*, através da quantificação de anticorpos anti-PGL-I. O PGL-I induz a produção de IgM específicos, e estudos relacionam os títulos de tais anticorpos ao grau de exposição ao *M. leprae* (Ulrich et al., 1991; van Beers et al., 1999). No entanto, uma das limitações dessa metodologia é a dificuldade de prever quando a exposição ocorreu, e de diagnosticar formas clínicas com poucos bacilos de forma eficiente. Os níveis de anti-PGL-I também estão relacionados às formas clínicas da hanseníase, e sendo assim auxiliam na classificação clínica, no monitoramento do tratamento e em contatos são um indicativo de maior risco em desenvolver a doença (Barreto et al., 2011; Duppre et al., 2012). Proteínas específicas do *M. leprae* que possam ser utilizadas para aumentar a eficiência da detecção por métodos sorológicos, especialmente nos estágios iniciais ou de baixa carga bacilar, também são alvo de estudo (Spencer et al., 2011). Estudos também avançam na tentativa de desenvolver novos testes rápidos (do tipo “point-of-care”) para detecção sorológica de forma rápida e de baixo custo, em alternativa ao ELISA, baseados em proteínas de fusão como o LID-1, que poderiam ser amplamente implementados na rotina do diagnóstico (Stefani et al., 2012).

Talvez um dos importantes avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase tenha sido o desenvolvimento de técnicas de identificação do material genético do *M. leprae* em amostras clínicas através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A identificação molecular consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do *M. leprae*, a partir de amostras de biópsias de pele ou nervo, muco nasal ou sangue. A detecção do *M. leprae* por PCR é de grande utilidade para auxiliar em casos de difícil diagnóstico clínico, tais como casos de baciloscopia negativa nos pacientes paucibacilares, histopatologia inconclusiva, e na forma neural pura, a qual não exhibe lesões de pele (Martinez et al., 2014). Além disso, a PCR pode auxiliar no seguimento de contatos. Foi observado que contatos PCR positivos no momento do diagnóstico do caso índice tiveram maior risco de adoecimento, sugerindo que a PCR, em combinação com outros marcadores, pode ser usada no prognóstico da hanseníase em contatos (Reis et al., 2013).

Ainda, estudos desenvolvidos por Martinez e colaboradores mostraram que, comparado ao PCR convencional, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) apresenta como vantagem a alta sensibilidade e especificidade na detecção do *M. leprae* em amostras clínicas (Martinez et al., 2006; Martinez et al., 2011).

1.5 Formas Clínicas e Classificação

A classificação da hanseníase é uma etapa de grande importância durante o diagnóstico, pois é utilizada para determinar o tipo de tratamento apropriado. Em 1953, no Congresso Internacional de Madri, foi proposto pela primeira vez que a hanseníase pudesse ser classificada de acordo com critérios de polaridade. Assim, a doença poderia assumir formas que iam desde a localizada, com baciloscopia negativa (forma Tuberculóide), a uma forma disseminada, com baciloscopia positiva (forma Virchoviana) (WADE, 1953). Com o avanço do conhecimento na área de imunologia, e com a descoberta da existência de grupos distintos de linfócitos (T e B) na década de 60, observou-se que as formas clínicas da hanseníase possuíam estreita relação com a resposta imune do hospedeiro, fazendo da doença um modelo ideal para o estudo da imunidade celular. Assim em 1966, Ridley e Jopling propuseram outro sistema de classificação, baseado em critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos (Ridley and Jopling, 1966).

Mediante a exposição ao *M. leprae*, acredita-se que mais de 90% dos indivíduos apresentem resistência natural, e não desenvolvam a doença (Moraes et al., 2006). Dado que a infecção ocorreu, a mesma pode permanecer em um estágio de latência, no qual a doença permanece assintomática em um período longo, geralmente de 2 a 5 anos (MS, 2001). A partir daí a doença pode progredir passando pela forma indeterminada (caracterizada por um estágio inicial e transitório) e depois evoluir para qualquer uma das formas clínicas. De acordo com Ridley e Jopling as manifestações clínicas da hanseníase são contínuas e se enquadram em um espectro. No pólo tuberculóide (TT) a hanseníase apresenta-se com lesões localizadas, contendo poucos bacilos, e com a presença de resposta celular *M. leprae* específica. Já no polo oposto está a forma lepromatosa (LL), caracterizada pela proliferação de numerosos bacilos, levando a lesões mais graves e disseminadas pelo corpo, com predomínio de resposta imune

mediada por anticorpos e ausência de resposta celular específica ao bacilo (Ridley and Jopling, 1966). Entre os polos existem ainda as formas intermediárias ou borderlines (BT, BB e BL), formas imunologicamente instáveis. Da forma BT à BL há uma diminuição gradual da resposta celular, concomitante com o aumento da carga bacilar. O clássico perfil espectral associado às formas clínicas da doença está representado na Figura 4.

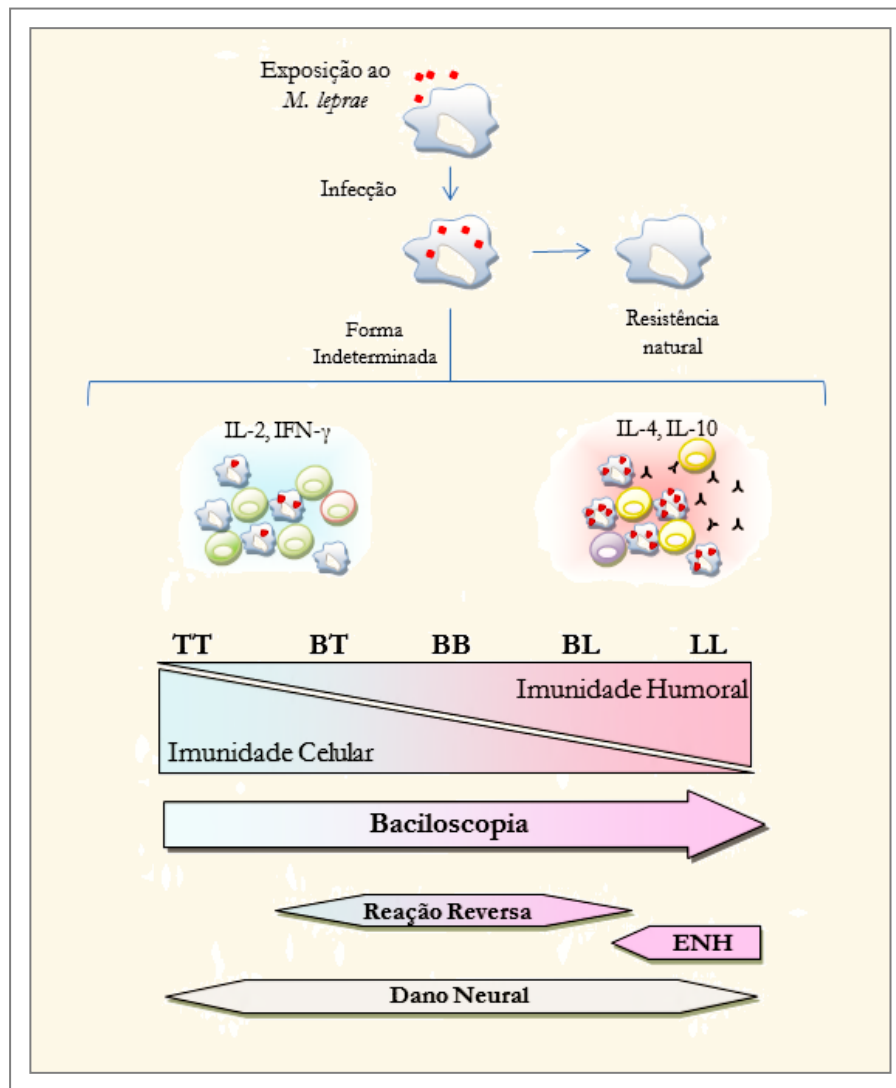


Figura 4. Formas clínicas da hanseníase. Esquema demonstra o perfil espectral classicamente associado à doença. Está representado o contexto celular de exposição ao bacilo, que extrapolando para o indivíduo, pode resultar na cura espontânea ou no estabelecimento da doença, a qual pode assumir qualquer uma das formas clínicas do espectro. Nos polos das formas clínicas diferentes contextos imunológicos estão presentes. Representação baseada na classificação de Ridley e Jopling: TT (tuberculóide), BT (borderline tuberculóide), BB (borderline), BL (borderline lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão representados também a baciloscopia, e os episódios reacionais (reação reversa e eritema nodoso hansênico - ENH).

A resposta imune celular específica ao *M. leprae* pode ser medida pelo teste cutâneo da lepromina, ou teste de Mitsuda. Tal teste consiste na injeção subcutânea de uma suspensão de bacilos mortos pelo calor. Após 21 a 28 dias a reação é medida através da induração do nódulo inflamatório, de acordo com o proposto no Sexto Congresso Internacional de Hanseníase em Madri, 1953 (Alcais et al., 2000). Os pacientes TT possuem reação positiva a lepromina, enquanto que o mesmo teste se mostra negativo nos LL.

Para fins de tratamento, a OMS estabeleceu uma classificação operacional da hanseníase baseada na carga bacilar. Essa classificação divide os pacientes em dois grupos e atribui a classificação de paucibacilares (PB) aos pacientes com índice baciloscópico negativo, e multibacilares (MB) aos pacientes com índice baciloscópico positivo. Quando não é possível fazer a baciloscopia, aplica-se uma classificação operacional ainda mais simplificada, que define como PB os pacientes que possuem de 1 a 5 lesões e MB àqueles com mais de cinco lesões (OMS., 2010).

1.6 Episódios Reacionais e Neuropatia

Antes, durante ou após o tratamento os pacientes com hanseníase podem apresentar os episódios reacionais, que são complicações clínicas caracterizadas por uma resposta inflamatória abrupta, intensa e desregulada. As reações podem apresentar-se em duas formas principais chamadas de reação reversa (RR) ou reação do tipo 1 (T1R), e eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação do tipo 2 (T2R). Os pacientes da forma lepromatosa da hanseníase podem também apresentar uma forma rara e muito agressiva de reação, o fenômeno de Lúcio, forma não nodular e difusa da hanseníase com ulcerações graves que progridem para necrose (Pai et al., 2014). Os casos desse fenômeno são majoritariamente observados na América Central, principalmente no México, e nos demais países foram descritos apenas casos isolados (Vargas-Ocampo, 2007).

Dependendo da população estudada estima-se que entre 30 a 50% dos pacientes podem desenvolver quadros reacionais (Kumar et al., 2004; Scollard et al., 1994). Devido à predileção do *M. leprae* pelos nervos periféricos, os episódios reacionais constituem a principal causa do dano neural, que pode avançar rapidamente para a perda

de sensibilidade e deformidades. Um estudo prospectivo em pacientes do Brasil retrata bem esse quadro, onde as reações ocorreram em 40% dos pacientes. Desses, 30% apresentaram incapacidades físicas instaladas após o tratamento (Oliveira et al., 2013). Ainda, cerca de 30% dos casos de reação são detectados simultaneamente ao diagnóstico da hanseníase (Ranque et al., 2007), reflexo do diagnóstico tardio da doença, quando possivelmente o dano neural já encontra-se instalado.

Os mecanismos que levam à ocorrência das reações ainda não estão esclarecidos, todavia, estudos descrevem fatores de risco que estariam relacionados ao desenvolvimento dos mesmos. Os fatores de risco mais relacionados com as reações de uma forma geral são a carga bacilar e as formas clínicas, mas outros fatores tais como a idade e a presença de co-infecções também são sugeridos, e diferentes contextos desses fatores podem estar associados ao tipo de reação apresentada (melhor descrito abaixo) (Kumar et al., 2004; Van Brakel et al., 1994). A genética do hospedeiro também mostra influência na susceptibilidade à ocorrência de reações (Fava et al., 2012).

A reação do tipo 1 (T1R) ocorre majoritariamente (cerca de 90% dos casos) nos pacientes BT, BB e BL (Ranque et al., 2007), e caracteriza-se por uma resposta de hipersensibilidade tardia ao *M. leprae*, que pode ser efetiva na eliminação do bacilo, mas extremamente prejudicial ao tecido afetado. Clinicamente se apresenta pela resposta inflamatória intensa em lesões preexistentes e aparecimento de novas lesões, com o envolvimento ou não de nervos periféricos (Nery et al., 2013). O atendimento dos pacientes com T1R deve ser de caráter emergencial na tentativa de reduzir as chances de avanço para dano neural. Estima-se que um total de 40 a 50% dos casos de T1R ocorra no período de 6 a 12 meses após o início do tratamento da hanseníase, embora estudos epidemiológicos mostrem que esse tipo de reação possa ocorrer de forma tardia até 7 anos após o diagnóstico (Kumar et al., 2004). Estudos epidemiológicos demonstram que os principais fatores de risco ao desenvolvimento de T1R são as formas clínicas borderlines, e a PQT durante o primeiro ano de tratamento (Scollard et al., 1994). Uma abordagem prospectiva na população do Nepal, por exemplo, observou que pacientes borderlines, no primeiro ano de tratamento e com a forma clínica MB apresentaram maior risco a T1R (Van Brakel et al., 1994). A idade também foi sugerida como importante nesse desfecho, visto que pacientes Vietnamitas com idade > 15 anos apresentaram risco aumentado de desenvolvê-lo (Ranque et al., 2007). Já um estudo em pacientes brasileiros identificou a idade > 40 anos e a PCR *M.*

leprae positiva (de biópsias de pele) também como fatores de risco para T1R (Sousa, 2007).

A reação do tipo 2 (T2R) é uma complicação geralmente observada em pacientes com as formas clínicas BL e LL, e caracterizada por um perfil de resposta imune humoral, com altos níveis de anticorpos circulantes (Rojas et al., 1997). Os pacientes que desenvolvem este tipo de reação apresentam nódulos eritematosos sem predileção por lesões pré-existentes, que geralmente são acompanhados de sintomas sistêmicos como febre, dor de cabeça e nas articulações. Os nódulos podem tornar-se crônicos e avançar para necrose e dano tecidual. Uma revisão sistemática recente avaliando a T2R, mostrou que a sua incidência é mais elevada no período entre primeiro e o terceiro ano após o tratamento com a PQT, e que de 39 a 77% dos pacientes com T2R apresentaram múltiplos episódios (Voorend and Post, 2013). Ainda, foi demonstrado por um estudo de coorte em pacientes indianos, acompanhados por 11 anos, que os principais fatores de risco para esse episódio foram a forma clínica LL e a carga bacilar superior a quatro (Pocatterra et al., 2006).

Em relação ao contexto imunológico durante os episódios reacionais, os estudos vêm demonstrando que os pacientes exibem aumento do perfil inflamatório em ambos os tipos de reação, e identificando os principais mediadores envolvidos nesse processo. Um dos primeiros estudos avaliando essa questão identificou o aumento de TNF e IL-1 no soro de pacientes com reação, quando comparado aos pacientes que não as desenvolveram (Sarno et al., 1991). Posteriormente o mesmo grupo avançou avaliando os níveis de mRNA em PBMCs e biópsias de pele de pacientes reacionais, nos quais observaram o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-1 (Moraes et al. 1999), e indicando um perfil indistinguível entre T1R e T2R. Na tentativa de identificar fatores plasmáticos biomarcadores para T1R e T2R comparado aos pacientes não reacionais, foram avaliados 27 mediadores séricos, incluindo 16 citocinas pró-inflamatórias, e dentre eles os mediadores IP10 e IL-6 foram característicos de T1R enquanto IL-7 e IL-6 relacionados a T2R (Stefani et al. 2009). Recentemente, níveis séricos aumentados de IP-10, IL-17 e IL-6 também foram relacionados ao desenvolvimento de T1R (Chaitanya et al., 2013). Ainda nesse contexto, a comparação entre o perfil transcricional de pacientes com T1R e pacientes sem reação (utilizando amostras de sangue total estimuladas com *M. leprae*), identificou

vias enriquecidas, principalmente vias pró- e anti-inflamatórias da resposta imune inata, sugerindo uma assinatura gênica para a T1R (Orlova et al., 2013).

O peculiar tropismo do *M. leprae* pelos nervos periféricos faz da hanseníase também uma neuropatia, na qual a infecção das células de Schwann pode levar ao comprometimento neural, e a perda de condutividade do axônio (de Freitas and Said, 2013). Hipóteses divergentes a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de dano neural têm sido apresentadas. Há dados indicando a indução da apoptose em células de Schwann estimuladas com *M. leprae* (Oliveira et al., 2003) enquanto outros estudos sugerem que o bacilo possa favorecer a multiplicação dessas células (Rambukkana et al., 2002). Também não está claro se o *M. leprae* de fato provoca a desestruturação ou não da bainha de mielina (Hagge et al., 2002; Rambukkana, 2004).

Sugere-se que a exacerbação da resposta imune durante os episódios reacionais seja a principal responsável pelo dano neural. De uma maneira geral a neurite ou neuropatia hansênica ocorre em consequência da inflamação dos nervos periféricos, comum durante os episódios reacionais, mas que pode também ocorrer em qualquer momento no curso da doença, ou até mesmo isoladamente. De fato, pacientes que apresentam a hanseníase em sua forma neural pura apresentam apenas o comprometimento nervoso, sem o aparecimento de lesões cutâneas. Clinicamente os pacientes com esta forma clínica apresentam neuropatia periférica com disfunções sensoriais e/ou motoras, sendo necessária a biópsia de nervo como procedimento diagnóstico. Foi demonstrado que cerca de 24% dos pacientes que são diagnosticados com a forma neural pura permanecem com algum grau de incapacidade definitiva (Castro, 2012).

1.7 Tratamento

O tratamento da hanseníase é considerado estratégico no controle epidemiológico da doença, uma vez que leva à interrupção da transmissão logo após seu início. Em 1981 a OMS introduziu o tratamento poliquimioterápico (PQT) em substituição a monoterapia com a Dapsona, o que reduziu as chances de resistência medicamentosa. A PQT consiste na combinação de Rifampicina, Clofazimina e

Dapsona, associação que leva à inviabilidade e eliminação dos bacilos. A administração do tratamento é feita através de esquema padrão, de acordo com a classificação operacional dos pacientes em PB e MB, como sumarizado na Tabela 1. Após cumprir o esquema de tratamento corretamente, o paciente recebe alta por cura.

Tabela 1- Esquema Padrão de Tratamento para a Hanseníase Recomendado pela OMS.

Classificação	PQT*	Dose	Tratamento
Paucibacilar	Rifampicina	600mg dose única mensal/supervisionada	6 cartelas (6-9 meses)
	Dapsona	100mg dose diária/auto administrada	
Multibacilar	Rifampicina	600mg dose única mensal/supervisionada	12 cartelas (12-18 meses)
	Dapsona	100mg dose diária/auto administrada	
	Clofazimina	300mg dose única mensal/supervisionada e 50mg dose diária/auto administrada	

* PQT: poliquimioterapia.

O tratamento dos episódios reacionais da hanseníase é realizado tão logo o diagnóstico do tipo de reação seja definido, sendo utilizada terapia anti-inflamatória que pode estar associada à PQT. Nos pacientes com T1R, é utilizada a prednisona em doses diárias, enquanto para a forma T2R o tratamento é feito com Talidomida e/ou corticoides. Quando há comprometimento neural nas reações, são utilizados também esteroides tais como a prednisona.

2. Resposta Imune na Hanseníase

Mediante o contato inicial do *M. leprae* com o hospedeiro, a resposta imune inata constitui o primeiro nível de interação, e frente à baixa patogenicidade do bacilo, possui requisitos que podem ser suficientes para reconhecer e restringir a infecção. Assim, essa resposta é considerada crucial no estágio inicial onde se define o estabelecimento ou não da hanseníase.

Nos sítios primários de infecção tais como a mucosa nasal, a célula dendrítica é uma das primeiras células a entrar em contato com o bacilo. As células dendríticas são derivadas principalmente da linhagem monocítica, e constituem as principais células apresentadoras de antígenos na indução da resposta celular frente a infecção por micobactérias (Demangel and Britton, 2000). A interação do patógeno com a célula dendrítica leva a ativação e regulação da resposta imune adaptativa, principalmente pela produção de IL-12, a qual leva a ativação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1, IL-6 e TNF, contribuindo para a resolução da infecção. Em células dendríticas de pacientes LL, observou-se uma expressão diminuída de CD1, molécula apresentadora de antígenos lipídicos, em relação a pacientes do polo TT, o que sugere um papel importante dessa molécula na ativação da resposta celular específica ao *M. leprae* (Sieling et al., 1999).

Dados da literatura mostram ainda que o *M. leprae* é capaz de interferir na ação das células dendríticas. A infecção com o bacilo vivo levou a redução da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), indicando que o bacilo seja capaz de suprimir a interação entre as células dendríticas e as células T (Hashimoto et al., 2002). Foi mostrado também que o estímulo com *M. leprae* vivo inibe a ativação e maturação das células dendríticas, ao contrário do BCG e *M. tuberculosis*, que atuam como ativadores (Murray et al., 2007). Essa interferência na célula dendrítica é possivelmente pela indução de IL-10 (Kumar et al., 2013b) e inibição de IL-12 (Demangel et al., 2002).

A maior parte dos monócitos circulantes que são ativados pelo patógeno se diferencia em macrófagos, que são células com alta capacidade fagocítica e que possuem uma ação efetora na contenção bacilar. Esta característica, somada ao fato de que o *M. leprae* possui tropismo por essas células, leva a escolha do macrófago como um modelo interessante para investigar as vias da interação patógeno-hospedeiro na hanseníase. Estudos apontam claramente que a ativação de monócitos e macrófagos por micobactérias dirige a fagocitose, seguida da ativação de vias efetoras que tentam debelar a infecção, tais como a fusão lisossomo/fagossomo (fagolisossomo), com ação das enzimas lisossomais, a produção de óxido nítrico e de peptídeos antimicrobianos (Liu et al., 2006). Além disso, a ativação dos monócitos induz a produção de IL-12, ativando a resposta inflamatória patógeno-específica (Brightbill et al., 1999).

Dentre os mecanismos efetores macrofágicos podemos destacar a xenofagia, processo de autofagia que leva a degradação de bactérias intracelulares em uma via relacionada à de degradação de organelas celulares (mitofagia) (Behr and Schurr, 2013). A xenofagia possui um papel essencial na resposta imune inata por micobactérias, e mostrou induzir a maturação do fagossomo a fagolisossomo mediante a infecção por *M. tuberculosis*, levando a sua eliminação (Gutierrez et al., 2004).

Estudos indicaram que, frente a infecção pelo *M. leprae*, os macrófagos podem assumir uma programação predominantemente fagocítica, pela indução de IL-10, ou uma programação altamente microbicida induzida pela citocina IL-15 (Montoya et al., 2009). Essa regulação diferencial foi confirmada no contexto da infecção natural pelo *M. leprae*, uma vez que em lesões de pacientes MB a IL-10 foi predominante e os macrófagos exibiram um perfil fagocítico, enquanto nos pacientes TT a IL-15 foi mais expressa, e os macrófagos provenientes de lesões de RR exibiram um perfil altamente microbicida (Jullien et al., 1997; Montoya et al., 2009; Yamamura et al., 1991). Recentemente a IL-1 β também se mostrou capaz de induzir a diferenciação de macrófagos a um perfil fenotípico específico, com capacidade aumentada de fagocitar e apresentar os antígenos micobacterianos às células T (Schenk et al., 2014).

Os mecanismos de resposta imunológica têm início com a interação entre o patógeno e os receptores na célula hospedeira. Esta interação inicial pode ocorrer tanto via receptores associados com a adesão e entrada nos macrófagos e células de Schwann, tais como MRC1 (receptor de Manose), α 2-laminina e receptores do complemento, quanto através dos receptores de reconhecimento e ativação da resposta imune. Os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Os PAMPs são conservados e expressos constitutivamente por uma ampla classe de patógenos, tais como bactérias, vírus e fungos (Janeway and Medzhitov, 2002). Uma vez ativados, os PRRs recrutam proteínas intra e extracelulares formando um complexo que inicia uma cascata de sinalização que culmina na ativação da transcrição (Medzhitov, 2007). Dessa forma, em resposta a detecção do patógeno, os PRRs podem atuar na ativação da inflamação, fagocitose, apoptose e autofagia (Bortoluci and Medzhitov, 2010). Os principais PRRs que atuam mediando o reconhecimento do *M. leprae* são os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*), e o receptor NOD2 (do inglês "nucleotide-binding

oligomerization domain containing 2"), membro de uma classe de PRRs intracelulares conhecidos como NLRs (Nod-like receptors).

Na década de 90 os receptores Toll foram caracterizados em Drosófilas, implicados no reconhecimento e defesa frente a infecções por fungos e, alguns anos depois, o primeiro homólogo de Toll em humanos foi identificado (Medzhitov et al., 1997). A família TLRs consiste em receptores transmembrana contendo um domínio extracelular rico em leucinas (motivo LRR, do inglês *leucine-rich repeat*) que atua no reconhecimento dos PAMPs, um domínio transmembrana, e um motivo intracelular que participa da ativação de vias de sinalização (Bell et al., 2003). Os TLRs são expressos em células do sistema imune tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, assim como em fibroblastos e células epiteliais. Até o momento foram descritos 10 membros da família TLR em mamíferos, numerados de TLR1 a TLR10, os quais podem diferir quanto à localização celular e ao tipo de padrão molecular que é capaz de reconhecer (Kumar et al., 2013a).

Em linhas gerais a sinalização via TLRs inicia-se com o reconhecimento do ligante, que pode levar a organização desses receptores na forma de homo/heterodímeros, e em seguida induzir o recrutamento de várias proteínas adaptadoras/sinalizadoras, majoritariamente as da família MyD88/IRAK/TRAF, culminando na ativação de fatores de transcrição (principalmente NF- κ B) e na ativação da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias. Até o momento existem evidências de que os componentes micobacterianos possam ser reconhecidos pelo TLR2 em associação com o TLR1 ou TLR6, pelo TLR4 ou pelo TLR9 (Basu et al., 2012; Jo et al., 2007, Mattos et al., 2011). Na hanseníase, demonstrou-se que os TLR1 e TLR2 foram mais expressos em amostras de lesões provenientes de pacientes TT quando comparado a lesões de LL, sugerindo que o dímero TLR1/TLR2 possa participar da contenção da infecção pelo *M. leprae* (Krutzik e col., 2003).

Nos últimos 10 anos, a descrição de uma nova via de resposta antimicrobiana em infecções micobacterianas através dos TLRs está sendo elaborada. Primeiramente foi demonstrado que a ativação da via de TLR1/2 reduziu a viabilidade de *M. tuberculosis* em monócitos humanos (Thoma-Uszynski e col., 2001) (Krutzik et al., 2003). Posteriormente, a análise da expressão gênica de monócitos estimulados com lipopeptídeo sintético de *M. tuberculosis* específicos para TLR1/2 identificou o aumento da expressão de genes tais como o do receptor da vitamina D (VDR), sugerindo

experimentalmente pela primeira vez a participação desse receptor na via antimicrobiana (Liu e col., 2006). O mesmo grupo demonstrou a redução da viabilidade de *M. tuberculosis* diretamente via indução do VDR, de forma dependente da produção de peptídeos bactericidas como a catelicidina. Esse peptídeo foi mais expresso em monócitos infectados estimulados com a vitamina D, de uma maneira dose-dependente (Liu e col., 2007). Mais recentemente, mostrou-se que além da participação do VDR, a indução das citocinas IL-15 (Krutzik e col., 2008) e IL-1 β (Liu e col., 2009) permite que as duas atuem sinergicamente para ativar a induzida pelo TLR contra patógenos intracelulares. As principais vias envolvidas na ativação através dos TLRs estão resumidas na Figura 5, incluídas no contexto de ativação da resposta imune inata.

Ainda, outras rotas alternativas ou que atuam em conjunto com as vias dos TLRs, cooperando para a modulação da resposta microbica vêm sendo descritas. Ligantes de TLR levam à ativação da autofagia, processo que influencia diretamente a capacidade de apresentação antigênica, a produção de proteínas antimicrobianas e de citocinas pró-inflamatórias (Delgado et al., 2008; Xu et al., 2007). Estudos com macrófagos humanos indicaram que a Vitamina D é necessária para a produção de IFN- γ pelas células T, ativação da autofagia, maturação fagossomal e produção de peptídeos antimicrobianos (Fabri et al., 2011). Os microRNAs (miRNAs), recém-descritos controladores da expressão gênica, também vêm sendo caracterizados como reguladores chave por toda a cascata de sinalização dos TLRs. Através do anelamento na região 3'UTR, os miRNAs são capazes de controlar a expressão gênica levando a clivagem ou inibição do transcrito (Enges and Hutvagner, 2006). Já foi demonstrado também que os miRNAs podem ser induzidos pela via dos TLRs, assim vêm sendo sugeridos como reguladores nas infecções micobacterianas (He et al., 2014).

A segunda classe de PRRs discutida aqui são os NLRs, receptores intracelulares citosólicos capazes de reconhecer fragmentos do patógeno que são introduzidos no citoplasma via sistema de secreção bacteriana (Girardin et al., 2003; Girardin et al., 2001). Podem ser expressos nos linfócitos, macrófagos, células dendríticas e epiteliais, embora o NOD2 seja majoritariamente expresso em monócitos. Possuem como domínios principais uma região de ligação a nucleotídeos (nucleotide-binding domain) e um domínio CARD de ativação (do inglês *Caspase Recruitment Domain*). Os receptores que atuam no reconhecimento bacteriano são os NOD1 e NOD2, que interagem com os motivos de peptidoglicanos da parede bacteriana (meso-DAP, ácido meso-

diaminopimélico e MDP, muramil dipeptídeo respectivamente). Essa interação leva a ativação do domínio CARD, ativando a cascata RIP2/MAPK e a via do NF- κ B (Figura 5), levando a produção de citocinas inflamatórias e de fatores antimicrobianos (Le Bourhis et al., 2007). O NOD2 também mostrou induzir a autofagia nas células dendríticas, via estímulo por MDP (Cooney et al., 2010) e atuar em sinergia com os TLRs para induzir um perfil inflamatório na imunidade adaptativa (Ferwerda et al., 2005).

O envolvimento do NOD2 na hanseníase foi abordado por Schenk e colaboradores, que demonstraram a diferenciação de monócitos estimulados com MDP em células dendríticas através de um mecanismo dependente da IL-32, observado preferencialmente em lesões de pacientes com a forma TT da doença comparado aos LL. A adição da IL-32 recombinante restaurou a diferenciação das células dendríticas via NOD2 em pacientes LL, sugerindo uma contribuição chave dessa via na eliminação do *M. leprae* (Schenk et al., 2012). Em experimentos com monócitos, o estímulo com a vitamina D também levou a ativação da via mediada pelo NOD2, demonstrando a integração dessa via com a do VDR (Wang et al., 2010).

Considerando ainda as vias de reconhecimento de patógenos, a via do IFN tipo I (IFN- α/β) vem sendo apontada como participante na resposta frente a micobactérias. Essa citocina é classicamente associada aos efeitos moduladores em infecções virais, mas estudos vêm demonstrando a sua importância também em mecanismos de patogênese bacteriana (O'Connell et al., 2004). Ela pode ser ativada através dos receptores TLR3/7/9, NOD2 por outros sensores de DNA citoplasmático como IFI16 e DDX41, e foi sugerida como via chave na patogênese da infecção por *M. tuberculosis* (Manzanillo et al., 2012). A importância deste processo consiste no fato de que a produção de IFN α/β resulta na inibição da via de diferenciação Th1 e na atividade do IFN- γ , ou seja, é capaz de regular a ação microbicida da célula (de Paus et al., 2013). Na hanseníase foi demonstrado que IFN- γ é predominantemente expresso em lesões de pacientes TT enquanto IFN- β é predominantemente expresso em lesões de pacientes na forma LL (Teles et al., 2013). Acredita-se que o *M. leprae* seja capaz de induzir a via IFN tipo I como um dos mecanismos favoráveis a sua patogênese, na tentativa de evadir o sistema imunológico. Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que a via do IFN tipo I foi a mais expressa na infecção de células de Schwann pelo *M. leprae*, com destaque para a expressão do gene *OASL* (Robottom-Ferreira, 2011). Nesse estudo o

gene da OASL (2'-5'-oligoadenylate synthetase-like), enzima conhecidamente ativada pela via do IFN I, foi induzida pelo IFN- β em células THP-1 estimuladas com *M. leprae*, ao passo que o silenciamento da OASL reduziu a viabilidade intracelular do bacilo, sugerindo a sua participação no favorecimento da infecção (Pinto, 2013).

Além dos PRRs, outras moléculas da resposta imune inata também são importantes no contexto da hanseníase, dentre elas a parkina, cujo gene *PARK2* e o seu regulador *PACRG* foram identificados em estudos genéticos de clonagem posicional que avaliaram a hanseníase como desfecho (Mira et al., 2004). A parkina é uma ubiquitina ligase envolvida na sinalização de proteínas para a degradação, e classicamente relacionada à doença de Parkinson de início precoce. Entretanto, outros estudos identificaram sua participação em funções que poderiam relacioná-la a vias de resposta a doenças infecciosas. A partir do silenciamento do *PARK2* foi possível observar que essa molécula está envolvida na ativação dos mediadores CCL2/MCP-1/IL-6 em THP-1 e células de Schwann estimuladas com *M. leprae*, sugerindo o seu envolvimento na indução da resposta inflamatória (de Leseleuc et al., 2013). Além disso, uma participação funcional ainda mais direta da parkina nas doenças infecciosas foi recentemente descrita por Manzanillo e colaboradores. Foi demonstrado que em macrófagos a parkina participa do processo de xenofagia, ubiquitinando vesículas fagossomais contendo as bactérias e direcionando-as ao processo de degradação (Manzanillo et al., 2013).

Por fim, a resposta protetora deflagrada na imunidade inata leva a produção de citocinas que participam do eixo inflamatório regulador central nas infecções por micobactérias, o eixo IL-12/IL-23/IFN- γ (Langrish et al., 2004). Essas citocinas estimulam células NK e Linfócitos T a produzirem mediadores que ativam a resposta inflamatória, tais como TNF, IL-1 β e IL-6. Por outro lado, a ativação de mediadores anti-inflamatórios, e de vias como a via de miRNAs e do IFN tipo I, atuam em uma alça regulatória inibindo a ação efetora/microbicida dessas células (Goulart et al., 1996). Dessa forma, o desfecho da infecção envolve o balanço entre um perfil celular microbicida e o um perfil celular permissivo ao *M. leprae*, e as principais vias da resposta imune inata envolvidas nesse processo seguem resumidas na Figura 5.

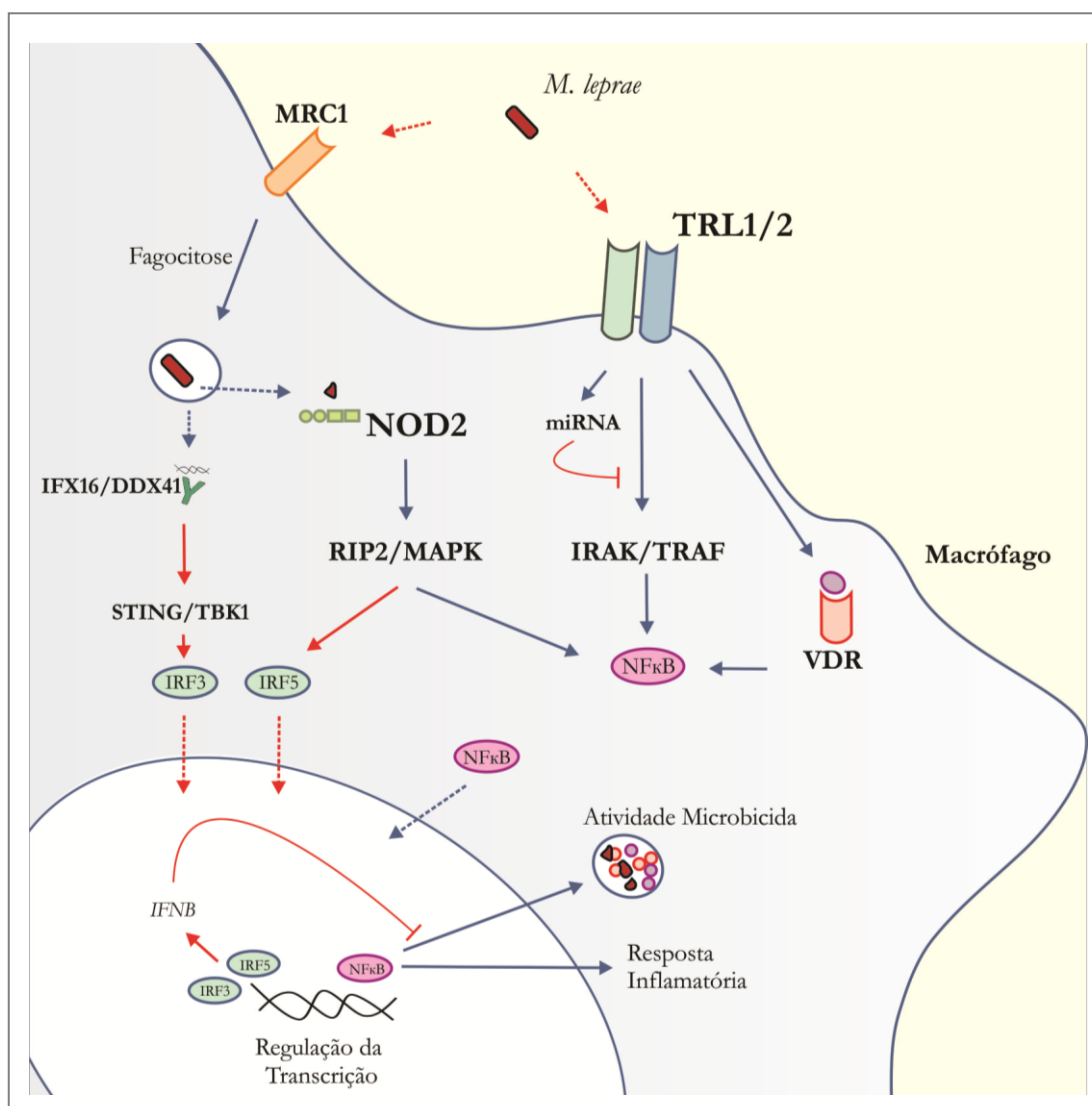


Figura 5. Principais vias de regulação da resposta imune inata na hanseníase. O *M. leprae* ativa o dímero TLR1/TLR2, levando a ativação da via pró-inflamatória e microbica, incluindo a via mediada pela vitamina D. Ao mesmo tempo, a fagocitose (mediada pelo MRC1) possibilita a entrada do bacilo e leva a ativação de receptores intracelulares como o NOD2, culminando também na ativação da resposta inflamatória. Em contrapartida, vias regulatórias da resposta microbica/inflamatória também podem ser ativadas (setas em vermelho) tais como a indução de miRNAs e do IFN- β . Essa regulação pode culminar em uma resposta protetora ou permissível à infecção pelo *M. leprae*.

Considerando que o *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, e portanto protegido da ação dos anticorpos, a resposta mediada por células na resposta imune adaptativa assume uma função central na resistência à doença. Experimentos clássicos conduzidos na década de 80 demonstraram que os pacientes TT apresentaram

proporções CD4:CD8 comparáveis aos controles (2:1) e níveis normais de células dendríticas, enquanto que os pacientes LL mostraram proporção CD4:CD8 invertida na lesão e células dendríticas em menor número (Modlin et al., 1983). Seguidamente, foi confirmado o comportamento da hanseníase de acordo com o perfil Th1 e Th2 de resposta imune do hospedeiro. Em síntese, sugere-se que os pacientes do pólo TT tenham um padrão de resposta imune mediada pelas células T parcialmente eficientes, enquanto os pacientes do pólo LL, possuem padrões imunológicos que seriam insuficientes para conter o *M. leprae* (Sampaio et al., 2003).

Nos pacientes TT ocorre a clássica estimulação da resposta inflamatória frente a infecção bacteriana, que pode ser resumida na produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T, via estímulo principalmente da IL-12. O IFN- γ é uma citocina característica da forma clínica TT, e juntamente com a IL-12 leva a diferenciação e ativação de linfócitos com perfil Th1 (CD4⁺ e CD8⁺), contribuindo para a resolução da infecção. O IFN- γ também participa da formação do granuloma, e a importância dessa via é retratada quando carreadores de mutações no seu receptor exibem susceptibilidade extrema a patógenos intracelulares (Al-Muhsen and Casanova, 2008).

O TNF assim como a Linfotóxina- α (LT- α) são membros da superfamília do TNF (ou TNFSF, do inglês TNF Super Family) que são implicados nas infecções, associados a regulação imune e ao perfil inflamatório. O TNF exerce papel essencial na ativação do macrófago e na formação do granuloma, estrutura essencial na contenção bacilar e resolução da infecção. Pacientes com doenças auto-imune, por exemplo, quando tratados com terapia anti-TNF podem desenvolver a hanseníase, indicando que o controle da doença depende da manutenção dos granulomas (Scollard et al., 2006). A LT- α é um mediador solúvel envolvido principalmente na ativação de moléculas de adesão e mediadores de recrutamento de linfócitos (Hagge et al., 2009). Ambos TNF e LT- α são detectadas nos pacientes TT ou em maiores quantidades nas reações reversas, e nesse último caso estão relacionados à inflamação crônica e dano tecidual (Bleharski et al., 2003). Foi observado que os dois mediadores são essenciais para a regulação do granuloma na hanseníase, sendo LT- α atuante na formação do granuloma e o TNF na manutenção da sua integridade (Hagge et al., 2009).

No polo LL da doença, onde há o contexto da IL-4, são ativados linfócitos Th2, e linfócitos B com produção de anticorpos. Nesse caso, observa-se de forma marcante o predomínio da IL-10, citocina com propriedades imunoreguladoras, produzida

principalmente pelos monócitos e células dendríticas como mencionado anteriormente, mas também linfócitos. A IL-10 atua inibindo a função inflamatória dos macrófagos através da regulação das moléculas do MHC e de proteínas co-estimuladoras. Observa-se que os níveis de IL-10 são elevados em pacientes MB comparados aos PB (Sieling PA, 1994), e a razão TNF/IL-10 em contatos domiciliares foi similar a razão em pacientes, e portanto relacionada a perfil inflamatório e de progressão a doença nesses contatos (Lima et al., 2000).

O papel das células T reguladoras (Treg) no polo mais susceptível da doença também vem sendo sugerido, sendo identificada maior frequência dessa subpopulação linfocitária em lesões LL comparadas às lesões TT/BT (Bobosha et al., 2014). As células Treg regulam resposta imunológica, e possuem papel importante na resposta a antígenos próprios e na resposta imune a infecções, por exemplo. Embora estas células sejam diferenciadas mediante estímulo com TGF- β , a presença concomitante de IL-6 e TGF- β induzem a diferenciação dos linfócitos em células Th17, produtores da citocina IL-17, que atua em processos de inflamação aguda. Assim, a regulação imunológica na hanseníase mostra-se bastante complexa, e vai além da simples dicotomia Th1 *versus* Th2.

3. Genética e a Hanseníase

3.1 Genética e Doenças Infecciosas

Na era Pasteur as doenças infecciosas eram consideradas de origem puramente ambiental, incluindo a teoria de que o patógeno seria necessário e suficiente para causar doença. No entanto, permanecia sem explicação a causa do alto nível de variabilidade clínica observada entre os indivíduos infectados pelo mesmo patógeno ou mesmo a variabilidade na suscetibilidade *per se* a doenças infecciosas (Casanova e Abel et al., 2013). Posteriormente várias teorias foram propostas para explicar esta heterogeneidade, e evidências epidemiológicas acumuladas desde 1930 através de estudos genéticos demonstram conclusivamente a influência da genética do hospedeiro na suscetibilidade a doenças infecciosas (Alcais e col., 2007). Essa influência foi inicialmente descrita em estudos com imunodeficiências primárias na década de 40,

quando se observou que algumas alterações genéticas raras e Mendelianas podiam predispor à doenças infecciosas, como foi descrito no caso da Síndrome da Susceptibilidade Mendeliana a Doenças Bacterianas (MSMD), causada por mutações em seis genes do eixo IL-12/IL-23/IFN- γ , (Alcais et al., 2009; van de Vosse et al., 2004).

As doenças infecciosas podem também ser influenciadas por genes/loci principais (*major gene/locus*), que diferem da herança Mendeliana por exibirem uma menor penetrância no desfecho, isso devido a influência de outros genes e de fatores ambientais. Acredita-se que a hanseníase sofra influência tanto de genes principais de susceptibilidade, quanto de vários genes que possuem um impacto modesto individual no desfecho, mas um efeito considerável ao nível populacional (Alter et al., 2008). É importante ressaltar que, alguns desses conjuntos de variações em múltiplos genes podem residir em uma via específica, o que amplia ainda mais o efeito no desfecho.

A maioria das doenças infecciosas, incluindo a hanseníase, são consideradas fenótipos complexos, pois mediante a exposição ao agente infeccioso vários fatores podem influenciar no estabelecimento da infecção (Figura 6). A partir do contato com o patógeno, o evento inicial de controle da infecção se dá na resposta imune inata, que por si só poderia controlar a infecção, ou avançar para a imunidade adaptativa, direcionando os fenótipos clínicos e biológicos da doença. Cada etapa do processo pode ainda ser influenciada por fatores ambientais, ou por fatores genéticos e não-genéticos do hospedeiro (Casanova and Abel, 2004).

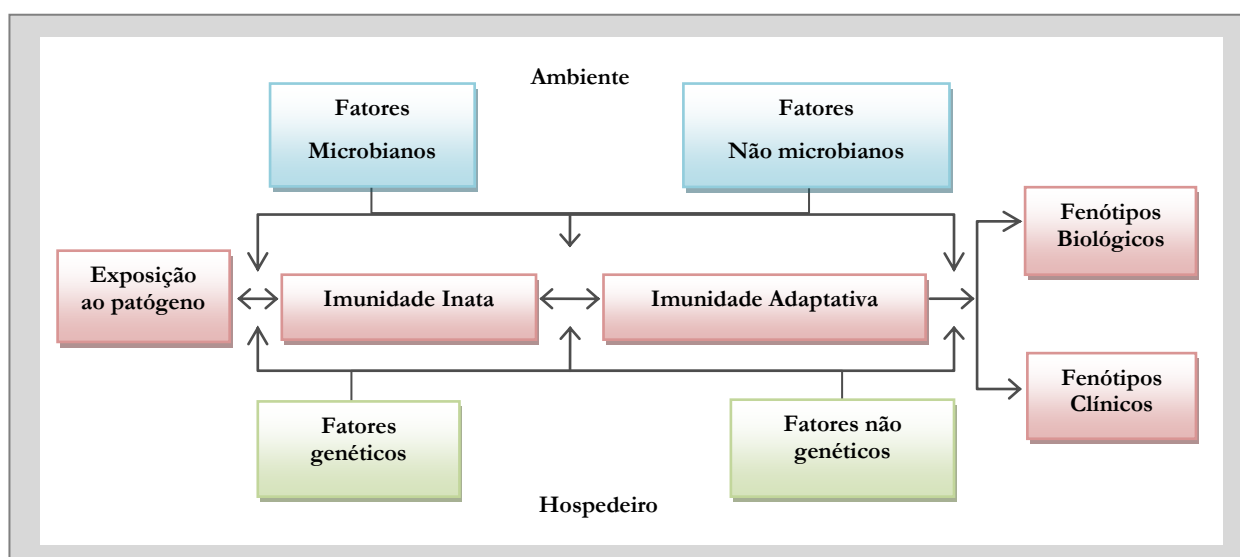


Figura 6. Interação hospedeiro-ambiente no curso das doenças infecciosas. O processo que vai desde a exposição ao patógeno até o desfecho da doença envolve tanto fatores do hospedeiro quanto do ambiente. Adaptado de Casanova & Abel, 2004.

3.2 Estratégias de Estudos Genéticos

Os estudos genéticos possibilitam investigar a existência de um componente genético de susceptibilidade do hospedeiro frente a uma determinada doença infecciosa ou desfecho em questão. As primeiras abordagens utilizadas nessas investigações incluíram estudos familiares observacionais, tais como estudos com gêmeos, análises de agregação familiar e segregação complexa. Tais modelos são capazes de confirmar a hipótese de influência genética e indicar um modelo de herança, mas não possibilitam especificar quais genes ou regiões gênicas estão envolvidos nesse processo (Martin et al., 1997).

Os estudos de ligação possibilitam justamente avaliar se uma determinada região gênica possui ligação com o desfecho em estudo (Cardon and Bell, 2001). Essa abordagem é feita utilizando marcadores específicos para os loci gênicos, tais como os microsatélites, e avaliando a segregação dos mesmos em membros afetados da família. Caso sejam utilizados marcadores distribuídos ao longo de todos os cromossomos, o estudo é caracterizado como “rastreamento genômico” (do inglês “*genome-wide scan*”). Após a identificação de uma região ligada à doença, pode-se ampliar o número de marcadores naquela região através de estudos de clonagem posicional, e esse mapeamento fino pode permitir a identificação dos genes na região ligada ao desfecho

(Cardon and Bell, 2001). Genes identificados em estudos de ligação são frequentemente utilizados como candidatos para estudos de associação genética.

Os estudos de associação, por sua vez, possuem como vantagem maior facilidade no recrutamento de amostras populacionais quando comparado ao recrutamento de famílias com múltiplos casos nos estudos de ligação, contribuindo para maior poder estatístico na detecção de um determinado efeito genético (Risch and Merikangas, 1996). Uma das estratégias mais comuns nos estudos de associação é a investigação de marcadores em genes candidatos, os quais podem ser escolhidos com base em sua participação em vias importantes no contexto da doença ou por evidências de associação genética em estudos anteriores. Tais candidatos podem ainda ser obtidos a partir de evidências de estudos genéticos ou análises de expressão em larga escala, sem hipótese *a priori*.

O desenho de estudo mais utilizado para investigar genes candidatos é o caso-controle, que avalia se a distribuição de frequência de um marcador genético difere entre indivíduos que apresentam o desfecho de interesse (casos) e indivíduos que não possuem o desfecho (grupo controle), possibilitando estimar medidas de associação entre o marcador e o desfecho em estudo. (Lewis and Knight, 2012). A escolha de um fenótipo bem caracterizado para a definição de casos e de um grupo controle adequado constituem etapas centrais no desenho do estudo (Pacheco and Moraes, 2009). Vale ressaltar que a escolha de um bom grupo controle inclui a seleção de indivíduos representativos da mesma população fonte que originou os casos, e que sendo assim estariam sob o mesmo risco de apresentar o desfecho de interesse, mas não apresentam. Um dos pontos que devem ser avaliados nesse desenho é a possibilidade de estratificação populacional, ou seja, a presença de subgrupos criados em função de uma dada característica da população. Além disso, é importante investigar outras possíveis variáveis que seriam capazes de confundir a análise de associação, e por isso devem ser se possível corrigidas durante a análise (Thomas and Witte, 2002).

Uma alternativa aos estudos caso-controle são os estudos de associação baseados em famílias que, a partir de trios formados por pais heterozigotos e ao menos um filho afetado, avaliam se o padrão de transmissão de um determinado alelo difere do esperado (teste de desequilíbrio de transmissão, ou TDT) (Schaid, 1998). É um desenho de estudo considerado mais acurado do que o caso-controle por utilizar um controle genético

interno, eliminando assim a influência da estratificação populacional. Uma desvantagem relacionada a essa metodologia é a dificuldade em recrutar as famílias informativas.

Uma segunda abordagem possível nos estudos de associação são os estudos genoma completo ou GWAS que, diferentemente dos estudos de genes candidatos, avaliam milhares de marcadores genéticos ao longo de todo o genoma, comparando as variações de frequência entre casos e controles (Hirschhorn and Daly, 2005). A era dos estudos do tipo GWAS vem acrescentando novos genes com associações importantes às doenças complexas, muitos deles supostamente não relacionados ao desfecho de interesse. Contudo, devido às rigorosas correções estatísticas inerentes às abordagens em larga escala, os GWAS requerem um tamanho experimental robusto para conseguir detectar variações com efeito sutil (Pearson and Manolio, 2008).

Nos estudos de associação, os marcadores genéticos mais utilizados são os SNPs. Alguns deles são mais informativos e são conhecidos como "tag SNPs" (ou etiquetas), por representar blocos de marcadores em desequilíbrio de ligação (LD). Considerando um bloco de SNPs em LD perfeito, a presença do tag SNP nos permite inferir sobre a presença dos demais, constituindo uma estratégia que possibilita otimizar o mapeamento de marcadores em uma determinada região gênica (Stram e col., 2004).

O esquema representado na Figura 7 resume as principais estratégias de estudos genéticos em doenças infecciosas. A figura aponta também para a importância da validação dos achados genéticos através de estudos de replicação conduzidos em outras populações, assim como para a utilização de estratégias como a meta-análise na tentativa estabelecer uma estimativa de associação que reflita um consenso entre os estudos já publicados. Por fim, a última etapa seria a análise funcional, avaliando a possibilidade de estabelecer a correlação genótipo-fenótipo e sugerir uma explicação funcional para a associação.

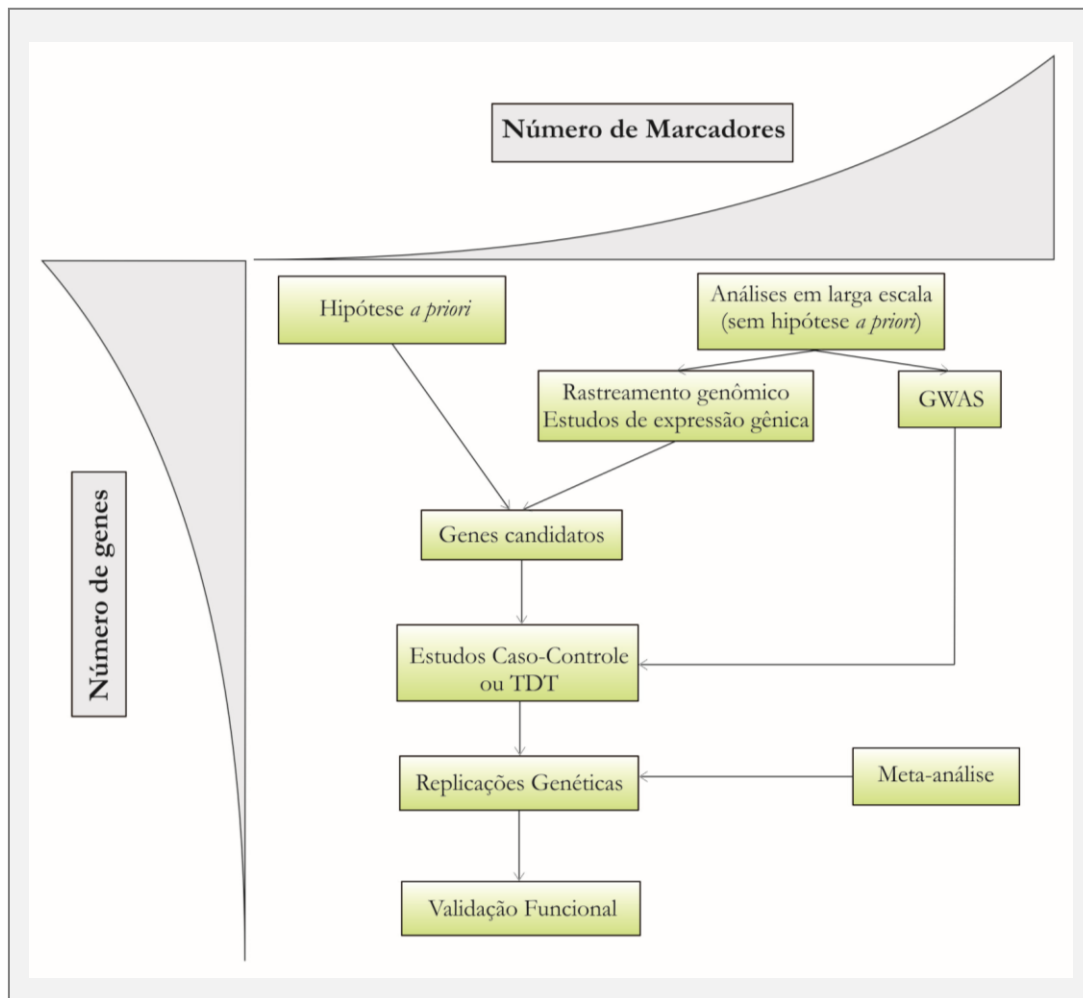


Figura 7 - Estratégias de estudos genéticos em doenças infecciosas. Em abordagens com genes candidatos, os alvos podem ser escolhidos com base em hipóteses (plausibilidade biológica) ou partindo de estudos em larga escala. Já os GWAS (do inglês *Genome-Wide Association Studies*) são utilizados para rastrear milhares de SNPs em todo o genoma. Os estudos de associação podem utilizar desenhos do tipo caso-controle ou em famílias, e etapas como as replicações genéticas, meta-análise e estudos funcionais são importantes para validar as associações encontradas. Adaptado de Cardoso et al., 2011a, Anexo I.

3.3 Influência Genética na Hanseníase

A influência genética na hanseníase foi demonstrada inicialmente em estudos utilizando gêmeos, em que houve uma maior concordância de fenótipos da doença entre monozigóticos quando comparados a dizigóticos (Chakravarti e Vogel, 1973). Posteriormente, estudos de segregação complexa conduzidos em 1988 em uma população do Caribe indicaram a presença de um gene principal controlando a

susceptibilidade à hanseníase (Abel and Demeais, 1988). Esse modelo foi mais tarde reforçado por análise de segregação complexa conduzida em brasileiros de uma região endêmica do estado do Pará, que também indicaram a participação de um componente genético de efeito pronunciado na população, levando assim à rejeição do modelo predominantemente ambiental participando na susceptibilidade à hanseníase (Lazaro et al., 2010).

Diversas evidências clínicas e epidemiológicas acumuladas nos últimos anos apontam para a participação importante da genética do hospedeiro na hanseníase, dentre elas podemos citar i) apesar da baixa diversidade genética do patógeno, a doença pode se apresentar em várias formas clínicas; ii) contatos domiciliares consanguíneos exibem maior risco de desenvolver a doença; iii) populações com diferentes *background* étnicos vivendo na mesma área geográfica exibiram taxas de prevalência distintas (Moraes et al., 2006). Durante o seu curso natural, sugere-se que a hanseníase seja influenciada pelo perfil genético do hospedeiro em pelo menos três estágios distintos que seriam a ocorrência ou não da infecção, independente da forma clínica (hanseníase *per se*), o direcionamento das formas clínicas, e ainda a ocorrência e gravidade dos episódios reacionais (Figura 8). Além disso, acredita-se que os fatores genéticos possam exercer um efeito combinatório, e a dinâmica resultante dessas combinações frente à infecção pelo *M. leprae* pode ser determinante no desfecho doença.

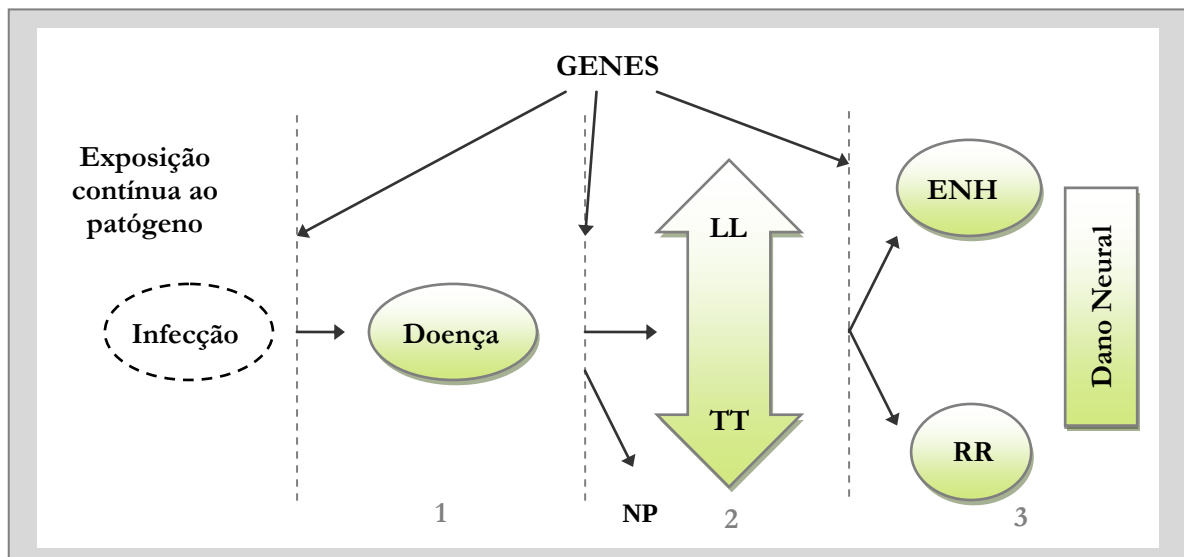


Figura 8. Influência genética no curso da hanseníase. Fatores genéticos podem contribuir na ocorrência da hanseníase *per se* (1), na gravidade das formas clínicas (2) nos episódios reacionais e no dano neural (3). Adaptado (Moraes et al., 2006)

Com o avanço do conhecimento sobre a genética e a biologia molecular, os últimos anos foram muito produtivos em relação aos estudos envolvendo a influência genética na hanseníase, permitindo identificar a participação de vários genes na susceptibilidade à doença. A maioria dos estudos utilizou desenhos de estudos de associação em genes candidatos (caso-controle ou TDT) ou análises de ligação utilizando famílias multiplex, demonstrando a influência de genes e de regiões gênicas na doença. As abordagens de larga escala como o rastreamento genômico e os GWAS contribuíram para enriquecer a lista de genes associados, especialmente na identificação de novos genes previamente não relacionados à doença. Os estudos apoiam a hipótese de que, em última instância, o resultado biológico/fenotípico da presença de polimorfismos seria a capacidade de modulação da resposta imune em algum grau, favorecendo ou não a ocorrência da doença. Um artigo publicado recentemente pelo nosso grupo descreveu os principais estudos genéticos envolvendo a hanseníase (Cardoso et al., 2011 a, Anexo I), reunindo os trabalhos mais relevantes nessa linha publicados até 2011. Nos próximos tópicos abordaremos esses estudos focando nos dados mais consistentes, incluindo também os achados recentemente publicados.

3.3.1 Genes da Resposta Imune Inata

O primeiro estudo de ligação do genoma completo identificou a ligação da região cromossômica 10p13 à hanseníase paucibacilar em uma população da Índia (Siddiqui et al., 2001), o que foi replicado em famílias Vietnamitas (Mira et al., 2003). Essa região contém o gene *MRC1*, que codifica para o receptor de manose presente em macrófagos, que atuam no reconhecimento e internalização do *M. leprae* (Kerrigan and Brown, 2009). Um estudo de associação posterior associou o polimorfismo G396S no éxon 7 do *MRC1* com proteção à hanseníase multibacilar, tanto em desenho baseado em famílias do Vietnã quanto no estudo de replicação caso-controle na população brasileira (Alter et al., 2010), o que não explica a ligação da região com a forma paucibacilar encontrada anteriormente.

Dada a participação chave dos TLR na resposta imune inata mediante a infecção pelo *M. leprae*, a identificação de marcadores de susceptibilidade ao longo desses genes é de grande interesse. O primeiro gene dessa família descrito como associado

geneticamente à hanseníase *per se* foi o *TLR1*, especificamente o polimorfismo +1805T>G na região codificante (troca aminoacídica I602S). Um estudo de associação em larga escala conduzido por Wong e colaboradores na população da Índia, identificou associações entre SNPs no *TLR1* e a hanseníase, e dentre elas a associação de proteção do alelo 1805G com a doença *per se* (Wong et al., 2010). O mesmo estudo replicou a associação do 1805G em desenhos independentes, incluindo estudos caso-controles e em famílias, e sugeriu que o efeito pronunciado e consistente dessa associação indica que o *TLR1* seja um dos genes principais no controle da susceptibilidade a hanseníase. O efeito funcional do SNP +1805T>G foi avaliado em células de indivíduos carreadores da variação, e a presença do alelo oposto, o alelo T, levou ao aumento da atividade inflamatória via NF-κB (Hawn et al., 2007; Johnson et al., 2007). Foi demonstrado também que a presença do alelo G levou a produção diminuída das citocinas pro-inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF em células estimuladas com o *M. leprae*, o que não explicaria o efeito genético de proteção desse alelo à doença (Misch et al., 2008).

Ainda no gene *TLR1*, um estudo caso-controle conduzido na população do Bangladesh identificou a associação de outro polimorfismo não sinônimo com a hanseníase *per se*, sendo o genótipo GG do SNP+743 A>G (equivalente a troca N248S) associado com o risco à doença (Schuring et al., 2009). Ambos os alelos 743G e 1805T foram associados com susceptibilidade à candidíase em americanos de origem caucasiana, porém nenhuma associação foi detectada em americanos de origem africana (Plantinga et al., 2012). Foi demonstrado que os padrões de LD entre os polimorfismos nessa região do *TLR1* variam entre as populações, o que poderia explicar essa diferença observada no estudo em americanos (Wong et al., 2010).

Outros receptores da família TLR podem ter um papel genético importante na hanseníase, e polimorfismos no gene *TLR4* por exemplo, foram associados com doença *per se* na população do Nepal (Bochud et al., 2009). Já variações nos genes *TLR1/TLR2* foram associadas com desfecho diferente, que seriam os episódios reacionais, o que será abordado posteriormente no tópico 3.3.4.

A associação genética entre *NOD2* e a hanseníase foi observada de forma inédita no primeiro GWAS que avaliou a hanseníase como desfecho (Zhang et al., 2009). Esse estudo foi conduzido em 1931 indivíduos da população Chinesa e incluiu três estudos de caso-controle independentes também em populações Chinesas como replicação, e

como resultado eles observaram a associação nos genes *CCDC122*, *CD13orf31*, *TNFSF15*, *HLA-DR*, *RIPK2*, *LRRK2* e no *NOD2*. No gene *NOD2* especificamente (as demais associações serão discutidas no capítulo 3), dois SNPs (rs9302752 e rs7194886) foram significativamente associados com o risco de desenvolver hanseníase. Na tentativa de replicar os achados dos chineses, um estudo em populações caso-controle e TDT da Índia avaliou os mesmos SNPs no *NOD2*, mas não encontrou associação dos mesmos com a doença, sugerindo que essa região seja heterogênea entre as populações (Wong et al., 2010). O estudo baseado em famílias na população do Vietnã, por sua vez, replicou a associação do gene *NOD2* com a hanseníase, mas com um SNP diferente, o rs8057341 (Grant et al., 2012). Foi realizado um estudo mais detalhado da região do *NOD2*, em que 32 tags SNPs representativos de toda a região gênica foram investigados quanto a associação com hanseníase na população do Nepal. Os resultados obtidos permitiram identificar oito SNPs associados com a doença *per se*, diferentes, entretanto, daqueles associados na população chinesa (Berrington et al., 2010). Em conjunto, os estudos genéticos sugeriram a existência de uma via que regula a sinalização através do *NOD2* e que estaria associada com susceptibilidade à hanseníase, o que vem sendo caracterizado através de estudos funcionais (Schenk et al., 2012).

Ao ser ativado pela ligação da vitamina D, o VDR atua como fator transcricional de vários genes envolvidos na imunomodulação, especialmente na cascata de produção de peptídeos antimicrobianos frente a micobactérias (Liu et al., 2006). Polimorfismos avaliados por fragmentos de restrição foram os mais investigados na associação com hanseníase dentre eles o SNP *TaqI*, uma variação sinônima no éxon 9, foi associado com hanseníase em algumas populações (Fitness et al., 2004; Roy et al., 1999; Sapkota et al., 2010; Velarde Félix et al., 2009). No entanto, os resultados das associações são conflitantes. Estudos conduzidos pelo nosso grupo utilizando estudos de caso-controle e familiar mostraram que o haplótipo formado pelos SNPs *FokI/Taq* no VDR tiveram associação borderline com proteção a hanseníase. A tentativa de reunir os estudos da literatura em meta-análise também não foi possível em virtude da carência de estudos que atingissem os critérios de qualidade necessários para a inclusão na análise (de Sales Marques, 2010). Análises que incluam um maior número de marcadores no gene VDR ainda são necessárias para descrever a respeito da influência desse gene na hanseníase. Além disso, a avaliação de outros genes candidatos na via de ativação do VDR poderia fornecer dados interessantes.

O segundo estudo de rastreamento genômico na hanseníase foi desenvolvido com amostras da população vietnamita e resultou na identificação de um pico de ligação na região do 6q25 (Mira et al., 2003). Em seguida, através de clonagem de posição, foram identificados os genes *PARK2* e *PARKG*, os quais a princípio estavam fora das vias clássicas que incluem os genes candidatos a doença. O mapeamento de alta resolução evidenciou dois SNPs que capturavam todo o sinal de associação observado, os SNPs *PARK2* -2599 e o rs1040079, associação essa que foi replicada em estudo TDT (vietnamitas) e em desenho caso-controle (brasileiros) (Mira et al., 2004). Posteriormente o achado não foi replicado em indianos e nem em chineses (Li et al., 2012; Malhotra et al., 2006). Em seguida, Alter e colaboradores (2013) realizaram um estudo de associação com a hanseníase *per se*, englobando mapeamento de alta densidade e o estudo do desequilíbrio de ligação na região *PARK2/PACRG*, identificando dois SNPs (rs1333955 e rs2023004) que capturaram a informação de associação tanto em um desenho TDT em Vietnamitas quanto em um caso-controle em Indianos (Alter et al., 2013). Nesse estudo, a associação foi mais pronunciada em jovens, sugerindo a participação da idade no desfecho.

Uma segunda abordagem de mapeamento na região do *PARK2* identificou um diferente bloco de SNPs associado com risco a hanseníase em indianos, mostrando que o perfil de LD na região difere entre as populações Vietnamitas e Indianas (Chopra et al., 2013). O mesmo estudo abordou a interação entre SNPs na região promotora do *PARK2* (rs9365492 e rs9355403) e SNPs presentes em genes de citocinas pró-inflamatórias/anti-inflamatórias, e mostraram combinações de SNPs que predisõem a susceptibilidade ou resistência à doença (Chopra et al., 2014). Embora os SNPs da parkina não tenham aparecido entre os associados no GWAS para hanseníase realizado em chineses, as análises *in silico* mostraram que os genes *PARK2* e *LRRK2* podem interagir diretamente em uma via incluindo genes de susceptibilidade a hanseníase (Zhang et al., 2009).

3.3.2 Genes da Resposta Adaptativa

O HLA participa da apresentação antigênica para as células T, conectando a imunidade inata à adaptativa, o que implica também em uma influência da variabilidade genética desta região sobre a eficiência na ativação dos linfócitos T. Os genes do HLA formam um complexo na região 6p21, considerada a mais variável do genoma humano, provavelmente em função da pressão seletiva exercida por doenças infecciosas. Tanto o HLA classe I (HLA-A, -B e -C) quanto o HLA classe II (HLA-DR, -DP e -DQ) já tiveram sua associação descrita na hanseníase, inclusive nos dois GWAS conduzidos com a doença (Wong et al., 2010; Zhang et al., 2009). Um dos resultados mais consistentes se refere aos alelos *HLA-DRB1*04* e *DRB1*10*, que nas populações Brasileira e Vietnamita foram associados à resistência e susceptibilidade, respectivamente (Vanderborght et al., 2007). A associação do alelo *DRB1*04* já havia sido descrita em japoneses, coreanos e taiwaneses (Joko S, 2000; Kim SJ, 1987) e a do *DRB1*10* observada previamente na população da Turquia (Koçak et al., 2002).

O gene *TNF*, localizado também na região 6p21, no HLA classe III, é um dos mais investigados em estudos de associação na hanseníase, o que se justifica pela grande importância desta citocina em protagonizar a resposta inflamatória na pele, a formação do granuloma e a lesão tecidual na doença. O principal SNP estudado é a troca -308 G>A na região promotora do *TNF*, o qual foi associado com a hanseníase nas populações do Brasil, Nepal, Índia e Malawi, mas com resultados discordantes no que diz respeito à força e direção da associação (Fitness et al., 2004; Roy et al., 1997; Sapkota et al., 2010; Shaw et al., 2001). Um estudo de meta-análise conduzido por Cardoso e colaboradores, incluindo os estudos da literatura e adicionalmente mais quatro populações brasileiras independentes (dois estudos caso-controle e dois desenhos baseados em famílias), indicou a associação do alelo *TNF*-308A com proteção a hanseníase, e a análise de subgrupos sugeriu que a associação é específica para a população brasileira (Cardoso et al., 2009b). Foi mostrado também que células de carreadores do alelo *TNF*-308A produziram maiores níveis de TNF quando estimuladas com *M. leprae*, indicando-o como marcador de resistência a doença. Estes dados corroboram ainda a relação observada do alelo do *TNF*-308A com resposta celular aumentada durante a reação de Mitsuda (Moraes et al., 2001). Uma análise estendida da região HLA/TNF por clonagem posicional apontou também a associação de um SNP no

gene da linfotóxina- α (*LTA*+80A>C) com susceptibilidade a hanseníase em jovens (<25 anos) nas populações vietnamita e indiana, e na população brasileira no limite da significância (Alcais et al., 2007).

Em relação ao eixo IL-12/IL-23/IFN- γ , foi mostrado que um SNP na porção 5' do gene do receptor da IL-12 foi associado com a forma LL da hanseníase e também à redução da atividade transcricional (Ohyama et al., 2005). Quanto ao gene do IFN- γ (*IFNG*), foram identificados polimorfismos relacionados a produção de citocinas (Pravica et al., 1999). Mais especificamente, a troca +874T>A, cujo alelo T foi atrelado ao aumento da produção do IFN- γ e resistência a tuberculose, tem sido o candidato mais comum (Sallakci et al., 2007). Uma abordagem utilizando duas populações caso-controle do Brasil mostrou a associação do *IFNG*+874 com proteção a hanseníase, e que essa variante está relacionada a maiores níveis de IFN- γ em células de indivíduos carreadores do alelo protetor (Cardoso et al., 2010). Um estudo de meta-análise reunindo também desenhos caso-controle confirma os dados anteriores (Silva et al., 2014).

O gene da citocina imunomoduladora IL-10 também foi associado à hanseníase. O SNP *IL10* -819 C>T, localizado na região promotora, foi amplamente avaliado, e o alelo T foi associado com risco aumentado de hanseníase *per se* na população brasileira em dois estudos independentes (Pereira et al., 2009; Santos et al., 2002), com posterior replicação na população Indiana (Malhotra et al., 2005). O último trabalho em brasileiros realizou um estudo caso-controle seguido de meta-análise, corroborando a associação do alelo -819T com a suscetibilidade a doença (Pereira et al., 2009). Por fim, no mesmo trabalho o alelo de risco foi funcionalmente relacionado a níveis reduzidos da citocina IL-10.

3.3.3 Genética e Episódios Reacionais

Os episódios reacionais são fenótipos complexos que podem sofrer influências de fatores de risco tanto ambientais quanto do hospedeiro, incluindo o seu perfil genético (Fava et al., 2012). De fato, as diferentes prevalências observadas para o desenvolvimento das reações em pacientes de diferentes regiões geográficas indicam que possa existir uma contribuição genética importante nesse desfecho.

Os primeiros estudos genéticos avaliando as reações como desfecho investigaram o papel de variações nos genes de receptores TLRs. Inicialmente, um desenho do tipo caso-controle na população do Nepal investigou variações no gene *TLR2*. Nesse estudo, o grupo de casos foi formado por pacientes que desenvolveram reação independente do tipo (*per se*), enquanto o grupo controle incluiu pacientes que não desenvolveram reação, sendo feitas também análises de subgrupos para os tipos de reação (T1R e T2R) (Bochud et al., 2008). Com base nesse estudo, uma variação microssatélite e também o SNP +597C>T foram associados com risco de desenvolvimento da forma T1R. Posteriormente, foi avaliada a associação do SNP *TLR1*+1805T>G com o desenvolvimento de reações na população de pacientes do Nepal, após um tempo de seguimento de três anos, resultando na associação do alelo G com proteção a T1R (Misch et al., 2008). Um terceiro grupo estudou polimorfismos nos genes *TLR1* e *TLR2* com os episódios reacionais na população do Bangladesh, e identificou o genótipo *TLR1* +743AA associado com o risco aumentado de desenvolvimento de ENL, comparado aos pacientes que não desenvolveram reação (Schuring et al., 2009).

A participação do gene *NOD2* também foi abordada no desfecho reação. O estudo conduzido por Berrington e colaboradores investigou a associação entre SNPs no gene *NOD2* tanto com hanseníase *per se* quanto com os episódios reacionais em pacientes do Nepal, incluindo no painel 32 tag SNPs que na população em estudo foi informativo para a região gênica do *NOD2*. Com base nesse estudo, foi descrita a associação do SNP rs8044354 com T1R e também da variante rs2287195 com T2R (Berrington et al., 2010).

O componente genético nas reações hansênicas foi também abordado em estudos conduzidos na população brasileira. O gene *NRAMP1* que codifica a proteína NRAMP (do inglês *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*), relacionada ao processamento de antígenos bacterianos pelas células fagocíticas, foi avaliado quanto a associação com as reações em pacientes da região nordeste brasileira (Recife-PE). De três variações avaliadas no *NRAMP1*, o genótipo TT do SNP+274C>T foi associado com susceptibilidade a T1R e com proteção ao desenvolvimento de T2R (Teixeira et al., 2010). Um segundo estudo foi realizado em pacientes da região central do Brasil (Goiânia-GO) avaliando a associação de variantes no gene da *IL-6* com as reações hansênicas (Sousa et al., 2012). Experimentos prévios do mesmo grupo, envolvendo a

dosagem de citocinas e quimiocinas no plasma, mostraram que a IL-6 foi o único biomarcador para ambos os episódios reacionais, justificando a escolha do mesmo como gene candidato (Stefani et al., 2009). Foram identificadas associações de três SNPs especificamente para T2R, dentre eles o alelo G do SNP rs2069840, associado com proteção ao desfecho, foi também correlacionado com maiores níveis de plasma da IL-6 (Sousa et al., 2012).

Os estudos genéticos avaliando o desfecho reação necessitam de maior mapeamento em outras regiões gênicas, incluindo replicações em diferentes populações. Adicionalmente os estudos genéticos carecem de validações funcionais para entender como essas variações poderiam influenciar na susceptibilidade ou não dos pacientes no desenvolvimento dos episódios.

II. JUSTIFICATIVA

A hanseníase ainda é um problema de saúde pública no Brasil, onde a incidência é a mais alta em todo o mundo e permanece no mesmo patamar a cada ano. Diante do fato de que a hanseníase é uma doença complexa cuja influência genética já foi evidenciada, estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de identificar marcadores genéticos de susceptibilidade associados com a mesma. Para tal fim já foram empregados desenhos genéticos tais como estudos de ligação, de caso-controle e em famílias, utilizando estratégias diversas para investigar a participação do gene/marcador, que vão desde a escolha de SNPs e genes candidatos ao rastreamento do genoma completo.

Genes envolvidos na resposta imune inata são interessantes candidatos para estudos de associação à hanseníase *per se*, principalmente devido ao papel dessa via na resposta inicial do hospedeiro frente à infecção, podendo ser decisiva na progressão ou não à doença. Os genes dos receptores TLR1 e NOD2, por exemplo, são candidatos importantes devido à participação no reconhecimento do *M. leprae* e ativação de vias efetoras centrais na resposta protetora contra o bacilo (Krutzik et al., 2003; Schenk et al., 2012). Além da implicação funcional desses receptores na imunopatogênese da doença, os genes que os codificam já foram associados com susceptibilidade à hanseníase (Johnson et al., 2007; Wong et al., 2010). Entretanto, até o momento ainda não foram avaliados na população brasileira.

Estudos mais recentes têm priorizado também a identificação de genes de susceptibilidade a desfechos clínicos tais como os episódios reacionais, que se constitui uma abordagem de extrema relevância, especialmente devido à importância desse desfecho no contexto de gravidade clínica do pacientes. Diante disso, os genes dos receptores TLR1 e NOD2 também já foram associados previamente com as reações, e acredita-se que outros genes associados com hanseníase *per se* poderiam desempenhar um papel importante nesse desfecho. Até o momento foi descrita a associação do gene *IL6* com reação em brasileiros, mas tanto esse como os demais estudos ainda não foram validados em outras populações. Assim, vale ressaltar que os genes *TLR1* e *NOD2* também não estão descritos para o desfecho reação na população brasileira.

A partir da identificação de um painel de marcadores genéticos de susceptibilidade à hanseníase, seria possível caracteriza-lo em populações com maior exposição ao bacilo, tais como os contatos domiciliares, e sugerir o acompanhamento

mais cuidadoso bem como medidas preventivas ao grupo de maior risco. No âmbito das reações o painel de marcadores em combinação com outras variáveis de risco, seria útil para rastrear os pacientes mais susceptíveis aos episódios reacionais, na tentativa de prevenir o agravamento do quadro clínico. O uso de um tratamento diferenciado preventivo teria grande impacto na incidência das reações hansênicas, incapacidades, e, conseqüentemente, na qualidade de vida dos pacientes.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a associação de genes da resposta imune no desenvolvimento da hanseníase *per se* e episódios reacionais.

2. Objetivos específicos

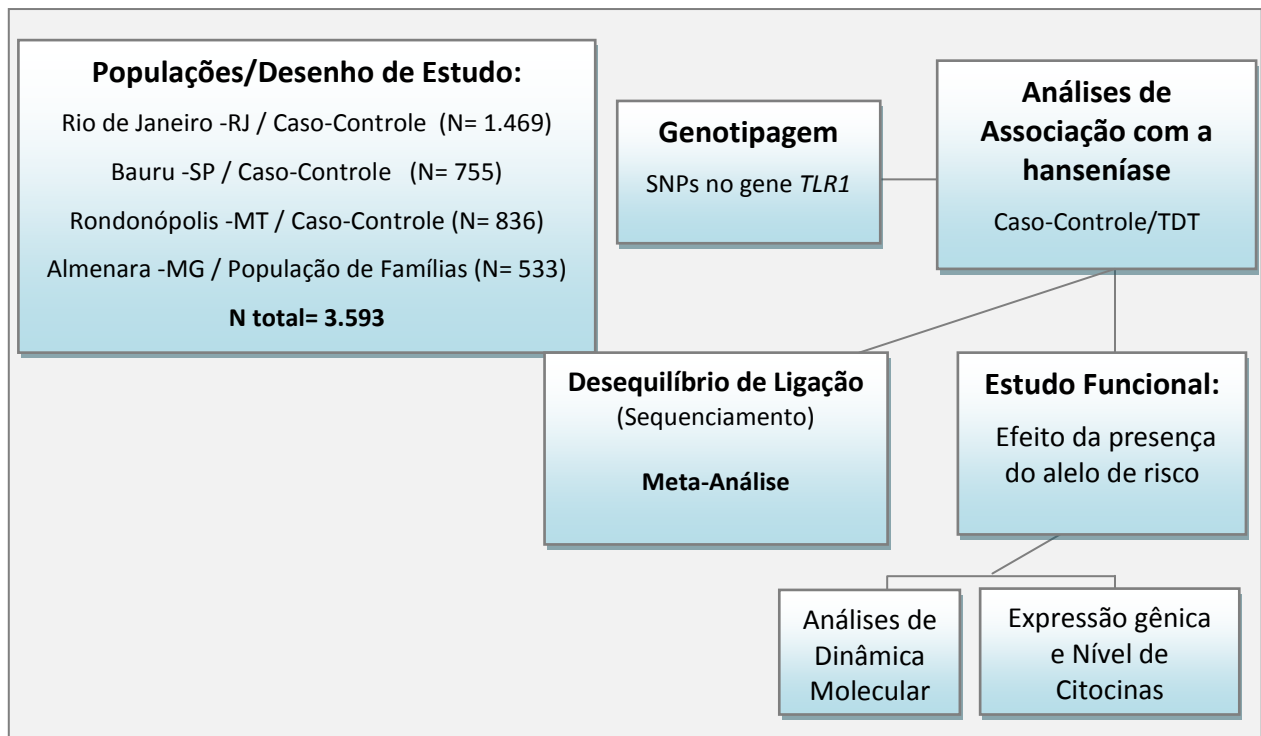
I- Investigar a associação entre polimorfismos no gene *TLR1* e a hanseníase *per se*, e avaliar a correlação genótipo-fenótipo em carreadores do alelo de risco;

II- Estudar a associação de polimorfismos no gene *NOD2* com a hanseníase *per se*,

III- Avaliar a associação entre 7 genes envolvidos na resposta imune à hanseníase, e o desenvolvimento dos episódios reacionais.

Capítulo II: Estudo de Associação Genética e Funcional entre o Gene TLR1 e a Hanseníase

O *TLR1* está entre os genes associados com a hanseníase em estudos mais recentes, e a replicação desta associação, através de desenhos de estudo distintos, incluindo abordagens de pequena e larga escala, sugere que o *TLR1* de fato desempenha um papel importante na suscetibilidade genética à doença. Dessa forma, decidimos investigar o efeito de polimorfismos do gene *TLR1* na população brasileira utilizando a estratégia de estudo representada no esquema abaixo.



N= tamanho amostral

De início, desenhamos um estudo caso-controle na população do Rio de Janeiro. Em seguida, a parceria de grupos colaboradores possibilitou a ampliação do estudo através da inclusão de populações de diferentes regiões do Brasil. Primeiramente foram utilizadas as populações de Bauru (caso-controle) e de Almenara (TDT) para testar a associação das variações I602S (rs5743618) e N248S (rs4833095), selecionados pela sua associação previa com a hanseníase em outras populações, e pela potencial funcionalidade. Os resultados indicaram a associação do SNP N248S com a hanseníase *per se*, confirmando a associação do alelo 248S com risco aumentado de desenvolver a doença também na população brasileira. A combinação dos dados gerados com os que haviam sido publicados no estudo da população de Bangladesh através de meta-análise apoiou a hipótese da associação do marcador com a hanseníase.

Ao avaliar a correlação genótipo-fenótipo em dois desenhos independentes, observamos que carreadores do alelo de risco apresentaram uma redução na razão TNF/IL-10, sugerindo reduzido perfil inflamatório. Adicionalmente, análises de dinâmica molecular mostraram que a presença do 248S modificou sutilmente o perfil eletrostático e as interações hidrofóbicas da proteína TLR1. Esses achados sugeriram uma possível explicação funcional para o efeito de risco do alelo S na hanseníase. Os resultados desse estudo foram publicados na revista "The Journal of Infectious Diseases", em artigo que segue anexado nas próximas páginas.

Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection

Carolinne de Sales Marques,¹ Vânia N. Brito-de-Souza,³ Luana Tatiana Albuquerque Guerreiro,¹ João H. Martins,² Evaldo P. Amaral,⁵ Cynthia C. Cardoso,^{1,a} Ida Maria Foschiani Dias-Batista,³ Weber Laurentino da Silva,³ José Augusto C. Nery,¹ Priscila Medeiros,³ Patricia Gigliotti,³ Ana Paula Campanelli,⁴ Marcos Virmond,³ Euzenir Nunes Sarno,¹ Marcelo T. Mira,⁶ Francisco C. F. Lana,⁵ Ernesto Raúl Caffarena,² Antonio G. Pacheco,² Ana Carla Pereira,^{3,b} and Milton Ozório Moraes^{1,b}

¹Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz and ²Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, ³Instituto Lauro de Souza Lima and ⁴Departamento de Ciências Biológicas, Escola de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, ⁵Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, and ⁶Programa de Graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

Conflicting findings about the association between leprosy and *TLR1* variants N248S and I602S have been reported. Here, we performed case-control and family based studies, followed by replication in 2 case-control populations from Brazil, involving 3162 individuals. Results indicated an association between *TLR1* 248S and leprosy in the case-control study (SS genotype odds ratio [OR], 1.81; $P = .004$) and the family based study ($z = 2.02$; $P = .05$). This association was consistently replicated in other populations (combined OR, 1.51; $P < .001$), corroborating the finding that 248S is a susceptibility factor for leprosy. Additionally, we demonstrated that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying 248S produce a lower tumor necrosis factor/interleukin-10 ratio when stimulated with *Mycobacterium leprae* but not with lipopolysaccharide or PAM₃cysK₄. The same effect was observed after infection of PBMCs with the Moreau strain of bacillus Calmette-Guerin but not after infection with other strains. Finally, molecular dynamics simulations indicated that the Toll-like receptor 1 structure containing 248S amino acid is different from the structure containing 248N. Our results suggest that *TLR1* 248S is associated with an increased risk for leprosy, consistent with its hypoimmune regulatory function.

Keywords. *TLR1*; leprosy; SNPs; N248S; TNF; IL-10; cytokine.

Interactions between bacterial, fungi, and viral components and pattern-recognition receptors, such as Toll-like receptors (TLRs), activate the NF- κ B pathway, trigger inflammation, and initialize the adaptive immune

response [1–3]. It has been suggested that subtle genetic variations in relevant genes of the innate and adaptive immune responses are regulating every step of the host-pathogen interaction [4, 5], whereas the low genetic variability of *Mycobacterium leprae* [6, 7] suggests that host genetic factors may have a major influence on the risk of *M. leprae* infection and the progression of leprosy.

In this scenario, knowledge of the pathways triggered by pattern-recognition receptors, such as *TLR1* and *NOD2*, is key to defining the outcome of leprosy. *TLR1* and *TLR2* cooperate to detect mycobacterial triacylated lipoproteins, while the activation of the *TLR1/TLR2* dimer by *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins triggers the TLR-mediated antimicrobial response, reducing

Received 4 September 2012; accepted 7 January 2013; electronically published 1 April 2013.

^aPresent affiliation: Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

^bA. C. P. and M. O. M. are joint senior contributors.

Correspondence: Milton Ozório Moraes, PhD, Laboratório de Hanseníase, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365 - Manguinhos Rio de Janeiro, RJ - 21040-360, Brazil (mmoraes@fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases 2013;208:120–9

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.
DOI: 10.1093/infdis/jit133

the viability of intracellular bacilli [8, 9]. Polymorphisms in the *MRC1* and *NOD2* genes have been associated with an increased risk for leprosy [10–12]. Likewise, polymorphisms in *TLR* genes were repeatedly associated with leprosy per se and leprosy reactions [13–18]. The S allele of the I602S (T1805G) polymorphism has been associated with protection against leprosy and with impaired TLR1 expression at the cell surface, NF- B signaling, and proinflammatory cytokine production [13, 15, 19]. However, I602S was not associated with the disease in a population from Bangladesh [17]. Also, the same study described the 248SS genotype of another nonsynonymous single-nucleotide polymorphism (SNP), N248S (G743A), as being associated with an increased risk of leprosy [17]. Interestingly, allele N of TLR1 N248S has been associated with decreased production of TLR1 and cytokines [2, 20]. Here, we investigate whether the SNPs N248S and I602S at *TLR1* are associated with leprosy and the downstream activation of the TLR1 pathway.

METHODS

Subjects and Study Design

We performed a case-control study involving individuals from Bauru, a city in the Brazilian state of São Paulo, at the Lauro de Souza Lima Institute (ILSL). We also conducted a family based study involving individuals from Almenara, Minas Gerais, Brazil. Then, we used a stepwise replication approach to include case-control studies performed in Rio de Janeiro, Brazil, at the Oswaldo Cruz Foundation and in Rondonópolis, Mato Grosso, Brazil. In each case-control cohort, unrelated blood donors from the same area of endemicity as patients were recruited as controls. The familial sample included households of patients with leprosy, composed originally of trios formed by the index patient and their biological parents. For households in which one of the parents was not present, siblings were included to infer the genotype of the absent parent. All patients were classified according to the criteria of Ridley and Jopling [21] and also according to the World Health Organization classification (paucibacillary or multibacillary) [22]. The ethnicity of each subject was classified as caucasoid, mestizo, or black, according to morphological characteristics of both the individual and their family. General characteristics of all samples used in these studies are presented in [Supplementary Table 1](#).

For genetic functional studies, a group of 24 healthy female individuals with a mean age of 45 years was selected from among ILSL staff: 9 had genotype 248NN, 9 had genotype 248NS, and 6 had genotype 248SS. A second sample of 22 healthcare workers from the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro was enrolled. Five workers were females, and the mean age was 33 years; 10 had genotype 248NN, 9 had genotype 248NS, and 3 had genotype 248SS. All individuals enrolled in the current study provided written informed consent. The

study protocol was approved after revision by local ethical boards of participating institutions.

DNA Extraction and SNP Genotyping

Genomic DNA was extracted from frozen blood samples by the salting out method. N248S polymorphism (rs4833095; A743G) was genotyped by real-time polymerase chain reaction (PCR) allelic discrimination, and reactions were performed using a TaqMan assay from Applied Biosystems (assay C_44103606_10) according to the manufacturer's instructions. The I602S SNP (rs5743618; T1805G) was genotyped using nested PCR, with a conventional reaction performed as described by Johnson et al [13]. Then, the amplicons were used for real-time PCR reactions with the TaqMan Design Assay (Applied Biosystems). All real-time reactions were conducted using the StepOne Plus Real-Time PCR System, and genotyping was based on allelic discrimination, through the StepOne 2.1 software (Applied Biosystems).

Sequencing

To identify other possibly associated SNPs at the TLR1 coding region, we sequenced PCR products of the *TLR1* gene in 114 healthy controls. In brief, we used 2 pairs of overlapping primers for both PCR and sequencing (TLR1F103: 5'-GGT CTC ATC CAC GTT CCT AAA-3'/TLR1R1100: 5'-TTT TCA AAA ACC GTG TCT GTT-3'; TLR1F935: 5'-TCG GTT TTC CGC AAA GTT AT-3'/TLR1R1925: 5'-AAA TAA ATG CAT GAA ACT GGA GAT-3'). Sequencing reactions were performed with the Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), using the 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). The sequences were analyzed by SeqScape software 2.1 (Applied Biosystems) and compared against the *TLR1* reference sequence (GenBank accession no. NM_003263.3).

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Culture

PBMCs were purified using Histopaque (Sigma, St. Louis, MO), and cells were cultivated in 24-well plates at a concentration of 5×10^5 cells/well in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium with supplements, as described elsewhere [23]. PBMCs from individuals from Bauru were stimulated with 100 ng/mL of PAM3CysK4 (PAM; N-palmitoyl-S-[2,3-bis (palmitoyl-oxy)-(2R)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine, Invitrogen, San Diego, CA), 100 ng/mL of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS; Sigma), and 10  g/mL of sonicated *M. leprae* antigen. In the study involving the Rio de Janeiro population, blood cells were cultivated under the same conditions, except for the cell concentration (3×10^5 cells/well), and were stimulated with live *Mycobacterium bovis* Danish, Moreau (Brazilian strain), or Pasteur strains at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1, without antibiotics. Cultures were kept at 37 C in a humidified 5% CO2 atmosphere

for 18 hours (for the Bauru samples) or for 24 hours or 72 hours (for the Rio de Janeiro samples). After this, the cell suspension was harvested and centrifuged. For all samples, the supernatant was kept at -80°C for cytokine measurements; for the Bauru samples, the cell pellet was resuspended in the residual volume and evaluated by flow cytometry.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The levels of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin 10 (IL-10) in the supernatant of PBMC cultures were evaluated by ELISA in 2 independent assays. For assay of the Bauru samples, the supernatant was collected 18 hours after stimulation. For PBMC samples from Rio de Janeiro, the supernatant was collected 24 hours and 72 hours after stimulation for quantification of TNF and IL-10, respectively. Quantikine HS (R&D Systems, Minneapolis, MN) and BD OptEIA (BD Biosciences) commercial kits were used to analyze IL-10 and TNF, respectively, according to the manufacturers' instructions.

Flow Cytometry

TLR1 expression in monocytes was assessed for 15 individuals, 5 with each N248S polymorphism, right after purification or subsequent to the cell culture. Cells were incubated with phycoerythrin-conjugated anti-human TLR1 (eBiosciences, San Diego, CA) and allophycocyanin-conjugated anti-human CD11c (BD Biosciences, San Jose, CA). Isotype-matched antibodies were used as negative controls, and AB human serum was used to block nonspecific binding. A total of 70 000 events were reached in a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience). Data were analyzed using FACS Express software, version 3 (De Novo Software, Los Angeles, CA).

Comparative Modeling and Molecular Dynamics

The 8 haplotypes formed by polymorphisms at positions N248S, H305L, and P315L (NHL, NHP, NLL, NLP, SHL, SHP, SLL, and SLP) were incorporated into the crystal structure (PDB code 2Z7X) that corresponds to the NHP haplotype, using the Pymol program [24]. The simulations were run on Gromacs 4.5.4. [25]. The systems were energy minimized, using periodic boundary conditions, to fit the atomic positions to the GROMOS96 force field [26]. The net charge of the complexes was held neutral by adding 4 Na^+ counterions. The equilibration phase consisted of 2 stages totaling 5 ns: a 3-ns stage to restrain the protein coordinates to their initial positions by applying harmonic potential with a spring constant K of 1000 kJ/(mol nm^2) to stabilize water molecules around the protein at 100 K, 200 K, and 300 K, respectively, and a 2-ns stage at 310 K to keep the complexes free. After the equilibration period, simulations evolved freely for an additional 50 ns, saving trajectories and velocities every 5 ps for analysis of structural features.

Statistical Analyses

For case-control samples, all statistical analyses (genotypic, allelic, and haplotypic analyses, with and without adjustment for the covariates) were performed as previously described [23, 27]. SNPs at *TLR1* were tested for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in control groups and were in agreement in all populations studied. We evaluated whether the allelic doses and their odds ratios (ORs) were directly proportional (which is indicative of an allele-dose effect) by the Cochran-Armitage test for trend. Linkage disequilibrium (LD) analysis between markers was performed through r^2 statistics in the control group. All analyses were performed using R statistical software for Windows, version 2.14.0 [28], using the genetics [29], haplo.stats [30], and coin [31] packages.

In the family based study, a transmission disequilibrium test (TDT) was performed on the basis of the number of transmissions of a marker allele from heterozygous parents to an affected child [32]. We determined the number of transmitted and nontransmitted alleles, using the *tdthap* package in R [33]. Analysis of data from the family based study was conducted using FBAT software [34, 35].

For TLR1 expression, we considered the percentage of cells expressing the receptor among different groups or stimuli. Data about TLR1 expression and cytokines measurements were analyzed by the nonparametric Mann-Whitney *U* test to compare median values between *S* carriers (genotypes NS + SS) and noncarriers (genotype NN) of SNP N248S. Analyses were performed using GraphPad InStat, version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), with *P* values of $< .05$ considered statistically significant.

RESULTS

The N248S SNP Is Associated With Leprosy

The frequency of genotypes, alleles, and minor allele carriers of SNPs N248S and I602S in the Bauru population are shown in Table 1. The 248 genotypes 248NS and 248SS, the 248S allele, and 248S carriage were significantly associated with leprosy susceptibility. In contrast, although the 602S variant was more frequent among controls (suggesting protection), it was not significantly associated with leprosy.

To determine whether the presence of other SNPs might explain the association between 248S and leprosy susceptibility, sequencing of the entire polymorphic region in 114 individuals was performed. LD analysis was conducted, and N248S showed LD with a synonymous SNP, S506S ($r^2 = 0.92$). Also, moderate LD was detected between N248S and I602S ($r^2 = 0.67$). No other important LD was observed among any SNPs detected (Figure 1). Next, we performed a N248S-I602S haplotype analysis (Table 2). By use of the N248/602S haplotype as a baseline, the combination S248/I602 was, in the same direction,

Table 1. Genotype, Allele, and Carriers Frequencies of the N248S and I602S Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) at *TLR1* and Leprosy in a Case-Control From Bauru, São Paulo, Brazil

SNP	No. (Frequency)		Odds Ratio (95% CI) ^a			
	Cases	Controls	Unadjusted	<i>P</i>	Adjusted ^b	<i>P</i>
N248S (rs4833095)						
NN	95 (0.21)	105 (0.28)	Reference		Reference	
NS	227 (0.50)	174 (0.46)	1.44 (1.02–2.02)	.03	1.58 (1.10–2.24)	.01
SS	128 (0.28)	97 (0.26)	1.46 (.99–2.13)	.05	1.81 (1.20–2.71)	.004
Total	450	376	...		...	
Allele N	417 (0.46)	384 (0.51)	Reference		Reference	
Allele S	483 (0.54)	368 (0.49)	1.21 (.91–1.59)	.17	1.34 (1.01–1.79)	.04
S carriers	355 (0.78)	271 (0.72)	1.45 (1.05–1.99)	.02	1.65 (1.18–2.30)	.003
I602S (rs5743618)						
II	171 (0.38)	133 (0.35)	Reference		Reference	
IS	213 (0.47)	191 (0.50)	0.87 (.64–1.16)	.35	0.79 (.58–1.08)	.15
SS	68 (0.15)	55 (0.15)	0.96 (.63–1.46)	.85	0.83 (.53–1.28)	.40
Total	452	379	...		...	
Allele I	555 (0.61)	457 (0.60)	Reference		Reference	
Allele S	349 (0.39)	301 (0.40)	0.95 (.72–1.26)	.74	0.88 (.66–1.18)	.42
S carriers	281 (0.62)	246 (0.65)	0.89 (.66–1.18)	.42	0.80 (.59–1.08)	.15

Global *P* values were .07 for N248S genotypes vs reference and .60 for I602S genotypes vs reference.

Bold values denote statistically significant results.

Abbreviation: OR, odds ratio.

^a By logistic regression analysis.

^b Adjusted for the covariates sex and ethnicity.

associated with leprosy susceptibility (adjusted OR, 1.26; *P* = .03). Furthermore, similar to that seen previously in Indians, the arrangement 248S/602S was virtually absent in Brazilians (frequency, < 0.01; Table 2).

In the family based replication study from Almenara, the TDT revealed that the S248 allele was overtransmitted to affected individuals ($z = 2.15$; *P* = .05; [Supplementary Table 2](#)), confirming the association with susceptibility to leprosy per se. The familial sample was tested for I602S, and although the 602S allele was undertransmitted to affected individuals, it was not statistically significant ($z = 2.16$; *P* = .06; data not shown). In the Almenara sample, N248S and I602S were also in moderate linkage disequilibrium ($r^2 = 0.55$), and consistently the 248S/I602 haplotype was associated with an increased risk for leprosy, replicating findings of the case-control study (Table 2).

Because of the relevant genetic effect of N248S observed in 2 populations, we turned our focus to this SNP and proceeded with a second replication experiment that involved 2 independent case-control studies with population samples from Rio de Janeiro and Rondonopolis. In the Rio de Janeiro sample, the 248SS homozygous genotype and the 248S allele were significantly more frequent among patients as compared to controls (Table 3), replicating the Bauru data in the same direction. Furthermore, the allele-dose effect was confirmed by the Cochran-Armitage test for trend ($\chi^2 = 21.23$; *P* < .001), since the OR was

larger for the SS genotype than for the NS genotype. The second case-control replication in Rondonopolis also revealed an association between 248S (248SS genotype and S carriers) and susceptibility to leprosy (Table 3). A combined analysis involving all 3 case-control population samples (1276 cases and 1353 controls) increased the power of the study and corroborated the associations previously observed between the 248S allele at *TLR1* and leprosy susceptibility (Table 4). Also, in a combined analysis, ORs showed an allele-dose effect ($\chi^2 = 15.20$; *P* < .001).

Additionally, we performed a systematic review of the literature for studies of the association between N248S and leprosy per se that could qualify for a meta-analysis [36, 37], but the search yielded only 1 eligible study, a case-control study performed by Schuring et al [17] in Bangladesh ([Supplementary Table 2](#)). The pooled OR from the meta-analysis indicated that N248S conferred an increased risk (1.22; *P* < .0001), supporting the association between 248S and susceptibility to leprosy per se ([Supplementary Figure 1](#)).

The N248S SNP Is Associated With Hyporesponsive Immune Activation

We then investigated the effect of the N248S variation on TLR1 function. For this purpose, first we evaluated the expression of TLR1 in monocytes obtained from healthy donors PBMCs noncarriers and carriers of allele S (NN vs NS + SS), assessed

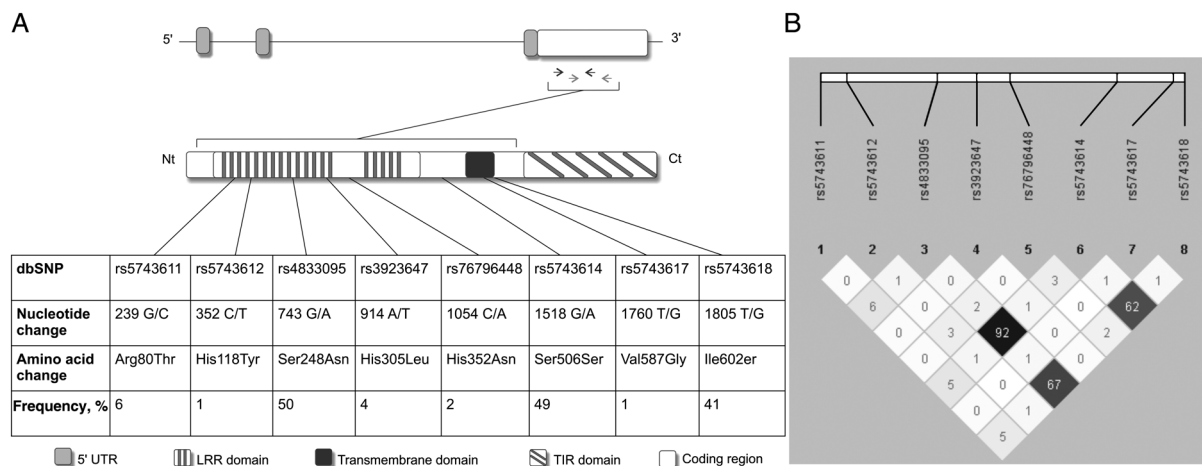


Figure 1. Detailed sequence analysis of the *TLR1* coding region in Brazilians. *A*, Schematics of *TLR1* exons (grey and white squares) and introns (lines). The arrows represent 2 polymerase chain reaction fragments encompassing the most important single-nucleotide polymorphisms (SNPs). A total of 1.823 pb of the *TLR1* coding region were sequenced. Leucine-rich repeats (LRRs), transmembrane domains, and (Toll–interleukin 1 receptor (TIR) domains are highlighted. The frequency and position of each SNP are indicated in the table ($n = 114$). *B*, Linkage disequilibrium (LD) map of polymorphisms identified at *TLR1*. The r^2 values, calculated by Haploview software, are shown in each box.

immediately after isolation (ex-vivo) or cultured with either PAM, LPS, or *M. leprae*. There were no statistically significant differences in the percentage of monocytes expressing TLR1 between 248S carriers (248NS/SS) and noncarriers under any stimulus (Figure 2A). Stratification for I602S (II vs SS + SI) did not result in significant differences in the expression of TLR1 (data not shown). Next, we examined cytokine levels in the supernatant of stimulated PBMCs obtained from 248S healthy carriers and noncarriers recruited in Bauru. When evaluated individually, IL-10 and TNF levels were not significantly different among carriers and noncarriers of the 248S allele (data not shown). However, the log of the ratio of the TNF level to the IL-10 level (TNF/IL-10) was significantly lower in 248S carriers

stimulated with sonicated antigen of *M. leprae* (ratio, -1.3) than in noncarriers (ratio, 0.6 ; $P < .0001$; Figure 2B). Yet the log (TNF/IL10) was not different when we compared 602S carriers (602IS/SS) and noncarriers (602II; data not shown). The interleukin 6 levels in the supernatant were also stratified by N248S and I602S, but the differences were not significant for either analysis (data not shown). We also analyzed an independent sample of healthy subjects recruited from Rio de Janeiro. Similar to the results from the Bauru sample, the log(TNF/IL10) was significantly lower in 248S carriers (ratio, 0.1) than in noncarriers (ratio, 0.6 ; $P = .01$), but significance was reached only when the Moreau strain of bacillus Calmette-Guerin was used as a stimulus (Figure 2C).

Table 2. Frequencies of N248S/I602S Haplotype at *TLR1* in Case-Control and Family Based Studies and Association With Leprosy

Haplotype	Case-Control Study, Frequency ^a		Odds Ratio (95% CI) ^b				Transmission Disequilibrium Test				Previous Studies, Frequency	
	Cases	Controls	Unadjusted	P	Adjusted ^c	P	Frequency	T:U, No.	z	P	White Individuals [19]	Indians [18]
N248/I602	0.08	0.12	0.70 (.49–1.00)	.05	0.67 (.47–.98)	.03	0.14	18:16	–0.25	.78	Absent	0.42
248S/I602	0.52	0.48	1.13 (.92–1.40)	.23	1.26 (1.01–1.57)	.03	0.53	49:33	2.32	.03	0.23	0.47
N248/602S	0.38	0.39	Reference		Reference		0.32	27:45	–2.24	.05	0.70	0.09
248S/602S	Absent	Absent	...		...		Absent	...	...		0.07	Absent

Bold values denote statistically significant results.

Abbreviations: CI, confidence interval; T, transmitted alleles; U, untransmitted alleles.

^a Estimated by maximum likelihood analysis. Haplotypes with a frequency of <0.01 are denoted as absent.

^b By logistic regression analysis.

^c Adjusted for the covariates sex and ethnicity.

Table 3. Genotype, Allele, and Carriers Frequencies of the N248S Single-Nucleotide Polymorphism at *TLR1* and Leprosy in Case-Control Studies From Rio de Janeiro and Rondonopolis, Brazil

Variable	Rio de Janeiro					Rondonopolis				
	No. (Frequency)		Odds Ratio (95% CI) ^a			No. (Frequency)		Odds Ratio (95% CI) ^a		
			Unadjusted	P	Adjusted ^b			Unadjusted	P	Adjusted ^b
NN	142 (0.24)	142 (0.25)	Reference		Reference	76 (0.19)	107 (0.26)	Reference		Reference
NS	234 (0.40)	288 (0.51)	0.81 (.60–1.08)	.16	0.83 (.61–1.12)	206 (0.51)	197 (0.48)	1.47 (1.03–2.09)	.03	1.47 (1.04–2.29)
SS	208 (0.36)	134 (0.24)	1.55 (1.12–2.13)	.007	1.59 (1.13–2.22)	120 (0.30)	109 (0.26)	1.55 (1.04–2.29)	.03	1.56 (1.05–2.31)
Total	584	564				402	413			
Allele N	518 (0.44)	572 (0.51)	Reference		Reference	358 (0.45)	411 (0.50)	Reference		Reference
Allele S	650 (0.56)	556 (0.49)	1.29 (1.02–1.62)	.03	1.28 (1.01–1.63)	446 (0.55)	415 (0.50)	1.23 (.93–1.62)	.14	1.24 (.94–1.63)
S carriers	376 (0.75)	430 (0.74)	1.04 (.80–1.36)	.73	1.05 (.79–1.38)	326 (0.81)	306 (0.74)	1.50 (1.07–2.09)	.02	1.50 (1.07–2.09)

Global *P* values (N248S genotypes vs reference) were <.001 for Rio de Janeiro and .05 for Rondonopolis. Bold values denote statistically significant results.

Abbreviation: CI, confidence interval.

^a By logistic regression analysis.

^b Adjusted for the covariates sex and ethnicity.

Finally, to investigate the influence of N248S on the 3-dimensional structure of TLR1, we conducted a comparative modeling analysis, using haplotypic combinations involving different amino acids at positions N248S, H305L, and P315L that were selected on the basis of their shared position at an important TLR1 site for lipopeptide recognition [38]. It was not possible to include I602S in comparative modeling, since X-ray crystallography findings for the region containing this SNP were not deposited in the protein database [39]. The molecular dynamics approach has the advantage of considering the positional information of the atoms along time, in contrast to other methods, which predict interactions and properties on the basis of a static snapshot. Molecular dynamics analysis showed that, compared with the baseline haplotype of N248/H305/P315, the S248/H305/P315 resulted in a change in the electrostatic potential and solvation layer around TLR1 (Figure 3A). An estimate of the electrostatic surface potential showed a redistribution of atomic partial charges, yielding a more negative environment in the presence of S248, while in the vicinity of N248S the potential was very close to neutral. The analysis of the number of hydrogen bonds formed during the molecular dynamics analysis showed a lower number of bonds for the 4 248S haplotypes, indicating that the transition from asparagine to serine resulted in a slight loss of interaction with water (Figure 3B).

DISCUSSION

The most important finding of our study is that the *TLR1* SNP N248S controls responses to mycobacteria and contributes to leprosy susceptibility. Also, N248S regulates immune responses to bacillus Calmette-Guerin stimulation, which is crucial finding for understanding how to customize BCG vaccine to hyporesponsive individuals.

We found a very reliable genetic association effect of *TLR1* 248S with leprosy susceptibility. This genetic finding was obtained through 2 replications of an initial positive association signal, in which 248S variations were found to confer an increased risk of developing leprosy in case-control and family based studies. The association between the SS genotype and the risk of leprosy was previously reported in a Bangladesh population [17], which we detected during a systematic review. We added data from this study our sample and performed a meta-analysis: the analysis included 4207 individuals and had a pooled OR of 1.22 ($P < .0001$). Curiously, allele 248S may be involved in the control of susceptibility to other mycobacterial diseases, such as tuberculosis in African Americans [40].

The present findings connecting N248S but not I602S with leprosy are intriguing because other studies, conducted among Turkish [13] and Indian [18] populations, found that 602S was associated with leprosy protection. While few articles have provided a detailed analysis of other SNPs at the locus in leprosy studies, both the 602S allele [40] and the 602I allele were

Table 4. Genotype, Allele, and Carriers Frequencies of the N248S Single-Nucleotide Polymorphism at *TLR1* and Leprosy in a Case-Control Study Combining Populations from Bauru, Rio de Janeiro and Rondonopolis, Brazil

Variable	No. (Frequency)		Odds Ratio (95% CI) ^a			
	Cases	Controls	Unadjusted	<i>P</i>	Adjusted ^b	<i>P</i>
NN	280 (0.22)	354 (0.26)	Reference		Reference	
NS	622 (0.49)	659 (0.49)	1.19 (.98–1.44)	.07	1.22 (1.01–1.49)	.03
SS	374 (0.29)	340 (0.25)	1.39 (1.12–1.72)	.003	1.51 (1.21–1.89)	.001
Total	1276	1353	...		...	
N	1182 (0.46)	1367 (0.51)	Reference		Reference	
S	1370 (0.54)	1339 (0.49)	1.18 (1.01–1.37)	.03	1.23 (1.05–1.44)	.008
S carriers	996 (0.78)	999 (0.73)	1.26 (1.05–1.50)	.01	1.31 (1.01–1.58)	.003

The global *P* value was .01 for genotypes vs reference. Bold values denote statistically significant results.

Abbreviation: CI, confidence interval.

^a By logistic regression analysis.

^b Adjusted for the covariates sex, ethnicity, and population.

associated with an increased risk of tuberculosis [20]. Also, re-analysis of a genome-wide study did not find I602S to be associated with leprosy in a Chinese population [41]. It is possible that the heterogeneous distribution of I602S frequencies in different regions of the world and the changes in LD could explain differential associations in the locus. In white individuals [2], the r^2 value for the relationship between N248S and I602S was around 0.80, whereas in Indian individuals, the r^2 value was around 0.08 [18]. Yet, the arrangement of the 248S/602S haplotype was virtually absent in our study and in the Indian study, although among white individuals this haplotype has a frequency of 7% (Table 2) [19].

Although we evaluated populations from different geographical regions of Brazil, we calculated the LD between N248S and I602S in all of them (data not shown) and observed a moderate LD (between 0.55 and 0.67). Thus, we cannot ignore the possibility that I602S was a genetic confounder of the effect of N248S. Nevertheless, our genetic study indicated a significant association between N248S and both leprosy and inflammation, but the association between I602S and each outcome, although potentially important, was not statistically significant, suggesting a pronounced effect of N248S in Brazilians. Analysis involving a larger number of SNPs genotyped in the region after sequencing (Figure 1) suggested that only S506S is in high LD with N248S. Therefore, we could not rule out that S506S is the functional SNP, since other synonymous SNPs have been associated with myriad diseases [42]. In this regard, it is likely that different genotypes contribute to the same phenotype (ie, leprosy).

Overall, findings of our functional and molecular dynamics studies indicate that the change from N to S in N248S has an important biological role. To advance the understanding of the biological effect underlying the strong evidence for a genetic

association between N248S and leprosy, we investigated the functional profile of PBMCs obtained from carriers and non-carriers of allele S. Unlike previously reported findings [20], the expression of TLR1 was detectable on the surface of PBMCs from both carriers and noncarriers of S. But investigation of the correlation between genotype and phenotype revealed that cells from 248S carriers had a lower log(TNF/IL10) when mycobacterial stimulation was used. Interestingly, 248S was hyporesponsive for every bacillus Calmette-Guerin strain tested; however, the effect only reached statistical significance when bacillus Calmette-Guerin Moreau was used. Joint effects of host and pathogen on the susceptibility to mycobacterial infections have been reported [43, 44]. Also, this observation suggests that host-pathogen interactions have specific effects on vaccine response. Curiously, a specific agonist of TLR1 induced similar cytokine production between the 2 genotype groups. This observation raises the possibility of whether the specific TLR1 agonists could be used as an adjuvant to improve the immune response to BCG vaccine in susceptible individuals. Recently, TLR pathway variations have been observed in association with altered in vivo immune response to BCG vaccination in newborns, suggesting novel vaccine adjuvant strategies [45]. The use of TLR ligands has already been studied to potentiate not only prophylactic but therapeutic vaccine-induced responses against infectious diseases [46, 47].

Polymorphism N248S, as well as polymorphisms H305L and P315, are located in the extracellular domain of TLR1 in a leucine-rich repeat [48], which is responsible for defining specificity toward different lipopeptide agonists [38]. Interestingly, our molecular dynamics simulations revealed, for the first time, an influence of the N248S S allele on electrostatic potential and water interactions; this provides a reasonable explanation for the functional effects observed in association with this

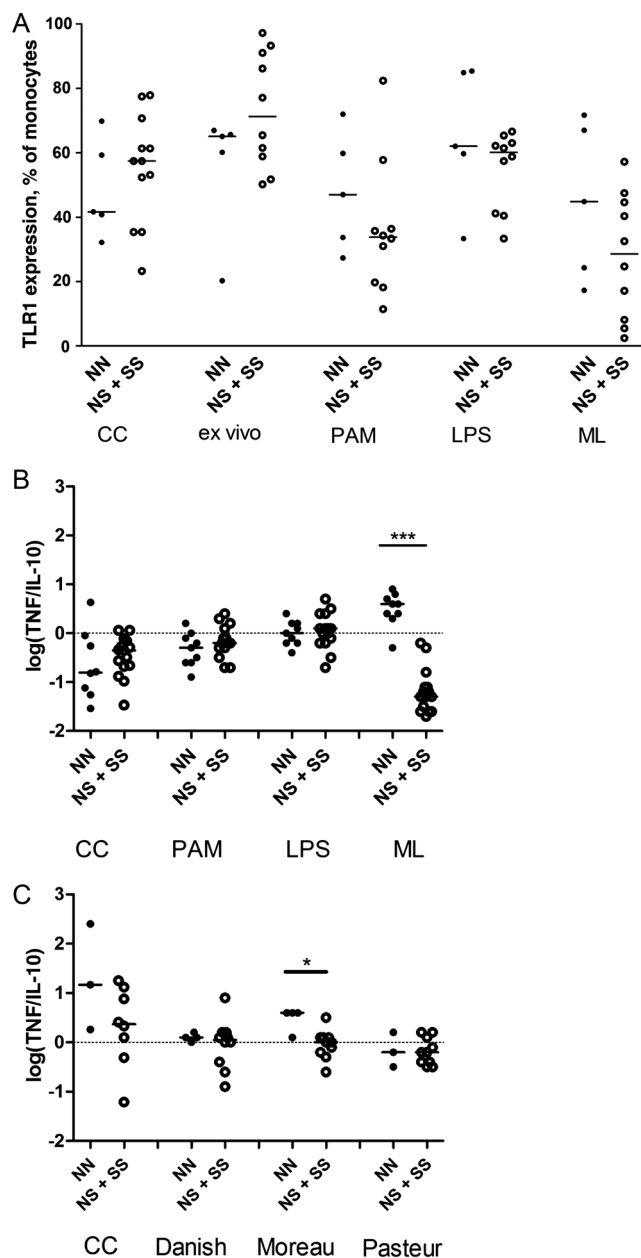


Figure 2. Surface expression of Toll-like receptor 1 (TLR1) on monocytes and the log of the ratio of the tumor necrosis factor level to the interleukin 10 (IL-10) level (TNF/IL-10) in noncarriers (NN) and carriers (NS + SS) of the S allele of N248S. *A*, Monocytes from healthy subjects were assessed immediately after isolation (ex vivo) or after culture with PAM3CysK4 (PAM; 100 ng/mL), lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL), or sonicated antigen of *Mycobacterium leprae* (ML; 10 µg/mL). Results were obtained by flow cytometry and are expressed as a percentage of monocytes. *B*, Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy subjects from Bauru, Brazil, were stimulated with PAM, LPS, or ML. After culture for 18 hours, cytokine production in supernatants was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *C*, PBMCs were stimulated with Danish, Moreau, or Pasteur strains of bacillus Calmette-Guerin (multiplicity of infection, 10:1) for 24 hours (for TNF analysis) or 72 hours (for IL-10 analysis). Cytokine production was evaluated by ELISA. Abbreviation: CC, without stimulus. The lines represent the median value of each group. * $P = .01$ and *** $P < .0001$, by the Mann–Whitney t test.

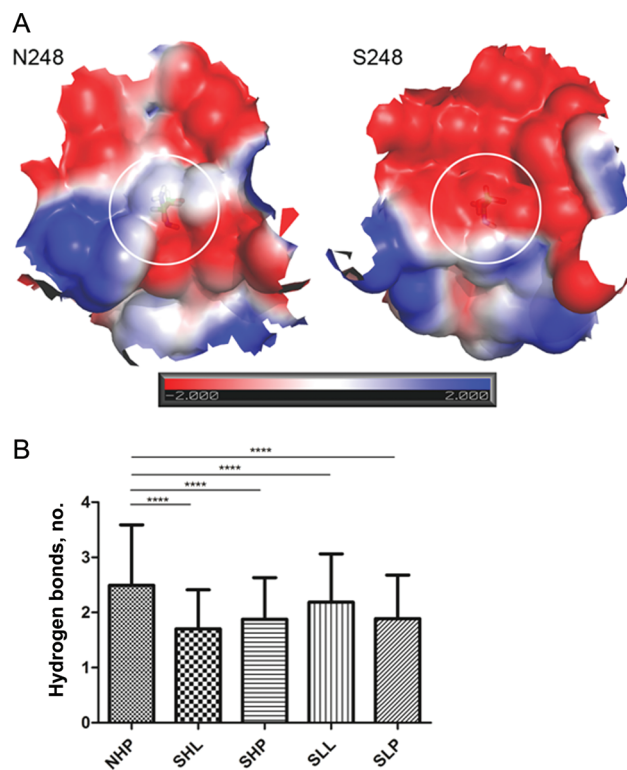


Figure 3. Effect of N248S in electrostatic profile and hydrogen bonds at TLR1. The variation at 248S residue was compared using N248/H305/P315 as a baseline. *A*, The figure corresponds to the initial state ($t = 0$ ns) for both haplotypes. The white circles encompass the N248 or S248 regions. Note the remarkable electronegative profile in the S248 area, represented in red. *B*, Number of hydrogen bonds between solvent and N248S/H305L/P315L combinations revealed by molecular dynamics analysis. Results are mean values. **** $P < .0001$, by the Mann–Whitney t test.

polymorphism. Indeed, a subtle decrease in water interaction may reflect a diminished ability of the TLR1 248S molecule to ligate to hydrophilic components. The molecular analysis adds important information suggesting that a decreased immune response, as measured by log(TNF/IL-10), could be associated with the molecular structure of TLR1 248S.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank Valcemir França, Suelen Moreira, and Cintia Oliveira Santos, for technical support; Anna Beatriz Robottom Ferreira, for the critical reading of the manuscript; the Ataulpho de Paiva Foundation, for kindly providing bacillus Calmette-Guerin strains; the Oswaldo

Cruz Foundation (PDTIS DNA Sequencing Platform/FIOCRUZ, Rio de Janeiro; available at: http://www.dbbm.fiocruz.br/PDTIS_Genomica/), for performing sequencing; and Dr Patrick Brennan (Colorado State University, Fort Collins) for kindly providing *M. leprae* antigen.

Financial support. This work was supported by Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (internal funds), Fundação Oswaldo Cruz/Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde; Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (research fellowship to M. O. M.), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (research fellowship to M. O. M.).

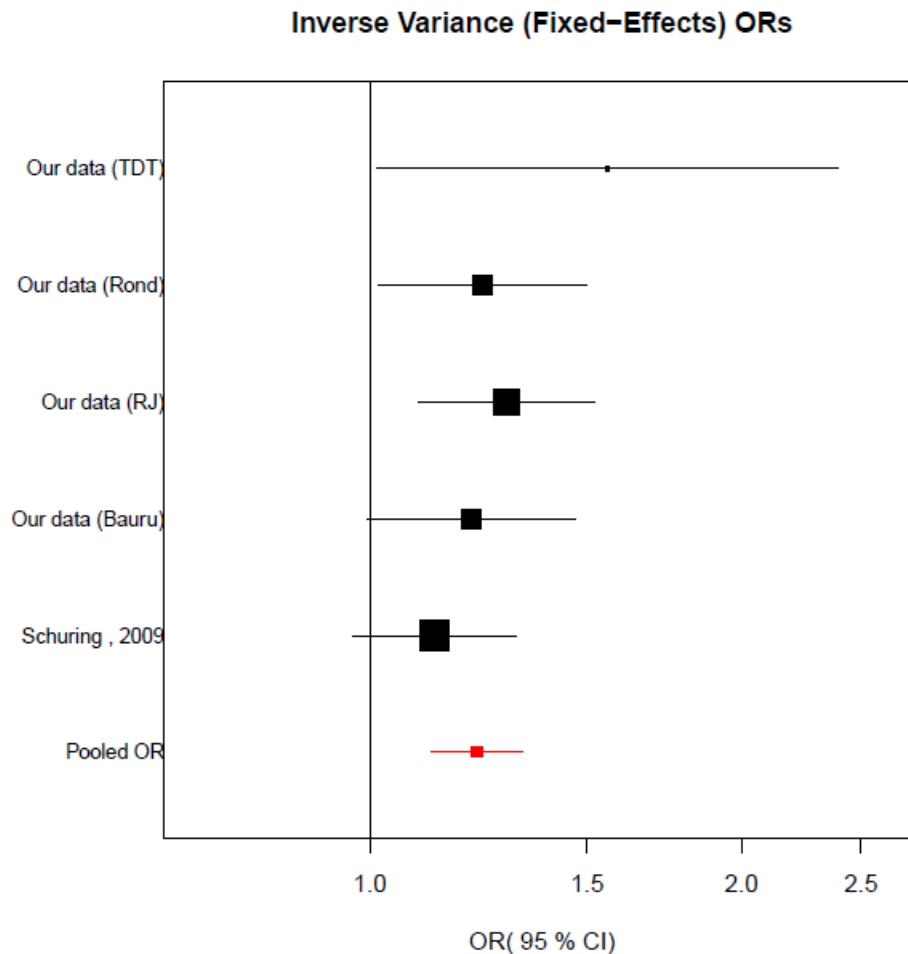
Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **1997**; 388:394–7.
- Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis* **2012**; 205:934–43.
- Taylor BD, Darville T, Ferrell RE, Kammerer CM, Ness RB, Haggerty CL. Variants in toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with *Chlamydia trachomatis* among women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis* **2012**; 205:603–9.
- Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* **2011**; 6:533–49.
- Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* **2006**; 77:189–202.
- Monot M, Honore N, Garnier T, et al. On the origin of leprosy. *Science* **2005**; 308:1040–2.
- Monot M, Honore N, Garnier T, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* **2009**; 41:1282–9.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* **2001**; 291:1544–7.
- Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **2006**; 311:1770–3.
- Zhang FR, Huang W, Chen SM, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* **2009**; 361:2609–18.
- 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**; 127:337–48.
- Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* **2010**; 201:1422–35.
- Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, et al. Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* **2007**; 178:7520–4.
- 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.
- Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**; 2:e231.
- Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2009**; 28:1055–65.
- Schuring RP, Hamann L, Faber WR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* **2009**; 199:1816–9.
- Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1000979.
- Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol* **2007**; 37:2280–9.
- Uciechowski P, Imhoff H, Lange C, et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *J Leukoc Biol* **2011**; 90:377–88.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1966**; 34:255–73.
- World Health Organization (WHO). Guide to elimination of leprosy as a public health problem. 1st Ed. Geneva; 2000.
- 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.
- Schrodinger. The PyMOL molecular graphics system. Version 1.3r1. 2010. Open access available at: <http://www.pymol.org/>.
- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* **2005**; 26:1701–18.
- Daura X, Mark AE, Van Gunsteren WF. Parametrization of aliphatic CHn united atoms of GROMOS96 force field. *J Comput Chem* **1998**; 19:535–47.
- Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis* **2011**; 204:1256–63.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, **2012**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/>.
- Warnes G, Leisch F. Genetics: population genetics. R package. Version 120. **2012**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/genetics/genetics.pdf>.
- Sinnwell J, Schaid DJ. Haplo.stats: statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous. R package. Version 122. **2013**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/haplo.stats.pdf>.
- Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, Zeileis A. Coin: conditional inference procedures in a permutation test framework. R package. Version 10–2. **2012**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/coin/coin.pdf>.
- Allison DB. Transmission-disequilibrium tests for quantitative traits. *Am J Hum Genet* **1997**; 60:676–90.
- Clayton D, Jones H. Transmission/disequilibrium tests for extended marker haplotypes. *Am J Hum Genet* **1999**; 65:1161–9.
- Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet* **2001**; 9:301–6.
- Kazem GR, Farrall M. Integrating case-control and TDT studies. *Ann Hum Genet* **2005**; 69:329–35.
- 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**; 123:477–84.
- Nicodemus KK. Catmap: case-control and TDT meta-analysis package. *BMC Bioinformatics* **2008**; 9:130.
- Omuetti KO, Beyer JM, Johnson CM, Lyle EA, Tapping RI. Domain exchange between human Toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem* **2005**; 280:36616–25.
- Xu Y, Tao X, Shen B, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **2000**; 408:111–5.
- Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals Toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One* **2007**; 2:e1318.
- Zhang F, Liu H, Chen S, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet* **2011**; 43:1247–51.
- Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* **2011**; 12:683–91.

43. Di Pietrantonio T, Hernandez C, Girard M, et al. Strain-specific differences in the genetic control of two closely related mycobacteria. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1001169.
44. Di Pietrantonio T, Correa JA, Orlova M, Behr MA, Schurr E. Joint effects of host genetic background and mycobacterial pathogen on susceptibility to infection. *Infect Immun* **2011**; 79:2372–8.
45. Randhawa AK, Shey MS, Keyser A, et al. Association of human TLR1 and TLR6 deficiency with altered immune responses to BCG vaccination in South African infants. *PLoS Pathog* **2011**; 7:e1002174.
46. Philipps KS, Wykes MN, Liu XQ, Brown M, Blanchfield J, Toth I. A novel synthetic adjuvant enhances dendritic cell function. *Immunology* **2009**; 128:e582–8.
47. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev* **2011**; 239: 178–96.
48. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **2003**; 24:528–33.



Supplementary figure 1. Meta-analysis of N248S *TLR1* and leprosy *per se*. Plot representation of meta-analysis (pooled OR= 1.22, $p < 0.001$), performed under fixed-effect, since no heterogeneity was observed across studies ($\chi^2 = 2.73$, $p = 0.60$). According to the Egger's test, no statistical evidence for publication bias was detected ($p = 0.12$). We conducted a literature search for studies that evaluated the association between N248S SNP and leprosy *per se* (supplementary table 3). The identification of eligible studies (inclusion and exclusion criteria) for the meta-analysis was performed in accordance to Cardoso and colleagues [27]. The literature search was made in MEDLINE through PubMed citations, using the keywords "Toll-like receptor 1", "TLR1", "polymorphism", "SNP" and "leprosy", without language restrictions. To be included in the analysis, the study must have been published up to July 2012. The meta-analysis study included case-control and family-based studies, as proposed by Kazeem and Farrall [34] and detailed elsewhere [27]. At Plot, Bars represent 95% CI and boxes OR values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled result. Rond, Rondonopolis; RJ, Rio de Janeiro; CI, Confidence Interval; OR, Odds Ratio; TDT, Transmission Disequilibrium Test.

Supplementary table 1: General characteristics of populations used in our study^a

	Family-based study		Case-control studies					
	Affected	Unaffected	Bauru		Rio		Rondonópolis	
			Case	Control	Case	Control	Case	Control
Age (mean $\pm$ SD)	35.8 $\pm$ 13.3	54.8 $\pm$ 17.5	39.5 $\pm$ 7.6	35.9 $\pm$ 10.7	38.7 $\pm$ 16.9	33.5 $\pm$ 9.6	42,02 $\pm$ 16.0	42,06 $\pm$ 14,4
Sex ^b								
Female	84 (0.46)	214 (0.61)	110 (0.29)	128 (0.34)	288 (0.37)	294 (0.44)	161 (0.39)	168 (0.40)
Male	100 (0.54)	135 (0.390)	265 (0.71)	252 (0.66)	490 (0.63)	367 (0.56)	250 (0.61)	257 (0.60)
Ethnicity ^b								
Caucasoids	27 (0.15)	70 (0.20)	303 (0.81)	240 (0.65)	307 (0.52)	372 (0.56)	147 (0.36)	141 (0.33)
Mestizoes	136 (0.74)	251 (0.72)	48 (0.13)	104 (0.28)	221 (0.37)	189 (0.29)	247 (0.60)	266 (0.63)
Blacks	21 (0.11)	28 (0.08)	23 (0.06)	28 (0.07)	66 (0.11)	11 (0.15)	17 (0.04)	18 (0.04)
WHO classification ^b								
Paucibacillary	85 (0.49)	-	74 (0.22)	-	300 (0.40)	-	96 (0.24)	-
Multibacillary	90 (0.51)	-	259 (0.78)	-	451 (0.60)	-	310 (0.76)	-

^aThe total number of individuals may be different from genotyped number due to missing information. ^bResults as shown as total count (frequency).

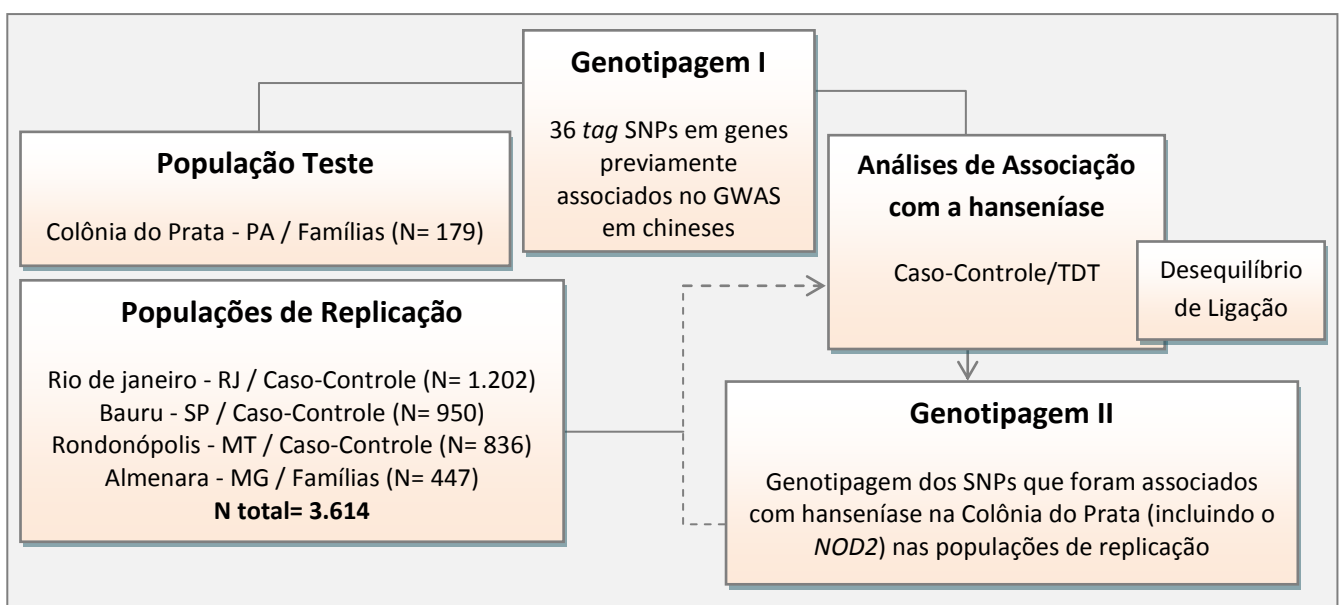
Supplementary table 2: Frequencies of N248S/I602S haplotype at *TLR1* in case-control and familial studies and association with leprosy.

Case-Control				TDT		Previous studies			
							Euro-Americans (Hawn et al, 2007)	New Delhi/India (Wong et al, 2010)	
N248S/I602S ^a	Frequency		Logistic Regression Model		Frequency	T:U ^c	Z (p-value)	Frequency	
	Case	Control	OR (p-value)	OR (p-value) ^b					
N248/I602	0.08	0.12	0.70 (p=0.05)	0.67 (p=0.03)	0.14	18:16	-0.25 (0.78)	*	0.42
248S/I602	0.52	0.48	1.13 (p=0.23)	1.26 (p=0.03)	0.53	49:33	2.32 (0.03)	0.23	0.47
N248/602S	0.38	0.39	Reference	Reference	0.32	27:45	-2.24 (0.05)	0.70	0.09
248S/602S	*	*	*	*	*	*	*	0.07	*

^a Haplotype as shown as frequency estimated by maximum likelihood (*the haplotype was absent - frequency < 0.01). ^b OR and p-value obtained by logistic regression model and adjusted for covariates sex and ethnicity. ^c Number of transmitted (T) versus untransmitted (U) by Transmission Disequilibrium Test (TDT).

Capítulo III: Associação do gene NOD2 na Hanseníase per se

Os estudos GWAS contribuem para elucidar variantes associadas a doenças complexas através do uso de desenhos de estudo robustos e amostragens numerosas, capazes de gerar resultados que se mostram cada vez mais reprodutíveis em estudos independentes. Um dos fatores que contribuiu tanto na estratégia de reprodução dos dados em outras populações quanto na confirmação de novas hipóteses foi a implementação do projeto HapMap, que gerou um banco de dados de domínio público contendo informações de SNPs e padrões de desequilíbrio de ligação do genoma humano em várias populações. Esse banco permitiu uma escolha mais racional de marcadores, incluindo "tag" SNPs capazes de capturar de forma significativa a informação genética em um determinado gene/região. Após a publicação do primeiro GWAS em hanseníase, vários grupos iniciaram estudos de replicação nas suas respectivas populações utilizando como candidatos os mesmos SNPs identificados nessa abordagem em larga escala. O GWAS resultou na descrição de associações de marcadores nos genes *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR* e *RIPK* com a hanseníase na população chinesa, sendo essas as associações confirmadas em parte em outras populações. Estudos em andamento no nosso grupo de pesquisa já priorizavam genes candidatos da resposta imune inata na hanseníase, incluindo o gene *NOD2*. Assim como os demais grupos, os achados em chineses impulsionaram também a nossa proposta de replicar as associações genéticas na população brasileira, o que motivou a inclusão do estudo do gene *NOD2* em um projeto maior de replicação dos achados do GWAS. O esquema do projeto pode ser representado como segue:



N= tamanho amostral

A proposta do estudo foi selecionar os mesmos genes/marcadores associados no GWAS, expandindo a densidade de polimorfismos através da seleção de *tag* SNPs no Hapmap, e testá-los em amostras da população brasileiras, em desenhos distintos e independentes. Para tal fim foi utilizada a estratégia conhecida como *StepWise*, onde os marcadores foram avaliados inicialmente em uma população teste (nesse caso a amostra de famílias Colônia do Prata), e as associações significativas foram validadas nas demais populações de replicação. Na população teste foram avaliados 36 *tag* SNPs em 4 genes, e o resultado sugeriu a associação do SNP rs8057341 no gene *NOD2* com proteção à hanseníase, o que foi observado também para o gene *CCDC122/LACC-1*. Esses marcadores foram então genotipados em três populações de estudo caso-controle (Rio de Janeiro, Bauru e Rondonópolis) e adicionalmente em uma população de Almenara-MG baseada em famílias, resultando na confirmação das associações. Os resultados indicaram consistentemente a associação de SNPs nos genes *NOD2* e *CCDC122/LACC-1* com hanseníase *per se* na população brasileira. Os resultados desse estudo estão descritos no artigo anexado a seguir, o qual foi publicado na revista "Human Genetics".

NOD2 and *CCDC122-LACC1* genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians

Carolinne Sales-Marques · Heloisa Salomão · Vinicius Medeiros Fava · Lucia Elena Alvarado-Arnez · Evaldo Pinheiro Amaral · Cynthia Chester Cardoso · Ida Maria Foschiani Dias-Batista · Weber Laurentino da Silva · Priscila Medeiros · Marcos da Cunha Lopes Virmond · Francisco Carlos Félix Lana · Antonio Guilherme Pacheco · Milton Ozório Moraes · Marcelo Távora Mira · Ana Carla Pereira Latini

Received: 2 June 2014 / Accepted: 19 October 2014 / Published online: 4 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Leprosy is a complex disease with phenotypes strongly influenced by genetic variation. A Chinese genome-wide association study (GWAS) depicted novel genes and pathways associated with leprosy susceptibility, only partially replicated by independent studies in different ethnicities. Here, we describe the results of a validation and replication study of the Chinese GWAS in Brazilians, using a stepwise strategy that involved two family-based and three independent case-control samples, resulting in 3,614 individuals enrolled. First, we genotyped a family-based sample for 36 tag single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of five genes located in four different candidate loci: *CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15* and *RIPK2*. Association between leprosy and tag SNPs at *NOD2* (rs8057431) and *CCDC122-LACC1* (rs4942254) was then replicated in three additional, independent samples (combined $OR_{AA} = 0.49$,

$P = 1.39e-06$; $OR_{CC} = 0.72$, $P = 0.003$, respectively). These results clearly implicate the *NOD2* pathway in the regulation of leprosy susceptibility across diverse populations.

Introduction

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that, in 2012, affected ~230,000 new individuals worldwide (WHO 2014). The disease compromise mainly the skin and peripheral nerves (Britton and Lockwood 2004) and can lead to severe disabilities. *M. leprae* is well adapted to the human host and exhibits very low variability across different isolates (Monot et al. 2009). Also, comparative molecular analysis of DNA samples recovered from preserved corpses from endemic European countries in the 12 and 13 centuries demonstrated that the genomic architecture and variability of *M. leprae* did not change significantly over the past 1,000 years (Schuenemann et al. 2013). *M. leprae* is not highly infectious since only a small proportion of the exposed individuals are infected and, among these, even fewer individuals progress toward clinical disease. Within

C. Sales-Marques and H. Salomão share first authorship.
M. T. Mira and A. C. Pereira share senior authorship.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00439-014-1502-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Sales-Marques · L. E. Alvarado-Arnez · C. C. Cardoso · A. G. Pacheco · M. O. Moraes
Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ,
Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

H. Salomão · V. M. Fava · M. T. Mira
Core for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program
in Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, Curitiba 80215-901, Brazil

E. P. Amaral · F. C. F. Lana
Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde
Pública, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
Horizonte 30130-100, Brazil

Present Address:

C. C. Cardoso
Departamento de Genética, Laboratório de Virologia
Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de
Janeiro 21941-570, Brazil

I. M. F. Dias-Batista · W. L. da Silva · P. Medeiros ·
M. da Cunha Lopes Virmond · A. C. Pereira Latini (✉)
Instituto Lauro de Souza Lima, Rod. Comte. João Ribeiro de
Barros Km 225/226, Aimorés, Bauri, São Paulo CEP 17034-971,
Brazil
e-mail: anacarlap@gmail.com

this subset of patients, leprosy may present either as a localized or disseminated disease. Today, it is well accepted that human genetic variability in genes involved with the regulation of host immunity is crucial to determine both susceptibility and progression toward clinical forms of leprosy (Alter et al. 2011). In fact, genome-wide linkage scans (Alcais et al. 2007; Mira et al. 2003; Siddiqui et al. 2001), case-control studies of candidate genes (Cardoso et al. 2011a; Pereira et al. 2009) and genome-wide association studies (GWAS) (Wong et al. 2010; Zhang et al. 2009) have been contributing to an increasing list of genes associated with leprosy. Validation and replication studies in different populations, although not common, are mandatory to finally pinpoint the major genes/pathways controlling leprosy phenotypes, ultimately leading to an improved understanding of the influence of genetic host variations in susceptibility or resistance to the disease (Cardoso et al. 2011b).

The first leprosy GWAS was conducted in a Chinese population sample, variants located at *CCDC122-LACC1* (the second, formerly known as *C13orf31*), *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR-DQ* and *RIPK2* were associated with the disease and trend toward association was observed for *LRRK2* (Zhang et al. 2009). A subsequent study using a Mali and a New Delhi population sample validated the *CCDC122* and *LACC1* associations (Wong et al. 2010). A family-based validation study conducted in Vietnamese families re-tested all 16 SNPs associated with leprosy in the Chinese original GWAS: 6 of them—located at *CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *RIPK2* and the *HLA-DR-DQ* loci—were replicated (Grant et al. 2012). The *NOD2* gene was also associated with leprosy per se and leprosy reactions when tested in Nepal (Berrington et al. 2010).

Here we investigated whether non-HLA genes originally described in the Chinese GWAS are associated with leprosy among Brazilians. Our stepwise design involving five population samples from different Brazilian regions resulted in positive association between leprosy and two genetic markers located at the *NOD2* and *CCDC122-LACC1* loci.

Methods

Ethics statement

All methods and procedures used in this study were approved by the local ethics boards and the Brazilian National Board for Ethics in Research. A written informed consent was obtained from all study participants.

Subjects and study design

First, we investigated all four candidate loci (five non-HLA genes identified previously in the Chinese GWAS:

CCDC122-LACC1, *NOD2*, *TNFSF15* and *RIPK2*) in a family-based sample recruited at the Prata Village, a former leprosy colony located at the state of Pará, north of Brazil. This village was founded in the early 1920 with the objective to isolate individuals affected by leprosy. Isolation was compulsory until 1962; however, to date, the population remains highly isolated and present unique characteristics, such as very high disease frequency and homogeneous distribution of socioeconomic and environmental variables (Lazaro et al. 2010; Werneck et al. 2011). A very strong genetic effect controlling susceptibility to leprosy has been described for the Prata population (Lazaro et al. 2010), making it suitable for genetic association studies on leprosy. The Prata sample is composed of 179 individuals distributed in 60 nuclear families, from which 67 trios (one leprosy-affected individual and both parents) were derived.

Then, we used a stepwise strategy to investigate the associated markers from Prata in four replication samples from Brazil, totaling 3,435 individuals: three case-control samples, including 1,601 leprosy cases and 1,387 controls, from Rio de Janeiro–Rio de Janeiro; Bauru–São Paulo and Rondonópolis–Mato Grosso, and an independent family-based sample from Almenara-Minas Gerais, composed by 447 individuals distributed in 125 nuclear families from which 147 trios were derived. When necessary, siblings were used to infer the genotype of an absent parent.

Patients were classified according to the classic, five-group classification system (Ridley and Jopling 1966), and were treated following the World Health Organization recommendation, as paucibacillary or multibacillary. In Rio de Janeiro and Bauru, blood donors were used as controls; in Rondonópolis, controls were recruited during campaigns of active search for new leprosy cases performed at military bases and universities. In all contexts, controls were unrelated and from the same geographical region as cases, and presented no documented history of chronic infectious or inflammatory diseases. The ethnicity of each subject was classified as Black, Caucasian or Mestizo according to morphological characteristics of the individual and his/her family. The description of demographic and clinical characteristics of these samples is summarized in Table 1 and described in detail elsewhere (Marques et al. 2013).

SNP selection and genotyping

Tag SNPs markers capturing the entire information of each candidate gene (from Chinese GWAS) were defined according to the information available at the International HapMap Project using the following parameters: minor allele frequency of 0.05 in the YRI population (Yoruba in Ibadan, Nigeria), tagger multimarker method, and r^2 cutoff of 0.8. Following this strategy, 36 markers were interrogated at the

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the individuals included in the family-based and case–control association studies

	Family-based study		Case-control study					
	Prata Village	Almenara	Rondonópolis		Bauru		Rio de Janeiro	
	Affected offspring (<i>n</i> = 67)	Affected offspring (<i>n</i> = 147)	Case (<i>n</i> = 411)	Control (<i>n</i> = 425)	Case (<i>n</i> = 570)	Control (<i>n</i> = 380)	Case (<i>n</i> = 620)	Control (<i>n</i> = 582)
Age, years mean (±SD)	14.1 ± 7.72	29.6 ± 14.0	42 ± 16.1	42 ± 24.5	42 ± 18.0	36 ± 10.81	38 ± 15.8	28 ± 14.5
Sex, <i>n</i> ^a (%)								
Female	34 (50.7)	66 (44.9)	161 (39.2)	168 (39.6)	185 (32.5)	127 (33.4)	228 (36.8)	244 (41.9)
Male	33 (49.3)	81 (55.1)	250 (60.8)	257 (60.4)	385 (67.5)	253 (66.6)	392 (63.2)	338 (58.1)
Ethnic group, <i>n</i> ^a (%)								
Black	10 (14.9)	15 (10.3)	17 (4.1)	18 (4.2)	23 (4.0)	28 (7.3)	59 (9.5)	85 (14.6)
Caucasian	7 (10.4)	24 (16.4)	147 (35.8)	140 (32.9)	303 (53.1)	240 (63.1)	336 (54.2)	322 (55.3)
Mestizo	49 (73.1)	107 (73.3)	247 (60.1)	266 (58.1)	48 (8.4)	104 (27.3)	217 (35.0)	169 (29.0)
WHO classification, <i>n</i> ^a (%)								
Paucibacillary	38 (56.7)	67 (48.2)	96 (23.3)	–	108 (20.0)	–	257 (41.5)	–
Multibacillary	23 (34.3)	72 (51.8)	310 (75.4)	–	432 (80.0)	–	363 (58.5)	–

SD Standard deviation

^a Number of individuals with available information. The number of individuals may be different from the total number due to missing information

four loci, as follows: 13 markers at *CCDC122-LACCI*, 7 markers at *NOD2*, 8 markers at *RIPK2* and 8 markers at *TNFSF15*.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by classic salting-out (John et al. 1991). Genotyping was performed by fluorescence-based allelic discrimination using TaqMan, as implemented in the Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System platform.

Statistical analysis

Family-based association analysis was performed using the Transmission Disequilibrium Test (TDT), as implemented in the FBAT software, version 2.0.2 (Horvath et al. 2001). We applied the empirical variance ($-e$) function to allow for association testing in the presence of linkage, an appropriate approach when multiplex families are used (Lake et al. 2000). Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium (LD) estimations (Prata Village) were performed using the Haploview software, version 4.2 (Barrett et al. 2005). To test for independence of positive association signals in the Prata sample, stepwise logistic multivariate regression analysis (Schaid and Rowland 1998) was performed as implemented in the SAS software version 9.1.

Comparative analyses for allelic, genotypic and carrier frequencies among cases and controls were carried out using an unconditional logistic regression model as previously described (Cardoso et al. 2011a; Marques et al. 2013). Analysis was performed using R for Windows (R Development Core team 2013) version 2.10.1, with the package “genetics”. An overall analysis combining the case–control samples was performed controlling for possible confounding effects using the geographic region of the population sample, gender and ethnicity. In addition, we have integrated our TDT and case–control studies to obtain an overall OR estimate as suggested by Kazeem and Farrall (2005), using the package “catmap” in R environment.

Results

Allele frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium in all population samples included (data not shown) and the genotyping success rate was $\geq 95\%$ for the tested markers. Seven out of the 36 SNPs genotyped in the primary sample of trios from the Prata Village were excluded from the analysis due to complete homozygosity (rs5743270, rs16900581, rs16900592, rs16900593, rs11995005, rs16931739, rs6478107). In addition, marker rs17065164 from *CCDC122* was not analyzed due to the low number of informative families in the discovery sample (<10). Among the remaining 28 markers tested for association with leprosy *per se* in

the Prata Village, 23 were not associated (Table S1). Three alleles of *NOD2* markers—rs8057341-A, rs2111234-G and rs3135499-C—and two at *CCDC122-LACCI*—rs4942254-C and rs2275252-A—were under-transmitted to affected offspring, indicating leprosy protection (Table 2). Out of these five, two *NOD2* markers (rs8057341 and rs3135499) were also associated in the original Chinese GWAS.

Linkage disequilibrium analysis of the associated markers suggested the existence of one single association signal in each loci (Fig. 1): there is moderate LD between *NOD2* marker rs8057341 and both rs2111234 ($r^2 = 0.59$) and rs3135499 ($r^2 = 0.36$); marker rs4942254 of *CCDC122-LACCI* is in strong LD with rs2275252 ($r^2 = 0.93$). This effect was confirmed by stepwise, logistic multivariate analysis: for each gene, when all associated markers were included in the model, association remained significant only for rs8057341 and rs4942254 of *NOD2* and *CCDC122-LACCI*, respectively; therefore, these two markers were selected for further analysis in the replication samples.

Among the three genetic models tested in our case–control studies (genotypic, allelic and carriers), the genotypic was the best model to capture the differences between cases and controls in all populations. The replication of association between *NOD2* rs8057341 and leprosy was observed in all case–control samples, with the genotype “AA” conferring resistance to leprosy (Table 3). In the family-based Almenara sample, however, the allele rs8057341-A did not reach statistical significance ($P = 0.20$, Table S2). A combined analysis including all case–control studies endorsed the protective effect of rs8057341-AA against leprosy ($OR_{AA} = 0.49$, $P = 1.39e-06$, Table 3). Finally, to obtain an overall estimate, all samples (case–control and family-based studies) were included to build a summary plot that indicated a consensus protective OR value (overall $OR_{A\text{ allele}} = 0.80$, $P = 0.0001$), confirming allele “A” of *NOD2* rs8057341 as a leprosy resistance genetic factor (Fig. S1a).

Table 2 Association between leprosy *per se* and markers at *CCDC122-LACCI* and *NOD2* genes in a family-based study from Prata Village

Gene	SNP	MAF ^a	Allele	Z ^b	FBAT (P) ^c
<i>CCDC122-LACCI</i>	rs4942254	0.345	C	−2.000	0.013
<i>CCDC122-LACCI</i>	rs2275252	0.351	A	−2.263	0.023
<i>NOD2</i>	rs8057341	0.372	A	−2.556	0.003
<i>NOD2</i>	rs2111234	0.401	G	−2.157	0.031
<i>NOD2</i>	rs3135499	0.400	C	−2.556	0.023

^a Minor allele frequency

^b Z test

^c Family-based association test; P value, reported for the recessive model

The genotype “CC” of rs4942254 at *CCDC122-LACC1* was also associated with leprosy resistance in two of our replication samples: Rondonópolis and Rio de Janeiro (Table 3). However, no association was observed for this marker in Bauru and Almenara. The combined analysis of rs4942254 revealed association between the CC genotype and leprosy per se ($OR_{CC} = 0.72$, $P = 0.003$, Table 3). The summary plot including all studies resulted in a global OR consistent with a protective effect of *CCDC122-LACC1* allele rs4942254-C ($OR_{C\text{ allele}} = 0.86$, $P = 0.003$) against leprosy (Fig. S1b).

The LD plots for genes *RIPK2* and *TNFSF15* are available in Fig. S2. As a remark, the SNPs associated with leprosy in the Chinese GWAS are also indicated in the LD figures.

Discussion

Genetic risk factors for complex traits have been intensively investigated and candidate genes have been proposed for several common diseases, including leprosy. The first GWAS in leprosy (Zhang et al. 2009), performed in a Chinese sample, identified new genes (*CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR*, *RIPK2* and *LRRK2*) and pathways that encouraged validation and replication studies in other populations of distinct genetic backgrounds. A study involving an Indian and an African sample population validated only the association between leprosy and variants of the *CCDC122-LACC1* locus (Wong et al. 2010). In

contrast, when a Vietnamese sample population was investigated for the same genes and markers, only *LRRK2* and *TNFSF15* associations were not replicated (Grant et al. 2012). These conflicting results reinforce the importance of additional validation and/or replication studies using independent population samples. In this scenario, we sought to validate the Chinese results, first using a sample from a unique family-based sample from the Prata Village, located in the Brazilian amazonic state of Pará. Our assumption is that, due to its history as a former isolation colony, the Prata population is enriched of leprosy susceptibility genetic variants which, combined with very homogeneous demographic, socioeconomic, environmental and educational variables (Lazaro et al. 2010), makes it suitable for genetic association studies in leprosy. The small Prata sample size, however, poses an obvious limitation; thus, to confirm the observations, we applied a four-stage replication strategy using one family-based and three independent case–control samples from different regions of Brazil.

As a result, we have identified two polymorphisms at genes *NOD2* and the *CCDC122-LACC1* locus consistently associated with host resistance to leprosy. Up to now, the association between *NOD2* and leprosy susceptibility originally reported in Chinese has been validated in Nepalese and Vietnamese population samples (Berrington et al. 2010; Grant et al. 2012; Zhang et al. 2009), but not in Indians and Africans (Wong et al. 2010). Data from the Chinese study indicate the G allele associated with increased leprosy risk (Zhang et al. 2009). Here, allele A of *NOD2* rs8057341 was found associated with host resistance to leprosy in all the

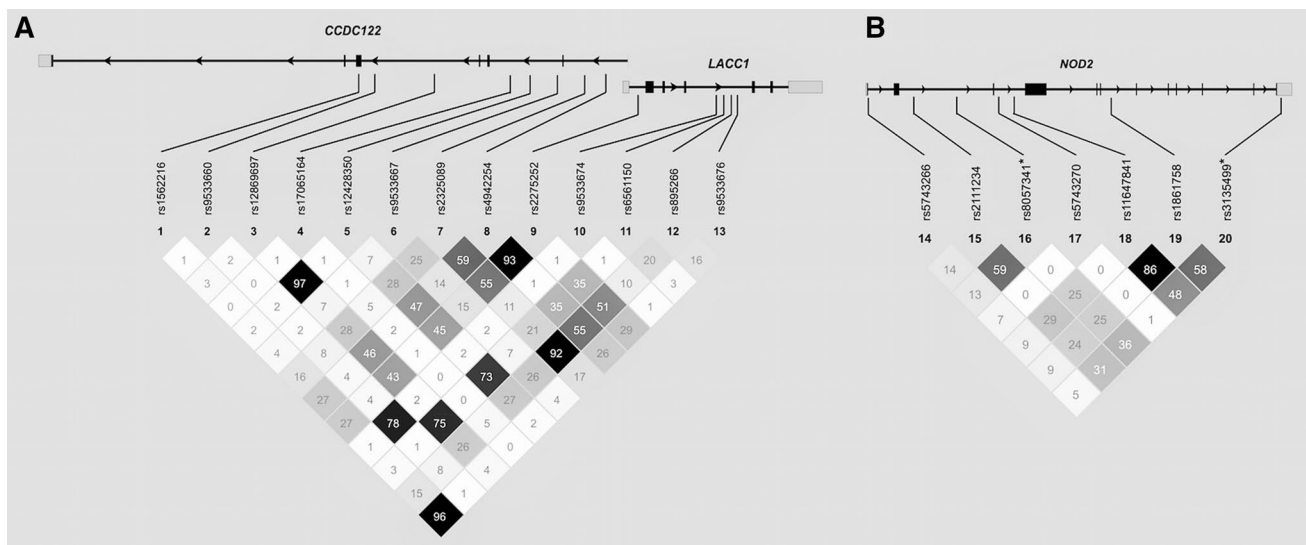


Fig. 1 Relative position and linkage disequilibrium plot (LD) patterns of markers for the coiled-coil domain containing 122 gene (*CCDC122*) and laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1 gene (*LACC1*) in Prata Village sample (a) and nucleotide-

binding oligomerization domain containing 2 gene (*NOD2*) (b). Values inside boxes represent LD measured using the r^2 parameter and the intensity of shading is proportional to r^2 . *SNPs associated in the Chinese GWAS (Zhang et al. 2009)

Table 3 Genotype frequencies for the rs8057341-*NOD2* and rs4942254-*CCDC122/LACC1* SNPs in case-control groups and logistic regression results for association with leprosy per se in Rondonópolis, Bauru and Rio de Janeiro populations and combined analysis including the three studies

SNP	Rondonópolis			Bauru			Rio de Janeiro			Combined analysis		
	Case	Control	OR (CI) <i>P</i> value ^a	Case	Control	OR (CI) <i>P</i> value ^a	Case	Control	OR (CI) <i>P</i> value ^a	Case	Control	OR (CI) <i>P</i> value ^b
rs8057341^c												
GA	175 (0.45)	189 (0.47)	0.84 (0.63–1.13) 0.25	267 (0.50)	151 (0.41)	1.30 (0.98–1.74) 0.06	207 (0.36)	245 (0.42)	0.70 (0.54–0.90) 0.006	649 (0.43)	585 (0.43)	0.89 (0.76–1.04) 0.15
AA	27 (0.07)	43 (0.11)	0.57 (0.34–0.96) 0.03	25 (0.05)	44 (0.12)	0.37 (0.21–0.64) 0.0003	37 (0.06)	59 (0.10)	0.44 (0.28–0.70) 0.0004	89 (0.06)	146 (0.11)	0.49 (0.36–0.65) 1.39e–06
Total	408	412		534	372		573	581		1515	1,365	
rs4942254^d												
TC	193 (0.48)	194 (0.47)	0.89 (0.65–1.21) 0.47	232 (0.47)	168 (0.49)	0.90 (0.64–1.26) 0.54	304 (0.49)	294 (0.51)	0.81 (0.62–1.06) 0.12	729 (0.48)	656 (0.49)	0.83 (0.70–0.99) 0.04
CC	67 (0.17)	91 (0.22)	0.65 (0.43–0.97) 0.037	99 (0.20)	76 (0.22)	0.97 (0.64–1.47) 0.90	102 (0.16)	121 (0.20)	0.66 (0.47–0.92) 0.02	268 (0.18)	288 (0.22)	0.72 (0.58–0.89) 0.003
Total	402	413		489	341		620	582		1,511	1,336	

Bold values indicate the significant results

Global *P* values (general test): rs8057341-Rondonópolis (0.08), Bauru (7.79×10^{-5}), Rio de Janeiro (0.001), Combined (1.30×10^{-5}); rs4942254-Rondonópolis (0.12), Bauru (0.53), Rio de Janeiro (0.06), Combined (1.45×10^{-2})

CI 95 % confidence interval

^a OR and *P* value adjusted for covariates sex and ethnicity

^b OR and *P* value adjusted for covariates sex, ethnicity and region

^c GG genotype as reference

^d TT genotype as reference

samples studied. The replication of the association signal for marker rs8057341, with the same resistance allele on all our population samples, argues consistently in favor of *NOD2* as leprosy per se susceptibility gene. Interestingly, in Vietnam, *NOD2* rs8057341 was not associated with leprosy (Grant et al. 2012); however, the same study reported *NOD2* marker rs9302752 associated with the disease, which may indicate a distinct LD profile across these populations, a hypothesis supported by the HapMap data—LD between rs8057341 and rs9302752 of $r^2 = 0.77$, 0.41 and 0.00 in the CEU, CHB and YRI populations, respectively (International HapMap 2005).

A second consistent association signal was observed for rs4942254, which is located intragenic to *CCDC122*; however extensive LD pattern does not allow excluding neighboring gene *LACC1* as the true responsible for the association detected. Finally, a combined plot was conducted to summarize the information from all samples of the present study. The results confirmed the host resistance effect for both loci.

The conflicting results obtained in leprosy association studies may reflect biological differences associated with population-specific genetic effect (Manry and Quintana-Murci 2013). The increased ethnic proximity between Vietnamese and Chinese may explain the higher rate of successful validation observed among these populations (Grant et al. 2012). Differences in allele frequency and haplotype/LD structure reflect ethnic specificity; thus, the association pattern identified in Chinese population may not be captured in different populations. Also, in the present study, it is important to consider that the small sample size of the discovery sample could have an impact upon the power to capture more subtle genetic association effects. Finally, we cannot exclude the possibility that genes not validated/replicated for leprosy per se susceptibility are actually controlling susceptibility to endophenotype of the disease, such as clinical forms and the occurrence of reversal reactions.

Zhang and cols (Zhang et al. 2009) identified a pathway placing five leprosy susceptibility genes (*LRRK2*, *NOD2*, *RIPK2*, *HLA-DRB1* and *TNFSF15*) within the same biological pathway that included *PARK2*, previously associated with leprosy (Mira et al. 2004). Several of these genes have been implicated with host immune response in different infectious diseases (Schurr and Gros 2009; Zhang et al. 2011). The *NOD2* gene encodes an intracellular sensing molecule that recognizes a component of mycobacterial wall. Upon recognition, the *NOD2*-mediated signaling pathway promotes the recruitment of *RIPK2* and formation of a *NOD2*–*RIPK2* complex that indirectly leads to activation of NF- κ B as a part of the host immune response to infection (Schurr and Gros 2009; Zhang et al. 2009, 2011). A functional study reinforced the importance of the *NOD2*

cascade in leprosy by demonstrating that the interaction of *NOD2* with muramyl dipeptide, a mycobacterium cell wall component, leads a distinct interleukin-32-dependent induction, resulting in the differentiation of monocytes into dendritic cells (Schenk et al. 2012). It has also been shown that *NOD2* is able to induce autophagy, a crucial mechanism for intracellular bacterial clearance (Cooney et al. 2010). In contrast, the function of *CCDC122*–*LACC1* locus is yet unknown. Remarkably, our data add up to the accumulating body of evidence indicating a common association fingerprint across leprosy, Crohn's and Parkinson's disease (Orlova et al. 2011): variants of leprosy susceptibility genes *PARK2*, *TNFSF15*, *NOD2*, *LACC1*, *LRRK2*, *IL23R*, *IL18RAP/IL18R1* and *IL12B* have been described also associated with Crohn's, Parkinson's and inflammatory bowel disease (Liu et al. 2012; Trabzuni et al. 2013; Zhang et al. 2009, 2011). It is possible to speculate that a better understanding of the genotype–phenotype regulatory switches controlled by these associated SNPs can help develop novel diagnostic and therapeutic approaches for infectious, inflammatory and neurodegenerative diseases.

Acknowledgments We thank all the families, affected and unaffected volunteers for agreeing to participate in this study. This study was supported by a grant from the Brazilian Departamento de Ciências e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, Ministério da Saúde/Tecnologia de Insumos Estratégicos (DECIT/CNPq/MS/SCTIE, Process Number 576051/2008-0).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alcais A et al (2007) Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 39:517–522. doi:10.1038/ng2000
- Alter A, Grant A, Abel L, Alcais A, Schurr E (2011) Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome* 22:19–31. doi:10.1007/s00335-010-9287-1
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457
- Berrington WR et al (2010) Common polymorphisms in the *NOD2* gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* 201:1422–1435. doi:10.1086/651559
- Britton WJ, Lockwood DN (2004) Leprosy. *Lancet* 363:1209–1219. doi:10.1016/S0140-6736(04)15952-7
- Cardoso CC et al (2011a) TNF-308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis* 204:1256–1263. doi:10.1093/infdis/jir521
- Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO (2011b) Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 6:533–549. doi:10.2217/fmb.11.39->
- CdS Marques et al (2013) Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates

- immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis* 208:120–129. doi:[10.1093/infdis/jit133](https://doi.org/10.1093/infdis/jit133)
- Cooney R et al (2010) NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 16:90–97. doi:[10.1038/nm.2069](https://doi.org/10.1038/nm.2069)
- Grant AV et al (2012) Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the Vietnamese population. *J Infect Dis* 206:1763–1767. doi:[10.1093/infdis/jis588](https://doi.org/10.1093/infdis/jis588)
- Horvath S, Xu X, Laird NM (2001) The family based association test method: strategies for studying general genotype–phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 9:301–306. doi:[10.1038/sj.ejhg.5200625](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200625)
- International HapMap C (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299–1320. doi:[10.1038/nature04226](https://doi.org/10.1038/nature04226)
- John SW, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR (1991) A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res* 19:408
- Kazeem GR, Farrall M (2005) Integrating case–control and TDT studies. *Ann Hum Genet* 69:329–335. doi:[10.1046/j.1529-8817.2005.00156.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2005.00156.x)
- Lake SL, Blacker D, Laird NM (2000) Family-based tests of association in the presence of linkage. *Am J Hum Genet* 67:1515–1525
- Lazaro FP et al (2010) A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis* 201:1598–1605. doi:[10.1086/652007](https://doi.org/10.1086/652007)
- Liu H et al (2012) Identification of IL18RAP/IL18R1 and IL12B as leprosy risk genes demonstrates shared pathogenesis between inflammation and infectious diseases. *Am J Hum Genet* 91:935–941. doi:[10.1016/j.ajhg.2012.09.010](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.010)
- Manry J, Quintana-Murci L (2013) A genome-wide perspective of human diversity and its implications in infectious disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a012450. doi:[10.1101/cshperspect.a012450](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012450)
- Mira MT et al (2003) Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 33:412–415. doi:[10.1038/ng1096](https://doi.org/10.1038/ng1096)
- Mira MT et al (2004) Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427:636–640. doi:[10.1038/nature02326](https://doi.org/10.1038/nature02326)
- Monot M et al (2009) Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* 41:1282–1289. doi:[10.1038/ng.477](https://doi.org/10.1038/ng.477)
- Orlova M, Di Pietrantonio T, Schurr E (2011) Genetics of infectious diseases: hidden etiologies and common pathways. *Clin Chem Lab Med* 49:1427–1437. doi:[10.1515/CCLM.2011.620](https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.620)
- Pereira AC et al (2009) Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for –819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun* 10:174–180. doi:[10.1038/gene.2008.97](https://doi.org/10.1038/gene.2008.97)
- R Development Core team (2013) R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org/>. Accessed 02 May 2014
- Ridley DS, Jopling WH (1966) Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34:255–273
- Schaid DJ, Rowland C (1998) Use of parents, sibs, and unrelated controls for detection of associations between genetic markers and disease. *Am J Hum Genet* 63:1492–1506. doi:[10.1086/302094](https://doi.org/10.1086/302094)
- Schenk M et al (2012) NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* 18:555–563. doi:[10.1038/nm.2650](https://doi.org/10.1038/nm.2650)
- Schuenemann VJ et al (2013) Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science* 341:179–183. doi:[10.1126/science.1238286](https://doi.org/10.1126/science.1238286)
- Schurr E, Gros P (2009) A common genetic fingerprint in leprosy and Crohn's disease? *N Engl J Med* 361:2666–2668. doi:[10.1056/NEJMe0910690](https://doi.org/10.1056/NEJMe0910690)
- Siddiqui MR et al (2001) A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet* 27:439–441. doi:[10.1038/86958](https://doi.org/10.1038/86958)
- Trabzuni D et al (2013) Fine-mapping, gene expression and splicing analysis of the disease associated LRRK2 locus. *PLoS One* 8:e70724. doi:[10.1371/journal.pone.0070724](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070724)
- Werneck RI et al (2011) A major gene effect controls resistance to caries. *J Dent Res* 90:735–739. doi:[10.1177/0022034510397614](https://doi.org/10.1177/0022034510397614)
- WHO (2014) Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. *Wkly Epidemiol Rec* 89:389–400
- Wong SH, Hill AV, Vannberg FO, India–Africa–United Kingdom Leprosy Genetics C (2010) Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 362:1446–1447. doi:[10.1056/NEJMc1001451](https://doi.org/10.1056/NEJMc1001451) (author reply 1447–1448)
- Zhang FR et al (2009) Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 361:2609–2618. doi:[10.1056/NEJMoa0903753](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903753)
- Zhang F et al (2011) Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet* 43:1247–1251. doi:[10.1038/ng.973](https://doi.org/10.1038/ng.973)

Supplementary Material

***NOD2* and *CCDC122-LACC1* genes are associated with leprosy susceptibility in
Brazilians**

Carolinne Sales-Marques^{1,a}, Heloisa Salomão^{2,a}, Vinicius Medeiros Fava², Lucia Elena Alvarado-Arnez¹, Evaldo Pinheiro Amaral³, Cynthia Chester Cardoso^{1,4}, Ida Maria Foschiani Dias-Batista⁵, Weber Laurentino da Silva⁵, Priscila Medeiros⁵, Marcos da Cunha Lopes Virmond⁵, Francisco Carlos Félix Lana³, Antonio Guilherme Pacheco¹, Milton Ozório Moraes¹, Marcelo Távora Mira^{2,b}, Ana Carla Pereira^{5,b}

^aThese authors share first authorship.

^bThese authors share senior authorship.

Corresponding author: Dra. Ana Carla Pereira, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil. E-mail: anacarlap@gmail.com

Table S1. Data of the SNPs tested with leprosy *per se* in the family-based study from Prata Village but with no significant association.

Gene	SNP ^a	Allele	AF ^b	Z ^c	FBAT (P)
CCDC122	rs12869697	C	0.204	-1.194	0.232 ^d
	rs9533667	C	0.778	-1.687	0.089 ^d
	rs2325089	G	0.470	-0.798	0.425 ^e
	rs9533660	C	0.926	0.000	1.000 ^e
	rs12428350	A	0.208	-1.417	0.156 ^d
	rs1562216	G	0.119	-0.352	0.724 ^d
LACC1	rs9533674	C	0.906	-0.662	0.507 ^e
	rs895266	T	0.493	-1.141	0.254 ^e
	rs9533676	T	0.125	-0.451	0.652 ^d
	rs6561150	G	0.260	-1.417	0.156 ^d
NOD2	rs1861758	A	0.287	-1.769	0.076 ^e
	rs5743266	G	0.762	-0.211	0.832 ^e
	rs11647841	A	0.293	-1.504	0.123 ^e
RIPK2	rs10504881	A	0.182	-1.084	0.278 ^d
	rs13262484	G	0.060	-0.798	0.508 ^d
	rs39764	T	0.735	-1.031	0.425 ^d
	rs39502	A	0.675	-1.179	0.302 ^d
TNFSF15	rs7847158	A	0.766	-0.087	0.930 ^e
	rs4979462	T	0.129	-0.095	0.924 ^d
	rs7862325	G	0.611	-1.187	0.060 ^e
	rs3810936	T	0.274	-1.438	0.150 ^d
	rs7867918	G	0.877	-1.857	0.063 ^e
	rs6478108	C	0.265	-1.897	0.057 ^e

^aSingle-nucleotide polymorphism

^bAllele frequency

^cZ test

^dFamily-based association test; *P*-value, reported for the dominant model

^eFamily-based association test; *P*-value, reported for the recessive model

Table S2. Association between leprosy *per se* and markers at *CCDC122-LACC1* and *NOD2* genes in a family-based study from Almenara sample.

Gene	SNP	MAF^a	Allele	Z^b	FBAT (P)^c
<i>CCDC122-LACC1</i>	rs4942254	0.419	C	0.614	0.538
<i>NOD2</i>	rs8057341	0.322	A	1.293	0.196

^aMinor allele frequency

^bZ test

^cFamily-based association test; *P*-value, reported for the additive model

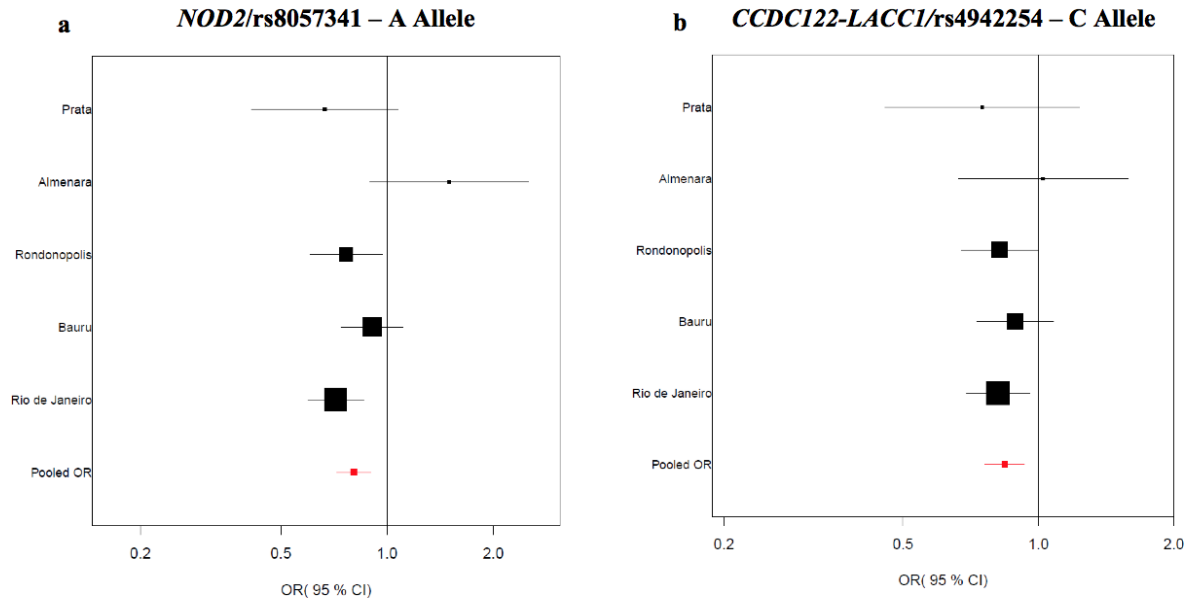


Fig. S1 Representative plots grouping our genetic studies (family-based and case-control studies) and the association between *NOD2* and *CCDC122-LACC1* SNPs with leprosy *per se*. At plot, the bars represent 95% of confidence interval and boxes odds ratio (OR) values. The size of each box indicates the weight of the study in the pooled result. In **a** the plot representation of rs8057341 - A allele at *NOD2* (Pooled OR = 0.80, $P = 0.0001$), and in **b** the plot representation of rs4942254 - C allele at *CCDC122-LACC1* (Pooled OR = 0.86, $P = 0.003$). The overall OR was obtained as described by Kazeem and Farrall (Kazeem and Farrall 2005), using the package “catmap” in R environment. In this analysis only the allelic model can be used, so the results can be different if compared with other genetic models

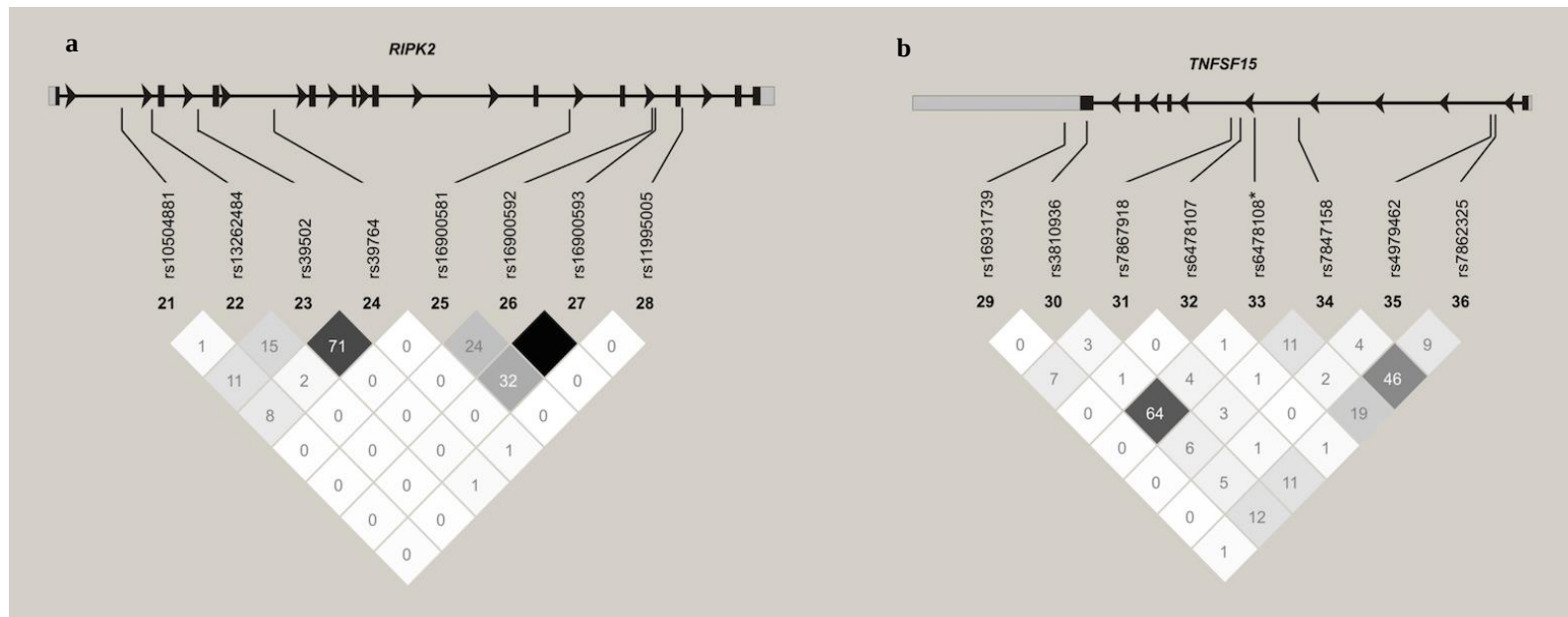
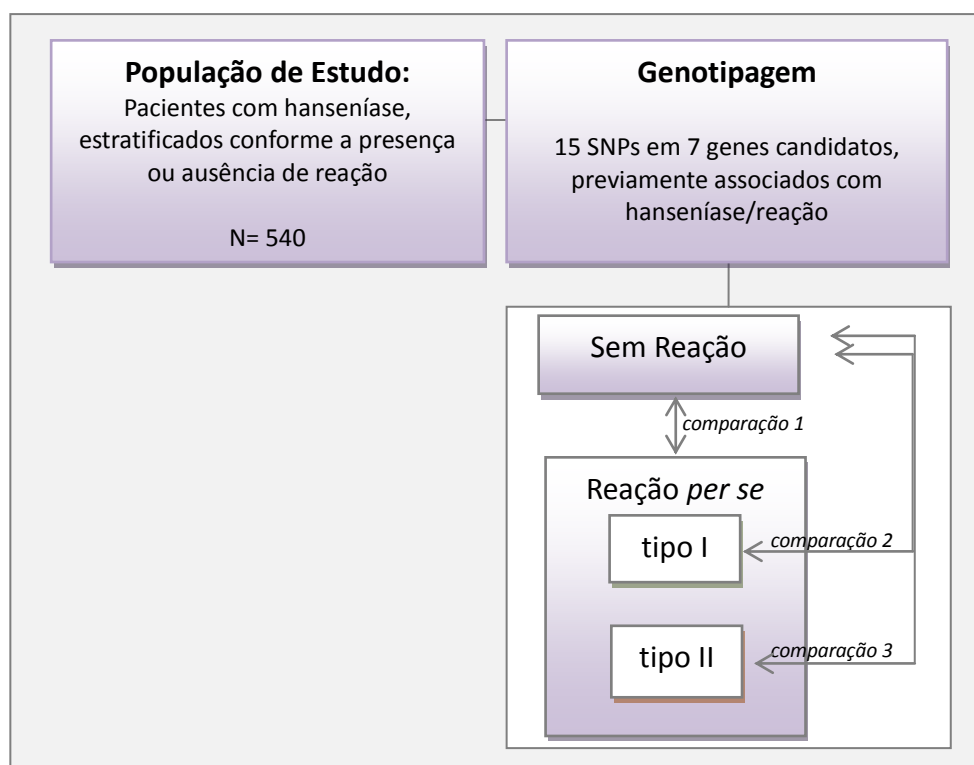


Fig. S2 Relative position and linkage disequilibrium plot (LD) patterns of markers for the receptor - Interacting Serine Threonine Kinase 2 gene (*RIPK2*) **(a)** and Tumor Necrosis Factor (ligand) superfamily, member 15 gene (*TNFSF15*) **(b)** in Prata Village sample. Values inside boxes represent LD measured using the r^2 parameter and the intensity of shading is proportional to r^2 . *SNPs associated in the Chinese GWAS (Zhang et al. 2009)

Capítulo IV: Susceptibilidade Genética e os Episódios Reacionais na Hanseníase

Embora os episódios reacionais sejam considerados as principais causas de dano neural e incapacidades relacionadas à hanseníase, poucos estudos genéticos foram conduzidos avaliando esse desfecho. Os primeiros estudos de associação com os episódios reacionais identificaram associações nos genes *TLR2* (Nepal), *TLR1* (Nepal e Bangladesh), e no gene *NOD2* também na população do Nepal, mostrando a participação de genes associados na hanseníase *per se* também no desfecho reação. O primeiro estudo de associação genética a este fenótipo conduzido na população brasileira utilizou o gene *IL6* como candidato e, como resultado, foi identificada a associação de um SNP deste gene com proteção contra a reação do tipo II, sendo o alelo protetor relacionado a níveis mais altos da citocina. Sendo assim, a terceira etapa do trabalho em questão avançou na investigação o efeito de variações genéticas no desenvolvimento dos episódios reacionais na hanseníase. Foram escolhidos genes/marcadores previamente associados com hanseníase *per se* ou reação em outras populações, incluindo 15 SNPs em sete genes, que foram testados em pacientes que apresentaram reação (tipo I ou tipo II) e outros que não as desenvolveram. Como resultado, identificamos dois SNPs no gene *IL6* associados ao desfecho reação *per se*, indicando a participação desse gene na susceptibilidade genética a reações na população brasileira. Ao estratificarmos a análise com base no tipo de reação, as estimativas de efeito permaneceram semelhantes, sugerindo que o efeito não foi específico para reação tipo I ou II na amostra investigada. O estudo foi desenvolvido conforme esquematizado abaixo, e os resultados foram descritos em trabalho anexado nas páginas seguintes (manuscrito em preparação).



POLYMORPHISMS AT *IL6* GENE ARE ASSOCIATED WITH LEPROSY REACTIONS

Carolinne Sales-Marques^{1,a}, Cynthia Chester Cardoso^{1,2,a}, Ximena Illaramendi¹, Lucia Elena Alvarado Arnez¹, Mariana A. Hacker¹, Euzenir Nunes Sarno¹, Antonio G Pacheco³, Milton Ozório Moraes¹

¹Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 21040-60, Brazil.

²current address: Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-570, Brazil.

³Programa de Computação Científica (PROCC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 21040-360, Brazil.

^aThese authors share first authorship.

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

Abstract

Leprosy reactions are strong reactivations of the immune response that leprosy patients may develop before, during or after treatment, and are considered a common cause of nerve damage and disability in leprosy. Results of genetic epidemiology studies using different designs have indicated that host genetic factors may influence susceptibility not only to leprosy outcome, but also to the development of clinical complications such as reactional episodes. However, the influence of genetic factors in these episodes deserves more investigation in the Brazilian population. Here, the genetic susceptibility to leprosy reactions its subtypes (type 1 or type 2 reactions) were investigated by genotyping a total of 15 SNPs at 7 candidate genes (*TNF/LTA*, *IFNG*, *IL10*, *TLR1*, *NOD2* and *IL6*) in a sample including 540 leprosy patients with different clinical phenotypes. Among all the genes evaluated, we have found significant association only between *IL6* and leprosy reaction, with protection for rs2069840-GG (OR= 0.14, p= 0.001) and susceptibility for rs2069845-AG genotypes (OR= 1.78, p = 0.01). This association was irrespective to the reaction subtype. Also, the combination rs2069832-G/rs2069840-G/rs2069845-A was associated with reaction *per se* (OR= 0.55; p = 0.008). These data confirmed the association between *IL6* and leprosy reactions observed previously in Brazilians.

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, that affects more than 200,000 people each year in the world, especially in Brazil, where the incidence was the highest (16.76/100,000 people) among the 105 countries that reported new cases of this disease in 2012 (OMS 2013). Leprosy is also considered a complex disease, which outcome depends on genetic and environmental factors. The vast majority of the individuals exposed to *M. leprae* will not develop the disease. However, even in those individuals, the bacillus will probably subvert early innate immune responses and silently hide into Schwann cells in nerves and macrophages in skin (Cardoso, et al. 2011). Then, in the susceptible individuals, *M. leprae* will successfully reprogram intracellular environment and slowly replicate. The disease can evolve in a wide spectrum of clinical forms, which are closely related to the levels of host cellular immune response against the bacteria (Ridley and Jopling 1966). Patients from the tuberculoid pole (TT) usually develop a localized form, where cellular response is effective to restrict bacterial growth. On the other hand, the patients of the lepromatous pole (LL) are unable to control bacterial spread and, therefore, develop disseminated disease. In between, there are also intermediate clinical variations – borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB) and borderline lepromatous (BL) – classified according to their relatedness to each polar form (Degang, et al. 2014).

Along the natural course of the disease, some patients may also develop clinical complications such as leprosy reactions, characterized by a strong and sudden reactivation of the inflammatory immune response (Sampaio, et al. 1998, Moraes, et al. 2000, Oliveira, et al. 1999). Leprosy reactions affect 30-50% of the patients, and represent the main cause of nerve damage and permanent disability (Britton and Lockwood 2004). These episodes can be observed prior, during or even after multidrug therapy (MDT) and are classified in two major types: type 1 or reversal reaction (T1R), and type 2 or erythema nodosum leprosum (T2R).

T1R are common among *borderline* patients and are characterized by reactivation of previous lesions as well as the appearance of new ones, accompanied by increased cell-mediated immune response, and intense skin and nerve inflammation (Nery, et al. 2013). T2R are observed mainly among patients from lepromatous pole, and are related to the development of new lesions, with up-regulated humoral immunity and activation of acute cellular immune response, that may cause severe systemic symptoms (Nery, et al. 1998, Kahawita and Lockwood 2008). In both cases, the strong inflammatory response is often associated to nerve injury, which may lead to permanent damages. Naturally, cytokines such as IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ and TNF (Sampaio, et al. 1998, Moraes, et al. 1999, Sampaio, et al. 1996, Sampaio, et al. 1992, Sampaio and Sarno 1998, Sarno, et al. 1991, Andersson, et al. 2005, Atkinson, et al. 2004, van Brakel, et al. 2005) have been consistently detected in high levels at the onset of the reactions either in serum or skin lesion.

The causes of this abrupt immune reactivation are not fully understood. However, leprosy reactions may be influenced by age, comorbidities and pregnancy (Mota 2012, Ranque, et al. 2007, Ramu and Desikan 2002). In addition, other risk factors such as the clinical form, positive bacillary index and introduction of multi-drug therapy also play an important role in leprosy reactions (Antunes, et al. 2013, Pocaterra, et al. 2006). Subtle modulations of immunity can also trigger the reaction outcome, suggesting that genetic variations may play a part in this phenomenon (Fava, et al. 2012). Indeed, the genetic component in clinical outcomes such as leprosy reactions, severe nerve impairment and/or disabilities has been suggested previously. The association between *NINJ1* gene, which codes for an adhesion molecule with neuroprotective effect, and leprosy disabilities has been reported by our group (Cardoso, et al. 2007) and replicated later (Graca, et al. 2012). The first studies designed to characterize the genetic component in leprosy reactions implicated *TLR1* and *TLR2* genes T1R outcome (Bochud, et al. 2008, Misch, et al. 2008). In the following year, a new investigation showed the association between a nonsynonymous SNP at *TLR1* and T2R (Schuring, et al. 2009). This association was also described for SNPs at *NOD2* gene, which also codes for a pattern recognition receptor (Berrington, et al. 2010). A functional study designed to explore several

candidate cytokines as serum biomarkers of leprosy reaction has reassured the role of TNF and IL-6 (Stefani, et al. 2009). Afterwards, the same research group described the association of *IL6* SNPs with T2R (Sousa, et al. 2012). However, the majority of the genetic associations published so far still lack replication studies or at least functional characterization to support the epidemiological findings.

The present study was designed to investigate the association of 15 SNPs at 7 genes with leprosy reactions in patients from Brazil. The markers included 4 markers at the classical candidates *TNF/LTA*, *IFNG* and *IL10*, and 11 SNPs selected to replicate the previously reported associations of *TLR1*, *NOD2* and *IL6* genes. Here, we have found an association between *IL6* SNPs and haplotypes and leprosy reactions, supporting data obtained in previous analyses of Brazilian patients.

Subjects and methods

Subjects and study design: We have performed a retrospective study, including a total of 540 leprosy patients diagnosed at the Souza Araújo Clinic at Fiocruz, Rio de Janeiro. Leprosy diagnosis was determined by experienced professionals after a careful clinical examination. The patients were classified according to Ridley and Jopling criteria (Ridley and Jopling 1966) and also as pauci- or multibacillary, for treatment purposes. All patients were treated as specified by the World Health Organization (WHO) and followed to determine the outcome of T1R or T2R, as described previously (Moraes et al., 1999). Patients classified as TT were not considered eligible for this study, since they are not at risk of developing reactions (Nery, et al. 2013, Scollard, et al. 1994). A patient was excluded from the study if he/she was co-infected with HIV or developed pure neuritis. The study included comparisons regarding the development of reactional episodes *per se* and T1R

or T2R. The patients who developed both types of reaction (N = 25) were excluded from the analyses regarding reactions subtypes. Written informed consent was obtained from all individuals included in the study as required by the local ethics committees (CEP-FIOCRUZ).

SNPs selection: the present study was designed to investigate the association of *TNF/LTA IL10*, *IFNG*, *IL6*, *TLR1* and *NOD2* genes in leprosy reactions outcome. The SNPs *TNF* -308G>A (rs1800629), *IL10* -819C>T (rs1800871) and *IFNG* +874T>A (rs2430561) were selected based on our previously published data, which showed their association to leprosy susceptibility among Brazilians (Cardoso et al., 2011; Pereira et al., 2009; Cardoso et al., 2010). The SNPs rs2069832, rs2069840 and rs2069845 were selected based on a search for *IL6* tag SNPs on the HapMap data bank, looking for SNPs capturing significant information at *IL6* locus (www.hapmap.org). The same strategy led to the selection of the SNPs rs751271, rs2066843 and rs748855, at *NOD2* gene. The remaining *NOD2* SNPs (rs7194886, rs9302752 and rs8057341) were selected from the literature (Zhang, et al. 2009). The SNPs rs5743592 and rs4833095, at *TLR1*, were included in this study as a way to replicate previous findings regarding their association to leprosy *per se* and reactional episodes (Misch, et al. 2008, Schuring, et al. 2009, de Sales Marques, et al. 2013, Johnson, et al. 2007, Wong, et al.).

DNA extraction and SNP genotyping: DNA was extracted from frozen blood samples using a salting-out precipitation method. SNPs at *TNF/LTA*, *IFNG*, *IL10*, and *TLR1* loci were genotyped as described (de Sales Marques, et al. 2013, Cardoso, et al. 2010, Cardoso, et al. 2011, Pereira, et al. 2009). SNPs at *NOD2* and *IL6* genes were genotyped using TaqMan[®] assays according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, CA, USA). Briefly, amplifications were carried out in a final volume of 5 µL containing 2.5 µL of the TaqMan[®] Universal Master Mix, 0.125 µL of the TaqMan mix (primers and probes) and 10-50 ng of template. PCR reactions were performed on ABI Prism 7000 and StepOne Plus Sequence Detection Systems (Life Technologies, CA, USA).

Statistical analyses: statistical analyses were carried out as previously described (Pereira, et al. 2009). Frequencies of each genotype, allele, and minor allele carriers were determined for each SNP by direct counting and haplotype frequencies were estimated by maximum likelihood. A stepwise forward procedure was used in order to control for potential confounders on the reaction outcome. Covariables included gender, ethnicity, age, clinical form, bacillary index and relapse. Odds ratios (ORs) were obtained through unconditional logistic regression models, and the significance level was corrected for multiple comparisons. The Cochran-Armitage trend test was applied to describe allele-dose effects. All analyses were performed using the R for windows, version 3.1.0, with the packages “genetics”, “coin” and “haplo.stats”.

Results

The general characteristics of the patients enrolled in the study, including age, gender, ethnicity and clinical classification are described in Table 1. From the 540 patients included in the study, 65% developed leprosy reactions, of which 42% had only T1R and 44% only T2R. The frequencies of each genotype, allele and minor allele carriers are shown for each SNP in the Supplementary material along with the frequencies of *TNF/LTA*, *TLR1*, *IL6* and *NOD2* haplotypes (Supplementary Table 1).

No association was found when the candidate SNPs *TNF* -308G>A, *LTA* +252A>G, *IFNG* +874T>A and *IL10* -819C>T were tested for their association to leprosy reactions *per se* or according to T1R and T2R subtypes, using both dominant model (Table 2) and codominant model (data not shown). Similar results were observed when the SNPs *TNF* -308G>A and *LTA* +252A>G were combined in haplotypes (data not shown).

In the following step, we tried to replicate and validate previously reported data, which described an

association between SNPs at *TLR1* and *NOD2* genes and leprosy reactions and subtypes. Similar to the results obtained for *TNF/LTA*, *IL10* and *IFNG* genes, we could not detect any statistically significant association for *TLR1* and *NOD2* SNPs in our sample (Table 2). The only exception was the trend towards an increased risk of T2R development among *NOD2* rs7194886 T carriers (OR = 2.36; $p = 0.06$). No association was found when *TLR1* and *NOD2* these SNPs were combined in haplotypes (data not shown).

When *IL6* SNPs were tested, the rs2069840-G allele was less frequent among patients who developed reactions (43%) as compared to those with no reaction (52%) (Supplementary table 1), and the OR values clearly indicated a protective effect against reaction *per se* (OR_{GG}= 0.14; OR_{GC/GG}= 0.56; $p = 0.01$ in both models) (Table 3). Moreover, the results of genotype analyses suggested an allele dose effect, with a more prominent effect for GG genotype as compared to GC (0.14 vs 0.65; $p = 0.01$), which was supported by the Cochran-Armitage trend test ($p = 2.2 \times 10^{-16}$). After the comparisons between T1R and T2R with no reaction group, the OR values remained virtually the same in both groups, suggesting that the rs2069840-G effect is not specific to reaction subtypes. However, the protector effect remained significant only for comparisons regarding T1R. Results of the Cochran-Armitage trend test were also significant for type I reaction outcome ($p = 4 \times 10^{-8}$).

Conversely, the AG genotype of rs2069845 was more frequent in patients who developed reactions indicating susceptibility to reaction *per se* (OR_{AG}= 1.78) (Table 3). A similar effect was observed in both reaction subtypes, and these results were statistically significant in comparisons of the T1R group (OR_{AG}= 1.98; $p = 0.01$). The OR obtained for rs2069845 G carriers also suggested an increased risk of developing leprosy reactions *per se* (OR= 1.68; $p = 0.02$) and T2R (OR= 1.80; $p = 0.02$), but these results could not achieve the significance level ($p \leq 0.016$). As observed in Table 4, results of the single SNPs analyses were confirmed by the haplotypes, since the combination rs2069832G/rs2069840G/rs2069845A was significantly associated to protection against leprosy reaction *per se* (OR= 0.55; $p = 0.008$). The SNP rs2069832 at *IL6* gene was not associated to

leprosy reaction or subtypes.

Discussion

Here we have confirmed the previously reported association between polymorphisms at *IL6* gene and leprosy reactions in Brazilians. More specifically, comparisons under a codominant model suggested a protective effect for the rs2069840-GG genotype, while rs2069845-AG was associated to increased risk of leprosy reactions outcome. Accordingly, the haplotype analyses showed that the haplotype including the rs2069840-G allele was associated with susceptibility to leprosy reaction. To investigate whether the association was specific of each reaction subtype, we stratified the group in T1R or T2R, and performed a subgroup analysis. We observed a similar OR value in both subtypes of reaction, suggesting that the effects were related to reaction *per se*.

Previously, from a cohort of patients from Goiania, a city from Central Brazil, two case-control studies were built using T1R (i) or T2R (ii) as outcome, and the same *IL6* SNPs were investigated (Sousa, et al. 2012). As result, they associated the alleles rs2069840-G to protection and rs2069845-G to the risk of T2R. We replicated that association, but with reaction *per se*. There are difficult to compare our results with that from Goiania, because they used a different design and they did not include reaction *per se* as outcome. Perhaps we failed to detect association in the T2R subgroup because our study had not enough statistical power, so a replication with similar design and larger sample possibly could help us understand this issue. Moreover, different combination of host and/or environmental risk factors across different genetic studies may also be a confounder and, therefore, limit the comparison between them.

The *IL6* gene was previously associated with a myriad of inflammatory and autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis and Crohn's Disease (Fishman, et al. 1998, Guerreiro, et al. 2009, Li, et al. 2014, Woo, et al. 2013). Functional studies have pointed out that variations at *IL6*, especially those located at promoter region, influence *IL6* gene expression by

altering transcriptional factors binding and, consequently impacting in gene transcription and cytokine levels (Fishman, et al. 1998, Licastro, et al. 2003, Smith, et al. 2008). The allele rs2069840-G was correlated with lower IL-6 plasma concentration, which is in accord with the protective effect. It suggests a model of genetic predisposition leading to increased/reduced levels of IL-6 and consequently affecting acute inflammation process and reactional episodes.

IL-6 is a pleiotropic cytokine that acts in events of innate and adaptive immunity, by addressing the acute inflammatory response and activation of Th1 and Th17 lymphocytes. It also inhibits Treg cells, mediating the balance between pro-inflammatory versus immunosuppressive T-cells (Waldner and Neurath 2014), which is consistent with the central role of IL-6 in prognosis of chronic inflammation. Indeed, IL-6 has been considered a master regulator of immune response in inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis (Woo, et al. 2013, Waldner and Neurath 2014). Moreover, IL-6 was the only cytokine considered a biomarker for both T1R and T2R reactions in a total of 27 candidate factors investigated in a Brazilian cohort including patients with different clinical phenotypes (Stefani, et al. 2009).

In the present study, we have additionally investigated the classic candidate genes *TNF/LTA*, *IFNG* and *IL10*, which were consistently associated with leprosy *per se* (Cardoso, et al. 2011, Cardoso, et al. 2011, Pereira, et al. 2009) and, despite the central roles of these cytokines in leprosy reactions (Moraes, et al. 1999), they were not genetically associated with reaction outcome in our sample. We also did not detect association of *NOD2* and *TLR1*, gene previously associated with reactions in other populations. Again, maybe the different experimental designs used, or different linkage disequilibrium profile between these markers in Brazilians could explain these different findings among populations.

Despite the studies suggesting the influence of risk host and environmental factors in leprosy reactions, the complete mechanisms of their occurrence remain unclear. However, there is no doubt that reactions are the main cause of physical impairment. Recent results obtained from a

prospective study including leprosy patients from Brazil, showed that 30% of the reaction cases were associated with persistent physical disability (Oliveira, et al. 2013). The development of a prognostic panel to predict reaction is a possible strategy to help the surveillance of patients with higher chance to develop clinical complications that culminate in disabilities.

References

1. OMS. World Health Organization - Leprosy: Weekly epidemiological record. 35(88): 365-380. Available at <http://www.who.int/wer>. . 2013.
2. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 2011; 6:533-49.
3. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; 34:255-73.
4. Degang Y, Nakamura K Fau - Akama T, Akama T Fau - Ishido Y, et al. Leprosy as a model of immunity. 2014.
5. Sampaio EP, Moraes MO, Nery JA, Santos AR, Matos HC, Sarno EN. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin Exp Immunol* 1998; 111:300-8.
6. 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.
7. Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JA, Sampaio EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukoc Biol* 1999; 65:364-71.
8. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; 363:1209-19.
9. Nery JA, Bernardes Filho F Fau - Quintanilha J, Quintanilha J Fau - Machado AM, Machado Am Fau - Oliveira SdSC, Oliveira Sde S Fau - Sales AM, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. 2013.
10. Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998; 40:363-70.
11. Kahawita IP, Lockwood DN. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. 2008.

12. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, 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; 50:541-9.
13. Sampaio EP, Malta AM, Sarno EN, Kaplan G. Effect of rhuIFN-gamma treatment in multibacillary leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1996; 64:268-73.
14. Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J Exp Med* 1992; 175:1729-37.
15. Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:69-76.
16. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:103-8.
17. Andersson AK, Chaduvula M, Atkinson SE, et al. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infect Immun* 2005; 73:3725-33.
18. Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Marlowe S, et al. Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1R) reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004; 72:27-34.
19. van Brakel WH, Nicholls PG, Das L, et al. The INFIR Cohort Study: investigating prediction, detection and pathogenesis of neuropathy and reactions in leprosy. Methods and baseline results of a cohort of multibacillary leprosy patients in north India. *Lepr Rev* 2005; 76:14-34.
20. Mota. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. 2012.
21. Ranque B, Nguyen VT, Vu HT, et al. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis* 2007; 44:33-40.
22. Ramu G, Desikan KV. Reactions in borderline leprosy. *Indian J Lepr* 2002; 74:115-28.
23. Antunes DE, Araujo S, Ferreira GP, et al. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108:901-8.
24. Pocaterra L, Jain S Fau - Reddy R, Reddy R Fau - Muzaffarullah S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. 2006.
25. Fava V, Orlova M Fau - Cobat A, Cobat A Fau - Alcais A, Alcais A Fau - Mira M, Mira M Fau - Schurr E, Schurr E. Genetics of leprosy reactions: an overview. 2012.
26. 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.
27. Graca CR, Paschoal VD, Cordeiro-Soubhia RM, et al. NINJURIN1 single nucleotide polymorphism and nerve damage in leprosy. *Infect Genet Evol* 2012; 12:597-600.

28. 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.
29. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2:e231.
30. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* 2009; 199:1816-9.
31. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* 2010; 201:1422-35.
32. Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis* 2009; 9:75.
33. Sousa AL, Fava Vm Fau - Sampaio LH, Sampaio Lh Fau - Martelli CMT, et al. Genetic and immunological evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction. 2012.
34. Scollard DM, Smith T Fau - Bhoopat L, Bhoopat L Fau - Theetranont C, Theetranont C Fau - Rangdaeng S, Rangdaeng S Fau - Morens DM, Morens DM. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. 1994.
35. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine* 2009; 361:2609-18.
36. de Sales Marques C, Brito-de-Souza VN, Albuquerque Guerreiro LT, et al. Toll-like receptor 1 (TLR1) N248S single nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis* 2013.
37. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* 2007; 178:7520-4.
38. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog*; 6:e1000979.
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; 128:481-90.
40. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis* 2011; 204:1256-63.
41. 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.
42. Fishman D, Faulds G Fau - Jeffery R, Jeffery R Fau - Mohamed-Ali V, et al. 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. 1998.

43. Guerreiro CS, Ferreira P Fau - Tavares L, Tavares L Fau - Santos PM, et al. Fatty acids, IL6, and TNFalpha polymorphisms: an example of nutrigenetics in Crohn's disease. 2009.
44. Li XA-O, Chai W, Ni M, et al. The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a chinese population. 2014.
45. Woo P, Humphries SE, Mocchegiani E, et al. IL-6 polymorphisms: a useful genetic tool for inflammation research? 2013.
46. Licastro F, Grimaldi Lm Fau - Bonafe M, Bonafe M Fau - Martina C, et al. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. 2003.
47. Smith AJ, D'Aiuto F Fau - Palmen J, Palmen J Fau - Cooper JA, et al. Association of serum interleukin-6 concentration with a functional IL6 -6331T>C polymorphism. 2008.
48. Waldner MJ, Neurath MF. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. 2014.
49. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006; 77:189-202.
50. Oliveira D, Sherlock J, Melo EVd, et al. Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. 2013.
51. Orlova M, Cobat A Fau - Huong NT, Huong Nt Fau - Ba NN, et al. Gene set signature of reversal reaction type I in leprosy patients. 2013.

Table 1. Characteristics of the patients included in the study.

Leprosy Patients*				
	No Reaction (N=200)	Leprosy Reaction (N= 385)	Type 1 Reaction** (N=163)	Type 2 Reaction** (N=170)
Age (mean $\pm$ SD)	41.1 $\pm$ 17.2	38.4 $\pm$ 16.2	41.6 $\pm$ 16.7	34.5 $\pm$ 13.9
Sex				
<i>Female</i>	92 (0.46)	132 (0.25)	64 (0.40)	49 (0.28)
<i>Male</i>	108 (0.54)	253 (0.75)	99 (0.60)	121 (0.72)
Ethnicity				
<i>Caucasoid</i>	68 (0.51)	129 (0.51)	59 (0.53)	51 (0.49)
<i>Mestizo</i>	55 (0.41)	97 (0.38)	40 (0.36)	40 (0.39)
<i>Black</i>	11 (0.08)	27 (0.11)	12 (0.11)	12 (0.12)
Clinical Form				
<i>I</i>	26 (0.13)	12 (0.03)	10 (0.06)	
<i>BT</i>	106 (0.53)	68 (0.18)	50 (0.31)	---
<i>BB</i>	22 (0.11)	54 (0.14)	49 (0.30)	2 (0.01)
<i>BL</i>	26 (0.13)	104 (0.27)	49 (0.30)	41 (0.23)
<i>LL</i>	20 (0.10)	147 (0.38)	5 (0.03)	127 (0.76)

* Results are shown as total counts (frequency) except for age . ** Were excluded patients with both type 1 and type 2 reactions. SD = standard deviation.

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

Table 2. Association between SNPs in *TNF/LTA*, *IL10*, *IFNG*, *TLR1* and *NOD2* genes and the development of leprosy reactions or its subtypes.

Gene	SNPs	Genotypes	OR (95% CI; p-value)*		
			Leprosy Reaction	Type 1 Reaction	Type 2 Reaction
<i>TNF</i>	rs1800629	GA/AA	1.18 (0.71 – 1.94; p = 0.51)	1.22 (0.69 – 2.15; p = 0.47)	1.28 (0.38 – 3.40; p = 0.61)
<i>LTA</i>	rs909253	AG/GG	1.11 (0.72 – 1.69; p = 0.62)	1.11 (0.69 – 1.80; p = 0.64)	0.85 (0.39 – 1.88; p = 0.74)
<i>IL10</i>	rs1800871	CT/TT	1.39 (0.89 – 2.16; p = 0.14)	1.34 (0.79 – 2.26; p = 0.27)	0.88 (0.41 – 1.86; p = 0.60)
<i>IFNG</i>	rs2430561	AT/TT	0.93 (0.61 – 1.42; p = 0.75)	0.90 (0.55 – 1.45; p = 0.67)	0.63 (0.29 – 1.33; p = 0.23)
<i>TLR1</i>	rs5743592	AG/GG	0.94 (0.60 – 1.47; p = 0.78)	0.85 (0.49 – 1.46; p = 0.55)	1.43 (0.63 – 3.24; p = 0.39)
	rs4833095	GA/AA	0.90 (0.59 – 1.37; p = 0.61)	0.99 (0.60 – 1.64; p = 0.98)	0.66 (0.30 – 1.46; p = 0.30)
<i>NOD2</i>	rs7194886	CT/TT	1.09 (0.69 – 1.71; p = 0.72)	1.13 (0.68 – 1.88; p = 0.63)	2.36 (0.97 – 5.77; p = 0.06)
	rs9302752	GA/AA	0.68 (0.43 – 1.06; p = 0.09)	0.78 (0.48 – 1.29; p = 0.34)	0.52 (0.22 – 1.23; p = 0.15)
	rs8057341	GA/AA	1.29 (0.85 – 1.95; p = 0.23)	1.34 (0.84 – 2.14; p = 0.22)	0.88 (0.42 – 1.83; p = 0.74)
	rs2066843	CT/TT	0.80 (0.49 – 1.32; p = 0.40)	0.80 (0.47 – 1.35; p = 0.41)	0.81 (0.38 – 1.72; p = 0.59)
	rs751271	GT/TT	0.73 (0.46 – 1.16; p = 0.19)	0.78 (0.48 – 1.28; p = 0.33)	0.54 (0.25 – 1.13; p = 0.10)
	rs748855	AG/GG	0.91 (0.57 – 1.47; p = 0.71)	1.02 (0.59 – 1.74; p = 0.95)	1.77 (0.71 – 4.39; p = 0.22)

* Results of dominant model adjusted for gender, clinical form (I/BB/BT, BL or LL) and relapse (presence or absence). CI: confidence interval.

Table 3: Association between *IL6* SNPs and the development of leprosy reactions or its subtypes.

SNPs	Genotype/allele	OR (95%CI; p-value)*		
		Leprosy Reaction	Type 1 Reaction	Type 2 Reaction
rs2069832	GA	1.33 (0.83 – 2.13; p = 0.24)	1.47 (0.88 – 2.46; p = 0.14)	1.03 (0.40 – 2.67; p = 0.95)
	AA	0.54 (0.17 – 1.73; p = 0.30)	0.47 (0.09 – 2.30; p = 0.35)	0.73 (0.09 – 5.77; p = 0.77)
		p** = 0.58	p** = 0.13	p** = 0.10
	GA/AA	1.22 (0.77 - 1.92; p = 0.40)	1.35 (0.82 – 2.25; p = 0.24)	0.99 (0.40 – 2.43; p = 0.98)
rs2069840	CG	0.65 (0.40 – 1.05; p = 0.08)	0.64 (0.37 – 1.09; p = 0.10)	0.56 (0.22 – 1.38; p = 0.21)
	GG	0.14 (0.04 – 0.45; p = 0.001)	0.14 (0.03 – 0.66; p = 0.01)	0.12 (0.02 – 0.87; p = 0.04)
		p** = 0.01	p** = 0.01	p** = 0.17
	CG/GG	0.56 (0.35 - 0.88; p = 0.01)	0.55 (0.33 – 0.93; p = 0.02)	0.49 (0.20 – 1.18; p = 0.11)
rs2069845	AG	1.78 (1.11-2.84; p = 0.01)	1.98 (1.17 – 3.34; p = 0.01)	1.53 (0.64 – 3.65; p = 0.34)
	GG	1.32 (0.63 - 2.77; p = 0.46)	1.12 (0.46 – 2.72; p = 0.80)	1.61 (0.28 – 9.38; p = 0.59)
		p** = 0.29	p** = 0.03	p** = 0.73
	AG/GG	1.68 (1.08-2.63; p = 0.02)	1.80 (1.08 – 3.00; p = 0.02)	1.54 (0.67 – 3.55; p = 0.31)

* Results are shown for codominant and dominant models adjusted for gender, clinical form and relapse. CI: confidence interval. ** Global p-value.

Table 4: Association between *IL6* haplotypes and the development of leprosy reactions or its subtypes.

Haplotype	Alleles	OR (95%CI; p-value)*		
		Leprosy Reaction	Type 1 Reaction	Type 2 Reaction
rs2069832/rs2069840/ rs2069845**	A/C/G	1.0 (0.64 - 1.56; p = 0.98)	1.05 (0.64 – 1.75; p = 0.84)	1.03 (0.44 – 2.42; p = 0.95)
	G/C/G	1.92 (1.04 - 3.53; p = 0.04)	1.74 (0.88 – 3.44; p = 0.11)	2.24 (0.72 – 7.03; p = 0.17)
	G/G/A	0.55 (0.35 - 0.86; p = 0.008)	0.57 (0.35 – 0.94; p = 0.03)	0.48 (0.21 – 1.12; p = 0.09)
	G/C/A	-	-	-

*Results adjusted for gender, clinical form (I/BB/BT, BL or LL) and relapse (presence or absence). CI: confidence interval. ** Haplotype frequencies do not sum up to 1 because the rare haplotypes were collapsed in one single group and excluded from the analysis. The allelic combination G/C/A was used as reference in the model.

Supplementary table 1. Frequencies of SNPs and haplotypes in patients according to the presence of leprosy reactions and subtypes.

GENE SYMBOL	SNP		No reaction	Leprosy reaction	Type 1 reaction	Type 2 reaction
<i>IL6</i>	rs2069832	GG	86 (0.57)	178 (0.62)	65 (0.52)	84 (0.68)
		GA	56 (0.37)	99 (0.34)	56 (0.45)	31 (0.25)
		AA	8 (0.05)	12 (0.04)	3 (0.02)	8 (0.07)
			150	289	124	123
		G	228 (0.76)	455 (0.79)	186 (0.75)	199 (0.81)
		A	72 (0.24)	123 (0.21)	62 (0.25)	47 (0.19)
		A carriers	64 (0.43)	111 (0.38)	59 (0.47)	39 (0.32)
	rs2069840	CC	73 (0.48)	159 (0.57)	68 (0.59)	68 (0.56)
		CG	64 (0.42)	112 (0.40)	46 (0.40)	49 (0.40)
		GG	14 (0.09)	8 (0.03)	2 (0.02)	5 (0.04)
			151	279	116	122
		C	210 (0.70)	430 (0.77)	182 (0.78)	185 (0.76)
		G	92 (0.30)	128 (0.23)	50 (0.22)	59 (0.24)
		G carriers	78 (0.52)	120 (0.43)	48 (0.41)	54 (0.44)
	rs2069845	AA	73 (0.46)	111 (0.38)	40 (0.33)	54 (0.43)
		AG	69 (0.43)	145 (0.50)	72 (0.59)	55 (0.43)
		GG	18 (0.11)	36 (0.12)	11 (0.09)	18 (0.14)
			160	292	123	127
		A	215 (0.67)	367 (0.63)	152 (0.62)	163 (0.64)
		G	105 (0.33)	217 (0.37)	94 (0.38)	91 (0.36)
		G carriers	87 (0.54)	248 (0.85)	98 (0.80)	73 (0.57)
	rs2069832/rs2069840/rs2069845	A/C/A	0.01	0.00	0.00	0.00
		A/C/G	0.24	0.21	0.25	0.19
		G/C/A	0.36	0.39	0.39	0.40
		G/C/G	0.08	0.16	0.14	0.17
		G/G/A	0.30	0.23	0.22	0.24

Supplementary table 1. Continuation

GENE SYMBOL	SNP		No reaction	Leprosy reaction	Type 1 reaction	Type 2 reaction
<i>IFNG</i>	rs2430561	AA	80 (0.45)	156 (0.49)	58 (0.45)	87(0.55)
		AT	77 (0.43)	124 (0.39)	56 (0.44)	49 (0.31)
		TT	22 (0.12)	38 (0.12)	14 (0.11)	22 (0.14)
			179	318	128	158
		A	237 (0.66)	436 (0.69)	172 (0.67)	223 (0.71)
		T	121 (0.34)	200 (0.31)	84 (0.33)	93 (0.29)
		T carriers	99 (0.55)	162 (0.51)	70 (0.55)	
<i>IL10</i>	rs1800871	CC	72 (0.41)	107 (0.37)	39 (0.34)	56 (0.40)
		CT	84 (0.47)	136 (0.47)	54 (0.47)	64 (0.45)
		TT	21 (0.12)	48 (0.16)	21 (0.18)	21 (0.15)
			177	291	114	141
		C	228 (0.64)	350 (0.60)	132 (0.58)	176 (0.62)
		T	126 (0.36)	232 (0.40)	96 (0.42)	106 (0.38)
		T carriers	105 (0.60)	184 (0.63)	75 (0.66)	
<i>TNF/LTA</i>	rs909253	AA	84 (0.49)	138 (0.44)	60 (0.46)	59 (0.42)
		AG	72 (0.42)	137 (0.44)	56 (0.43)	63 (0.45)
		GG	15 (0.09)	36 (0.12)	14 (0.11)	17 (0.12)
			171	311	130	139
		A	240 (0.70)	413 (0.66)	176 (0.68)	181 (0.65)
		G	102 (0.30)	209 (0.34)	84 (0.32)	97 (0.35)
		G carriers	87 (0.51)	173 (0.56)	70 (0.54)	
	rs1800629	GG	167 (0.84)	311 (0.81)	127 (0.78)	143 (0.84)
		GA	27 (0.13)	71 (0.18)	35 (0.21)	26 (0.15)
		AA	6 (0.03)	3 (0.01)	1 (0.01)	1 (0.01)
			200	385	163	170
		G	361 (0.90)	693 (0.90)	289 (0.89)	312 (0.92)
		A	39 (0.10)	77 (0.10)	37 (0.11)	28 (0.08)
		A carriers	33 (0.16)	74 (0.19)	36 (0.22)	
	rs909253/rs1800629	A/A	0.02	0.03	0.03	0.03
		A/G	0.67	0.63	0.65	0.63
		G/A	0.10	0.07	0.07	0.06
		G/G	0.21	0.26	0.25	0.28

Supplementary table 1. Continuation

GENE SYMBOL	SNP		No reaction	Leprosy reaction	Type 1 reaction	Type 2 reaction
<i>TLR1</i>	rs5743592	AA	128 (0.71)	234 (0.72)	97 (0.76)	102 (0.67)
		AG	45 (0.25)	85 (0.26)	28 (0.22)	45 (0.30)
		GG	8 (0.04)	8 (0.02)	3 (0.02)	5 (0.03)
			181	327	128	152
		A	301 (0.83)	553 (0.85)	222 (0.87)	249 (0.82)
		G	61 (0.17)	101 (0.15)	34 (0.13)	55 (0.18)
		G carriers	53 (0.29)	93 (0.28)	31 (0.24)	50 (0.33)
	rs4833095	GG	63 (0.34)	120 (0.36)	47 (0.36)	53 (0.34)
		GA	74 (0.40)	133 (0.40)	48 (0.37)	72 (0.46)
		AA	50 (0.27)	77 (0.23)	35 (0.27)	31 (0.20)
			187	330	130	156
		G	200 (0.53)	373 (0.57)	142 (0.55)	178 (0.57)
		A	174 (0.47)	287 (0.43)	118 (0.45)	134 (0.43)
		A carriers	124 (0.66)	210 (0.64)	83 (0.64)	103 (0.66)
	rs5743592/rs4833095	A/A	0.44	0.41	0.42	0.42
		A/G	0.39	0.43	0.44	0.40
		G/A	0.02	0.02	0.03	0.01
		G/G	0.14	0.13	0.10	0.17
<i>NOD2</i>	rs7194886	CC	60 (0.37)	112 (0.39)	45 (0.37)	47 (0.37)
		CT	80 (0.50)	144 (0.50)	59 (0.48)	69 (0.55)
		TT	21 (0.13)	33 (0.11)	18 (0.15)	10 (0.08)
			161	289	122	126
		C	200 (0.62)	368 (0.64)	149 (0.61)	163 (0.65)
		T	122 (0.38)	210 (0.36)	95 (0.39)	89 (0.35)
		T carriers	101 (0.63)	177 (0.61)	77 (0.63)	79 (0.63)
	rs9302752	GG	72 (0.46)	152 (0.53)	61 (0.50)	70 (0.55)
		GA	78 (0.49)	114 (0.40)	53 (0.43)	49 (0.38)
		AA	8 (0.05)	21 (0.07)	8 (0.07)	9 (0.07)
			158	287	122	128
		G	222 (0.70)	418 (0.73)	175 (0.72)	189 (0.74)
		A	94 (0.30)	156 (0.27)	69 (0.28)	67 (0.26)
		A carriers	86 (0.54)	135 (0.47)	61 (0.5)	58 (0.45)

Supplementary table 1. Continuation

GENE SYMBOL	SNP		No reaction	Leprosy reaction	Type 1 reaction	Type 2 reaction
<i>NOD2</i>	rs8057341	GG	112 (0.60)	188 (0.56)	72 (0.53)	97 (0.60)
		GA	67 (0.36)	123 (0.37)	54 (0.40)	53 (0.33)
		AA	8 (0.04)	24 (0.07)	9 (0.07)	11 (0.07)
			187	335	135	161
		G	291 (0.78)	499 (0.74)	198 (0.73)	247 (0.77)
		A	83 (0.22)	171 (0.26)	72 (0.27)	75 (0.23)
		A carriers	75 (0.40)	147 (0.44)	63 (0.47)	64 (0.40)
	rs2066843	CC	96 (0.62)	166 (0.62)	76 (0.67)	74 (0.62)
		CT	57 (0.37)	97 (0.36)	36 (0.32)	43 (0.36)
		TT	2 (0.01)	5 (0.02)	2 (0.02)	3 (0.02)
			155	268	114	120
		C	249 (0.80)	429 (0.80)	188 (0.82)	191 (0.80)
		T	61 (0.20)	107 (0.20)	40 (0.18)	49 (0.20)
		T carriers	59 (0.38)	102 (0.38)	38 (0.33)	46 (0.38)
	rs751271	GG	72 (0.44)	133 (0.46)	60 (0.48)	57 (0.46)
		GT	81 (0.50)	115 (0.40)	48 (0.39)	50 (0.40)
		TT	9 (0.06)	39 (0.14)	16 (0.13)	18 (0.14)
			162	287	124	125
		G	225 (0.69)	381 (0.66)	168 (0.68)	164 (0.66)
		T	99 (0.31)	193 (0.34)	80 (0.32)	86 (0.34)
		T carriers	90 (0.55)	154 (0.54)	64 (0.52)	68 (0.54)
	rs748855	AA	58 (0.39)	113 (0.46)	40 (0.40)	53 (0.45)
		AG	73 (0.49)	118 (0.48)	50 (0.51)	57 (0.49)
		GG	19 (0.13)	17 (0.07)	9 (0.09)	7 (0.06)
			150	248	99	117
		A	189 (0.63)	344 (0.69)	130 (0.66)	163 (0.70)
		G	111 (0.37)	152 (0.31)	68 (0.34)	71 (0.30)
		G carriers	92 (0.61)	135 (0.54)	59 (0.59)	64 (0.55)

Supplementary table 1. Continuation

GENE SYMBOL	SNP	No reaction	Leprosy reaction	Type 1 reaction	Type 2 reaction
<i>NOD2</i>					
rs7194886/rs9302752/rs8057341/ rs2066843/ rs751271/ rs748855					
	C/A/A/C/G/A	0.05	0.03	0.05	0.02
	C/A/A/C/T/A	0.25	0.24	0.22	0.24
	C/G/G/C/G/A	0.10	0.12	0.08	0.13
	C/G/G/C/G/G	0.03	0.02	0.03	0.02
	C/G/G/C/T/A	0.01	0.04	0.05	0.04
	C/G/G/T/G/A	0.18	0.19	0.17	0.18
	T/G/G/C/G/G	0.32	0.30	0.34	0.28
	T/G/G/C/T/A	0.03	0.05	0.03	0.06

Results are shown as total count (frequency). Haplotype frequencies were estimated by maximum likelihood.

Capítulo V: Discussão e Conclusões

1. Discussão complementar

O presente estudo investigou o efeito de variações genéticas tanto no desfecho da hanseníase *per se* quanto nas reações hansênicas. No manuscrito em questão apresentamos os resultados no formato de artigos, então optamos por fazer a discussão de uma forma mais abrangente e complementar àquelas que já foram apresentadas nos capítulos anteriormente.

Mediante ao contato com o *M. leprae*, vários mecanismos são disparados na tentativa de conter a infecção. Nesse aspecto os estudos genéticos vêm contribuindo na elucidação e no entendimento das vias de ativação, sendo possível pontuar dentro dessas vias, várias moléculas cujos genes já foram associados com a hanseníase. Os principais candidatos seguem esquematizados na Figura 11.

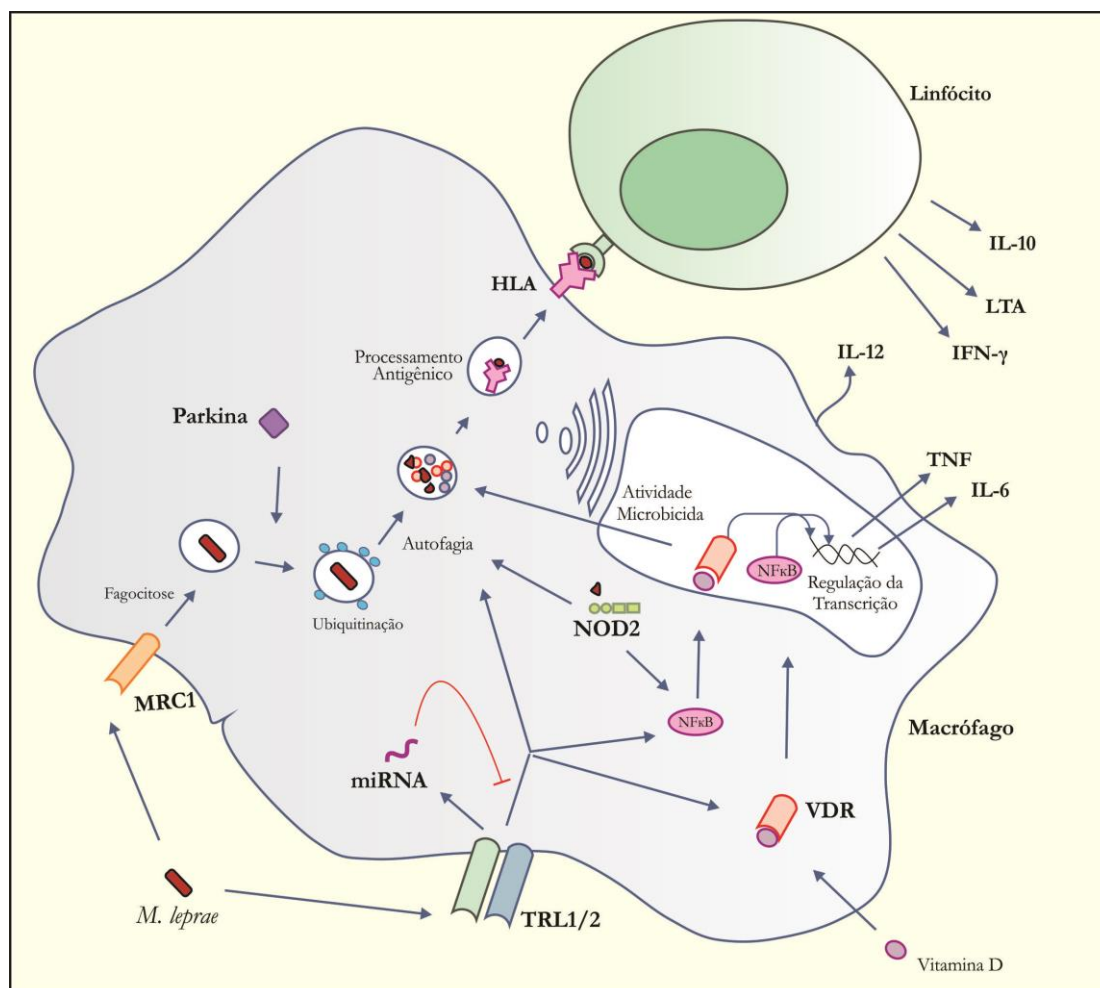


Figura 11. Principais genes associados à hanseníase incluídos nas vias de resposta a doença. O esquema ilustra os principais candidatos associados/ligados com a hanseníase em estudos genéticos, que foram integrados em vias de ativação da resposta imune inata e adaptativa frente a infecção pelo *M. leprae*. Polimorfismos nessas vias poderiam contribuir para compor um perfil mais susceptível ou protetor à doença. Adaptado de Cardoso et al., 2011 (Anexo I).

A partir da Figura 11, nota-se que existe a possibilidade de integrar os genes de susceptibilidade e inseri-los dentro do contexto da via de ativação da resposta imune na hanseníase. Na imunidade inata, o primeiro nível de interação e reconhecimento do *M. leprae* pelas células do hospedeiro ocorre via receptores de reconhecimento de padrão, tais como NOD2 e TLR1/2, assim como por receptores que participam da internalização do bacilo, tais como o MRC1. Esse reconhecimento leva à ativação dos macrófagos, disparando vias de sinalização que culminam em respostas efetoras antimicrobianas. A ativação do fator de transcrição NF- κ B ocupa um papel central na cascata de sinalização, levando à regulação da expressão gênica e à indução de citocinas que contribuirão para um perfil inflamatório mediante a infecção, e a ativação de vias microbicidas (Liu et al., 2006). Conjuntamente, podemos destacar também o papel da autofagia na resposta protetora frente ao *M. leprae*, que mostrou levar à ativação do fagolisossomo (xenofagia) e contribuir para a eliminação de micobactérias. A ativação da autofagia envolve a ubiquitinação do fagossomo pela parkina, e passa pela ativação dos complexos autofágicos pelos sensores TLRs e NOD2 (Manzanillo et al., 2013).

Embora a via descrita seja compatível com um desfecho favorável ao hospedeiro, sabe-se que o *M. leprae* é capaz de subverter alguns desses mecanismos de defesa, contribuindo para ativar vias que contribuam para o sucesso da infecção (Figura 5, Capítulo 1). Alguns miRNAs, por exemplo, são ativados pela via dos TLRs (Figura 11), e atuam em uma alça reguladora que tem como alvo moléculas da própria via dos TLRs (IRAK/TRAF6), e outros genes da resposta inflamatória como o TNF e, sendo assim, regulam negativamente a resposta microbicida (Liu et al. 2012; Taganov et al. 2006). Foi mostrado que o NOD2 também induz a expressão de miR-29, o qual regula a expressão de IL-32 e IL-12 em células dendríticas (Brain et al., 2013). Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo sugerem a participação do miRNAs na hanseníase, sendo identificada uma variação funcional no miR-146a, que foi associada com susceptibilidade à doença e a menores níveis de TNF. Além disso, o estímulo com *M. leprae* vivo induziu a expressão do miR-146a em células THP-1, consistente com o papel imunomodulador do mesmo na hanseníase (Cezar-de-Mello et al. 2013). Ainda considerando essa capacidade moduladora do bacilo, estudos vêm sugerindo que o *M. leprae* é capaz de induzir a via de IFN tipo I, após o reconhecimento pelos sensores TLR, NOD ou outros sensores citoplasmáticos como o STING, os quais vão direcionar a resposta para um perfil favorável à infecção e sobrevivência do bacilo (Pinto 2013,

Manzanillo et al., 2012, Teles et al., 2013). É importante ressaltar que esse perfil hiporresponsivo pode ser influenciado também por variações nos genes que codificam os receptores e mediadores da resposta imunológica, alterando sua expressão e/ou a funcionalidade proteica, e consequentemente alterando a cascata de ativação da resposta imune. Essa hipótese tem sido testada e comprovada através de diferentes abordagens genéticas (Cardoso et al., 2011b, Anexo I).

Os estudos genéticos apontam cada vez mais para a teoria "variantes comuns-doenças comuns", que defende a importância das variantes com frequência alta nas populações, tais como os SNPs, na influência à susceptibilidade a doenças. Acredita-se que essas variantes possuem efeitos modestos individualmente, mas que podem resultar em um efeito maior quando em conjunto (Becker 2004). Uma hipótese interessante que vem sendo sugerida é a de que variantes comuns possam na verdade estar em desequilíbrio de ligação com variantes raras de maior efeito, resultando na associação observada, o que pode estar acontecendo na hanseníase, por exemplo (Gibson et al., 2012). O presente estudo avaliou o efeito de variantes comuns em genes da resposta imune na hanseníase, investigando a associação de genes dos receptores TLR1 e NOD2 na hanseníase *per se*, e de genes clássicos da resposta imune inata nos episódios reacionais. Os resultados observados serão abordados nos tópicos seguintes, acrescentando ao que já foi discutido nos capítulos anteriores.

1.1 Associação entre o *TLR1* +743G>A (N248S) e a hanseníase *per se*

Entre as moléculas que protagonizam a resposta imune inata na hanseníase estão os TLRs, visto que a maioria das vias é conectada de alguma forma à ativação desses receptores. Foi demonstrado o papel do heterodímero TLR1/2 na infecção a patógenos intracelulares, disparando processos microbicidas e de autofagia, eventos cruciais na resposta protetora ao estabelecimento da doença (Krutzik et al. 2003; Liu et al. 2006; Delgado et al. 2008; Shin et al. 2010).

Além da hanseníase, outras doenças infecciosas foram associadas a polimorfismos em genes da família TLR, incluindo tuberculose pulmonar, infecções fúngicas e do trato urinário, e sepse (Hawn et al. 2009; Plantinga et al. 2012; Schroder and Schumann 2005; Y. Zhang et al. 2013). Na hanseníase o estudo de associação mais robusto envolvendo o *TLR1* foi conduzido por Wong e colaboradores na população Indiana e

permitiu identificar vários SNPs associados à doença, replicando associações já descritas e identificando novos candidatos. No entanto, a associação mais interessante foi a da variante I602S, no gene *TLR1*. Antes disso, o SNP N248S já havia sido associado à hanseníase na população de Bangladesh (Schuring et al., 2009). Esses resultados nos motivaram a estudar esse gene e investigar a associação com a doença na população brasileira.

No nosso estudo o alelo 248S no *TLR1* foi associado com susceptibilidade à hanseníase, o que foi consistentemente validado em populações de quatro diferentes regiões do Brasil, utilizando tanto desenhos caso-controle quanto de famílias. A combinação de todas as nossas populações e a do estudo em Bangladesh, totalizando 4.207 indivíduos na análise, corrobora o achado sugerindo que o SNP N248S constitui um marcador de susceptibilidade a hanseníase na população brasileira ($OR_{\text{Alelo S}}=1,22$; $p<0.0001$).

A substituição N248S (+743A>G) localiza-se em um domínio importante do TLR1 no reconhecimento do patógeno (Omueti et al., 2003). Estudos associaram a variante 248N a baixa expressão do TLR1 (Uciechowski et al., 2011) e à redução da expressão de NF- κ B (Randhawa et al., 2011). Já no nosso estudo funcional os portadores do 248S não exibiram alteração na expressão do TLR1, nem dos níveis individuais das citocinas TNF, IL-10, IL-12 e IL-6. No entanto, a presença do S acarretou em uma razão $\log(\text{TNF/IL-10})$ diminuída frente ao estímulo com BCG ou *M. leprae*, indicando uma relação do alelo com hiporesponsividade inflamatória. A razão TNF/IL-10 foi reportada previamente como preditora do status pro- versus anti-inflamatório na hanseníase, sendo a redução dessa razão relacionada com risco à doença (Lima et al., 2000). Esse perfil inflamatório hipo-responsivo dos carreadores de S frente ao estímulo com BCG pode sugerir uma estratégia interessante para otimização vacinal de indivíduos suscetíveis. Recentemente, variações em genes da via TLR foram relacionadas com resposta imune alterada *in vivo*, sugerindo novas estratégias para adjuvantes capazes de reverter essa alteração em vacinas (Randhawa et al., 2011).

Nas análises de dinâmica molecular o 248S mostrou influenciar a estrutura molecular do TLR1 na região da proteína em que se encontra, afetando no perfil eletrostático e no número de pontes de hidrogênio. Essa foi uma abordagem pioneira em estudos envolvendo a hanseníase, utilizando modelagem protéica para tentar entender a influência de genótipos na sua estrutura. É importante observar que essa é uma

ferramenta promissora, pois diferentemente dos modelos estáticos para predição tais como o software polyphen, a dinâmica permite a análise simulando o efeito dos rearranjos ao longo do tempo. As análises foram conduzidas avaliando também as interações com o solvente, onde observamos que a presença da variação de risco levou ao rearranjo das interações com moléculas de água, o que poderia influenciar no reconhecimento do patógeno, na especificidade da interação ou na cascata de sinalização. Não foi possível incluir o SNP I602S na modelagem, pois a região em que ele se encontra (porção intracelular do TLR1) não foi cristalizada até o momento. No entanto, experimentos em colaboração com a equipe do Dr. Ernesto Cafarena/João Hermínio (PROCC/FIOCRUZ), estão em andamento com o objetivo de simular a conformação tridimensional da região contendo o I602S, e avançar na avaliação do efeito conjugado de todos os SNPs no TLR1.

O nosso estudo não detectou a associação entre o SNP I602S (+1805T>G) no *TLR1* e a hanseníase. Esse achado foi a princípio intrigante, dada a associação do alelo 602S à proteção no estudo na população indiana (Wong et al., 2010) e também aos achados funcionais relacionados a essa variante. Contudo, ao avaliarmos os diferentes perfis de desequilíbrio de ligação na região do I602S nas diferentes populações já estudadas notamos que o LD varia de maneira importante entre elas. O mesmo padrão de variabilidade é observado na frequência dos SNPs individualmente e de suas combinações haplotípicas, o que poderia explicar a dificuldade na detecção do efeito e replicação dos dados entre as populações (Tabela 2, Capítulo 1). O haplótipo formado pelos alelos associados nos dois estudos (248S/602S), por exemplo, foi ausente tanto em brasileiros quanto em indianos. Diferentes processos de pressão seletiva entre as populações podem ter exercido influência nas frequências dos SNPs no *TLR1*. Estudos avaliando a dinâmica evolutiva dos TLRs concluíram que os receptores intracelulares sofreram forte seleção purificadora, enquanto os receptores *TLR10*, *TLR1* e *TLR6* passaram por um processo recente de pressão seletiva positiva em populações não Africanas (Barreiro et al., 2009; Casanova et al., 2011).

A fim de entender o perfil de LD em nossa amostra da população brasileira e também de possibilitar a detecção de novas variações, realizamos o sequenciamento de toda a região codificante do gene *TLR1*. Identificamos oito polimorfismos nessa região, o que foi similar ao observado em um estudo prévio de caracterização de variantes nos *TLR1/2/6* (Ben-Ali et al., 2011). A partir desses resultados, dois pontos importantes

foram levantados. O primeiro foi o LD considerado moderado entre os SNPs N248S e I602S, que não nos permite descartar a hipótese de que o I602S tenha efeito na associação observada. O segundo ponto é que identificamos outro SNP (rs5743516) em alto LD com o N248S, o que também não excluiria a possibilidade de que esse SNP seja a variante funcional no *bin*. Porém, ao contrário do N248S, o rs5743516 é uma substituição sinônima (S506S), e não foi identificado em nenhum estudo funcional/genético com doenças infecciosas da literatura. Esses fatos, somados aos dados de efeito funcional do presente trabalho, nos leva a acreditar que o efeito da associação seja de fato pelo SNP N248S.

1.2 Associação entre o gene *NOD2* e a hanseníase

A segunda vertente do presente estudo foi avaliar a associação do gene *NOD2* na hanseníase, inserido no contexto de um projeto maior cujo objetivo foi replicar na população brasileira as associações observadas no GWAS em chineses. Inicialmente foi feito um rastreamento na população teste, que incluiu as famílias da Vila Santo Antônio do Prata, Pará (ex-colônia de isolamento de pacientes com hanseníase). Essa população possui características interessantes para investigações genéticas, dentre elas o alto grau de isolamento e a alta frequência da doença com distribuição homogênea da mesma na comunidade (Lazaro et al., 2010), o que poderia indicar algum tipo de enriquecimento de genes associados à doença. Esse rastreamento incluiu os SNPs associados nos chineses e expandiu a abordagem incluindo também "tag SNPs" nos genes associados, aumentando a densidade de SNPs nas regiões de interesse. Essa abordagem resultou na associação de um SNP no gene *NOD2* (rs8057341) e outro no gene *CCDC122* (rs4942254), resultados que foram seguidamente replicados e confirmados nas demais populações de estudo (Rio de Janeiro, Bauru, Rondonópolis e Almenara), indicando-os como marcadores de susceptibilidade à doença na população brasileira.

Em uma abordagem conduzida paralelamente incluindo somente a população do Rio de Janeiro, outros 5 SNPs no gene *NOD2* também foram testados, resultando na associação dos SNPs rs2066843 (R259R) e rs751271 (localizado no íntron 6), com proteção a hanseníase (dados não mostrados). De forma interessante, o haplótipo que incluía os seis SNPs genotipados na população do Rio de Janeiro foi mais frequente em

pacientes e associado a risco de desenvolvimento da doença (OR= 2,13, p= 0,0004). Esses achados reforçam a associação genética do *NOD2* com a hanseníase.

No nosso trabalho ainda não foi possível avançar no estudo funcional para tentar entender como as variantes no *NOD2* afetariam a resposta imune na hanseníase, e até o momento nenhum estudo da literatura abordou a relação genótipo-fenótipo nesse gene. No nosso estudo os mesmos doadores de PBMCs incluídos no estudo funcional do *TLR1* foram também genotipados para os SNPs no gene *NOD2*. Entretanto, após análise dos dados, não foram observadas diferenças significativas na expressão de TNF, IL-10, IL-6, IL-12 e IL-1 em função da presença dos alelos de risco (dados não mostrados). Estudos em células dendríticas indicam que a expressão de IL-32 poderia refletir a ativação da via do NOD2, o que seria interessante para investigar o efeito da presença dos polimorfismos (Schenk et al., 2012).

O NOD2 é um receptor intracelular que ao ser estimulado pelo *M. leprae* poderia ativar duas cascatas principais: uma via distinta da via dos TLRs, dependente da produção de IL-32 e que levaria à ativação de uma resposta protetora, ou ainda outra via em sinergia com os TLRs levando à ativação de NF- κ B, autofagia e atividade microbicida (Cooney et al., 2010; Ferwerda et al., 2005; Shin et al., 2010). As vias mediadas por TLRs e NOD2 mostraram ainda atuarem de forma não redundante, e a forma como elas desempenhariam um papel sinérgico na infecção vem sendo cada vez mais estudada. A vitamina D mostrou estimular de forma robusta a via de ativação do NOD2 em monócitos e células epiteliais, induzindo ao atividade de NF- κ B e a produção dos peptídeos antimicrobianos catelicidina e β -defensina (Wang et al., 2010). Na doença de Crohn o estímulo com a vitamina D levou à inibição das citocinas estimuladas pelos TLRs individualmente, mas induziu a produção de citocinas que seriam fruto da co-estimulação de TLRs e NOD2 (IL-10, IL-23, TNF). Foi mostrado ainda que células de pacientes portadores de uma mutação no NOD2 foram irresponsivas ao estímulo com vitamina D ou MDP, ligantes do VDR e NOD2 respectivamente (Dionne et al., 2014). Uma abordagem interessante seria analisar qual o efeito da combinação entre os SNPs do *TLR1*, *NOD2* e *VDR*, utilizando análises de interação SNP-SNP e também simulações *in silico*. Abordagem similar foi realizada recentemente, avaliando a interação entre SNPs do gene *PARK2* e de citocinas, revelando que combinações entre polimorfismos no *PARK2* e nos genes *TNF*, *IL10* e *IL6* foram associadas com risco aumentado à hanseníase (Chopra et al., 2014).

Os genes *CCDC122-LACC1*, localizados na região 13p14, foram associados com a hanseníase pela primeira vez na população chinesa, mas ainda não tiveram sua função descrita. Nossos resultados reforçam a hipótese de que esses genes sejam candidatos promissores não apenas para estudos genéticos, mas também para investigações que visem descrever seu papel biológico na doença.

1.3 Episódios reacionais na hanseníase e a associação do gene *IL6*

Durante o curso da hanseníase é possível distinguir pelo menos três estágios distintos, representados pela progressão ou não à hanseníase após a exposição ao bacilo, o estabelecimento das formas clínicas, e o desenvolvimento de quadros mais graves, tais como os episódios reacionais. Estes se desenvolvem no contexto de doença já estabelecida, quando já houve ativação da resposta imune frente ao *M. leprae*. Nesse momento, os pacientes podem apresentar exacerbação da resposta inflamatória, que culminaria com o desenvolvimento dos episódios reacionais. No contexto de suscetibilidade genética, acredita-se que grupos distintos de genes poderiam influenciar esses diferentes “estágios” da doença, conforme hipótese ilustrada na Figura 3 do artigo de revisão no Anexo 1.

O estudo descrito no capítulo IV teve como objetivo investigar a suscetibilidade genética aos episódios reacionais. A escolha dos 7 genes candidatos incluídos no estudo foi baseada em dados já publicados por nosso grupo ou ainda outros disponíveis na literatura sugerindo a associação dos mesmos seja com hanseníase *per se* ou com reações. Dentre os genes avaliados no nosso desenho, apenas o da *IL-6* foi associado à ocorrência de reação. Os SNPs nos genes *TLR1* e *NOD2*, os quais foram previamente associados com reação em outras populações (Berrington et al., 2010; Bochud et al., 2008), não foram associados a este desfecho no nosso estudo. O desfecho reação é extremamente complexo, e observa-se que a definição de casos pode variar entre os estudos, o que implica na dificuldade de replicar os dados da literatura. No nosso estudo houve a perda de poder estatístico nos grupos, principalmente após a estratificação para os subtipos de reação, podendo ter dificultado a detecção de possíveis associações. Além disso, os modelos de regressão utilizados no presente trabalho foram ajustados para co-variáveis tais como sexo e, principalmente, a forma clínica, que está

diretamente associada ao desfecho de reação. Tal ajuste não foi realizado na maioria dos estudos, o que pode ter impacto importante nas medidas de associação obtidas.

Na avaliação do gene *IL6* com reação, tentamos replicar os SNPs associados previamente na população de Goiânia (Sousa et al., 2012), visto que o grupo identificou associações com reação do tipo 2, além de uma correlação entre a presença do alelo protetor e maiores níveis de IL-6. Como resultado, identificamos dois SNPs associados com o desfecho reação *per se*, tanto individualmente quanto combinados em haplótipos. Após a estratificação para os subtipos de reação, o valor de OR permaneceu praticamente inalterado, indicando que, em nossa população de estudo, as variações do gene *IL6* estão associadas com o desenvolvimento de reação independente do subtipo. De fato, a IL-6 já foi considerada um marcador para ambos os tipos de reação (Stefani et al., 2009), o que estaria de acordo com os nossos achados. Altos níveis de IL-6 são relacionados a doenças com perfil crônico/inflamatório tais como doença de Crohn, e polimorfismos no gene *IL6* também vêm sendo associados a esses desfechos (Guerreiro et al., 2009; Lee et al., 2012). Estudos também sugerem que, do ponto de vista imunológico, as reações do tipo I e tipo II apresentem perfis semelhantes, ambas caracterizadas pela presença de citocinas pró-inflamatórias (Moraes et al. 1999; Moraes et al., 2001). Desta forma, é possível que os diferentes fatores de risco, especialmente a carga bacilar e eventualmente a ativação específica de uma subpopulação de linfócitos T sejam responsáveis por direcionar o desenvolvimento de cada tipo de reação.

Um fator relevante em relação a IL-6 é que a citocina mostrou ser um indicador do funcionamento das vias dos receptores TLR e NOD2, sendo um mediador produzido no final dessas cascatas e que indicaria a ativação das mesmas (Hawn et al. 2007). Isso foi reforçado pela influência de polimorfismos presentes nesses receptores nos níveis da IL-6 (Plantinga et al., 2012). Foi demonstrado também que a produção de IL-6 pode ser regulada pela parkina. O silenciamento da parkina em células THP-1 resultou em redução da IL-6 e da quimiocina CCL2 em resposta a micobactéria ou LPS. O interessante é que a produção de IL-6 foi dependente do estímulo com a vitamina D, indicando também a participação das vias TLR1/2 e VDR nesse processo (de Leseleuc et al., 2013). O mesmo estudo também mostrou que polimorfismos na parkina foram relacionados com os níveis de transcrição de *IL6* e *CCL2*, mediante ao estímulo com *M. leprae* sonicado. Esse estímulo remete ao contexto dos episódios reacionais durante/após o tratamento, onde pode existir uma reativação da resposta inflamatória

frente a fragmentos do bacilo. Esses achados sugerem que a IL-6 possa assumir um papel relevante durante as reações, e mais estudos precisam ser conduzidos para contribuir no entendimento tanto do efeito genético na região quanto dos mecanismos biológicos envolvidos na participação da citocina.

É muito provável que vários outros genes estejam envolvidos com o processo de reação na hanseníase. Atualmente nosso grupo tenta dar continuidade ao entendimento deste desfecho através de um projeto em colaboração com o grupo do Dr. Erwin Schurr (McGill, Montreal-CA), que tem investigado a associação de variações genéticas com o desfecho reação na população do Vietnã. O projeto iniciou-se com um estudo em larga escala avaliando a associação de variantes ao longo de todo genoma com a hanseníase *per se* em Vietnamitas, com interesse também no desfecho reação do tipo I. Esse estudo gerou uma lista de genes associados para ambos os desfechos os quais foram então testados em nossa população (caso-controle e famílias do Rio de Janeiro) com o intuito de replicar os achados. Estes experimentos foram também conduzidos na Universidade McGill, durante um período de "Doutorado Sanduiche". Dentre as associações replicadas com reação do tipo I na população brasileira, a mais interessante foi a do gene *TNFSF15* (dados não mostrados), uma vez que o mesmo SNP já havia sido associado com hanseníase *per se* no GWAS conduzido na população da China (Zhang et al. 2009). Um fato intrigante é que, ao analisar as características descritas no artigo dos chineses, observa-se que a maioria dos pacientes apresenta grau 2 de incapacidade, sugerindo que possa existir um enriquecimento do fenótipo reação na amostra utilizada no estudo.

Conforme detalhado anteriormente, as reações apresentam a principal causa de dano neural e incapacidades permanentes na hanseníase, e até então não foi validado nenhum tipo de marcador que possa prever a ocorrência das mesmas nos pacientes. Muitas vezes (estima-se que em cerca de 30% dos casos) os pacientes já são diagnosticados para hanseníase e reação simultaneamente (Ranque et al., 2007). Nos demais casos, nos quais os pacientes abrem quadro de reação durante ou após o tratamento, a elaboração de um painel que seja capaz de prever o risco para ocorrência de reação, ou até mesmo para a gravidade do dano neural, seria de extrema importância. Esse painel poderia incluir uma combinação entre marcadores genéticos e biomarcadores no soro, por exemplo, rastreando os pacientes quanto às possibilidades de apresentar esses

agravamentos clínicos. Essa é uma estratégia que poderia minimizar a ocorrência das reações e dos danos permanentes associados a elas.

2. Conclusões

O estudo em questão contribuiu para identificar marcadores genéticos associados com a hanseníase *per se* e episódios reacionais na população brasileira. A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- O SNP *TLR1* +743A>G, que leva a troca de aminoácidos N248S, está associado com risco à hanseníase *per se* na população brasileira;

- O marcador *TLR1* +1805T>G (I602S) não foi individualmente associado com a hanseníase, mas o haplótipo correspondente à combinação *TLR1* - 248S/I602 mostrou efeito de risco à doença;

- A presença da variante 248S no *TLR1* influenciou o perfil eletrostático da proteína *in silico*, e está funcionalmente relacionada à hipo-responsividade inflamatória;

- Os SNPs rs8057431-A e rs4942254 nos genes *NOD2* e *CCDC122-LACC1* respectivamente, estão associados com proteção à hanseníase na população brasileira, enquanto os genes *TNFSF15* e *RIPK* não mostraram associação;

- Os marcadores rs2069840-GG e rs2069845-GA no gene *IL6* estão associados com proteção e risco ao desfecho de reação *per se*, respectivamente, ao passo que nos genes *TNF/LTA*, *IFNG*, *IL10*, *TLR1*, *NOD2* não foi observada associação.

3. Referências Bibliográficas

- Abel, L., and Demenais, F. (1988). Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet* 42, 256-266.
- Al-Muhsen, S., and Casanova, J. L. (2008). The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases.
- Alcais, A., Abel, L., and Casanova, J. L. (2009). Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest* 119, 2506-2514.
- Alcais, A., Alter, A., Antoni, G., Orlova, M., Nguyen, V. T., et al. (2007). Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early onset leprosy. *Nat Genet* 39, 517 - 522.
- Alcais, A., Sanchez, F. O., Thuc, N. V., Lap, V. D., Oberti, et al. (2000). Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *The Journal of infectious diseases* 181, 302-308.
- Alter, A., Alcais, A., Abel, L., and Schurr, E. (2008). Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Human genetics*.
- Alter, A., de Leseleuc, L., Van Thuc, N., Thai, V. H., Huong, N. T., et al. (2010). Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Human genetics* 127, 337-348.
- Alter, A., Grant, A., Abel, L., Alcais, A., Schurr, E. (2011). Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome* 22(1-2), 19-31.
- Alter, A., Fava V., Huong N., Singh M., Orlova M., et al. (2013). Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy.
- Antunes, S. L., Chimelli L., Jardim, M. R., Vital, R. T., Nery, J.A. et al. (2012). Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency.
- Barreiro, L. B., et al. (2009), 'Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense', *PLoS Genet*, 5 (7), e1000562.
- Barreto, J. G., Bisanzio, D., Guimarães, L. d. S., Spencer, J. S., Vazquez-Prokopec, G. et al. (2014). Spatial Analysis Spotlighting Early Childhood Leprosy Transmission in a Hyperendemic Municipality of the Brazilian Amazon Region. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2665.
- Barreto, J. G., Guimaraes L de S., Leao, M. R. , Ferreira, D. V., Salgado, C. G., et al. (2011). Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon.
- Basu, J., Shin D., Jo, K. (2012). Mycobacterial signaling through toll-like receptors.
- Behr, M., and Schurr, E. (2013). Cell biology: A table for two. *Nature* 501, 498-499.
- Ben-Ali, M., et al. (2011), 'Functional characterization of naturally occurring genetic variants in the human TLR1-2-6 gene family', *Hum Mutat*, 32 (6), 643-52.

- Bell, J. K., Mullen and G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., et al. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24, 528-533.
- Berrington, W. R., Macdonald, M., Khadge, S., Sapkota, B. R., Janer, M., Hagge, D. A., Kaplan, G., and Hawn, T. R. (2010). Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *The Journal of infectious diseases* 201, 1422-1435.
- Bleharski, J. R., Li, H., Meinken, C., Graeber, T. G., Ochoa, M. T., et al. (2003). Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science (New York, NY)* 301, 1527-1530.
- Bobosha, K., Wilson, L., van Meijgaarden, K. E., Bekele, Y., Zewdie, et al. (2014). T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2773.
- Bochud, P. Y., Hawn, T. R., Siddiqui, M. R., Saunderson, P., Britton, et al. (2008). Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *The Journal of infectious diseases* 197, 253-261.
- Bortoluci, K. R., and Medzhitov, R. (2010). Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR.
- Brightbill, H. D., Libraty D., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, et al. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors.
- Cardon, L. R., and Bell, J. I. (2001). Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2, 91-99.
- Cardoso, C., et al. (2010), 'IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians', *Human Genetics*, 128 (5), 481-90.
- Cardoso, C. C., et al. (2011), 'TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study', *J Infect Dis*, 204 (8), 1256-63.
- Cardoso, C., Pereira, A., Brito-de-Souza, V., Dias-Baptista, I., Maniero, V., et al. (2010). IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Human genetics* 128, 481-490.
- Casanova, J. L., and Abel, L. (2004). The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol* 4, 55-66.
- Casanova, J. L., Abel, L., and Quintana-Murci, L. (2011). Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* 29, 447-491.
- Casanova, J. L., and Abel, L. (2012). The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14, 215-43.
- Castro, F. R. S. (2012). Alterações neurológicas na forma neural pura de hanseníase: aplicação do grau de incapacidade física e da classificação internacional de funcionalidade, incapacidade e saúde. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro - RJ, 129 pg.
- Cezar-de-Mello, P. F. T., de Sales Marques, C., Arnez, L. E. A., Toletto-Pinto, T., Guerreiro, L. T. G., Ferreira, et al. (2013). A common SNP in pre-miR-146A

(rs291010164G>C) is genetically and functionally associated with leprosy: insight into TNF production. 18th International Leprosy Congress Hidden challenges Brussels, 157. Disponível em: http://www.leprosy-ila.org/arquivos/leprosy_congress.pdf.

Chopra, R., Ali S., Srivastava, A. K., Aggarwal, S., Kumar, B., Manvati, S., et al. (2013). Mapping of PARK2 and PACRG overlapping regulatory region reveals LD structure and functional variants in association with leprosy in unrelated indian population groups.

Chopra, R., Kalaiarasan P., Ali S., Srivastava, A. K., Aggarwal, S., Garg, V. K., et al. (2014). PARK2 and proinflammatory/anti-inflammatory cytokine gene interactions contribute to the susceptibility to leprosy: a case-control study of North Indian population.

Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., et al. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007-1011.

Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., et al. (2012). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine* 16, 90-97.

DATASUS (2014). Dados do Ministério da Saúde/SINAN. TabWin 3.0 para Windows. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060805>.

de Freitas, M. R., and Said, G. (2013). Leprous neuropathy.

de Leseleuc, L., Orlova, Cobat, A., Girard, M., Huong, N. T., et al. (2013). PARK2 mediates interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 production by human macrophages.

de Paus, R. A., van Wengen A., Schmidt, I., Visser, M., Verdegaal, E. M. , et al. (2013). Inhibition of the type I immune responses of human monocytes by IFN- α and IFN- β .

de Sales Marques, C. (2010). Estudo de Associação entre o Gene VDR e a Hanseníase. Tese [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., and Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 27, 1110-1121.

Demangel, C., Bertolino P Fau - Britton, W. J., and Britton, W. J. (2002). Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production.

Demangel, C., and Britton, W. J. (2000). Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol* 78, 318-324.

Dionne, S., Calderon, M. R., White, J. H., Memari, B., Elimrani, I., et al. (2014). Differential effect of vitamin D on NOD2- and TLR-induced cytokines in Crohn's disease. *Mucosal Immunol*.

Duppre, N. C., Camacho L., Sales, A. M., Illarramendi, X., Nery, J. A. C., et al. (2012). Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study.

- Eidt, L. (2004). Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade* 13, 76-88.
- Engels B.M. and Hutvagner G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25: 6163–6169.
- Fabri, M., Stenger S., Shin, D. Yuk J., , Liu P., et al. (2011). Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages.
- Fava, V., Orlova M Fau - Cobat, A., Cobat A Fau - Alcais, A., Alcais A Fau - Mira, M., Mira M Fau - Schurr, E., and Schurr, E. (2012). Genetics of leprosy reactions: an overview.
- Ferreira, J., Neumann, A., Uzedo, C., Rangel, C., Pessolani, M., et al. (2013). Analysis of persistence of *Mycobacterium leprae* in *Amblyomma cajennense* e *Rhodnius Prolixus* after infection by artificial feeding. 18th International Leprosy Congress Hidden challenges Brussels, 16-19 September. Disponível em: http://www.leprosy-ila.org/arquivos/leprosy_congress.pdf.
- Ferwerda, G., Girardin, S. E., Kullberg, B. J., Le Bourhis, L., de Jong, D. J., et al. (2005). NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1, 279-285.
- Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D. K., Sichali, L., Mwaungulu, L., et al., (2004). Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 71, 330-340.
- Girardin, S. E., Boneca I., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., et al. (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan.
- Girardin, S. E., Tournebise R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., et al. (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*.
- Gonzalez, R. P., Leyva, A., and Moraes, M. O. (2001). Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research. *Biological & pharmaceutical bulletin* 24, 1097-1101.
- Goulart, I. M., Figueiredo F., Coimbra, T., and Foss, N. T. (1996). Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy.
- Grant, A. V., Alter A., Huong, N. T., Orlova, M., Van Thuc, N., et al., (2012). Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the Vietnamese population.
- Guerreiro, C. S., Ferreira P., Tavares, L., Santos, P. M., Neves, M., et al. (2009). Fatty acids, IL6, and TNFalpha polymorphisms: an example of nutrigenetics in Crohn's disease.
- Gutierrez, M. G., Master S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., et al. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages.
- Hacker, M. A., Duppre N., Nery, J. A. Sales, A. M., and Sarno, E. N., (2012). Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987-2010.

- Hagge, D. A., Oby Robinson, S., Scollard, D., McCormick, G., and Williams, D. L. (2002). A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. *The Journal of infectious diseases* 186, 1283-1296.
- Hagge, D. A., Saunders, B. M., Ebenezer, G. J., Ray, N. A., Marks, et al. (2009). Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol* 174, 1379-1389.
- Hashimoto, K., Maeda Y., Kimura, H., Suzuki, K., Masuda, A., et al. (2002). *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function.
- Hawn, T. R., Misch, E. A., Dunstan, S. J., Thwaites, G. E., Lan, N. T., et al. (2007). A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol* 37, 2280-2289.
- Hawn, T. R., Scholes D. Li, S. S., Wang, H., Yang, Y., et al. (2009). Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women.
- He, X., Jing, Z., and Cheng, G. (2014). MicroRNAs: New Regulators of Toll-Like Receptor Signalling Pathways.
- Hirschhorn, J. N., and Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6, 95-108.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jo, E. K., Yang C., Choi, C. H., and Harding, C. V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: branching out from Toll-like receptors.
- Job, C. K., Jayakumar, J., Kearney, M., and Gillis, T. P. (2008). Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg* 78, 518-521.
- Johnson, C. M., Lyle, E. A., Omueti, K. O., Stepensky, V. A., Yegin, et al. (2007). Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* 178, 7520-7524.
- Joko S, N. J., Kawashima H, Namisato M, and Maeda H. (2000). Human leukocyte antigens in forms of leprosy among Japanese patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 68, 49-56.
- Jullien, D., Sieling P., Uyemura, K., Mar, N. D., Rea, T. H., and Modlin, R. L. (1997). IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection.
- Kerrigan, A. M., and Brown, G. D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562-575.
- Kim SJ, C. I., Dahlberg S, Nisperos B, Kim JD, Hansen JA. (1987). HLA and leprosy in Koreans. *Tissue Antigens* 29, 146-153.
- Klatser, P. R., van Beers S., Madjid, B., Day, R. and de Wit, M. Y. (1993). Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic.
- Koçak, M., Balç I.M., Peñçe, B., and Kundakçı, N. (2002). Associations between human leukocyte antigens and leprosy in the Turkish population. *Clinical and Experimental Dermatology* 27, 235-239.

- Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Uematsu, S., Ng, Y. W., et al. (2003). Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature medicine* 9, 525-532.
- Krutzik, S. R., Hewison, M., Liu, P.T., Robles, J.A., Stenger, S., et al. (2008), 'IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway', *J Immunol*, 181 (10), 7115-20.
- Kumar, B., Dogra, S., and Kaur, I. (2004). Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72, 125-133.
- Kumar, S., Ingle H. Prasad D., and Kumar, H. (2013a). Recognition of bacterial infection by innate immune sensors.
- Kumar, S., Naqvi R. Bhat, A. A., Rani, R., Ali, R., et al. (2013b). IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy.
- Langrish, C. L., McKenzie, B. S., Wilson, N. J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., et al. (2004). IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 202, 96-105.
- Lavania, M., Katoch K., Gupta, A. K., Chauhan, D. S., Sharma, R., et al. (2008). Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy.
- Lazaro, F. P., Werneck, R. I., Mackert, C. C., Cobat, A., Prevedello, F. C., et al. (2010). A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil.
- Le Bourhis, L., Benko, S., and Girardin, S. E. (2007). Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans* 35, 1479-1484.
- Lee, Y. H., Lee, H. S., Choi, S. J., Ji, J. D., and Song, G. G. (2012). The association between interleukin-6 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus* 21, 60-67.
- Lewis, C. M., and Knight, J. (2012). Introduction to Genetic Association Studies. Cold Spring Harbor Protocols 2012, pdb.top068163.
- Li, J., Liu, H., Liu, J., Fu, X., Yu, Y., Yuet al. (2012). Association study of the single nucleotide polymorphisms of PARK2 and PACRG with leprosy susceptibility in Chinese population.
- Lima, M. C., Pereira, G. M., Rumjanek, F. D., Gomes, H. M., Duppre, et al. (2000a). Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol* 51, 419-428.
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., et al. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science (New York, NY)* 311, 1770-1773.
- Liu, P. T., Wheelwright M., Teles, R., Komisopoulou, E., Edfeldt, K., et al. (2012). MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy.
- Lutz, A. (1939). A transmissão da lepra pelos mosquitos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 34.

- Malhotra, D., Darvishi, K., Lohra, M., Kumar, H., Grover, C., et al. (2006). Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. *Eur J Hum Genet* 14, 438-442.
- Malhotra, D., Darvishi, K., Sood, S., Sharma, S., Grover, C., et al. (2005). IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Human genetics* 118, 295-300.
- Manzanillo, P. S., Ayres J., Watson, R. O., Collins, A. C., Souza, G., et al. (2013). The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens.
- Manzanillo, P. S., Shiloh M., Portnoy Da Fau and Cox, J. S. (2012). Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages.
- Marri, P. R., Bannantine, J. P., and Golding, G. B. (2006). Comparative genomics of metabolic pathways in Mycobacterium species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev* 30, 906-925.
- Martinez, A. N., Britto, C. F., Nery, J. A., Sampaio, E. P., Jardim, M. R., et al. (2006). Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *Journal of clinical microbiology* 44, 3154-3159.
- Martinez, A. N., Ribeiro-Alves M., Sarno, E. N. and Moraes, M. O. (2011). Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens.
- Martinez, A. N., Talhari, C., Moraes, M. O., and Talhari, S. (2014). PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic.
- Martinez, T. S., Figueira M., Costa, A. V., Goncalves, M. A., Goulart, L. R., and Goulart, I. M. (2010). Oral mucosa as a source of Mycobacterium leprae infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status.
- Matsuoka, M., Izumi S., Budiawan, T., Nakata, N., and Saeki, K. (1999). Mycobacterium leprae DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection.
- Mattos, K.A., Oliveira, V.G., D'Avila, H., Rodrigues, L.S., Pinheiro, R.O., Sarno, E.N., Pessolani, M.C., Bozza, P.T (2011). TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol* 187, 2548-58.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Mira, M. T., Alcais, A., Nguyen, V. T., Moraes, M. O., Di Flumeri, et al. (2004). Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427, 636-640.
- Mira, M. T., Alcais, A., Van Thuc, N., Thai, V. H., Huong, N. T., et al. (2003). Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 33, 412-415.

- Misch, E. A., Macdonald, M., Ranjit, C., Sapkota, B. R., Wells, et al. (2008). Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e231.
- Modlin, R. L., Hofman, F. M., Taylor, C. R., and Rea, T. H. (1983). T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol* 8, 182-189.
- Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppee, J. Y., et al. (2005). On the origin of leprosy. *Science (New York, NY)* 308, 1040-1042.
- Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., et al. (2009). Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* 41, 1282-1289.
- Montoya, D., Cruz, D., Teles, R. M., Lee, D. J., Ochoa, et al. (2009). Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe* 6, 343-353.
- Moraes, M. O., Cardoso, C. C., Vanderborght, P. R., and Pacheco, A. G. (2006). Genetics of host response in leprosy. *Leprosy review* 77, 189-202.
- Moraes, M. O., Duppre, N. C., Suffys, P. N., Santos, A. R., Almeida, A. S., et al. (2001a). Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 53, 45-47.
- Moraes, M. O., Sampaio, E. P., Nery, J. A., Saraiva, B. C., Alvarenga, F. B., et al. (2001b). Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *Br J Dermatol* 144, 175-181.
- Moraes, M. O., Sarno, E. N., Almeida, A. S., Saraiva, B. C., Nery, J. A., et al. (1999). Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 50, 541-549.
- Moraes, M. O. and Pacheco, A. G. (2013). Genetics of complex diseases: knowing gene polymorphisms do matter. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 29, 11
- Morgado de Abreu, M. A., Roselino A., Enokihara, M., Nonogaki, S., Prestes-Carneiro, L. E., et al. (2014). *Mycobacterium leprae* is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients.
- MS (2001). Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle da hanseníase na atenção básica: guia prático para profissionais da equipe de saúde da família. elaboração de Maria Bernadete Moreira e Milton Menezes da Costa Neto. Normas e Manuais Técnicos Série A, 84p.
- MS (2013/2014). Ministério da Saúde. Plano Brasil Sem Miséria. Disponível em: <http://www.brasilsemiseria.gov.br/noticias/ultimas-noticias/2013/fevereiro/brasil-intensifica-acoes-para-eliminacao-da-hansenia-se-come-problema-de-saude-publica>. Acesso em: 2023 de Abril de 2014.
- Murray, R. A., Siddiqui M., Mendillo, M., Krahenbuhl, and Kaplan, G. (2007). *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation.
- Murthy, P. K. (2004). Current epidemiology of leprosy. *Journal of the Indian Medical Association* 102, 672-673, 683.

- Nery, J. A., Bernardes Filho F., Quintanilha, J., Machado, A. M., Oliveira, S. C., et al. (2013). Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy.
- O'Connell, R. M., Saha S. Vaidya S., Bruhn, K. W., Miranda, G. A., et al. (2004). Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection.
- Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Namisato, M., Fukutomi, et al. (2005). Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *Journal of clinical pathology* 58, 740-743.
- Oliveira, D., Sherlock, J., Melo, E. V. d., Rollemberg, K. C. V., Paixao, T. R. S. d., Abuawad, Y. G., et al. (2013). Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment.
- Oliveira, R. B., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Rea, T. H., Rambukkana, A., Sarno, E. N., et al. (2003). Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infection and immunity* 71, 1427-1433.
- OMS (2009). Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy (plan period: 2011–2015). World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, Disponível em http://www.searo.who.int/entity/global_leprosy_programme/documents/enhanced_strategy/en/index.html. Acesso em: Abril, 2013.
- OMS (2013). Organização Mundial de Saúde (World Health Organization) - Weekly epidemiological record. 35, 365-380. Disponível em <http://www.who.int/wer>. Acesso: Abril 2014.
- OMS. (2010). Organização Mundial de Saúde (World Health Organization). Leprosy: the disease [online]. Disponível em: <http://www.who.int/lep/leprosy/en/index.html>, Último acesso em 28 de Abril de 2014.
- Orlova, M., Cobat A., Huong, N. T., Ba, N. N., Van Thuc, N., et al. (2013). Gene set signature of reversal reaction type I in leprosy patients.
- Pacheco, A. G., and Moraes, M. O. (2009). Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies.
- Pai, V. V., Athanikar S. Naveen, K. N., Sori, T., and Rao, R. (2014). Lucio phenomenon.
- Patrocinio, L. G., Goulart I., Goulart, L. R., Patrocinio, J. A., Ferreira, F. R., et al. (2005). Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction.
- Pearson, T. A., and Manolio, T. A. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 299, 1335-1344.
- Penna, M. L., de Oliveira Ml Fau - Penna, G. O., and Penna, G. O. (2009). The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil.
- Penna, M. L., and Penna, G. O. (2012). Leprosy frequency in the world, 1999-2010.
- Pereira, A. C., Brito-de-Souza, V. N., Cardoso, C. C., Dias-Baptista, I. M., Parelli, F. P., et al. (2009). Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10

promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes and immunity* 10, 174-180.

Pinto, T. G. T. (2013). Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos. Tese [mestrado em Biologia Celular e Molecular] Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - RJ.

Plantinga, T. S., Johnson M., Scott, W. K., van de Vosse, E., Velez Edwards, D. R., et al. (2012). Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia.

Pocatterra, L., Jain S F., Reddy, R., Muzaffarullah, S., Torres, O., et al. (2006). Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India.

Pravica, V., Asderakis, A., Perrey, C., Hajeer, A., Sinnott, P. J., and Hutchinson, I. V. (1999). In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. *European Journal of Immunogenetics* 26, 1-3.

Rambukkana, A. (2004). *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Curr Opin Immunol* 16, 511-518.

Rambukkana, A., Zanazzi, G., Tapinos, N., and Salzer, J. L. (2002). Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science (New York, NY)* 296, 927-931.

Randhawa, A. K., Shey, M. S., Keyser, A., Peixoto, B., Wells, R. D., et al. (2011). Association of human TLR1 and TLR6 deficiency with altered immune responses to BCG vaccination in South African infants. *PLoS Pathog* 7, e1002174.

Ranque, B., Nguyen, V. T., Vu, H. T., Nguyen, T. H., Nguyen, N. B., et al. (2007). Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis* 44, 33-40.

Rees, R. F., and McDougall, A. C. (1977). Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice.

Reis, E. M., Araujo S., Lobato, J., Neves, A. F., Costa, A. V., et al. (2013). *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *LID* - 10.1111/1469-0691.12349 [doi].

Ridley, D. S., and Jopling, W. H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34, 255 - 273.

Robbins, G., Tripathy, V. M., Misra, V. N., Mohanty, R. K., Shinde, et al. (2009). Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS ONE* 4, e5669.

Robottom-Ferreira, A. B. (2011). Estudos moleculares da interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann: uma abordagem de expressão gênica. Tese [doutorado em Biologia Computacional e Sistemas] Instituto Oswaldo Cruz.

Rojas, R. E., Demichelis S., Sarno, E. N., and Segal-Eiras, A. (1997). IgM anti-phenolic glycolipid I and IgG anti-10-kDa heat shock protein antibodies in sera and immune complexes isolated from leprosy patients with or without erythema nodosum leprosum and contacts.

Roy, S., Frodsham, A., Saha, B., Hazra, S. K., Mascie-Taylor, C. G., et al. (1999). Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *The Journal of infectious diseases* 179, 187-191.

- Roy, S., McGuire, W., Mascie-Taylor, C. G., Saha, B., Hazra, S. K., et al. (1997). Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *The Journal of infectious diseases* 176, 530 - 532.
- Sales, A. M., Ponce de Leon, A., Düppre, N. C., Hacker, M. A., Nery, J. A. C., et al. (2011). Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1013.
- Sallakci, N., Coskuna, M., Berberb, Z., Gürkanc, F., Kocamazc, H., et al. (2007). Interferon- γ gene+874T–A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 87, 225-230.
- Sampaio, E., Moraes, M., Pessolani, M. C., and Sarno, E. (2003). Role of Th1 Cytokines in Host Defenses Against *Mycobacterium leprae*. In *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*, M. Kotb, and T. Calandra, eds. (Humana Press), pp. 163-186.
- Santos, A. R., Suffys, P. N., Vanderborght, P. R., Moraes, M. O., Vieira, L. M., et al. (2002). Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *The Journal of infectious diseases* 186, 1687-1691.
- Sapkota, B. R., Macdonald, M., Berrington, W. R., Misch, E. A., Ranjit, et al. (2010). Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol* 71, 992-998.
- Schaid, D. J. (1998). Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations. *Am J Hum Genet* 63, 935-941.
- Schenk, M., Fabri M., Krutzik, S. R., Lee, D. J., Vu, D. M., et al. (2014). Interleukin-1beta triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells.
- Schenk, M., Krutzik S., Sieling, P. A., Lee, D. J., Teles, R. M. B., et al. (2012). NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy.
- Schroder, N. W., and Schumann, R. R. (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 5, 156-164.
- Schuenemann, V. J., Singh, P., Mendum, T. A., Krause-Kyora, B., Jager, G., et al. (2013). Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science (New York, NY)* 341, 179-183.
- Schuring, R. P., Hamann, L., Faber, W. R., Pahan, D., Richardus, et al. (2009). Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *The Journal of infectious diseases* 199, 1816-1819.
- Scollard, D. M., Joyce, M. P., and Gillis, T. P. (2006). Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis* 43, e19-22.
- Scollard, D. M., Smith T., Bhoopat, L., Theetranont, C., Rangdaeng, S., et al. (1994). Epidemiologic characteristics of leprosy reactions.
- Shaw, M. A., Donaldson, I. J., Collins, A., Peacock, C. S., Lins-Lainson, Z., et al. (2001). Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes and immunity* 2, 196-204.

- Shin, D. M., Yuk, J. M., Lee, H. M., Lee, S. H., Son, J. W., et al. (2010). Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell Microbiol* 12, 1648-1665.
- Siddiqui, M. R., Meisner, S., Tosh, K., Balakrishnan, K., Ghei, S., Fisher, S. E., Golding, M., et al. (2001). A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet* 27, 439-441.
- Sieling, P. A., Jullien D., Dahlem M. Tedder T., Rea, T. H., Modlin, R. L., et al. (1999). CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity.
- Sieling PA, M. R. (1994). Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* 191, 378-387.
- Silva, Naveca, F. G., Ramasawmy, R., and Boechat, A. L. (2014). Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: a meta-analysis.
- Silva, C. A., Danelishvili L. McNamara, M., Berredo-Pinho, Bildfell, R., et al.(2013). Interaction of Mycobacterium leprae with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis.
- SINAN (2014). Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.
- Sousa, A. L., Fava V., Sampaio, L. H., Martelli, C. M. T., Costa, M. B., et al. (2012). Genetic and immunological evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction.
- Souza-Araujo, H. C., Mariano, J., and Castro, G. M. O. (1944). Tentativas de transmissão da lepra ao homem, por meio de Triatomídeos infectados em doentes lepromatosos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 41, 495-505.
- Spencer, J. S., Kim H., Wheat, W. H., Chatterjee, D., Balagon, M. V., et al. (2011). Analysis of antibody responses to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy.
- Stefani, M. M., Grassi A., Sampaio, L. H., Sousa, A. L. O., Costa, M. B., et al. (2012). Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal.
- Stefani, M. M., Guerra J., Sousa, A. L. M., Costa, M. B., Oliveira, M. L. W., et al. (2009). Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report.
- Suneetha, S., Arunthathi S. Job, A., Date, A., Kurian, N., et al. (1998). Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa.
- Taganov, K. D., Boldin M. Chang, K.J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses.
- Talhari, S., Grossi M., Oliveira, M. L., Gontijo, B., Talhari, C., et al. (2012). Hansen's disease: a vanishing disease?

- Teixeira, M. A., Silva N., Ramos A., Hatagima, A., and Magalhaes, V. (2010). [NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil].
- Teles, R. M., Graeber T., Krutzik, S. R., Montoya, D., Schenk, M., et al. (2013). Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses.
- Truman, R. (2005). Leprosy in wild armadillos.
- Truman, R. W., and Krahenbuhl, J. L. (2001). Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 69, 1-12.
- Truman, R. W., Singh P., Sharma, R., Busso, P., Rougemont, J., et al. (2011). Probable zoonotic leprosy in the southern United States.
- Turankar, R. P., Lavania, M., Chaitanya, V. S., Sengupta, U., Darlong, J., et al. (2014). Single nucleotide polymorphism-based molecular typing of *M. leprae* from multibase families of leprosy patients and their surroundings to understand the transmission of leprosy. *Clinical Microbiology and Infection* 20, O142-O149.
- Ulrich, M., Smith P., Sampson, C., Zuniga, M., Centeno, M., Centeno M Fau - Garcia, V., Garcia V Fau - Manrique, X., Manrique X Fau - Salgado, A., Salgado A Fau - Convit, J., and Convit, J., et al. (1991). IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela: epidemiological observations and a prospective study of the risk of leprosy.
- van Beers, S. M., Hatta, M., and Klatser, P. R. (1999). Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 67, 119-128.
- Van Brakel, W. H., Khawas I. and Lucas, S. B. (1994). Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal.
- van de Vosse, E., Hoeve, M. A., and Ottenhoff, T. H. (2004). Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 4, 739-749.
- Vanderborght, P. R., Pacheco, A. G., Moraes, M. E., Antoni, G., Romero, M., et al. (2007). HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 8, 320-324.
- Vargas-Ocampo, F. (2007). Diffuse leprosy of Lucio and Latapi: a histologic study. *Leprosy review* 78, 248-260.
- Velarde Félix, J. S., Cazarez Salazar, S. G., Castro Velázquez, R., Rendán Maldonado, J. G., and Rangel Villalobos, H. (2009). Relación del polimorfismo TaqI del gen del receptor de la vitamina D con la lepra lepromatosa en población mexicana. *Salud Pública de México* 51, 59-61.
- Vidal Pessolani, M. C., Marques, M. A., Reddy, V. M., Loch, C., and Menozzi, F. D. (2003). Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 677-684.
- Voorend, C. G., and Post, E. B. (2013). A systematic review on the epidemiological data of erythema nodosum leprosum, a type 2 leprosy reaction.
- WADE, H. W. (1953). International Congress of Leprosy, Commission of Classification. *Memoria Madri*, 1953 6, 75-86.

- Waldner, M. J. and Neurath, M. F. (2014), 'Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development', (1096-3618 (Electronic)).
- Wang, T. T., Dabbas B., Laperriere, D., Bitton, A. J., Soualhine, H., et al. (2010). Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease.
- Williams, D. L., Slayden, R. A., Amin, A., Martinez, A. N., Pittman, et al. (2009). Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC Genomics* 10, 397.
- Wong, S. H., Gochhait, S., Malhotra, D., Pettersson, F. H., Teo, et al. (2010). Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* 6,
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X. D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejska, K. E., et al.(2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27, 135-144.
- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., et al. (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* NY 254, 277-279.
- Zhang, F.R., Huang, W., Chen, S.M., Sun, L.D., Liu, H., et al. (2009). Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine* 361, 2609-2618.
- Zhang, Y., Jiang, T., Yang, X., Xue, Y., Wang, C., et al. (2013). Toll-Like Receptor -1, -2, and -6 Polymorphisms and Pulmonary Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 8,

O artigo anexado nas páginas seguintes foi publicado no periódico "Future Microbiology" no ano de 2011. Consiste em um artigo de revisão em que foram discutidos tópicos envolvendo a susceptibilidade genética na hanseníase, reunindo os estudos da literatura que estavam disponíveis até o momento da publicação. Essa revisão abordou as características que sugerem um componente genético de susceptibilidade a doença, e posteriormente descreveu as principais estratégias de estudos genéticos utilizados para demonstrar a associação de genes com a doença. Nesse aspecto, foram também abordadas as principais regiões ou genes identificados em estudos de ligação com a doença. Ao longo do texto foram discutidas as associações genéticas inseridas no contexto de resposta imunológica frente ao *M. leprae*, abordando as associações em genes que compõem as vias de resposta imune inata, incluindo os genes *MRC1*, *TLR1*, *NOD2*, *VDR* e *PARK2*, as vias de resposta imune adaptativa envolvidas na resposta efetora e manutenção do granuloma, tais como os genes *TNF*, *LTA* e *IFNG*, e as vias de ativação e diferenciação dos linfócitos, abordando as associações no complexo *HLA*. Além de descrever as associações já observadas, o texto sugere uma hipótese de como variações nesses genes poderiam influenciar o desfecho da hanseníase. Também foi reforçada a hipótese de que durante o curso da infecção, a genética do hospedeiro pode influenciar a hanseníase nos três estágios principais de progressão da doença, indicando os grupos de genes que participariam em cada processo. Finalmente, o artigo apresenta genes associados com hanseníase e também com doenças autoimunes (doença de Crohn) e neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), sugerindo a hanseníase como um modelo interessante que pode contribuir para entender a patogênese de outras doenças complexas.

Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome

Cynthia Chester Cardoso¹, Ana Carla Pereira², Carolinne de Sales Marques¹ & Milton Ozório Moraes¹

¹Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

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

*Author for correspondence: Tel.: +21 2562 1556 ■ Fax: +21 2270 9997 ■ mmoraes@fiocruz.br

The past few years have been very productive concerning the identification of genes associated with leprosy. Candidate gene strategies using both case-control and family-based designs, as well as large-scale approaches such as linkage and gene-expression genomic scans and, more recently, genome-wide association studies, have refined and enriched the list of genes highlighting the most important innate and adaptive immune pathways associated with leprosy susceptibility or resistance. During the early events of host-pathogen interaction identified genes are involved in pattern recognition receptors, and mycobacterial uptake (TLRs, *NOD2* and *MRC1*), which modulate autophagy. Another gene, *LTA4H*, which regulates the levels of lipoxin A4 and possibly interacts with lipid droplet-related events, also plays a role in the early immune responses to *Mycobacterium leprae*. Together, the activation of these pathways regulates cellular metabolism upon infection, activating cytokine production through NF- κ B and vitamin D-vitamin D receptor pathways, while *PARK2* and *LRRK2* participate in the regulation of host-cell apoptosis. Concomitantly, genes triggered to form and maintain granulomas (*TNF*, *LTA* and *IFNG*) and genes involved in activating and differentiating T-helper cells (*HLA*, *IL10*, as well as the *TNF/LTA* axis and the *IFNG/IL12* axis) bridge immunological regulation towards adaptive immunity. Subtle variations in these genes, mostly single nucleotide polymorphisms, alter the risk of developing the disease or the severity of leprosy. Knowing these genes and their role will ultimately lead to better strategies for leprosy prevention, treatment and early diagnosis. Finally, the same genes associated with leprosy were also associated with autoimmune (Crohn's disease, rheumatoid arthritis, psoriasis) or neurodegenerative diseases (Parkinson's and Alzheimer's). Thus, information retrieved using leprosy as a model could be valuable to understanding the pathogenesis of other complex diseases.

Classically, leprosy is considered a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Although true, this is somewhat incomplete – leprosy is not only an infectious condition, but also one influenced by genes. Thus, leprosy has long been considered a complex disease, in which host and environmental characteristics are as important as the pathogen to determine disease outcome [1]. In this article, we will provide hard evidence to endorse this view.

Mycobacterium leprae preferentially affects skin macrophages and Schwann cells from the peripheral nerves, in which the presence of the bacillus evokes a strong inflammatory response that can lead to nerve damage. The widely different clinical manifestations of leprosy contrast with the low variability of the bacillus [2–4], suggesting that disease variation

is derived mainly from the host. The disease spectrum includes five distinct clinical forms that are closely related to the host's immune response. The view of the clinical spectrum of leprosy indicates that individuals from the tuberculoid pole (TT) usually develop a partially effective cellular immune response that can control bacterial replication and spread, while the lepromatous (LL) patients have high bacillary loads as a result of an impaired or even absent cellular immune response [5]. The intermediate clinical forms, termed borderline (BT, BB, BL), are classified according to their proximity to each pole [6]. Furthermore, throughout the natural course of the disease, patients can also develop clinical complications such as the 'leprosy reactions', which are classified as either type I (reversal reaction) or II (erythema

Keywords

■ autophagy ■ cytokines
■ genetics ■ granuloma
■ infectious ■ leprosy ■ lipid
bodies ■ population ■ SNPs
■ TNF ■ vitamin D

future medicine part of fsg

nodosum leprosum). Although clinically different, both types can lead to severe nerve damage and disabilities [5,7].

The classical and widespread notion that environmental factors alone (e.g., bacterial challenge, nutrition and vaccination) explain susceptibility to infectious diseases in general – and leprosy in particular – has been present in several genetics textbooks up until the early 1970s. However, intensive research conducted over the past 40–50 years has been devoted to revisiting this concept, and within the last decade, several important papers pointed out association and/or linkage between different genes/genomic regions and leprosy. In fact, epidemiological and microbiological evidence have implicated genes as major contributors to the development of bacterial/mycobacterial diseases [8], which means that the presence of the bacilli is not sufficient to trigger the outcome of the disease.

Genetic influence on mycobacterial diseases: familial studies & mouse models

The genetic component of leprosy susceptibility was first suggested by observational studies, including twin studies, familial aggregation and segregation analyses [9–16]. Overall, results of complex segregation analyses suggest an oligogenic model of leprosy susceptibility, with a few major genes influencing disease and several additional genes and variations causing subtle effects on disease outcome.

In the 1960s Shepard developed a method for growing *M. leprae* suspensions isolated from skin biopsies in the mouse footpad. Interestingly, only Balb/C mice strains would grow the bacilli over a 9-month incubation period. Later, it was demonstrated that the increased susceptibility of Balb/C – when compared to other isogenic, resistant mice strains, such as C57BL/6 – is due to a single nonsynonymous mutation causing a change from glycine to aspartic acid at position 169 of the *Nramp* gene, inducing a knock-down of one the main innate pathways that controls *M. leprae* replication in mice [17–19].

Nevertheless, in the past 15–20 years, the use of athymic nude mice with a Balb/C background was implemented and created a unique platform for cultivating *M. leprae*, since the absence of the T-cell response knocks out the second ‘layer’ of resistance to the bacilli, that is, T-cell-mediated immunity. These mice are completely permissive to *M. leprae* growth, and cultures containing larger amounts of bacilli are obtained in shorter periods after inoculation (up to 10^{10} bacilli in

6–9 months). Attempts at growing *M. leprae* through this approach in mice with different backgrounds, such as C57BL/6 (including *TNFR1* gene knockouts) or Swiss mice, have resulted in enhanced capacity to control *M. leprae* growth, although bacteria never achieve more than 10^7 – 10^8 counts [20,21].

Although a simple extension of the findings in mice to humans could be a stretch of logic, there are several papers that have been published in the last 30 years that use genetic techniques in mice to screen and test for human disease phenotypes [22]. Thus, an extension of the findings in Balb/C and athymic mice after *M. leprae* infection in to humans, could lead us to hypothesize that human genes are activated in a way that two interconnected ‘layers’ (innate and adaptive immune responses) are generated while the host interacts with *M. leprae*. Indeed, several human susceptibility candidate genes can easily be suggested from the mouse model, such as *NRAMP1* (*SLC11A1*). Also, several human studies provided new targets for testing, generally involving genes coding for cytokines such as *TNF* and *IFNG* and immune system receptors [23–25].

The past few years have been very productive in providing clues to confirm the participation of several genes in leprosy susceptibility. Most of these studies came from population-based designs (case–control studies) involving candidate genes, or linkage analyses using multiplex families. This latter strategy has proved very efficient in unravelling previously unsuspected genes that participate in the pathogenesis of leprosy, such as *PARK2/PACRG* and the lymphotoxin-A gene (*LTA*) [26,27]. Another strategy that helps to decrease the ambiguity and find consensus estimates for polymorphisms studied in independent, controversial studies is meta-analysis, which confirmed the role of *IL10* in leprosy susceptibility [28–30]. Finally, a genome-wide association study (GWAS) was applied using a very large case–control design using markers throughout the entire genome to pinpoint genes that were previously unknown to have an impact on leprosy susceptibility, such as *NOD2* and *LRRK2* (FIGURE 1). Genes identified through these strategies were able to validate some important genes disclosed previously. This helped ascertain key pathways in *M. leprae* infection and disease outcome. The pattern of cellular activation in either innate or adaptive immunity is clear during *M. leprae* infection. Further results from the host–pathogen interactions point to some preferred pathways activated after infection that can influence leprosy

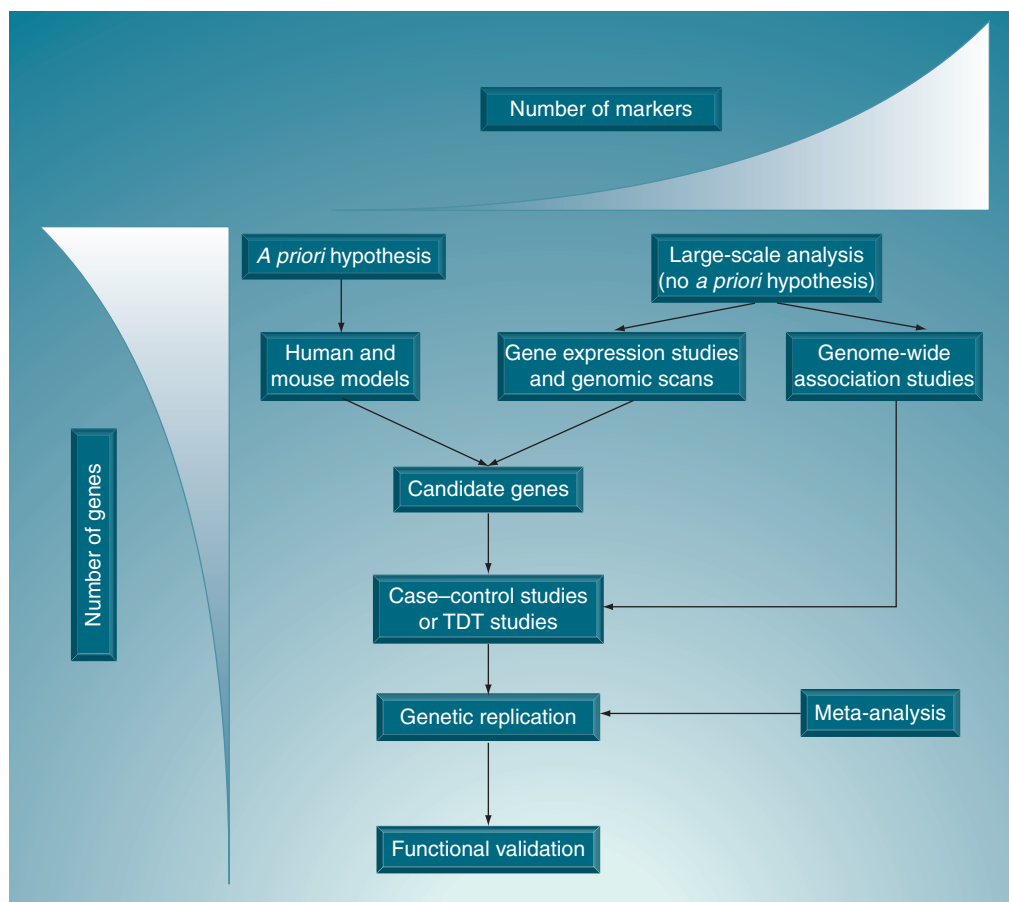


Figure 1. Experimental strategies to study and validate genetic influence in leprosy (which can be extended to any other infectious disease). Studies could use either candidate gene approaches based on previous information of the immunopathogenesis of the disease (*TNF* and *IFNG*), generally mapping few markers within the locus, or could describe new genes after screening the entire genome with microarrays or genomic scans (*PARK2* and *LTA*). The association of candidate genes can be tested using population (case-control) or family-based (TDT) designs. Recently, novel strategies can map the whole genome using a large number of SNPs (500K–2M). Also, meta-analysis can be used to decrease ambiguity and define consensus estimates (IL10) [154]. The last step of the analysis, which is still very poorly applied to the study of leprosy, is functional analysis that could ultimately validate the genotype-phenotype correlation. Generally, all analyses begin with thousands of candidates and end up with very few. TDT: Transmission disequilibrium test.

outcome. It is likely that polymorphisms, especially single nucleotide polymorphisms (SNPs), in these selected genes modulate the immuno-inflammatory response and provide a permissive environment for *M. leprae* proliferation (FIGURE 2). The most important genes identified after 15 years of studies, including replication in different populations and functional analyses, are discussed below.

This article concentrates on studies that evaluated leprosy outcome *per se*. Unfortunately, there are few papers exploring genetic susceptibility of leprosy forms or reactional states that consistently showed genetic replication of a certain locus in different populations. However, there are some nice studies that have been published so

far evaluating these outcomes [5,31–35]. Indeed, we are aware of the existence of additional, promising candidate genes for leprosy susceptibility *per se* as well as other outcomes in leprosy [36,37]; however, due to the lack of replication or functional data involving these findings, these other variants will not be reviewed here.

Genes associated with leprosy **Pattern recognition receptors &** **mycobacterial adhesion/uptake genes:** **Toll-like receptors, mannose receptor** **(MRC1) & NOD2**

The first level of interaction and recognition of *M. leprae* by host cells are the pattern recognition receptors (Toll-like receptors [TLRs])

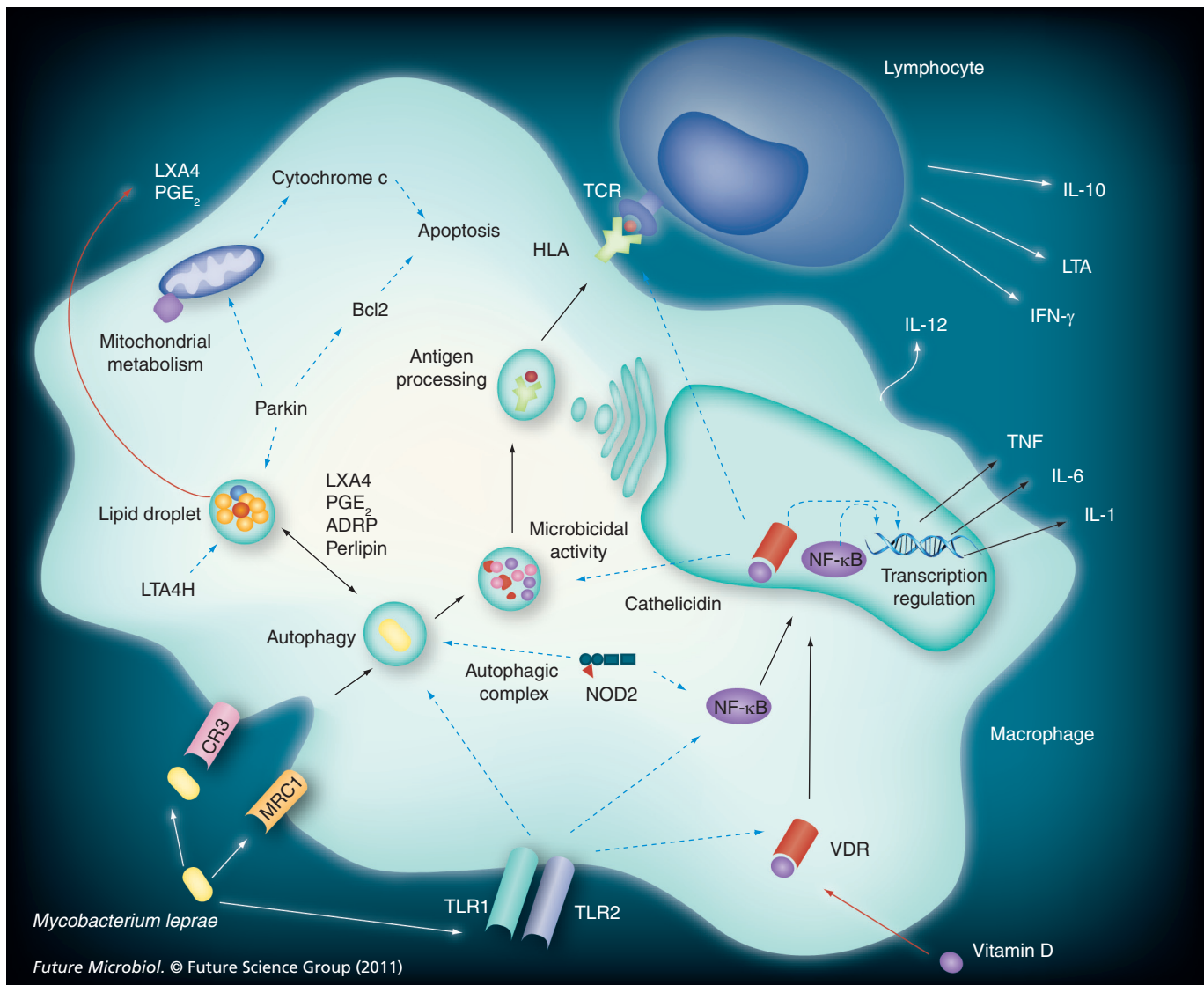


Figure 2. The most prominent pathways involving genes consistently associated with leprosy in genetic studies. When in contact with the host, *Mycobacterium leprae* may be recognized preferentially by pattern recognition receptors (PRRs), such as TLR or NOD2, which activate macrophages. Also, MRC1 (among others such as CR3) mediate phagocytosis, regulating bacilli uptake. Both interactions may trigger autophagy. In parallel, when activated by *M. leprae*, the heterodimer TLR1/2 can induce an inflammatory and antimicrobial response, mainly activating NF-κB, which, in turn, regulates the transcription of genes that are important in controlling the infection. TLR1/2 also increases VDR expression, which becomes activated through the binding of vitamin D and acts as a transcription factor, also inducing (along with NF-κB) expression of genes associated with the immune-inflammatory response (*TNF*, *IL1*, *IL6*, *IL12* and *HLA*) and macrophage microbicidal activity. A successful activation of these pathways leads to degradation of the pathogen after fusion of the autophagosome with the lysosome. It is likely, however, that susceptible individuals do not properly activate autophagic or NF-κB VDR pathways, leading to persistence of the bacilli in intravesicular particles. Eicosanoid metabolism and the formation of lipid droplets will also interact with autophagy and regulate this pathway. *LTA4H* gene variations result in higher levels of the anti-inflammatory mediator lipoxin A_4 . Other lipid mediators such as ADRP, perilipin and PGE_2 are upregulated, which is consistent with an inhibition of autophagy and inflammation and contributes to *M. leprae* persistence. Parkin has been shown to be involved with several pathways, including the regulation of lipid droplet formation as well as autophagy and apoptotic pathways. It is likely that susceptible individuals will have subtle deficiencies in Parkin activity leading to sustained cell metabolism. After these events of innate immunity, several induced mediators will activate and differentiate T cells and regulate granuloma formation. Also, a down-modulation of key genes in this process, such as *HLA*, *TNF*, *LTA*, *IFNG* and *IL10*, can evolve to an unresponsive state that leads to *M. leprae* infection and later progresses to disease. Dotted blue arrows correspond to activation pathways while solid arrows identify either protein interactions or translocations. TLR: Toll-like receptor; VDR: Vitamin D receptor.

and NOD2) and the receptors associated with *M. leprae* adhesion and entry in Schwann cells and macrophages (MRC1, $\alpha 2$ -laminin, complement receptor). Genetic variations at this stage

could render hosts naturally resistance, simply by modulating activation through TLRs or blocking/decreasing the rate of bacilli uptake by cells. Thus, it is expected that susceptible

individuals will phagocytose *M. leprae* that will evade host mechanisms of mycobacterial killing and successfully infect the cell.

TLR1

Genetic and immunological studies of the *TLR1* gene demonstrated the relevance of the I602S (T1805G) variant. It has been shown that the 1805G (602S) allele is less expressed on the cell surface and also causes abnormal signaling [38]. Misch and colleagues showed that the presence of this allele (602S) is associated with diminished production of IL-1 β , IL-6 and TNF in peripheral blood mononuclear cells stimulated with *M. leprae* [31].

Genetic analysis found an association of 602S with protection against leprosy [38,39] that was further replicated in a large scale study using more than 1500 subjects [40]. Also, protection against the development of reversal reaction by this allele was detected [31].

The exact mechanism by which these receptors restrict *M. leprae* internalization and growth is yet to be defined and could be explored, for example, by using a model of live *M. leprae* infection in human macrophages carrying the 602S variation. Since TLR1/2 is responsible for recognition of mycobacterial lipopeptides and increases conversion of provitamin D into vitamin D and, later, a cascade of microbicidal peptides such as cathelicidin [41], abnormal signaling through TLR1/2 could inhibit this pathway and favor infection. Also, TLRs are responsible for triggering autophagy, which could aim to control infection [42]. Vitamin D also regulates autophagy when cells are stimulated with mycobacterial lipoproteins through TLR1/2/CD14 receptors [43].

NOD2

The involvement of a class of intracellular pattern recognition receptors known as NOD-like receptors in the innate immune response against *M. leprae* was suggested by association studies in leprosy-affected Chinese populations. Genetic association of the *NOD2* gene was observed in a GWAS, in which 620,000 SNPs were genotyped in 1931 individuals, followed by three independent replication studies all carried out in Chinese individuals. An association between two *NOD2* gene polymorphisms (rs9302752 and rs7194886) and susceptibility to leprosy was found [44]. The finding triggered several subsequent initiatives aiming to replicate the original finding, using both case-control and family-based designs. In India and Mali, the same SNPs in the *NOD2* gene were not associated with leprosy [40]. In a different

study conducted in Nepal, positive association was observed between *NOD2* markers and leprosy. The associated SNPs, however, were not the same as the ones described in the original Chinese publication [45]. The genetic evidence obtained so far implicate *NOD2* as an important gene in the regulation of leprosy susceptibility, although a careful inspection of the haplotype arrangements in each population is still necessary to better understand the inconsistencies between populations [46].

It is likely that SNPs in either *TLR1* or *NOD2* involved in leprosy susceptibility may regulate autophagy. In fact, *NOD2* interacts with the autophagy-related gene 16L1 (*ATG16L1*), which seems to be important in inducing the formation of the autophagosome complex (*ATG5-ATG12*), for bacterial clearance, which is impaired in Crohn's disease [47]. Genetic variations in *NOD2*, *ATG16L1* and *IRGM* have been associated with Crohn's disease and TB [48,49]. In Crohn's disease, these risk variants are unable to induce to autophagy, human leukocyte antigen (HLA)-DR upregulation and bacterial clearance [47]. In leprosy, it is likely that these variations in the *NOD2* gene could regulate the autophagic pathway in a similar manner, thus favoring *M. leprae* infection. This could also lead to a lower induction of NF- κ B and antimicrobial factors, acting in synergy with TLRs. Thus, *TLR1* and *NOD2* SNPs will also downregulate the immune inflammatory profile and consequently adaptive immunity (i.e., reduced production of TNF, IL-6, IL-12, possibly contributing to the sustained infection by *M. leprae*) [50,51].

Mannose receptor (MRC1) gene

The first genome-wide linkage study conducted in leprosy identified a linkage peak at chromosomal region 10p13 among Indian populations [52], which was later replicated in a subsample of Vietnamese paucibacillary (PB) leprosy-affected families [53]. Although no positional cloning was carried out, the *MRC1* gene was considered the best candidate for further investigation of this linkage peak as it codes for the mannose receptor present on macrophages, which recognizes mannose residues present on the *M. leprae* cell wall [54].

Thus, an association study was conducted to assess the role of *MRC1* in the genetics of leprosy susceptibility using both family-based (580 Vietnamese families) and case-control (783 Brazilians) study designs. The authors described an association between the S396 allele of the G396S polymorphism (rs1926736) and protection against leprosy and the multibacillary

forms of the disease [55]. The study also attempted to extend the analysis to assess the functional role of G396S.

However, the experimental design using HEK cells transfected with different *MRC1* haplotypes could not reveal whether mycobacteria have different rates of phagocytosis, regardless of genotype. In fact, the transfected cells could not bind to *M. leprae* or BCG, suggesting that mycobacterial uptake is dependent on accessory molecules presented on macrophages. In this case, it could be hypothesized that MRC1 396S would restrict *M. leprae* entry through a modulation of the interaction between MRC1 and these accessory molecules. Alternatively, this SNP could interfere in the activation of cellular signaling pathways subsequent to phagocytosis [55].

In Dengue fever, the presence of the AA genotype at position -336 of the DC-SIGN promoter (CD209) was associated with protection against dengue. This SNP regulates pathogen entry and suggests that alleles conferring resistance to Dengue fever could increase TNF and IL-12 levels [56,57]. It is still not clear whether variations in MRC1 would follow the same path, but it would be tempting to suggest that 396S is associated with higher TNF levels.

It is important to mention that *M. leprae* components can also modulate the immune response and subvert resistance mechanisms. Tabouret *et al.* transfected BCG with plasmids containing genes involved in the synthesis of phenolic glycolipid-I (PGL-I), a specific component of the *M. leprae* cell wall [58]. Results demonstrated that PGL-I mediated recombinant uptake through complement receptor (CR3) and impaired NF- κ B activation and TNF synthesis. There is a clear bridge between these early events in *M. leprae* recognition and uptake and later T-cell-mediated responses towards protection.

Also there are some promising candidate genes recently associated with leprosy such as mannan binding lectin (MBL) [33,34]. MBL is involved in the recognition and targeting microorganisms for phagocytosis and clearance through complement pathway. Thus, it is likely that MBL polymorphisms associated with lower levels of circulating lectin could reduce phagocytosis and prevents disease or progression towards severe forms.

Other early innate immune response genes

SLC11A1

The *SLC11A1* gene, previously called *NRAMP1*, is an iron transporter that limits the availability of metals to microorganisms by exporting

them from the phagolysosome. Since the original finding that only one SNP was responsible for resistance in mice, genetic variation in this gene has been investigated extensively in humans. However, the human genetic structure is much more complex and no perfect genotype–phenotype correlation was observed. Nevertheless, a meta-analysis including several *SLC11A1* markers resulted in positive evidence for an association with TB [59]. For leprosy, results are difficult to interpret since studies did not find a consensus estimate after different populations were tested for this locus. It is possible that *SLC11A1* plays a role during maturation of autophagosomes and autophagic flow, but this is yet to be confirmed.

Vitamin D receptor

The vitamin D receptor (VDR) gene is located at the 12q13.11 region. When activated by vitamin D, VDR acts as a transcriptional factor for several genes involved in immunomodulation. There has been increasing interest in studying vitamin D as a major player in the resistance mechanisms against mycobacterial infections. TLRs stimulated by lipoproteins upregulate VDR and vitamin D-1-hydroxylase genes. As a result, induction of monocytic differentiation and activation of a microbicidal program is observed [41,60]. This mechanism consists of conversion of provitamin D into bioactive vitamin D by cyp27b1, which leads to cathelicidin and other peptides synthesis, which efficiently control mycobacterial infections. In fact, analysis of the serum from leprosy patients, as compared with healthy individuals, suggests that patients exhibit lower amounts of cathelicidin [61].

The activation of VDR and downstream microbicidal pathways through TLR2/1 ligands is dependent on IL-15 [62]. This differentiation pattern also indicates that the cell is less phagocytic [63]. Finally, a link between the antimycobacterial program and autophagy has been made. Activation of heterodimeric TLR2/TLR1 also regulates autophagy, where a functional VDR plays a central role in the activation of the cell and the antimicrobial responses including autophagy [43].

The restriction fragment length polymorphisms *TaqI*, *ApaI*, *BsmI* and *FokI* have been the most frequently studied in the *VDR* gene [64]. From these, the SNP *TaqI* has been the most common target of the studies in leprosy, including results from different populations [65–69]. Unfortunately, studies of this SNP are very conflicting and meta-analysis was unable to resolve it [MARQUES CS ET AL., UNPUBLISHED DATA], most likely due to differences in

experimental design, which yielded results that are difficult to standardize for comparison. Further analysis using a large number of markers and functional studies are still necessary to characterize the association between the *VDR* gene and leprosy susceptibility. Thus, at this point it would be speculative to suggest the participation of genetic variations in this receptor in leprosy. However, other candidate genes in the *VDR* downstream pathway, such as defensin, have been associated with leprosy [70], which indicates that *VDR* genetic variations may not be prominent in leprosy susceptibility, but other genes may play a role.

PARK2, PACRG & LRRK2

The first, and probably the most remarkable, finding obtained from a genomic scan study in leprosy was the linkage peak at 6q25 [53], which led to the positional cloning of two variations at a bidirectional promoter region shared by *PARK2* and its coregulated gene *PACRG*. By using high-resolution mapping and multivariate analysis, the authors identified two SNPs (*PARK2*-2599 and rs1040079) that captured the entire association signal observed. The same haplotype was strongly associated with leprosy in both a sample of Vietnamese simplex families (independent from the multiplex families used in the linkage study) and a Brazilian, case–control population [26]. Later, the finding was replicated in an Indian study; however, the association signal did not resist correction for multiple testing [71].

Parkin is an E3 ubiquitin-protein ligase, an enzyme responsible for transferring ubiquitin residues from E2 peptides to proteins targeted for degradation. However, published data have shown different roles for parkin, not necessarily related to protein ubiquitination and degradation. A study using isolated mitochondria, as well as rodent and human neuroblastoma cell lines, showed that parkin has an anti-apoptotic effect, as it associates with mitochondria and prevents cytochrome c release [72]. The same study showed that this effect is lost in the presence of parkin loss-of-function mutations. Furthermore, it has been described that parkin increases the amount of Bcl-2 by mediating its mono-ubiquitination, enhancing Bcl-2 stability [73], finally confirming its anti-apoptotic effect. In this context, genetic variations in the *LRRK2* gene – which is known to interact with Parkin, increasing ubiquitination – were also found to be associated with leprosy [44], corroborating the hypothesis of a role for the ubiquitination pathway in leprosy susceptibility. The mutant *LRRK2* has also been shown to regulate apoptosis [74].

Parkin can also regulate autophagy under certain conditions. It is now clear that parkin recognizes depolarized mitochondria and helps catalyze the autophagy of the entire organelle [75]. Recent reports have shown fundamental similarities between the process by which mitochondria and intracellular bacteria are ‘marked’ for autophagy [76]. These similarities support a hypothesis under which parkin could also promote autophagy of intracellular pathogens. Under such a hypothesis, parkin would have a clear protective effect during infection, as it would not only avoid apoptosis, but also promote bacterial killing by autophagy. Conversely, genetic variations associated with leprosy susceptibility could show a deregulated mitochondrial metabolism and autophagic flow. Thus, these individuals would present a permissive environment to *M. leprae* growth. It has been proposed that proteosomal degradation and autophagy could be mediated by lipid droplets (LDs) [77], and localization of components of the ubiquitination system in LDs suggests that these processes are indeed interconnected in the regulation of innate immune response to *M. leprae*.

LTA4h

A recent study using a zebrafish model reported mutants that were dramatically susceptible to *Mycobacterium marinum* infection [78]. The mutations were mapped to a region at chromosome 4 containing several genes, including the zebrafish ortholog for the enzyme leukotriene A4 hydrolase (*Lta4h*), which was selected as a candidate for functional investigations. Results of these analyses showed an increase in lipoxygenase levels (LXA4) in the absence of the *Lta4h* gene, suggesting that the susceptibility phenotype was a result of deficiencies in the eicosanoid immunoregulatory pathway and not only the lack of leukotriene A4. The authors also investigated the effect of polymorphisms in the human *LTA4H* gene on susceptibility to mycobacterial diseases. Two SNPs were found to be associated with protection against TB and mortality in patients with severe disease. Curiously, protection was observed among heterozygotes, suggesting the existence of an optimal balance of pro- and anti-inflammatory eicosanoids that confer protection. The same SNPs were tested for susceptibility to leprosy and results showed that the heterozygosity at *LTA4H* also confers protection against multibacillary disease [78]. So far, there are no results directly associating *LTA4H* SNPs and the levels of LXA4. However, it could be suggested that variants of the *LTA4H*

gene modulate LXA4 levels in order to facilitate *M. leprae* infection in a response similar to that observed in *Mycobacterium tuberculosis* infection [79].

Independent studies have provided even stronger support for the role of lipids in leprosy. Recent investigations of microarray data have shown that genes associated with lipid metabolism are upregulated after *M. leprae* infection, especially among lepromatous patients [80]. Also, the shift from latent to active TB is accompanied by an upregulation of a cluster of genes involved in lipid metabolism [81]. Functional studies using cell cultures and knockout mice models have clearly shown that the synthesis of LDs was induced after *M. leprae* phagocytosis in both macrophages [82] and Schwann cells [83]. The same group described that LDs observed in leprosy lesions are a site for the synthesis of prostaglandin E2 (PGE₂) [82], a lipid mediator that has been found to suppress the Th1 response in leprosy patients [84]. Another study described the increased levels of ADRP and perilipin only when live *M. leprae* infects THP-1, a human monocytic lineage [85].

Finally, LDs have also been correlated to autophagy [86]. These processes apparently modulate each other in such a way that autophagy regulates lipid contents, while abnormal increases in intracellular lipids may impair autophagy [86]. In this scenario, synthesis of LDs would favor successful *M. leprae* infection in different ways:

- Cell metabolism would provide lipids for *M. leprae* survival;
- The Th1 response would be impaired due to the accumulation of ADRP, perilipin, LXA4, PGE₂ and other cholesterol metabolites;
- These increased lipid levels would also inhibit autophagy, turning the host cell into a safe environment for *M. leprae* growth.

Bridging early adaptive & late innate immune response, & genes regulating granuloma formation & maintenance **TNF/LTA**

The *TNF/LTA* locus is located in the 6p21 chromosomal region and belongs to the HLA class III group of genes. TNF is a pleiotropic cytokine that promotes macrophage activation and is especially important in stabilization of granuloma formation. In a *Mycobacterium marinum* granuloma model, TNF abrogation caused increased mortality either during innate or adaptive immunity [87]. In humans, it is clear that TNF plays a central role in leprosy since the

patients treated for autoimmune diseases with anti-TNF inhibitors (e.g., rheumatoid arthritis) can develop leprosy indicating that the control of *M. leprae* growth and spread is dependent on TNF maintenance of granulomas [88]. Also, the role of LTA in *M. leprae* infection was defined by injecting different doses of bacilli in knockout mice to access the impact of this cytokine on granuloma formation. In fact, the combination of both TNF and LTA form and maintain granulomas in response to *M. leprae* infection, although subtle variations between these two cytokines are observed. More specifically, in the mouse model, LTA seems to regulate granuloma formation while TNF is responsible for its integrity [89].

Although genetic linkage studies have repeatedly pointed to *TNF/LTA* as a leprosy susceptibility locus, association studies conducted in independent populations have described conflicting results, especially for the effect of the SNP *TNF* -308G>A [24,66,69,90–94]. However, a meta-analysis using also four new independent Brazilian populations (two family-based and two case–control) confirmed the association of -308A with protection against leprosy, suggesting -308A as a marker of disease resistance [95]. *TNF* -308A carriers produce higher amounts of TNF, which implies that individuals carrying *TNF* -308GG genotypes may be less efficient at maintaining the integrity of the granuloma favoring the progression from infection to disease (FIGURE 3). Also, a stronger delayed-type hypersensitivity reaction is observed in patients carrying the -308A allele when tested for lepromin skin test [96]. Genetic epidemiology tools have also been used to implicate LTA in the pathogenesis of leprosy. Results of a positional cloning initiative [16,53] indicate an association between functional, down-regulating variant *LTA* +80A [97] and leprosy susceptibility. One could speculate that the *LTA* +80A allele leads to the formation of loose granulomas, in a pattern similar to that observed in *TNF* variants.

IL-12/IL-23/IFN- γ axis

IFN- γ also participates in the formation of granulomas in mycobacterial diseases, while IL-12 is a prime cytokine that induces differentiation of Th1 cells. Thus, both IFN- γ and IL-12 participate in the regulation of T-cell-mediated immunity (Th1 response), which culminates in isolation and/or killing of invading mycobacteria. In fact, these genes are major players in the pathogenesis of a syndrome termed Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases, in which

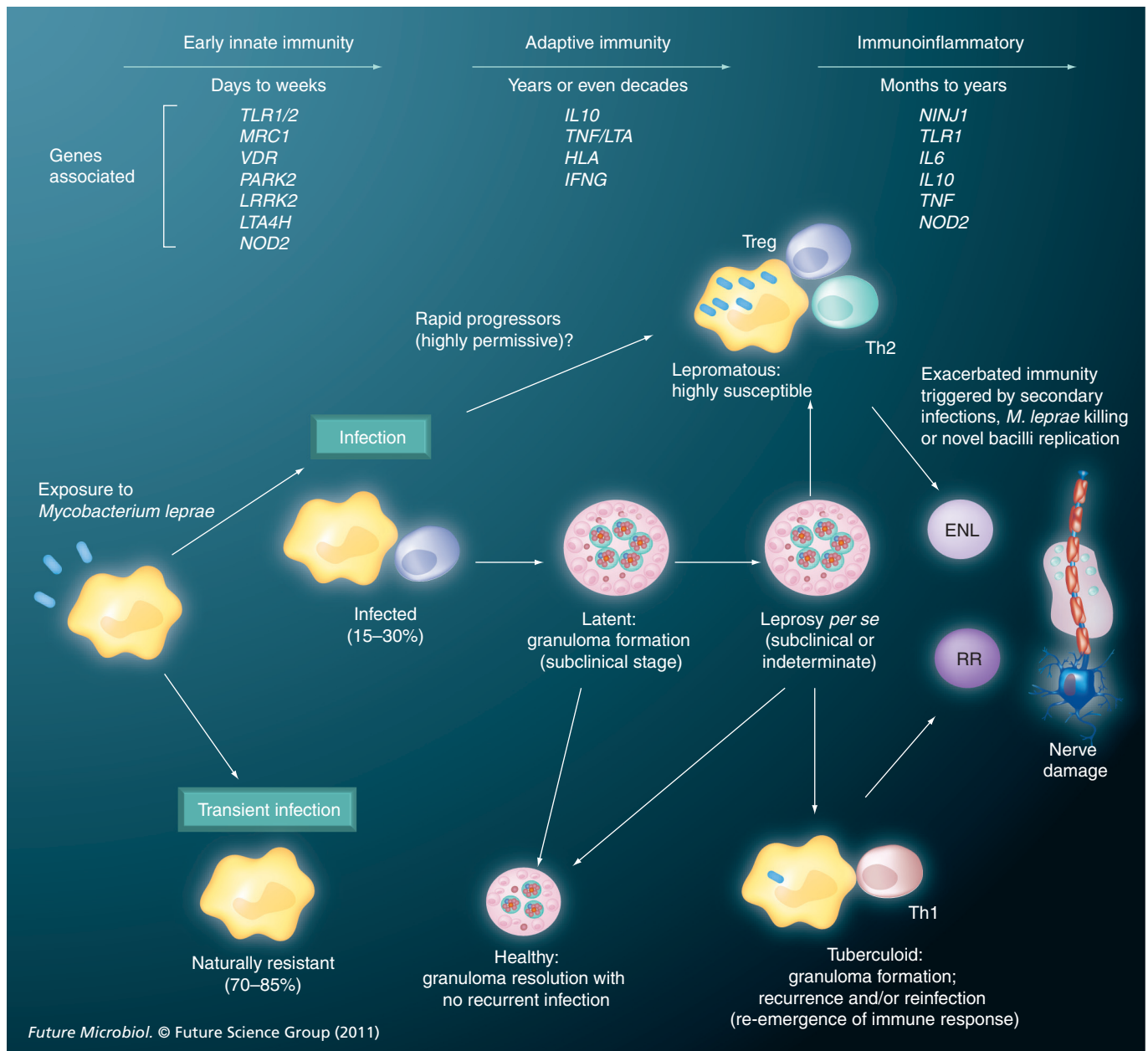


Figure 3. The evolution of *Mycobacterium leprae* interaction with the human host. *Mycobacterium leprae* interaction with the human host after exposure involves molecules, such as TLR1, TLR2, NOD2, MRC1, VDR, LTA4H, PARK2 and LRRK2, that may regulate autophagy, lipid droplet formation and apoptosis. Resistant individuals will clear bacilli. Activation of T cells will define whether *M. leprae* will permanently infect the host cells. This is regulated mainly by TNF, IL-12 and HLA. The interplay of these cytokines with other mediators will control granuloma formation. It is possible that individuals lacking resistant versions of the genes in both innate and adaptive immunity cannot control *M. leprae* replication and migrate directly to the lepromatous form of the disease. These individuals are probably highly susceptible and rapid progressors. At least 15% of those exposed may become infected, while most stay healthy for years or decades and never develop leprosy. However, there are leprosy cases that progress after 20–30 years. Thus, the lack of serological or clinical markers to distinguish healthy (cured) and infected individuals makes it virtually impossible to be sure who, among an infected population, is indeed cured or if they still carry bacilli. Under immune suppression that could also be mediated by genes regulating T-cell responses, such as *TNF*, *LTA* and *IFNG*, the granuloma can be disrupted and the disease progresses. At first, individuals develop a mild form, called indeterminate leprosy. Later, it is likely that recurrent infections could lead to exacerbated T-cell-mediated responses, leading to tuberculoid forms that also cause extensive tissue damage. Impairment of granuloma maintenance leads to development of the lepromatous form. In this situation a more intense disruption of the granuloma and the absence of regulatory circuits to rearrange and contain mycobacterial growth and spread are expected. Since there are different forms of multibacillary leprosy it is possible that the control over *M. leprae* replication along each one of these forms will be gradually lower. Finally, after months to years, patients can be interrupted by another wave of immune reactivation, developing leprosy reactional states, which is an exaggerated inflammatory response that leads to extensive tissue damage. ENL: Erythema nodosum leprosum; RR: Reversal reaction.

carriers of mutations in genes such as *IL12*, *IL12RB1* and *IFNGR* are highly susceptible to infections caused by avirulent intracellular pathogens [98], an observation that suggests the candidacy of these genes in the control of susceptibility to common mycobacterial diseases [99].

The *IFNG* gene is located in the highly conserved 12q14 region and polymorphisms seem to have impact over control of *in vitro* cytokine production [100–103]. Studies have mainly been focusing on the +874T>A SNP, and the T allele has been correlated with high production of IFN- γ and resistance to TB [101–105].

In leprosy, Cardoso *et al.* conducted an extensive data analysis from two Brazilian case–control panels (1752 individuals) and found a significant association between +874T and leprosy resistance. Further analysis using peripheral blood mononuclear cell cultures also showed that +874T carriers produce higher IFN- γ levels [105]. These results add to the previously described data regarding *TNF* and *LTA* genetic associations, suggesting that TNF, LTA and IFN- γ probably not only regulate granuloma formation, but also participate in a myriad of other antimycobacterial events during adaptive immunity that controls *M. leprae* proliferation and spread.

Finally, case–control studies designed to explore the association of other genes in the *IL12/IFNG* axis with leprosy did not reach any consensus [25,106–108].

HLA class I & II

The HLA complex comprises five regions located at chromosome 6p21, which is considered the most variable in the human genome [109]. It is believed that infectious diseases are an important selective force that contributed to this variability [110].

The classical HLA class I (HLA-A, -B and -C) and class II (HLA-DR, -DP and -DQ) loci are broadly studied in infectious and autoimmune diseases due to the key role of these molecules in antigen presentation to CD8⁺ and CD4⁺ cells, respectively.

Indeed, HLA genes have been associated with leprosy susceptibility for decades following different studies (mostly case–control designs). However, given the great diversity of the HLA system (multiallelic), most of the studies were underpowered. However, replication of some of the findings in different populations as well as recent analysis using higher sample sizes are helping to solve the ambiguity across studies. Moreover, a systematic hit of this 6p21 region after GWAS or genomic scans [53,44,111,112] clearly

suggests the participation of these loci in leprosy susceptibility. Indeed, SNP markers within the HLA region were pinpointed in the both GWAS studies [44,112]. Here, we will provide a short summary of the most important findings and their functional implications. For a detailed review see [113].

For HLA class I, the only consensus finding is the A11 allele, which has been associated with leprosy in Korean [114], Indian [115] and Brazilian populations [116]. Owing to the fact that the main restriction determinants for *M. leprae* reside on DR molecules [117], the results described for HLA class II are extensive and major association results refer to the presence of DR2. HLA-DR2 and the more recently identified *DRB1*15* have been consistently associated with leprosy (*per se* or different clinical forms) in Korean, Caucasian, Brazilian, Indian, Turkish, Mexican, Japanese, Chinese and Thai populations [114,118–129]. Risk associated with the *DRB1*10* allele has been described in Vietnamese, Brazilian and Turkish populations [124,130]. A protective effect on leprosy was described for *DRB1*04* in Korean, Japanese, Vietnamese, Brazilian and Taiwanese populations [114,124,128].

Even though genetic epidemiology data in leprosy involving the HLA region is extensive, cautious interpretation is required, due to the strong linkage disequilibrium across the entire region, frequently weak study designs and publication bias of positive results. Furthermore, functional data to support these associations is required, such as produced by [129] describing arginine substitutions as a probable cause for DRB1 allele associations or correlating alleles and HLA molecules expression.

Also, a link between innate and T-cell-mediated immunity can also be seen in the vitamin D pathway. Results obtained from a multiple sclerosis study showed that vitamin D increases the expression of the *HLA-DRB1*15* allele [131]. Interestingly, the vitamin D-dependent antimicrobial pathway could be associated indirectly with regulation of HLA expression (FIGURE 2).

IL-10

IL-10 is a cytokine with immunoregulatory properties that is secreted by cells of the monocyte/macrophage lineage and T-cell subsets such as Tr1, Treg and Th17. It suppresses the production of inflammatory mediators as well as antigen presentation. High levels of IL-10 are observed in multibacillary leprosy compared with PB and a low TNF/IL-10 ratio is correlated to disease progression [132–134].

The *IL10* gene is located at 1q31–q32, close to a chromosome region previously linked to leprosy (1q42.3; LOD score 2.13) [111]. Genetic epidemiology studies have found that SNPs located at the promoter region of *IL10*, mainly -819C>T, have been repeatedly associated with leprosy. In 2002, Santos and colleagues demonstrated that -819TT was associated with risk for leprosy *per se* and PB leprosy in Rio de Janeiro, Brazil [135]. The same group also associated extended haplotypes with leprosy, reinforcing the role of the -819T allele as a susceptibility marker for leprosy [136]. In 2009, Franceschi, also in Brazil, found a lower frequency of the -1082G-819C-592C/-1082G-819C-592C haplotype in a lepromatous leprosy-affected group [93]. In India, the -819T allele was associated with susceptibility to leprosy [137]. A new case–control in a larger sample from Brazil, along with meta-analysis, confirmed that the -819T allele was associated with increased risk for leprosy (maximum odds ratio of 1.66; *p*-value = 0.0001), evidencing the association of the -819T allele with leprosy susceptibility [28]. Indeed, functional inspection suggested that -819C>T has the potential to regulate IL-10 levels. The association of the gene was also corroborated after the genome-wide case–control study, although other markers have been pinpointed [112]. Montoya and colleagues demonstrated that IL-10 triggers the differentiation of monocytes with phagocytic, but not antimicrobial properties, suggesting that the -819T allele might indeed regulate patterns of the immune response and consequently, disease outcome [63].

A model for the evolution of *M. leprae* interaction with its human host

Mycobacterium leprae is a unique pathogen. It is an obligatory intracellular mycobacteria highly adapted to the human host environment at the cost of a remarkable reductive evolution that resulted in a large number of pseudogenes in a minimalist genome [4,138]. *M. leprae* also has a very low genetic diversity and the identification of good molecular epidemiology markers based on variable number of tandem repeats is very difficult. Nevertheless, strains have been well defined and evolutionary and migration patterns have been identified, mostly by SNPs. Unfortunately, *M. leprae* is uncultivable and the gene expression adjustments that it undergoes during interaction with the human host have never been defined due to methodological restrictions. Nevertheless, some information has recently been retrieved using the nude mouse footpad model [4,139–141]. Thus, mycobacterial regulatory pathways are

difficult to evaluate in *M. leprae* compared with *M. tuberculosis* [142]. Also, *M. leprae* has developed very sophisticated mechanisms to adhere and infect Schwann cells through α 2-laminin, subverting its metabolism and inducing these neural cells to proliferate, becoming a safe niche for its slow replication [143,144].

These features of *M. leprae* could not have been achieved if the human host was not also collaborating. Due to an ancient history of co-evolution, *M. leprae* has found a permissive environment facilitating its successful infection. This permissiveness is based on subtle genetic variations that allow *M. leprae* to pass through all the checkpoints of the immune system (FIGURE 3). After phagocytosis, the success of the infection depends on the ability of each mycobacteria to evade the host immune system and modulate cell-death pathways. In other words, phagocytosis of non-pathogenic mycobacteria results in autophagy and apoptosis, leading to the successful elimination of the pathogen. Conversely, highly pathogenic mycobacteria such as *M. tuberculosis* can not only inhibit autophagy and apoptosis but also stimulate necrotic cell death as a way to favor bacterial spread [79,145]. In the particular case of leprosy, which is caused by a pathogen with moderate virulence, the scenario seems to be intermediate because the infection persists and no necrosis is observed. In order to be successful, *M. leprae* needs to infect individuals that are unable to correctly mount an autophagic response and gene expression activation through NF- κ B. Several subtle variations in *TLR1*, *NOD2*, *MRC1* and *VDR*, as described earlier, could lead to inhibition of both autophagy and apoptosis pathways, thus favoring *M. leprae* infection. The regulation of LD formation is also dependent on genetic control at this stage and *LTA4H* can induce higher levels of lipoxin A4 along with other lipid mediators (FIGURE 2), leading to persistence of the pathogen. In parallel, *M. leprae* must evade cell apoptosis. Probably, SNPs causing a slight decrease of function in *PARK2* and *LRRK2* genes could inhibit apoptosis. The point where monocytic cells interact with and activate T cells is regulated by TNF, IL-12 and HLA and other cytokines and T cells will help to form the granuloma to contain *M. leprae*. Therefore, individuals carrying slight genetic deficiencies in both innate and adaptive immunity can migrate directly to the lepromatous pole.

The vast majority of those exposed will clear the bacilli, but it is expected that at least 15% may get infected. It is very difficult to estimate the prevalence of infection in leprosy due to

the absence of good markers, but analysis of anti-PGL-I antibodies in nonendemic areas in Brazil show 15% seropositivity [146]. Thus, infection will guarantee *M. leprae* a safe environment in a latent subclinical stage, which is, from the mycobacteria's point-of-view, rather interesting [147]. At this point, the maintenance of the granuloma is crucial for containing the mycobacteria. Disease progression is regulated by a combination of several environmental factors – such as age, nutrition, pregnancy and BCG vaccination – and genetic variations in *TNF*, *LTA* and *IFNG*. Individuals will then develop a very early form of leprosy, called indeterminate leprosy, from which patients can either be cured or progress further towards a tuberculoid or a lepromatous pole. The tuberculoid form is likely to have some sustained reactivation of the immune system probably due to reinfections. A strong T-cell response in these patients will lead to tissue damage in skin and nerves while lepromatous patients would have a more powerful imbalance, harboring more than one genetic variation, to disrupt granulomas. Some patients develop reactional states and neuritis during the course of the disease. Several events can lead to this transient breakup of the homeostatic disease state such as secondary infection and treatment of leprosy. This could be a state of immune reactivation of specific T-regulatory cells. At these reactional states, cytokines such as TNF, IL-6 and IL-10 are produced in high levels in a way that SNPs in these genes could be important [148–150]. Other immune regulating genes, such as *NINJ1*, *TLR1* and *TLR2* [31,35,151,152], have been associated with this exaggerated inflammatory response and the outcome of the leprosy reactions.

This view suggests that several genes are participating in leprosy outcome at different stages of the disease progression (FIGURE 3). Thus, this observation is consistent with the postulate from Casanova and Abel, which suggests that several genes regulate one disease [153]. Thus, it is clear that leprosy is influenced by the genetic background of the exposed individual and several routes for susceptibility are known, which could facilitate novel therapeutic strategies, or even vaccines. Leprosy still affects 250,000 new patients per year and early diagnosis, chemoprophylaxis and tailored treatment based on genetic evidence could be an alternative to interrupt the chain of transmission and the development of permanent nerve incapacities.

Conclusion & future perspective

The main pathways and genes associated with leprosy (or TB) susceptibility are also associated with other immune-based diseases, creating a platform to investigate immunopathology of complex diseases and setting universal strategies to treat and prevent these diseases. The greatest challenge will be to answer how these SNPs interact with one another in a complex disease. To do so, researchers will have to recruit and analyze data from larger populations (perhaps 20,000–50,000 individuals) using novel statistics and computational methods to define interactions between several markers in different genes as well as gene–gene or gene–environment interactions.

Understanding of the immunopathogenesis of complex diseases provides clues for the creation of novel classes of drugs and adjuvants. Pharmacological applications of these findings are absolutely unprecedented where combinations of drugs modulating lipid metabolism, and autophagy or vitamin D supplementation could be used either to treat mycobacterial infections or Crohn's disease. The challenge is that sometimes the emergence of an evolutionary protective response against an infection can be detrimental and trigger an exacerbated response and consequently lead to autoimmunity, which means that the range in which drugs exerting their mechanism of action may be narrow in order to correctly immunomodulate the host response.

Acknowledgements

We are grateful to Marcelo Távora Mira and Anna Beatriz Robottom Ferreira for the critical reading of the article.

Financial & competing interests disclosure

MO Moraes is funded by FAPERJ (from Portuguese Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), CAPES (from Portuguese Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (from Portuguese Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). CC Cardoso is a postdoctoral scholar from CAPES. AC Pereira is funded by FAPESP and CNPq and C de Sales Marques is a PhD fellow sponsored by CNPq. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Leprosy susceptibility is influenced by genes

- Results of observational studies show a higher concordance among monozygotic twins regarding disease outcome and clinical forms compared with dizygotic twins.
- Complex segregation analyses show that leprosy outcome is influenced by a combination of a few major genes and a wide range of genetic variations with subtle effects.
- The genotype–phenotype correlation (i.e., functional relevance of the vast majority of genetic polymorphisms associated with leprosy) still needs validation.
- The epistasis (i.e., interaction between variations in different genes) still remains to be investigated.
- It is likely that the development of genetic screening of susceptible individuals among high-risk population in endemic areas and chemoprophylaxis will help to reduce disease burden.

Genes associated with leprosy seem to bridge early & late events of the immune response

- Results of genetic epidemiological studies have pinpointed genes coding for pattern recognition receptors (*NOD2* and *TLR*) as important for *Mycobacterium leprae* infection. However, genes involved in adaptive immune response such as those involved in granuloma formation (*TNF/LTA*, *IFNG*, *LTA4H*) or apoptotic/autophagic pathways (*PARK2* and *LRRK2*), and T-cell activation (*IL10*) have been systematically associated with leprosy and are probably the most important ones to influence disease outcome.

Leprosy shares some susceptibility genes with noninfectious diseases

- Some of the major genes associated with leprosy are also associated with noninfectious diseases with complex outcomes.
- Genes such as *NOD2* (Crohn's disease), *PARK2* (Parkinson's disease), *LTA* (myocardial infarction), HLA (diabetes) and *TNF* (rheumatoid arthritis) clearly illustrate the close relatedness of the genetic component in infectious and chronic inflammatory diseases.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
- of considerable interest

- Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG: Genetics of host response in leprosy. *Lepr. Rev.* 77(3), 189–202 (2006).
- Monot M, Honore N, Garnier T *et al.*: On the origin of leprosy. *Science* 308(5724), 1040–1042 (2005).
- Monot M, Honoré N, Garnier T *et al.*: Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat. Genet.* 41(12), 1282–1289 (2009).
- Singh P, Cole ST: *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol.* 6(1), 57–71 (2011).
- Pinheiro RO SJ, Sarno EM, Sampaio EP: *Mycobacterium leprae* – host–cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview *Future Microbiol.* 6(2), 217–230 (2011).
- Ridley DS, Jopling WH: Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 34, 255–273 (1966).
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL: The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2), 338–381 (2006).
- Alter A, Grant A, Abel L, Alcais A, Schurr E: Leprosy as a genetic disease. *Mamm. Genome* 22(1–2), 19–31 (2011).
- Chakravarti M, Vogel F: A twin study on leprosy. In: *Topics in Human Genetics*. Georg Thieme, Stuttgart, Germany 1–123 (1973).
- Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA: Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *J. Clin. Invest.* 79(4), 1139–1143 (1987).
- 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.* 42(2), 256–266 (1988).
- **Seminal paper that describes the results of complex segregation analysis developed in families of a Caribbean island. Results suggested that different genes could control susceptibility to leprosy *per se*.**
- Beiguelman B: The genetics of resistance to leprosy. *Int. J. Lepr.* 33(4), 808–812 (1965).
- Beiguelman B: Leprosy and genetics. A review of past research with remarks concerning future investigations. *Bull. World Health Organ.* 37(3), 461–476 (1967).
- Beiguelman B: Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet. Med. Gemellol. (Roma)* 17(4), 584–594 (1968).
- Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC: The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am. J. Hum. Genet.* 56(5), 1179–1185 (1995).
- 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.* 201(10), 1598–1605 (2010).
- Bellamy R: The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect.* 1(1), 23–27 (1999).
- Malo D, Vidal SM, Hu J, Skamene E, Gros PL: High-resolution linkage map in the vicinity of the host resistance locus BCG. *Genomics* 16(3), 655–663 (1993).
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P: Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for BCG. *Cell* 73(3), 469–485 (1993).
- Ji B, Perani EG, Petinom C, Grosset JH: Bactericidal activities of combinations of new drugs against *Mycobacterium leprae* in nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(2), 393–399 (1996).
- Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP: Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2(11), E328 (2008).
- Longley R, Smith C, Fortin A *et al.*: Host resistance to malaria: using mouse models to explore the host response. *Mamm. Genome* 22(1–2), 32–42 (2011).
- Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG *et al.*: Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J. Infect. Dis.* 176(2), 530–532 (1997).
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR *et al.*: Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J. Infect. Dis.* 186(11), 1687–1691 (2002).
- Lee SB, Kim BC, Jin SH *et al.*: Missense mutations of the interleukin-12 receptor β 1 (IL12RB1) and interferon- γ receptor 1 (IFNGR1) genes are not associated with susceptibility to lepromatous leprosy in Korea. *Immunogenetics* 55(3), 177–181 (2003).

26. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT *et al.*: Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427(6975), 636–640 (2004).
- **Describes *PARK2* as a major gene in leprosy after the positional cloning of the 6q25 peak.**
27. Alcais A, Alter A, Antoni G *et al.*: Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat. Genet.* 39(4), 517–522 (2007).
- **Explains the positional cloning of the *LTA* gene after further characterization of a linkage peak at 6p21 and describes the single nucleotide polymorphisms at +80 site as a risk factor for early-onset leprosy.**
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.* 123(5), 477–484 (2008).
29. 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.* 10(2), 174–180 (2009).
30. 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.* 128(5), 481–490 (2010).
31. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C *et al.*: Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2(5), E231 (2008).
32. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S *et al.*: Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J. Infect. Dis.* 201(9), 1422–1435 (2010).
33. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR *et al.*: Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum. Immunol.* 71(10), 992–998 (2010).
34. de Messias-Reason IJ, Boldt AB, Moraes Braga AC *et al.*: The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. *J. Infect. Dis.* 196(9), 1379–1385 (2007).
35. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR *et al.*: Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J. Infect. Dis.* 197(2), 253–261 (2008).
36. Jamieson SE, Miller EN, Black GF *et al.*: Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11–q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun.* 5(1), 46–57 (2004).
37. Silva SR, Tempone AJ, Silva TP *et al.*: *Mycobacterium leprae* downregulates the expression of PHEX in Schwann cells and osteoblasts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105(5), 627–632 (2010).
38. Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ *et al.*: A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur. J. Immunol.* 37(8), 2280–2289 (2007).
39. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO *et al.*: Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol.* 178(12), 7520–7524 (2007).
40. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D *et al.*: Leprosy and the adaptation of human Toll-like receptor 1. *PLoS Pathog.* 6, E1000979 (2010).
41. Liu PT, Stenger S, Li H *et al.*: Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311(5768), 1770–1773 (2006).
42. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V: Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 27(7), 1110–1121 (2008).
43. Shin DM, Yuk JM, Lee HM *et al.*: Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell Microbiol.* 12(11), 1648–1665 (2010).
44. Zhang FR, Huang W, Chen SM *et al.*: Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 361(27), 2609–2618 (2009).
- **Describes the first genome-wide association study in leprosy, which confirmed previous associations and described the effect of new genes such as *NOD2* and *LRRK2* in leprosy susceptibility.**
45. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S *et al.*: Common polymorphisms in the *NOD2* gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J. Infect. Dis.* 201(9), 1422–1435 (2010).
46. Alter A, Alcais A, Abel L, Schurr E: Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum. Genet.* 123(3), 227–235 (2008).
47. Cooney R, Baker J, Brain O *et al.*: NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 16(1), 90–97 (2010).
48. Intemann CD, Thye T, Niemann S *et al.*: Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog.* 5(9), E1000577 (2009).
49. Schurr E, Gros P: A common genetic fingerprint in leprosy and Crohn's disease? *N. Engl. J. Med.* 361(27), 2666–2668 (2009).
50. Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ *et al.*: NOD2 and Toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 1(3), 279–285 (2005).
51. Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE: Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem. Soc. Trans.* 35(Pt 6), 1479–1484 (2007).
52. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K *et al.*: A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat. Genet.* 27(4), 439–441 (2001).
53. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N *et al.*: Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat. Genet.* 33(3), 412–415 (2003).
54. Kerrigan AM, Brown GD: C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214(7), 562–575 (2009).
55. 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.* 127(3), 337–348 (2010).
56. Wang L, Chen RF, Liu JW *et al.*: DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(1), E934 (2011).
57. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I *et al.*: A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat. Genet.* 37(5), 507–513 (2005).
58. Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C *et al.*: *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog.* 6(10), E1001159 (2010).
59. Li X, Yang Y, Zhou F *et al.*: SLC11A1 (NRP1) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 6(1), E15831 (2011).
60. Krutzik SR, Tan B, Li H *et al.*: TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 11(6), 653–660 (2005).

61. Matzner M, Al Samie AR, Winkler HM *et al.*: Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. *Acta Trop.* 117(1), 56–59 (2011).
62. Krutzik SR, Hewison M, Liu PT *et al.*: IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J. Immunol.* 181(10), 7115–7120 (2008).
63. Montoya D, Cruz D, Teles RM *et al.*: Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe* 6(4), 343–353 (2009).
64. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA: Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to vitamin D related disease states. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90(1–5), 187–193 (2004).
65. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV: Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J. Infect. Dis.* 179(1), 187–191 (1999).
66. 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.* 71(3), 330–340 (2004).
67. Velarde Félix JS, Cazarez Salazar SG, Castro Velázquez R, Rendán Maldonado JG, Rangel Villalobos H: Relación del polimorfismo TaqI del gen del receptor de la vitamina D con la lepra lepromatosa en población mexicana. *Salud Pública de México*, 51, 59–61 (2009).
68. Goulart LR, Ferreira FR, Goulart IM: Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48(1), 91–98 (2006).
69. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR *et al.*: Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum. Immunol.* 71(10), 992–998 (2010).
70. Prado-Montes de Oca E, Velarde-Felix JS, Rios-Tostado JJ, Picos-Cardenas VJ, Figueroa LE: SNP 668C (-44) alters a NF- κ B1 putative binding site in non-coding strand of human β -defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy. *Infect. Genet. Evol.* 9(4), 617–625 (2009).
71. Malhotra D, Darvishi K, Lohra M *et al.*: Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of *PARK2* and *PACRG* genes with leprosy in an Indian population. *Eur. J. Hum. Genet.* 14(4), 438–442 (2005).
72. Berger AK, Cortese GP, Amodeo KD, Weihofen A, Letai A, LaVoie MJ: Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* 18(22), 4317–4328 (2009).
- **Links parkin to one of the apoptosis pathways since it shows that parkin associates with mitochondria and inhibits cytochrome c release.**
73. Chen D, Gao F, Li B *et al.*: Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *J. Biol. Chem.* 285(49), 38214–38223 (2010).
74. Smith WW, Pei Z, Jiang H *et al.*: Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102(51), 18676–18681 (2005).
75. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y *et al.*: PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(1), 378–383 (2010).
76. Deretic V: Autophagy in infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(2), 252–262 (2010).
77. Spandl J, Lohmann D, Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C: Ancient ubiquitously protein 1 (AUP1) localizes to lipid droplets and binds the E2 ubiquitin conjugase G2 (UBE2G2) via its G2 binding region. *J. Biol. Chem.* 286(7), 5599–5606 (2011).
78. Tobin DM, Vary JC, Ray JP *et al.*: The *lta4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans. *Cell* 140(5), 717–730 (2010).
- **The authors used a zebrafish model and found a clear role for the *lta4h* gene in severe susceptibility to *Mycobacterium marinum* infection. Further investigations showed an association between the human *LTA4H* gene and susceptibility to TB and multibacillary leprosy.**
79. Chen M, Divangahi M, Gan H *et al.*: Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J. Exp. Med.* 205(12), 2791–2801 (2008).
80. Cruz D, Watson AD, Miller CS *et al.*: Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin. Invest.* 118(8), 2917–2928 (2008).
81. Kim MJ, Wainwright HC, Lockett M *et al.*: Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol. Med.* 2(7), 258–274 (2010).
82. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS *et al.*: Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leuk. Biol.* 87(3), 371–384 (2010).
- **Describes the induction of lipid droplets in cells infected with *Mycobacterium leprae* and describes the lipid droplets as intracellular sites for the synthesis of eicosanoids such as PGE₂.**
83. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC *et al.*: Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell. Microbiol.* 13(2), 259–273 (2011).
84. Misra N, Selvakumar M, Singh S *et al.*: Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and *in vitro* T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol. Lett.* 48(2), 123–128 (1995).
85. Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K *et al.*: Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 289(1), 72–79 (2008).
86. Singh R, Kaushik S, Wang Y *et al.*: Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458(7242), 1131–1135 (2009).
87. Tobin DM, Ramakrishnan L: Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 10(5), 1027–1039 (2008).
88. Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP: Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin. Infect. Dis.* 43(2), E19–E22 (2006).
89. 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.* 174(4), 1379–1389 (2009).
90. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG *et al.*: Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J. Infect. Dis.* 176(2), 530–532 (1997).
91. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A *et al.*: Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2(4), 196–204 (2001).
92. Vejbaesya S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P, Sermduangprateep C: TNF α and NRAMPI polymorphisms in leprosy. *J. Med. Assoc. Thai.* 90(6), 1188–1192 (2007).
93. Franceschi DSA, Mazini PS, Rudnick CCC *et al.*: Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 13(4), 493–498 (2009).
94. 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.* 68(3), 325–327 (2000).

95. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN *et al.*: TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis and functional study. *J. Infect. Dis.* (2011) (In press).
96. Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN *et al.*: Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 53(1), 45–47 (2001).
97. Knight JC, Keating BJ, Kwiatkowski DP: Allele-specific repression of lymphotoxin- α by activated B cell factor-1. *Nat. Genet.* 36(4), 394–399 (2004).
98. van de Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff TH: Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. *Lancet Infect. Dis.* 9(11), 688–698 (2009).
99. Al-Muhsen S, Casanova J-L: The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122(6), 1043–1051 (2008).
100. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV: *In vitro* production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. *Eur. J. Immunogen.* 26(1), 1–3 (1999).
101. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee J-H, Hutchinson IV: A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN γ production. *Hum. Immunol.* 61(9), 863–866 (2000).
102. Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R *et al.*: Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167(7), 970–975 (2003).
103. Sallakci N, Coskuna M, Berber Z *et al.*: Interferon- γ gene+874T–A polymorphism is associated with tuberculosis and γ interferon response. *Tuberculosis (Edinb.)* 87(3), 225–230 (2007).
104. Pacheco A, Cardoso C, Moraes M: IFNG+874T/A, IL10–1082G/A and TNF-308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum. Genet.* 123(5), 477–484 (2008).
105. Cardoso C, Pereira A, Brito-de-Souza V *et al.*: IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum. Genet.* 128(5), 481–490 (2010).
106. Alvarado-Navarro A, Montoya-Buelna M, Muñoz-Valle JF, López-Roa RI, Guillén-Vargas C, Fafutis-Morris M: The 3'UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the west of Mexico. *Immunol. Lett.* 118(2), 148–151 (2008).
107. Morahan G, Kaur G, Singh M *et al.*: Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens* 69(Suppl. 1), 234–236 (2007).
108. Ohya H, Ogata K, Takeuchi K *et al.*: Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J. Clin. Pathol.* 58(7), 740–743 (2005).
109. Horton R, Gibson R, Coghill P *et al.*: Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics* 60(1), 1–18 (2008).
110. Zinkernagel R: Major transplantation antigens in host responses to infection. *Hosp. Pract.* 13(7), 83–92 (1978).
111. 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.* 4(1), 67–73 (2003).
112. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D *et al.*: Leprosy and the adaptation of human Toll-like receptor 1. *PLoS Pathog.* 6, E1000979 (2010).
113. Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D: HLA and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(2), 370–385 (2009).
114. Kim SJ CI, Dahlberg S, Nisperos B, Kim JD, Hansen JA: HLA and leprosy in Koreans. *Tissue Antigens* 29(3), 146–153 (1987).
115. Shankarkumar U: HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. *Lepr. Rev.* 75(1), 79–85 (2004).
116. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC *et al.*: Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* 72(5), 478–482 (2008).
117. Ohya H, Matsushita S, Nishimura F *et al.*: T cell responses to major membrane protein II (MMP II) of *Mycobacterium leprae* are restricted by HLA-DR molecules in patients with leprosy. *Vaccine* 20(3–4), 475–482 (2001).
118. Visentainer JEL, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzl-Erler ML: Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(1), 51–59 (1997).
119. van Eden W, Gonzalez NM, de Vries RR, Convit J, van Rood JJ: HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J. Infect. Dis.* 151(1), 9–14 (1985).
120. de Vries RR, Mehra NK, Vaidya MC, Gupte MD, Meera Khan P, Van Rood JJ: HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. *Tissue Antigens* 16(4), 294–304 (1980).
121. Cem Mat M, Yazici H, Ozbakir F, Tüzün Y: The HLA association of lepromatous leprosy and borderline lepromatous leprosy in Turkey. A preliminary study. *Int. J. Dermatol.* 27(4), 246–247 (1988).
122. Schauf V, Ryan S, Scollard D *et al.*: Leprosy associated with HLA-DR2 and DQw1 in the population of northern Thailand. *Tissue Antigens* 26(4), 243–247 (1985).
123. Wang LM, Kimura A, Satoh M, Mineshita S: HLA linked with leprosy in southern China: HLA-linked resistance alleles to leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 67(4), 403–408 (1999).
124. Vanderborcht 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.* 8(4), 320–324 (2007).
125. Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA, Beena KR, Stastny P: Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. *Tissue Antigens* 42(3), 133–137 (1993).
126. Singh M, Balamurugan A, Katoh K, Sharma SK, Mehra NK: Immunogenetics of mycobacterial infections in the North Indian population. *Tissue Antigens* 69, 228–230 (2007).
127. Gorodezky C, Alaez C, Munguia A *et al.*: Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis (Edinb.)* 84(1–2), 82–92 (2004).
128. Joko S NJ, Kawashima H, Namisato M, Maeda H: Human leukocyte antigens in forms of leprosy among Japanese patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 68(1), 49–56 (2000).
129. Zerva L, Cizman B, Mehra NK *et al.*: Arginine at positions 13 or 70–71 in pocket 4 of HLA-DRB1 alleles is associated with susceptibility to tuberculoid leprosy. *J. Exp. Med.* 183(3), 829–836 (1996).
130. Koçak M, Balci M, Pençe B, Kundakçı N: Associations between human leukocyte antigens and leprosy in the Turkish population. *Clin. Exp. Dermatol.* 27(3), 235–239 (2002).
131. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L *et al.*: Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet.* 5(2), E1000369 (2009).

132. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ *et al.*: Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254(5029), 277–279 (1991).
133. Sieling PA, Modlin RL: Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* 191(4–5), 378–387 (1994).
134. Lima MCBS, Pereira GMB, Rumjanek FD *et al.*: Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand. J. Immunol.* 51(4), 419–428 (2000).
135. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR *et al.*: Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J. Infect. Dis.* 186(11), 1687–1691 (2002).
136. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ *et al.*: Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 5(7), 592–595 (2004).
137. Malhotra D, Darvishi K, Sood S *et al.*: IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum. Genet.* 118(2), 295–300 (2005).
138. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J *et al.*: Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409(6823), 1007–1011 (2001).
139. Williams DL, Slayden RA, Amin A *et al.*: Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC Genomics* 10, 397 (2009).
140. Akama T, Suzuki K, Tanigawa K *et al.*: Whole-genome expression analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application. *Jpn J. Infect. Dis.* 63(6), 387–392 (2010).
141. Williams DL, Torrero M, Wheeler PR *et al.*: Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8(1), 58–72 (2004).
142. Stokes RW, Waddell SJ: Adjusting to a new home: *Mycobacterium tuberculosis* gene expression in response to an intracellular lifestyle. *Future Microbiol.* 4(10), 1317–1335 (2009).
143. Tapinos N, Rambukkana A: Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102(26), 9188–9193 (2005).
144. Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI: Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. *Cell* 88(6), 811–821 (1997).
145. Behr M, Schurr E, Gros P: TB: screening for responses to a vile visitor. *Cell* 140(5) 615–618 (2010).
146. Frota CC, Freitas MV, Foss NT *et al.*: Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 104(7), 490–495 (2010).
147. Paige C, Bishai WR: Penitentiary or penthouse condo: the tuberculous granuloma from the microbe's point of view. *Cell. Microbiol.* 12(3), 301–309 (2010).
148. Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JA, Sampaio EP: Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF- α and exhibit accelerated apoptosis *in vitro*. *J. Leukoc. Biol.* 65(3), 364–371 (1999).
149. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS *et al.*: Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon- γ and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand. J. Immunol.* 50(5), 541–549 (1999).
150. 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.* 115(6), 935–941 (2000).
151. Schuring RP, Hamann L, Faber WR *et al.*: Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J. Infect. Dis.* 199(12), 1816–1819 (2009).
152. Cardoso CC, Martinez AN, Guimaraes PE *et al.*: NINJIN 1 asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J. Neuroimmunol.* 190(1–2), 131–138 (2007).
153. Casanova JL, Abel L: Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J.* 26(4), 915–922 (2007).
154. Pacheco AG, Moraes MO: Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis. Markers.* 27(3), 173–186 (2009).