

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

HELOISA SALOMÃO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES CANDIDATOS E HANSENÍASE EM
UM ISOLADO POPULACIONAL HIPERENDÊMICO**

**CURITIBA
2014**

HELOISA SALOMÃO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES CANDIDATOS E
HANSENÍASE EM UM ISOLADO POPULACIONAL HIPERENDÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração: Medicina e áreas afins, da Escola Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

CURITIBA

2014

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

S173e Salomão, Heloisa
2012 Estudo de associação entre genes candidatos e hanseníase em um isolado populacional hiperendêmico / Heloisa Salomão; orientador, Marcelo Távora Mira. -- 2014
107 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2012.
Inclui bibliografias

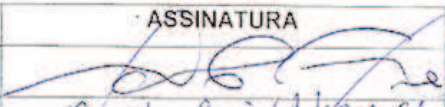
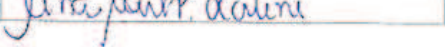
1. Hanseníase. 2. Doenças transmissíveis. 2. Epidemiologia. 3. Genes.
I. Mira, Marcelo Távora. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.998

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos trinta dias do mês de outubro de 2014, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, "**Estudo de associação entre genes candidatos e hanseníase em um isolado populacional hiperendêmico**" apresentada por **HELOISA SALOMÃO** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

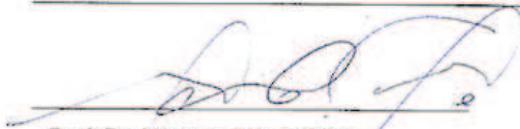
A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

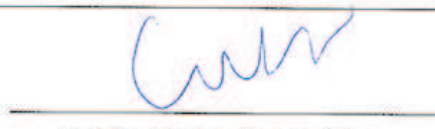
MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Marcelo Távora Mira (PUCPR) – Presidente	
Profa. Dra. Renata Iani Werneck (PUCPR)	
Profa. Dra. Ana Carla Pereira Latini (ILSL-SP)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira	Conceito: <u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Renata Iani Werneck	Conceito: <u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Ana Carla Pereira Latini	Conceito: <u>Aprovado</u>
	Conceito Final: <u>Aprovado</u>

Observações da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Presidente da Banca Examinadora


Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha
família, pelo apoio incondicional
nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bençãos que Ele tem colocado no meu caminho, que de alguma forma têm contribuído para minha formação acadêmica, bem como de ser humano.

Aos meus pais, **Nilso** e **Edite**, minha total admiração, pelo carinho, educação e amor incondicional, por estarem sempre participando das minhas conquistas, acreditando no meu potencial e me dando forças para continuar na busca dos meus sonhos. Nunca teria chegado até aqui sem vocês.

À minha irmã, **Angela**, que sempre me trouxe muita felicidade e incentivo nas minhas tomadas de decisões, muito obrigada pelo amor, paciência e parceria de sempre! Ao meu cunhado, **Rodolfo**, pelas sugestões e pela convivência agradável em meu dia-a-dia. E, ao meu sobrinho, **Rodrigo**, que recentemente me despertou um novo amor, o amor de titia, que a cada dia está me ensinando a ter mais zelo e felicidade em meu coração.

Ao meu “pai” científico, **Marcelo Távora Mira**, pelo apoio, sugestões, críticas e confiança em mim depositadas, o qual contribuíram para o aprimoramento do meu conhecimento científico, bem como do meu desenvolvimento pessoal. A sua paixão, ética, honestidade e entusiasmo pela ciência serão sempre lembrados. Você terá a minha eterna admiração.

A Prof. **Vanessa Santos Sotomaior**, que me propiciou a primeira oportunidade de entrar em contato com o mundo científico através do PIBIC.

Aos meus amigos e colegas dos laboratório 01: **Alice Lichs Marssaro, Angela Schnider Francio, Bruna Loss, Denise Endo da Costa, Geovana Brotto Ramos, Helena Regina Salomé D'Espindula, Juliane Monteiro, Laire S Ferreira, Liliane Machado do Nascimento, Maria Eduarda Krauss, Mónica Dallmann Sauer, Nathália Cavazzani, Priscila**

Uaska Sartori, Rafael Saraiva de Andrade, Renata Helena Sindeaux, Renata Iani Werneck, Roberto Gomes Tarlé, Wilian Corrêa de Macedo, Vinícius Medeiros Fava. Muito obrigada por todas as sugestões cuidadosas no meu trabalho e pelos momentos inesquecíveis que ficarão em minha memória.

Meus sinceros agradecimentos, ao grupo da Dra. **Ana Carla Perreira Latini** do Instituto Lauro de Souza Lima pela dedicação, paciência, entusiasmo e colaboração direta neste trabalho. Bem como, ao grupo do Dr. **Milton Osório Moraes** da Fundação Oswaldo Cruz, especialmente à **Carolinne de Sales Marques** (Carol) pelo trabalho em equipe. Estas pessoas foram essenciais para consolidação dos resultados obtidos bem como na elaboração do manuscrito.

Aos demais colegas, amigos e funcionários do NIMA, em especial a **Irenice Cairo** e **Elaine Doff Sotta**, cujas atividades são essenciais para viabilizar o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Aos membros da banca de qualificação e defesa que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Meu especial agradecimento aos pacientes da **Vila Santo Antônio do Prata** que contribuem de uma forma imensurável para o desenvolvimento da ciência afim de contribuir para o melhor entendimento da doença.

Por fim, agradeço com muito carinho, a todos os demais professores, mestres, amigos e colegas que contribuíram na minha jornada acadêmica, muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Se pude enxergar mais longe foi
porque estava sobre os ombros de
gigantes”

Isaac Newton

“Nós não temos dinheiro, então
temos que pensar”

Ernest Rutherford

“De tudo ficaram três coisas: a
certeza de que ele estava sempre
começando, a certeza de que era
preciso continuar e a certeza de
que seria interrompido antes de
terminar. Fazer da interrupção um
caminho novo. Fazer da queda um
passo de dança, do medo uma
escada, do sono uma ponte, da
procura um encontro”

Fernando Sabino

RESUMO

Introdução: A hanseníase, uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, afetou 232.857 novos indivíduos no mundo em 2012, principalmente na Índia (134.752, 57.8%) e Brasil (33.303, 14.3%). Dentre estes novos casos, 59% (137.410) eram multibacilares e 8.5% (20.200) ocorreram em crianças. Hoje, é amplamente aceita a existência de um componente genético do hospedeiro controlando a susceptibilidade à hanseníase e suas formas clínicas; no entanto, o número total e a natureza exata das variações genéticas envolvidas permanecem desconhecidas. Um estudo anterior, pan-genômico, conduzido numa amostra populacional chinesa, revelou associação entre hanseníase e cinco genes não-HLA: *CCDC122*, *LACC1* (anteriormente conhecido, *C13orf31*), *NOD2*, *TNFSF15* e *RIPK2*. **Objetivo:** Investigar variantes dos genes previamente descritos em associação com a hanseníase em uma amostra populacional Chinesa para testar a associação em um grupo independente de famílias hansenianas brasileiras. **Métodos:** Foram genotipados 36 *tag SNPs*, que capturavam a informação completa dos cinco genes candidatos, em 179 indivíduos distribuídos em 51 trios formados por um filho afetado e seus pais. Todos os trios foram recrutados na Vila do Prata, um isolado populacional hiperendêmico para hanseníase localizado na Amazônia brasileira. Genótipos de todos os indivíduos foram produzidos através de tecnologia baseada em fluorescência *TaqMan*. A análise de associação baseada em famílias foi realizada como implementada no *software* FBAT. As estimativas de desequilíbrio de ligação foram realizadas utilizando o *software* Haploview. **Resultados:** O estudo baseado em famílias demonstrou associação entre a proteção a hanseníase e os alelos “A” do rs8057341 ($P = 0.01$) e “C” do rs4942254 ($P = 0.04$), localizados nos genes *NOD2* e *CCDC122*, respectivamente. **Conclusão:** Nossos resultados corroboram com a hipótese de um papel para variantes de *NOD2* e *CCDC122* no complexo mecanismo molecular de controle da susceptibilidade à hanseníase. Importante, a associação entre a hanseníase e *NOD2* marcador rs8057341 é uma perfeita replicação dos resultados observados no estudo original.

Palavras-chave: hanseníase, estudo de associação, genes candidatos.

ABSTRACT

Introduction: Leprosy, a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, affected 232.857 new individuals worldwide in 2012, mainly in India (134.752, 57.8%) and Brazil (33.303, 14.3%). Among these new cases, 59% (137.410) were multibacillary and 8.5% (20.200) occurred in children. To date, it is largely accepted the existence of a host genetic component controlling susceptibility to leprosy and its clinical forms; however, the total number and the exact nature of the genetic variations involved are still unknown. A previous genome-wide study conducted in a Chinese population sample revealed association between leprosy and five non-HLA genes: *CCDC122*, *LACC1* (formerly known, C13orf31), *NOD2*, *TNFSF15* and *RIPK2*. **Aim:** To investigate genes previously described in association with leprosy in a Chinese population sample for replication in an independent collection of Brazilian leprosy families. **Methods:** The five candidate genes previously described in the Chinese study were genotyped for 36 tag SNPs capturing their entire information, in 179 individuals distributed in 51 trios composed by an affected child and both parents. All trios were recruited at the Prata Village, an isolated, highly endemic former leprosy located at the outskirts of Brazilian Amazon. Fluorescence-based TaqMan technology was applied to produce genotypes of all individuals. Family-based association analysis was performed as implemented in the software FBAT. Linkage disequilibrium estimations were carried out using the Haploview software. **Results:** The family-based study revealed association between leprosy resistance and alleles “A” of rs8057341 ($P = 0.01$) and “C” of rs4942254 ($P = 0.04$), located at *NOD2* and *CCDC122*, respectively. **Conclusion:** Our results support the hypothesis of a role for variants of *NOD2* and *CCDC122* in the complex molecular mechanism controlling leprosy susceptibility. Of note, the association between leprosy and *NOD2* marker rs8057341 is a perfect replication of the results observed in the original Chinese study.

Keywords: leprosy, association study, candidate genes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Crânio humano fossilizado de aproximadamente 4.000 anos.....	03
Figura 2. Disseminação da hanseníase no mundo.....	04
Figura 3. Gráfico de prevalência de hanseníase no início de 2012.....	06
Figura 4. Coeficiente de prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes nas Unidades da Federação Brasileira e municípios.	07
Figura 5. Gráfico de incidência de hanseníase no início de 2012.....	08
Figura 6. Coeficiente de detecção da hanseníase por 100.000 habitantes segundo regiões geográficas entre 2002 à 2012.	09
Figura 7. Patogênese da hanseníase.....	13
Figura 8. Esquema recomendado e tempo de tratamento com a PQT.....	17
Figura 9. Mapa do genoma circular do <i>M. leprae</i> mostrando a posição e orientação dos genes, pseudogenes e sequências repetitivas.	20
Figura 10. Desenho do estudo do trabalho “Caracterização Epidemiológica e Clínica e Avaliação de Estratégias de Intervenção em Áreas Endêmicas de Hanseníase”	25
Figura 11. Desenho detalhado da etapa da “Genética do Hospedeiro” envolvendo cinco amostras populacionais	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índice bacilosκόpio (IB) para 100 campos microscópicos.....	14
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
a.C	Antes de Cristo
A	Adenina
AAK1	<i>AP2 associated kinase 1</i>
ANXA4	<i>Annexin A4</i>
ASC	Análise de Segregação Complexa
ATP6V1B1	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1</i>
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	<i>Borderline-Borderline</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BCHE	<i>Butyrylcholinesterase</i>
BL	<i>Borderline-Lepromatoso</i>
BT	<i>Borderline-Tuberculóide</i>
C	Citosina
CCDC122	<i>Coiled-coil dominant containing 122</i>
CD207	<i>CD207 molecule, langerin</i>
cDNA	DNA complementar
CEP-PUCPR	Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR
CLEC4F	<i>C-type lectin domain family 4, member F</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONEP	Conselho Nacional de Ética Em Pesquisa
CUBN	<i>Cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)</i>
DL	Desequilíbrio de Ligação
DECIT	Departamento de Ciência e Tecnologia
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ENH	Eritema nodoso hansênico
ER	Estados Reacionais

<i>FBAT</i>	<i>Family Based Association Tests</i>
<i>folP2</i>	<i>Dihydropteroate synthase</i>
G	Guanina
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
<i>gyrA</i>	<i>DNA gyrase subunit A</i>
<i>HapMap</i>	<i>International Hapmap Project</i>
<i>HLA</i>	<i>Human leukocyte antigen</i>
I	Indeterminada
IB	Índice baciloscópio
IgM	Imunoglobulina da Classe M
<i>IL10</i>	<i>Interleukin 10</i>
<i>IL23R</i>	<i>Interleukin 23 receptor</i>
<i>IL6</i>	<i>Interleukin 6</i>
<i>KIR</i>	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
<i>LACC1</i>	<i>Laccase (Multicopper oxidoreductase) domain containing 1</i>
LL	Lepromatoso-Lepromatoso
<i>LRRK2</i>	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
<i>LTA</i>	<i>Lymphotoxin alpha</i>
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MB	Multibacilar
mL	Mililitros
<i>MRC1</i>	<i>Mannose receptor, C type 1</i>
MS	Ministério da Saúde
<i>NEBL</i>	<i>Nebulette</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pará
<i>PACRG</i>	<i>PARK2 co-regulated</i>
<i>PARK2</i>	<i>Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
PB	Paucibacilares
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGL-1	Anti-Glicolepídeo Fenólico-I
<i>PPP3R1</i>	<i>Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha</i>
PQT	Poliquimioterapia

PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
qPCR	Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa
<i>RAB32</i>	<i>RAB32, member RAS oncogene family</i>
<i>RIPK2</i>	<i>Receptor-interacting serine-threrosine Kinase 2</i>
<i>rpoB</i>	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta</i>
RR	Reação Reversa
<i>SLC11A1</i>	<i>Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter) member 1</i>
<i>SNPs</i>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>T1R</i>	<i>Type 1 Reaction</i>
<i>T2R</i>	<i>Type 2 Reaction</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>Th1</i>	<i>T helper type 1</i>
<i>Th2</i>	<i>T helper type 2</i>
<i>TLR1</i>	<i>Toll-like receptor 1</i>
<i>TLR2</i>	<i>Toll-like receptor 2</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<i>TNFSF15</i>	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15</i>
T	Timina
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
<i>VDR</i>	<i>Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	ASPECTOS GERAIS	2
1.2	HISTÓRIA DA HANSENÍASE.....	2
1.3	EPIDEMIOLOGIA.....	5
1.3.1	Prevalência.....	5
1.3.2	Incidência	7
1.4	AGENTE ETIOLÓGICO	9
1.5	TRANSMISSÃO	11
1.6	PATOGÊNESE.....	12
1.7	DIAGNÓSTICO	13
1.8	TRATAMENTO E PROFILAXIA DA HANSENÍASE.....	16
1.9	ESTADOS REACIONAIS.....	18
1.10	TRATAMENTO DOS ESTADOS REACIONAIS.....	19
1.11	GENÉTICA DO <i>M. LEPRAE</i>	19
1.12	GENÉTICA DA SUSCEPTIBILIDADE HUMANA A FENÓTIPOS DA HANSENÍASE.....	21
1.13	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROJETO.....	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVO GERAL	28
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “<i>HUMAN GENETICS</i>”	29
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	53
	ANEXO II E III – APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ (CEP-PUCPR).....	58
	ANEXO IV – APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO CONSELHOR NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA (CONEP)	62
6	ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “<i>CLINICS IN DERMATOLOGY</i>”	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório de crescimento lento que exibe um tropismo especial por macrófagos e células de Schwann do Sistema Nervoso Periférico (1). A capacidade do bacilo de invadir e infectar células de Schwann é responsável por desencadear os danos neurais que podem acarretar incapacidades físicas permanentes e perda sensorial, as quais contribuem para o forte estigma e preconceito ainda associados com a doença (2, 3).

O *M. leprae* foi identificado em 1873 pelo norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen (4), sendo este o primeiro patógeno reconhecido como agente etiológico de uma doença infecciosa humana. O mecanismo exato de transmissão do bacilo em seres humanos não foi completamente elucidado, mas acredita-se que ocorra principalmente através do contato com secreções das vias respiratórias de indivíduos infectados (5). Um dos principais problemas para a redução da ocorrência de casos novos de hanseníase é o diagnóstico tardio e, consequentemente, a transmissão ativa da doença de indivíduos não tratados para os contatos (indivíduos saudáveis em estreita proximidade com indivíduos infectados).

1.2 História da Hanseníase

A hanseníase é uma doença mítica e milenar cuja história sobre a sua origem e disseminação acompanha a história da humanidade (6, 7) Os primeiros relatos da hanseníase provêm de papiros egípcios datados de mais de 4.000 antes de Cristo (a.C) (8). Além disso, relatos muito antigos indicam que a "lepra" provavelmente existiu em populações humanas no Egito (9), Índia (7) e China (10), embora a doença pode muitas vezes ter sido confundida com outras manifestações dermatológicas. Os mais antigos registros escritos da hanseníase estão presentes

nos textos indianos *Sushruta Samhita* datados cerca de 600 a.C., que descreve com precisão as características e diagnóstico de hanseníase (11). Restos de esqueletos continuam sendo o indicador mais confiável, para se observar as deformidades características da hanseníase (**Figura 1 – a e b**) (11).

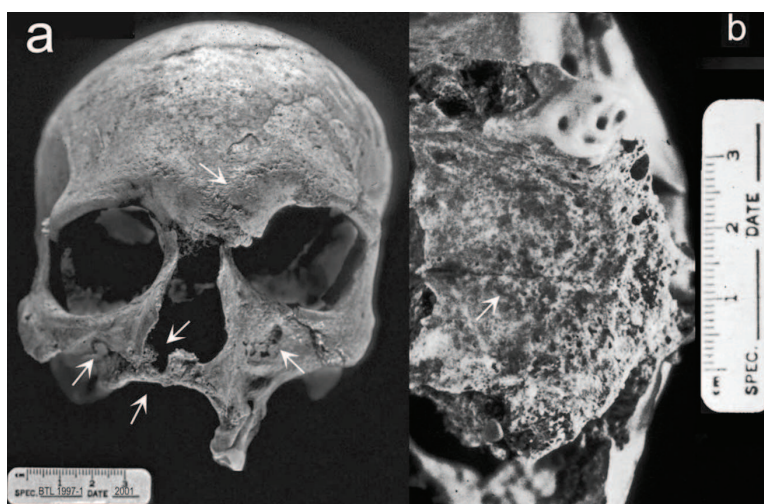


Figura 1. Crânio humano fossilizado apresentando lesões erosivas na região da glabella, remodelação da abertura nasal e necrose bilateral da maxila (**a**) alterações no palatino (**b**). Fonte: (7).

Hipóteses recentes indicam que muito provavelmente a hanseníase teve sua origem no leste do continente Africano, do ponto de vista evolutivo, mesmo local onde surgiu o homem moderno; acredita-se que as rotas migratórias foram responsáveis pela disseminação da doença para Índia, Ásia e continente Europeu. Posteriormente, a doença foi disseminada no continente Americano através das navegações de colonização e de expansão comercial (12, 13).

Uma maneira de refazer a história da hanseníase foi examinar os genomas de isolados de *M. leprae* coletadas em diversas regiões geográficas, que identificou polimorfismos raros presentes em apenas algumas cepas do globo, que puderam ser usados para se estimar a rota de disseminação da doença (**Figura 2**). Mais recentemente, um estudo de genômica comparativa analisou cepas de *M. leprae* antigas frente a linhagens modernas, representando diversos genótipos e regiões geográficas: as comparações revelaram uma notável conservação genômica durante os últimos 1000 anos, indicando que a variabilidade do bacilo é baixa (14).

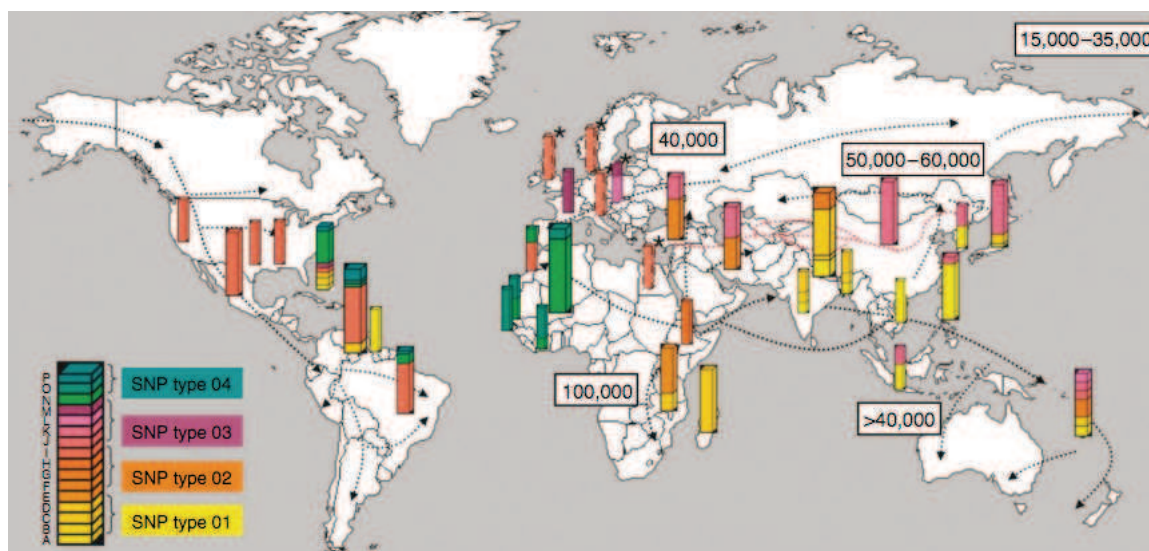


Figura 2. Gráfico da disseminação da hanseníase no mundo – a distribuição do bacilo acompanha as rotas migratórias humanas (indicadas pelas setas) (13).

Durante a Idade Média a “lepra” não designava apenas uma doença, mas a um conjunto de enfermidades dermatológicas de cunho visual semelhante, como vitiligo, psoríase e pênfigo (15), contribuindo assim para a perpetuação do forte estigma psicossocial observado nos portadores de hanseníase.

Desde os escritos bíblicos, no antigo testamento, o termo “lepra” conta com aproximadamente 50 citações, sobre tudo no livro Levítico (16) que relata uma breve descrição a respeito da identificação dos casos de “lepra” e o que deveria ser feito com os indivíduos portadores da doença:

“Quando um homem for atingido pela lepra; será conduzido ao sacerdote, que o examinará. Se houver na sua pele um tumor branco, e este estiver branqueando o cabelo, e aparecer em carne viva o tumor, é lepra inveterada na pele do seu corpo; o sacerdote o declarará impuro; não o encerrará, porque é imundo”

Sendo assim, feito o diagnóstico da doença por um sacerdote, o “leproso” era submetido a uma cerimônia que solenizava a sua exclusão social, nesta ocasião o doente era vestido com uma mortalha e levado em procissão até a igreja onde era rezada uma missa fúnebre de corpo presente. Por sua vez, o padre deveria colocar terra retirada do cemitério na testa do paciente, indicando que a partir daquele

momento ele estaria morto para a sociedade. O “leproso” então era conduzido à sua nova moradia, o leprosário, onde deveria habitar fora dos limites da comunidade. Aos “leprosos”, instruções eram impostas tais como: o uso de vestimentas longas, de luvas e de um grande chapéu a fim de encobrir as deformidades do seu corpo e de sua face, bem como uma sineta ou matraca para anunciar a presença de um “leproso” (17, 18).

Historiadores acreditam que certamente a hanseníase foi endêmica na Europa e o ápice global foi entre os séculos XII e XIII, enquanto a redução da doença ocorreu na Europa em meados dos séculos XIX e XX, sendo a Noruega, um dos últimos países europeus a eliminar a doença (11).

O forte estigma associado à “lepra”, gerado na antiguidade, permanece em nossa sociedade até os tempos atuais. No Brasil, a doença permanece como um problema de saúde pública, e a segregação compulsória foi abolida somente em 1962. No entanto, muitos moradores permanecem nesses locais, pois não foram adaptados socialmente. O decreto N. 76.078/1975 e posteriormente a lei N. 9.010/1995 torna obrigatória a substituição da terminologia “lepra” e seus derivados por hanseníase, divergindo da nomenclatura mundial, e visando diminuir o preconceito contra os portadores da doença. Além destes, a medida provisória N. 373/2007 reconheceu a pensão vitalícia aos hansenianos.

1.3 Epidemiologia

1.3.1 Prevalência

A hanseníase tem sido um fardo para a humanidade há milhares de anos, e apesar dos esforços globais para sua redução e eliminação, a doença permanece endêmica em alguns países em desenvolvimento, com destaque para Brasil e Índia, que apresentam os maiores índices absolutos de casos. Inicialmente a proposta da OMS consistia na redução da prevalência para menos de um caso a cada dez mil habitantes (1/10.000 habitantes) até o ano 2000, porém, em 2012, três países ainda não haviam atingido essa meta, incluindo o Brasil (**Figura 3**) (19).

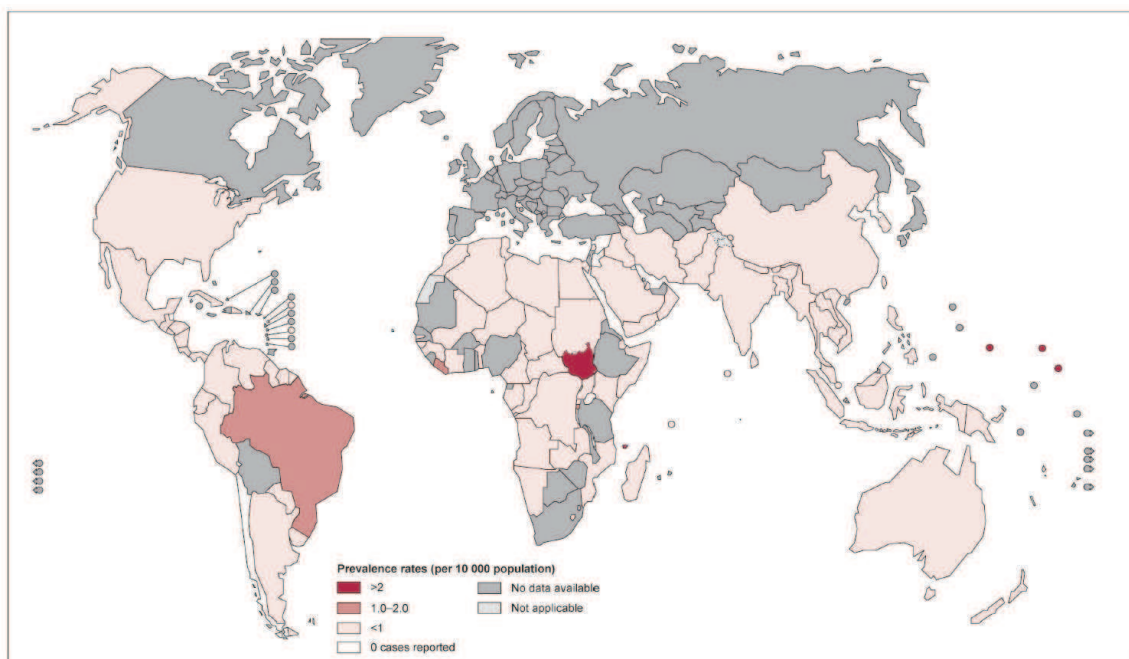


Figura 3. Gráfico de prevalência de hanseníase no início de 2012. O Brasil ficou entre 1 - 2 casos/10.000 habitantes, ainda fora da meta de eliminação da OMS. Fonte: (20).

Segundo indicadores do Ministério da Saúde, observa-se, que os estados do Mato Grosso, Maranhão e Tocantins apresentam coeficiente de prevalência alto (entre 5 e 9,99 casos/10.000 habitantes) (**Figura 4 – A**). Por sua vez, observa-se uma padrão espacial de concentração da prevalência da hanseníase por municípios (**Figura 4 – B**). Aqueles de endemidade mais elevada estão localizados no entorno da Amazônia brasileira, especialmente em Rondônia, Mato Grosso, oeste de Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Tocantins e sudoeste do Pará (21).

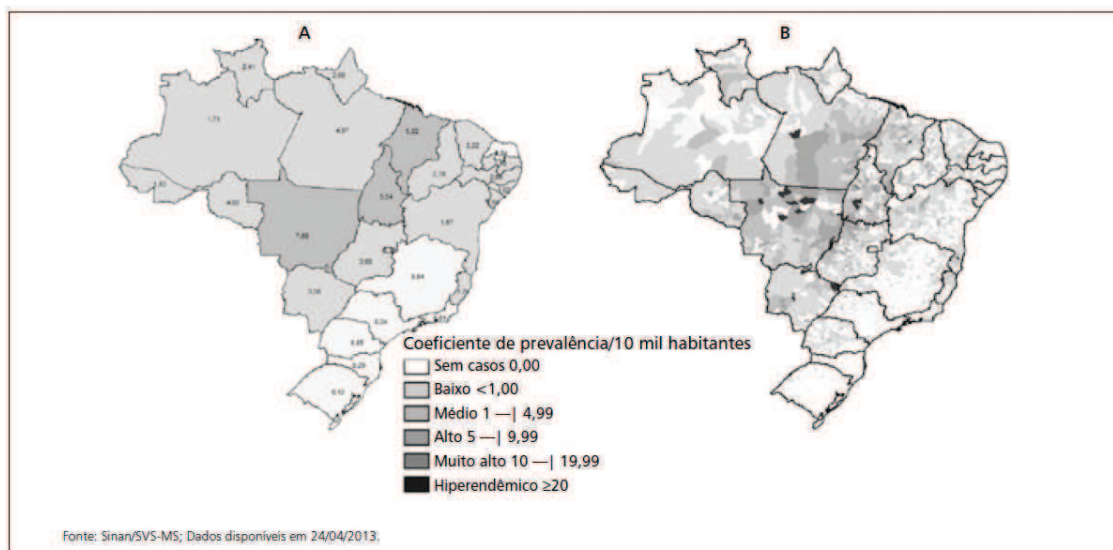


Figura 4. Coeficiente de prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes nas Unidades da Federação Brasileira **(A)** e municípios **(B)**. Fonte: (21).

1.3.2 Incidência

Apesar da diminuição na prevalência, as taxas de incidência (novos casos/100.000 habitantes) da hanseníase mantiveram-se estáveis nos últimos anos e, somente no ano 2012, foram registrados 232.857 novos casos de hanseníase no mundo (19). O Brasil, atualmente, ocupa o primeiro lugar mundial na taxa de incidência (16,76), seguido pelo Sudão (16,61), Nepal (12,71) e Índia (10,89) **(Figura 5)**.

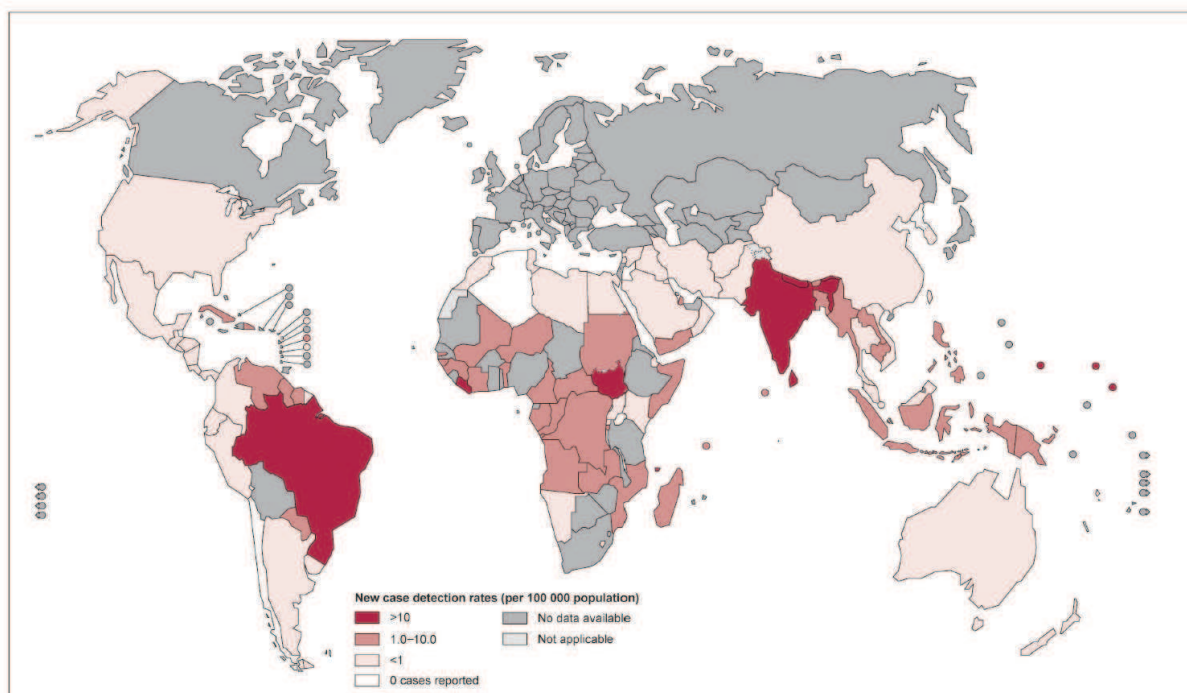


Figura 5. Gráfico da taxa de incidência de hanseníase no início de 2012. O Brasil ficou com a taxa de detecção >10 casos/100.000 habitantes, ainda fora da meta de eliminação da OMS. Fonte: (19).

Entre os novos casos registrados no mundo, 8,5% (20.200) ocorreram em crianças, indicando a transmissão ativa da doença. Nas Américas, foram registrados 2.549 casos em crianças; destes, 2.420 (94,9%) foram notificados pelo Brasil (19). Outro índice epidemiológico relevante a ser observado é a incapacidade física de grau 2: de acordo com a OMS, no Brasil foram detectados 2.234 casos em 2012, indicando diagnóstico tardio, consequentemente, transmissão da doença (19).

Segundo indicadores epidemiológicos do Ministério da Saúde (MS), a maior concentração de detecção de novos casos da doença em nosso país está nos estados das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste, com taxas de incidência em 2012 de 42.24, 40.04 e 25.78/100.000 habitantes, respectivamente, configurando hiperendemicidade (21) (**Figura 6**). É possível observar que determinadas regiões geográficas concentram bolsões de pobreza e além disso, acredita-se que os fatores históricos, sócio-econômicos e cultural possam contribuir para o ocorrência concentrada de casos.

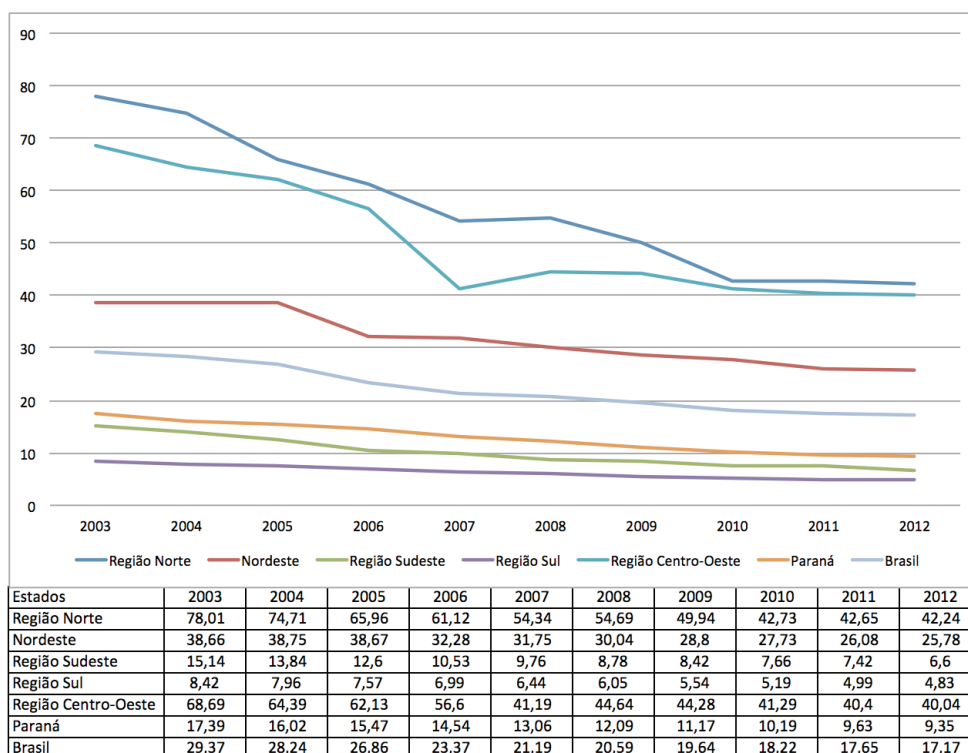


Figura 6. Coeficiente de detecção da hanseníase por 100.000 habitantes segundo regiões geográficas entre 2002 à 2012. Fonte: (21).

No estado do Paraná, entre período de 2003 a 2012, o coeficiente de detecção variou de 17.39 a 9.35/100.000 habitantes, apresentando uma classificação “alta” em 2012, segundo parâmetros oficiais (21).

Recentemente, o Ministério da Saúde definiu sua diretrizes para os anos de 2013 – 2015 e o principal objetivo dos programas de controle da hanseníase será fortalecer a promoção e, a vigilância em saúde visando aumentar a proporção de cura nas coortes detectados em casos novos de hanseníase, bem como garantir os exames dos contatos intradomiciliares para garantir o diagnóstico precoce da hanseníase (22).

1.4 Agente Etiológico

O *M. leprae* é uma bactéria que pertence ao gênero *Mycobacterium*, da classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales* e da família *Mycobacteriaceae* (23).

Esta família inclui cerca de 200 espécies e mais de 600 cepas. No entanto, apenas 20 espécies são consideradas potencialmente patogênicas para os seres humanos: *M. africanum*, *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. avium paratuberculosis*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasism*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* e *M. ulcerans* (24).

Morfologicamente o *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, gram positivo, álcool-ácido resistente (BAAR). Normalmente, apresenta um formato reto ou ligeiramente curvado, com comprimento médio entre 1 - 8 µm e 0.3 – 0.6 µm de largura, podendo ser observado isoladamente ou em globias (agrupamento característico do *M. leprae*). Entre as micobactérias, o *M. leprae* é o único que infecta nervos periféricos, e apresenta tempo de duplicação extremamente lento: entre 12 – 14 dias em temperatura ótima de 30 – 32°C (24).

Por microscopia eletrônica, observa-se que o envoltório celular do *M. leprae* é constituído basicamente pela parede celular (camada exterior e camada interior) e membrana plasmática. Estes elementos desempenham um papel crucial na adaptação intracelular, modulação imunológica e defesa contra as atividades microbidas do sistema imunológico, bem como barreiras permeáveis para a absorção de nutrientes e drogas (24).

Até o presente momento, o *M. leprae* não é cultivável *in vitro* utilizando meios sólidos, o que constitui um fator limitante no entendimento da infecção e da modulação a resposta imunológica do hospedeiro - é possível apenas mantê-lo vivo em meios líquidos ou em culturas de macrófagos por um curto período de tempo. Os modelos animais, especialmente em tatus e camundongos, vem sendo sugeridos para manutenção e multiplicação do bacilo para fins experimentais. Atualmente, inoculação de *M. leprae* em camundongos atímicos (nude), imunologicamente deficiente de células T, têm resultado em formação de granulomas com quantidades significativas de bacilos viáveis (25, 26).

1.5 Transmissão

Ainda hoje, o mecanismo exato de transmissão do *M. leprae* em seres humanos não foi completamente elucidado, mas devido a fisiologia do bacilo, que apresenta baixa virulência e baixa infectividade, acredita-se que ocorra principalmente através do contato com secreções das vias respiratórias de indivíduos infectados não submetidos ao tratamento com a poliquimioterapia (PQT) (5, 27). Suportando esta hipótese, estudos detectaram o ácido desoxirribonucleico (DNA) do *M. leprae*, por reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de mucosas (28), pele e secreções nasais (29, 30) de pacientes e indivíduos saudáveis. Sendo assim, um dos principais problemas para a redução da ocorrência de casos novos de hanseníase é o diagnóstico tardio e, consequentemente, a transmissão ativa da doença para os contatos intradomiciliares (indivíduos saudáveis em estreita proximidade com indivíduos infectados), bem como para vizinhos e pessoas do convívio social. O risco relativo estimado para a hanseníase foi de cerca de nove vezes maior para os contatos intradomiciliares de pacientes multibacilares, frente a quatro vezes maior para contatos de pacientes paucibacilares (31); esta observação reforça a ideia que a vigilância dos contatos é uma estratégia profilática no controle da hanseníase.

Embora a hanseníase afete ambos os sexos, é interessante observar que, em diferentes regiões geográficas, os homens são afetados mais frequentemente que as mulheres, muitas vezes, na proporção de 2:1 (32-34).

Sabe-se, que os seres humanos são considerados o principal reservatório natural do *M. leprae*, embora a doença tenha sido relatada em outros animais, em particular, o tatu (35). O impacto de tatus afetados com hanseníase nos humanos é difícil de mensurar, porém um estudo realizado em Arkansas, Louisiana, Mississippi e Texas demonstrou a possibilidade dos tatus silvestres serem uma reservatório do *M. leprae* (36). Posteriormente, o mesmo grupo, relatou casos de pacientes com hanseníase no sul dos Estados Unidos, sem histórico de exposição externa, infectados com a mesma cepa do *M. leprae* de tatus selvagens capturados na região. Este achado indica a possibilidade da hanseníase ser uma zoonose neste região (37).

Outras possíveis rotas alternativas de transmissão vem sendo propostas, incluindo a detecção de *M. leprae* viável em amostras de solo de áreas endêmicas (38, 39), bem como em amostras de água (40). Contudo, não há evidência de relevância epidemiológica de nenhum desses modelos alternativos.

1.6 Patogênese

A exposição ao *M. leprae* é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da hanseníase. Sendo assim, após a exposição do indivíduo ao bacilo, a patogênese da hanseníase pode ser dividida em dois estágios principais: no primeiro, os indivíduos são expostos ao bacilo, porém não desenvolvem a infecção, esses são ditos indivíduos não susceptíveis. Por outro lado, os indivíduos intrinsecamente susceptíveis desenvolvem a infecção, porém parte destes evoluem para a cura espontânea (41, 42). Estes indivíduos são descritos como susceptíveis a hanseníase *per se*, isto é, independente da sua manifestação clínica. Indivíduos que não curam espontaneamente avançam para o segundo estágio, no qual a doença se manifesta clinicamente, de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro (42).

Em 1966, Ridley e Jopling (41), propuseram um sistema de classificação da hanseníase envolvendo critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos. Segundo este sistema, as formas clínicas da hanseníase são distribuídas em dois polos e três formas intermediárias. Em um polo deste espectro encontra-se a forma tuberculóide (TT), localizada, com lesões bem definidas, ausência de bacilos na pele e nervos, associada com uma forte resposta imunológica do tipo Th1 e reação positiva ao Teste de Mitsuda. No polo oposto está a forma lepromatosa (LL), sistêmica, com múltiplas lesões de pele, presença de bacilos em pele e nervos, associada com uma resposta imunológica do tipo Th2 e reação negativa ao Teste de Mitsuda. Entre os polos, há três formas intermediárias denominadas *borderline*: *borderline* tuberculóide (BT) *borderline borderline* (BB) e *borderline* lepromatosa (BL); da primeira à última, ocorre uma progressiva redução da resposta imunológica mediada por células, acompanhada pelo aumento da carga bacilar, nível de anticorpos anti PGL-1 (específico para *M. leprae*), lesões cutâneas e de nervos periféricos (43). A forma

indeterminada (I) também foi proposta como sendo um estágio transitório que evolui para uma das cinco formas do espectro de manifestações das formas clínicas proposto por Ridley e Jopling (**Figura 7**).

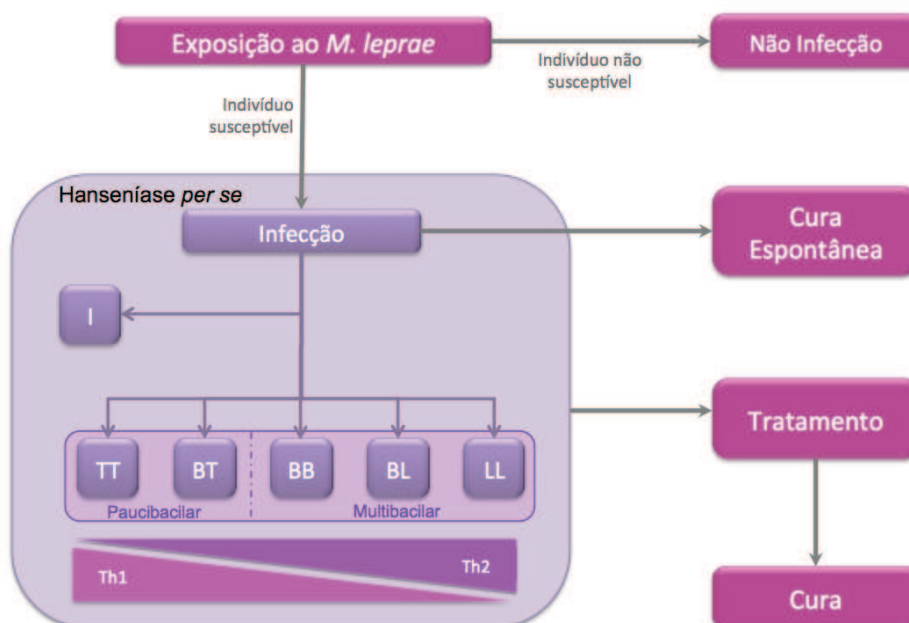


Figura 7. Patogênese da hanseníase. Fonte: Adaptado de (2).

Para fins operacionais e de orientação terapêutica, a OMS estipulou uma classificação em apenas dois grandes grupos: os multibacilares (MB) e paucibacilares (PB). Todos os pacientes devem ser classificados de acordo com o índice baciloscópico e número de lesões na pele. Os pacientes BB, BL e LL geralmente são MB, apresentam baciloscopia positiva e seis ou mais (≥ 6) lesões cutâneas; os pacientes BT e TT são PB, que por sua vez apresentam baciloscopia negativa e menor ou igual a cinco (≤ 5) lesões cutâneas (44).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é clínico e laboratorial (baciloscopia e/ou histopatologia); se necessário, outros exames laboratoriais podem ser utilizados. A anamnese deve incluir a avaliação de lesões de pele e palpação dos nervos periféricos, juntamente com a avaliação sensorial e motora (42). Em regiões

hiperendêmicas que não dispõe de recursos laboratoriais, o diagnóstico é essencialmente clínico e, para fins de tratamento, conta-se o número de lesões cutâneas. Os casos com até cinco lesões são considerados PB, e aqueles que apresentam número de lesões superior são classificados como MB (35).

Um dos primeiros testes a seres implementados para auxílio no diagnóstico e/ou classificação da hanseníase foi o Teste de Mitsuda; no entanto, hoje este teste não está sendo realizado em alguns estados brasileiros devido a escassez da lepromina (suspensão esterilizada de bacilos de hanseníase mortos pelo calor). O teste consiste na aplicação de 0,1 mL de lepromina intradérmicamente, na face anterior do antebraço. O resultado é observado após 21 – 28 dias da injeção, em leitura tipicamente binária, negativa ou positiva. A reação é negativa quando a medida do nódulo inflamatório for menor que 3,0 milímetros, e positiva quando o nódulo inflamatório apresentar diâmetro ≥ 3 milímetros (41) (45). Os pacientes LL mostram-se negativos ao teste, enquanto os paciente TT possuem reação positiva a lepromina.

O exame baciloscópico de esfregaços cutâneos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e/ou lesões) é um procedimento laboratorial rápido e de baixo custo. A coloração é feita pelo método de Ziehl-Neelsen e a avaliação através do índice baciloscópico (IB), que varia de 0 a 6. O IB é um parâmetro diretamente relacionado com a carga bacteriana, e reflete o número estimado de todas as bactérias (independente de sua forma) presentes em um esfregaço (46). É realizado através da contagem do bacilo em uma série de 100 campos sob objetiva em óleo de imersão, como proposto por Ridley e Jopling (**Tabela 1**) (41).

Tabela 1. Índice baciloscópico (IB) para 100 campos microscópicos.

IB	Leitura
0	Ausência de BAAR em 100 campos microscópicos
1+	1 - 10 de BAAR em 100 campos microscópicos
2+	10 - 100 de BAAR em 100 campos microscópicos
3+	100 - 1.000 de BAAR em 100 campos microscópicos
4+	1.000 - 10.000 de BAAR em 100 campos microscópicos
5+	10.000 - 100.000 de BAAR em 100 campos microscópicos
6+	> 100.000 de BAAR em 100 campos microscópicos

A correlação entre a baciloscopia e a clínica é de fundamental importância para o diagnóstico da hanseníase. A baciloscopia mostra-se (IB=0) na TT; por sua vez, apresenta-se fortemente positiva, com presença de volumosas globias (IB=+6) na LL, e apresenta valores variáveis nas formas BT, BB e BL. Na forma I, os bacilos estão ausentes ou muito escassos (41).

A histopatologia, é um procedimento auxiliar para o diagnóstico da hanseníase: o paciente é submetido a biópsia de pele ou nervos, nas quais é possível observar os aspectos morfológicos do tecido, bem como a presença de infiltrados celulares (47).

Imunoensaios para detecção de anticorpos IgM contra o antígeno Glicolípido Fenólico-1 (PGL-1), específico do *M. leprae* podem ser empregados como ensaios alternativos de diagnóstico. A detecção do anticorpo anti PGL-1 é realizada através da análise do soro do paciente pelo teste de ELISA (do inglês, "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*"), e o nível detectado de PGL-1 correlaciona-se com a carga bacilar (48, 49). Os pacientes PB, em sua maioria, apresentam resultados negativos, enquanto, os pacientes MB são soro-positivos (49-51). Apesar do teste apresentar uma baixa sensibilidade e alta especificidade, os dados sorológicos vem sendo de grande ajuda para classificação clínica e possível definição da terapia medicamentosa. Testes rápidos para detecção de anticorpos anti PGL-1 vem sendo propostos (49), no entanto, estes precisam ser validados para possível implementação laboratorial em massa.

A recente introdução da metodologia de PCR como ferramenta de diagnóstico laboratorial da hanseníase, propiciou a detecção rápida e sensível do *M. leprae* a partir de amostras de *swab* nasais (52), biópsia de pele (53). A técnica apresenta 100% de especificidade e 90% de sensibilidade em pacientes com a forma multibacilar da doença; nos paucibacilares, a sensibilidade oscila entre 34% à 80% (54). A associação entre a clínica e dados de PCR e outros exames laboratoriais disponíveis pode ter grande utilidade na elucidação dos casos de hanseníase de difícil diagnóstico clínico.

Mais recentemente, testes específicos de PCR quantitativa (qPCR) vem substituindo a PCR convencional, com melhora na especificidade e sensibilidade na quantificação de DNA bacteriano e/ou conteúdo de cDNA de amostras clínicas (55-57).

1.8 Tratamento e Profilaxia da Hanseníase

A busca de tratamento efetivo para a cura da hanseníase exigiu grandes investimentos, principalmente no século passado. Na década de 50, o tratamento era feito por monoterapia baseada no antibiótico dapsona (sulfona), sendo este o tratamento padrão para os paciente MB e PB. No entanto, esta estratégia resultou no aparecimento de cepas de *M. leprae* resistentes à dapsona em algumas regiões, chegando a 40 – 70% dos novos casos diagnosticados (58, 59). Na década de 70, a rifampicina, muito eficaz no combate ao *M. leprae*, passou a ser utilizada como monoterapia no tratamento da hanseníase. No entanto, em 1976, foram relatados os primeiros casos de resistência a rifampicina (60). Sendo assim, a partir de 1981, a OMS passou a recomendar o uso da PQT para o tratamento efetivo da hanseníase. A PQT é composta pelos medicamento rifampicina, dapsona e clofazimina, e a combinação destes é adaptada para a forma clínica apresentada pelo paciente (61).

Desde 1995, a PQT é disponibilizada global e gratuitamente para todos os pacientes com hanseníase. Pacientes MB devem ser tratados com dapsona, rifampicina e clofazimina por 12 meses; pacientes do grupo PB devem ser tratados com dapsona e rifampicina por 6 meses (para uso pediátrico, as doses são ajustadas) (61, 62) (**figura 8**).

PQT

Cada blister contém medicação para 4 semanas de tratamento.

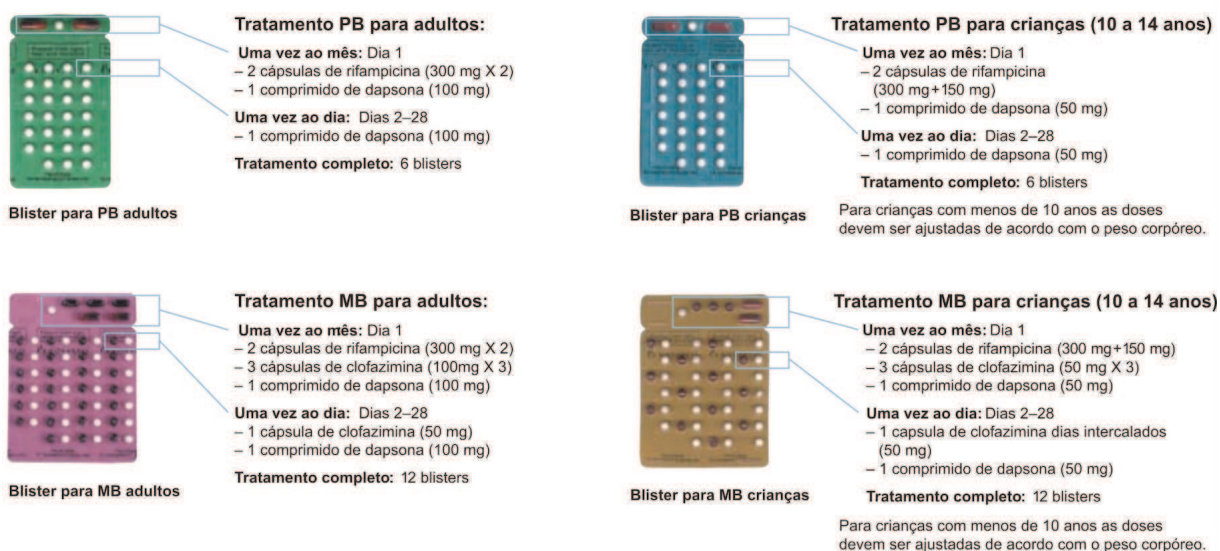


Figura 8: Esquema recomendado e tempo de tratamento com a PQT. Fonte: (62).

O tratamento com PQT é considerado eficaz na quase totalidade dos casos. No entanto, relatos de resistência tem sido reportados na África, Ásia, e América do Sul (63), conforme detectada através da análise molecular de variantes dos genes *folP2*, *rpoB* e *gyrA* associadas a resistência a dapsona, rifampicina e quinolonas (ofloxacina), respectivamente (64-66). Sendo assim, nos casos de reação alérgica ou de cepas resistentes principalmente à rifampicina, existe tratamento alternativo com quinolonas (ofloxacina, pefloxacina, sparfloxacina e moxifloxacina), tetraciclina (minociclina) e macrolídeos (claritromicina).

A vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), eficaz na prevenção da tuberculose, tem sido utilizada para prevenção da hanseníase. No entanto, estudos mostram que o nível de proteção desenvolvido contra a hanseníase a partir do emprego da vacina BCG varia entre as populações (67). Apesar de promissores, as razões para variações na qualidade das imunizações devem ser claramente compreendidas, e até o presente momento não existe uma vacina eficaz para prevenção da hanseníase.

1.9 Estados Reacionais

Estima-se que os estados reacionais (ER) podem ocorrer entre 30 – 50% dos indivíduos diagnosticados com hanseníase (54). Estes são caracterizados pela exacerbação da resposta imunológica contra o bacilo, podendo manifestar-se antes do tratamento antimicrobiano, durante este tratamento e até mesmo em pacientes que atingiram a cura terapêutica. Estes episódios, ainda pouco conhecidos cientificamente, caso não tratados rapidamente, provocam danos neurais permanentes, contribuindo para o aparecimento das deformidades físicas, especialmente de grau 2 (presença de feridas, úlceras e garra móvel nas mãos ou pés, hiperemia acentuada e fechamento incompleto dos olhos)

Os ER são divididos em dois grandes grupos: reação do tipo 1 (RT1) (ou “reação reversa”, RR), e reação do tipo 2 (RT2) (ou “eritema nodoso hansênico”, ENH) (68). Estes eventos são distintos, porém podem ocorrer em um mesmo paciente em diferentes períodos de tempo, mesmo que raramente (69). Os fatores de risco mais envolvidos com os episódios reacionais são a carga bacteriana e a forma clínica da doença. No entanto, estudos recentes mostram a influência da genética do hospedeiro na ocorrência dos estados reacionais (70, 71).

A RT1 ocorre predominantemente em pacientes classificados com a forma *borderline* da doença (BT, BB e BL); nestes pacientes, ocorre um aumento espontâneo da resposta imunológica celular e de hipersensibilidade tardia ao *M. leprae*. Frequentemente, ocorrem danos na pele e aparecimento de novas lesões, podendo apresentar o envolvimento ou não de nervos periféricos. A manifestação dos sinais e sintomas clínicos surgem rapidamente e devem ser imediatamente tratados a fim de evitar dano neural permanente (72).

A RT2 ocorre predominantemente em paciente classificados nas formas (BL e LL) da doença e se caracteriza por um aumento inesperado da resposta imunológica Th1 em pacientes com resposta Th2 (73, 74). Frequentemente, surgem lesões eritematosas na pele, formação de nódulos e pápulas de coloração vermelha a roxa, podendo tornar-se ulcerativas ou necróticas. A maioria dos pacientes apresentam febre alta (75) e dores no corpo. Da mesma forma que na RT1, é de extrema importância que a RT2 seja diagnosticada e tratada precocemente a fim de evitar incapacidades físicas permanentes.

1.10 Tratamento dos Estados Reacionais

Pacientes com hanseníase que desenvolvem ER devem iniciar terapia anti-inflamatória o mais breve possível, se necessária, concomitante à PQT, para evitar a progressão para eventuais danos neurais. Nos pacientes com RT1, é utilizada a prednisona em doses de 30-40 mg/dia, enquanto para a forma RT2, o tratamento é feito com prednisona 40-60 mg/dia, podendo estar associado a talidomida em doses diárias de 400 mg/dia; contudo, este medicamento deve ser administrado com cautela em mulheres na idade fértil, devido à sua teratogenicidade (76, 77).

1.11 Genética do *M. leprae*

O genoma do *M. leprae*, cuja sequência completa foi publicada em 2001, é formado por 3.268.203 pares de base e um conteúdo médio de G+C de 57,79%. Por sua vez, o genoma do *M. tuberculosis* tem 4.411.532 bp e 65,61% de G+C. Na comparação destes dois genomas, observa-se uma perda expressiva de genes pelo *M. leprae*, que possui apenas 49,5% do genoma contendo genes funcionais; em contraste, a capacidade codificante do *M. tuberculosis* é de 90,8% (78). Este achado pode explicar o maior tempo de duplicação e a incapacidade do cultivo do *M. leprae* *in vitro*.

O *M. leprae* sofreu redução evolutiva, e apresenta 1.116 pseudogenes distribuídos essencialmente ao acaso (**Figura 9**) (78), número elevado em comparação com outras bactérias patogênicas e não patogênicas (79). O aparecimento de pseudogenes pode indicar uma mudança brusca na evolução adaptativa do bacilo, de um modo de vida livre para um parasitismo intracelular obrigatório (13).

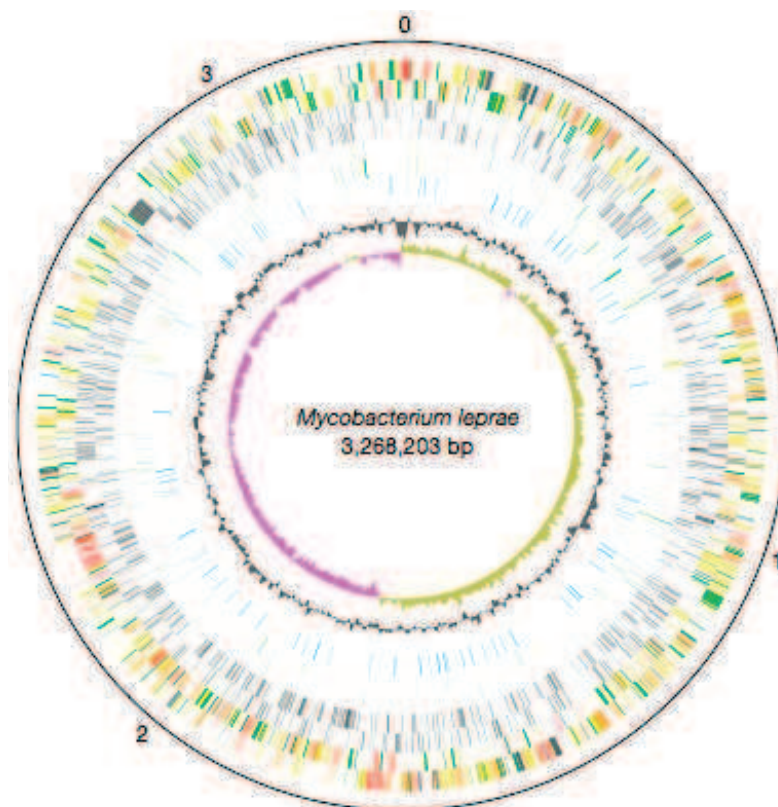


Figura 9. Mapa do genoma circular do *M. leprae* mostrando a posição e orientação dos genes, pseudogenes e sequências repetitivas. De fora para dentro: círculos 1 e 2 (sentido horário e anti-horário) genes das fitas – e +, respectivamente; círculos 3 e 4 pseudogenes; 5 e 6 genes específicos do *M. leprae*; 7 sequências repetitivas; 8 conteúdo G+C (G+C)/(G-C) desvio do conteúdo G/C. Fonte: (78).

Apesar do papel dos transcritos derivados de pseudogenes permanecerem desconhecidos, dados indicam que alguns possam estar envolvidos no processo de crescimento celular, organogênese (80), regulação da infecção e parasitismo intracelular (79). Assim, a função reguladora dos pseudogenes do *M. leprae* pode ser uma ferramenta importante na capacidade de sobrevivência do bacilo, mesmo com um número limitado de genes funcionais.

No contexto da genética de susceptibilidade à hanseníase, uma das principais contribuições do sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* foi a observação de que diferentes cepas do patógeno, distribuídas em regiões geográficas distintas e em diferentes períodos de tempo, apresentaram baixa variabilidade (**Figura 2**) (12, 14). Isso reforça a importância de estudos de fatores de risco genéticos do hospedeiro no controle da susceptibilidade à hanseníase, a fim de permitir um melhor entendimento dos fenótipos e endofenótipos da hanseníase.

1.12 Genética da Susceptibilidade Humana a Fenótipos da Hanseníase

A epidemiologia genética humana evoluiu de uma abordagem inicial de estudos sobre doenças mendelianas raras para a análise das doenças complexas, ou seja, aquelas em que a ocorrência é controlada por componentes genéticos juntamente com a ação integrada de fatores distais (ambientais, socioeconômicos e culturais).

A investigação da existência de fatores genéticos envolvidos no controle da susceptibilidade humana à hanseníase teve início no século XIX, com os primeiros estudos observacionais que indicaram a presença de um componente familiar de susceptibilidade à doença (81). Em 1972, um estudo com 102 pares de gêmeos realizado na Índia revelou maior taxa de concordância para hanseníase *per se* entre gêmeos monozigóticos (60%) quando comparados a gêmeos dizigóticos (20%). Quando avaliados frente às formas clínicas, 52% dos gêmeos monozigóticos foram concordantes, contra 15% dos gêmeos dizigóticos (15). Outro estudo relatou 83% de concordância para hanseníase *per se* em gêmeos monozigóticos quando comparados a 17% em dizigóticos (82). Estes achados indicam a existência de um forte componente genético controlando susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase *per se*, bem como seu espectro das manifestações clínicas.

No final da década de setenta, análises de segregação complexa (ASC) foram realizadas, visando a descrição do modelo de herança genética envolvido na transmissão dos fenótipos da hanseníase. Em 1988, um estudo com uma amostra populacional de 27 pedigrees multigeracionais, incluindo um total de 953 indivíduos, foi realizado na ilha caribenha de Desirade. A prevalência da doença na ilha era de aproximadamente 30/1.000 habitantes, e os pesquisadores assumiram homogeneidade dos fatores ambientais e de exposição ao *M. leprae*. Como resultado, foi detectada a presença de um gene principal envolvido na susceptibilidade a hanseníase *per se* (83). Mais recentemente, uma ASC realizada por nosso grupo, após o recrutamento completo da população da Vila Santo Antônio do Prata, Pará, (uma ex-colônia de hansenianos, geograficamente isolada, hiperendêmica para hanseníase, e objeto do presente estudo), também resultou na rejeição do modelo predominantemente ambiental no controle da susceptibilidade a hanseníase (84). Este estudo indicou a dependência familiar na presença do efeito de um gene principal juntamente com a transmissão herança mendeliana como

modelo genético ideal para explicar o enriquecimento de fatores de risco genético para susceptibilidade à hanseníase nesta população.

Os conhecimentos adquiridos nas últimas duas décadas permitiu avanços no desenvolvimento de métodos e ferramentas de análise genética molecular, como estudos de ligação envolvendo regiões genômicas candidatas, a fim de localizar genes responsáveis por determinado efeito, e estudos de associação, eficientes na identificação de alelos de risco de genes candidatos. Mais recentemente, ambos desenhos passaram a ser aplicados em *scan* genômicos completos.

O primeiro *scan* genômico de ligação para genes de susceptibilidade à hanseníase encontrou evidências de ligação entre a região 10p13 e hanseníase paucibacilar em uma amostra populacional das regiões de Tamil Nadu e Andhra Pradesh, Índia (85). Um estudo subsequente encontrou associação de um polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*) não-sinônimo (p.Gly396Ser) no exon 7 do gene *MRC1* (*mannose receptor, C type 1*), localização 10p12.33, com hanseníase *per se* e sua forma MB em dois grupos populacionais distintos do Vietnã e do Brasil (86).

Um segundo *scan* genômico de ligação para genes de susceptibilidade à hanseníase *per se* resultou na primeira identificação, por clonagem de posição, de variantes genéticas envolvidas no controle à susceptibilidade a uma doença infecciosa. A análise de ligação foi realizada em 86 famílias *multiplex* (pai, mãe e filhos) vietnamitas afetadas com hanseníase e distribuídas igualmente entre as formas clínicas PB ou MB. Em uma primeira etapa de análise, foram utilizados 388 marcadores do tipo microssatélites, e foram identificadas 11 regiões cromossômicas que mostraram evidência de ligação com hanseníase *per se*. Uma segunda etapa de análise envolvendo 89 marcadores adicionais identificou as regiões 6p21 e 6q25-q27 fortemente ligadas à hanseníase *per se* (87). Um estudo subsequente de mapeamento de alta resolução para análise de associação foi realizado na região de 6,4 mega bases (Mb) do cromossomo 6q25-q27 em uma amostra populacional independente de 197 famílias *simplex* (pai, mãe e filho) do Vietnã. Como resultado, 17 *SNPs* foram encontrados associados a hanseníase *per se* na população em estudo, todos distribuídos na região co-regulatória dos genes *PARK2* (*parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*) e *PACRG* (*PARK2 co-regulated gene*) (88). Pouco mais tarde, um estudo independente demonstrou os mesmos polimorfismos de susceptibilidade à hanseníase dos genes *PARK2/PACRG* associados com febre

tifóide e paratifóide em uma amostra populacional da Indonésia (89), sugerindo um papel destes polimorfismos no controle de outras doenças infecciosas.

Recentemente, um total de 305 *SNPs* cobrindo densamente a região candidata *PARK2/PACRG* foram genotipados em uma amostra de famílias vietnamitas, e 69 *SNPs* foram associados com a hanseníase *per se*; destes, 56 *SNPs* estavam localizados na região promotora sobrepostas destes dois genes. No mesmo estudo, foi detectada associação entre hanseníase e 24 *SNPs* da região *PARK2/PACRG* em uma amostra populacional de 364 casos e 370 controles do Norte da Índia. Importante ressaltar que dois *SNPs* (rs1333955 e rs2023004) foram replicados entre os dois grupos étnicos. Este estudo mostrou que o padrão de associação entre marcadores – um fenômeno denominado DL – e a idade de diagnóstico da amostra populacionais são cruciais para a validação dos achados originais para *PARK2/PACRG*. Com a construção dos bins (utilizando um *cut-off* de $r^2 = 0,6$) eles puderam observar diferenças nos blocos de *LD* entre as duas amostras populacionais, etnicamente distintas, analisadas com algumas regiões de concordância. Essa análise elucidou o motivo pelo qual diferentes *SNPs* desses genes foram associados com a doença em certas amostras populacionais e não em outras. Posteriormente, os autores realizaram uma estratificação da amostra populacional de acordo com a idade de diagnóstico, e observaram que a associação de marcadores da região promotora dos genes *PARK2/PACRG* com a hanseníase também são idade-dependente (90).

Um estudo envolvendo mais de 400 marcadores genéticos do complexo HLA (*Human leukocyte antigen*) encontrou forte evidência de associação entre alelos do gene *LTA* (*Lymphotoxin alpha*), mais especificadamente, o polimorfismo *LTA+80*, e susceptibilidade à hanseníase *per se* em amostras populacionais do Vietnã e da Índia. Evidência para associação foi mais forte em casos de manifestação precoce da doença (91). Outros estudos reportaram variantes do complexo HLA associadas a hanseníase *per se* e a suas formas clínicas (2) que parecem ser independentemente modificadas por polimorfismos nos genes *TNF* (92), e *DRB1* (93). Finalmente, marcadores de genes não-HLA, tais como *KIR* (19q13) (94), *SLC11A1* (2q35) (95, 96), *VDR* (12q13) (97), *IL10* (1q31) (98-100), *BCHE* (3q26) (101), *IL23R* (1p31) e *RAB32* (6q24) (102), *CUBN* (10p13) e *NEBL* (10p13) (103), *TLR1* e *TLR2* (104-106), bem como *IL6* (7p21) (71) já foram descritos em ligação e/ou associação com fenótipos da doença.

Um *scan* genômico completo de ligação realizado em uma amostra populacional chinesa composta por 23 famílias com múltiplos casos encontrou forte evidência de ligação na região 2p14 com a hanseníase. A região apresenta genes potencialmente envolvidos com a resposta imune inata, em particular o processo de endocitose, como por exemplo, *CLEC4F*, *CD207*, *ATP6V1B1*, *PPP3R1*, *ANXA4* e *AAK1*. Estes achados podem ajudar a orientar novos estudos sobre a hanseníase (107).

Mais recentemente, uma primeira varredura genômica de associação em hanseníase (*Genome-Wide Association Studies – GWAS*) foi realizada em uma amostra populacional chinesa. Inicialmente, um total de 491.883 *SNPs* foram genotipados em 706 casos e 1225 controles. Subsequentemente, 93 *SNPs* com forte evidência de associação com hanseníase foram testados em três amostras populacionais independente (caso/controle) formadas predominantemente por chineses Han. O resultado foi a identificação de 15 *SNPs* localizados em seis genes – *CCDC122* (*coiled-coil domain containing 122*), *LACC1* (*laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1*), *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*), *TNFSF15* (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15*), *HLA-DR* e *RIPK2* (*receptor-interacting serine-threonine kinase 2*) – associados com a susceptibilidade à hanseníase (108). Além disso, o gene *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*) mostrou uma tendência de associação (108). Os autores destacam que estes genes, exceto *LACC1* e *CCDC122*, na mesma via do *PARK2*.

Na tentativa de validar esses achados, Wong e cols. genotiparam os mesmos marcadores em amostras populacionais provenientes da Índia e do oeste da África (caso/controle); apenas as associações envolvendo variantes dos genes de função desconhecida *LACC1* e *CCDC122* foram validadas (109). O mesmo grupo utilizando a técnica *gene-centric* associaram os genes *TLR1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *CCDC122* e *LACC1* com hanseníase em diferentes amostras populacionais caso-controle e famílias proveniente da Índia (110). Em seguida, cinco desses genes, *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *HLA-DR* e *RIPK2*, foram validados com hanseníase *per se* em uma amostra populacional composta por 472 famílias nucleares vietnamitas (111). O gene *NOD2* também foi associado com hanseníase *per se* e estados reacionais em uma do Nepal (112).

1.13 Contextualização do Projeto

O presente projeto encontra-se inserido em uma proposta maior intitulada “Caracterização Epidemiológica e Clínica e Avaliação de Estratégias de Intervenção em Áreas Endêmicas de Hanseníase”, mais especificamente, no subprojeto voltado para o estudo da genética do hospedeiro, conforme representado nos fluxogramas das **Figuras 10 e 11**.

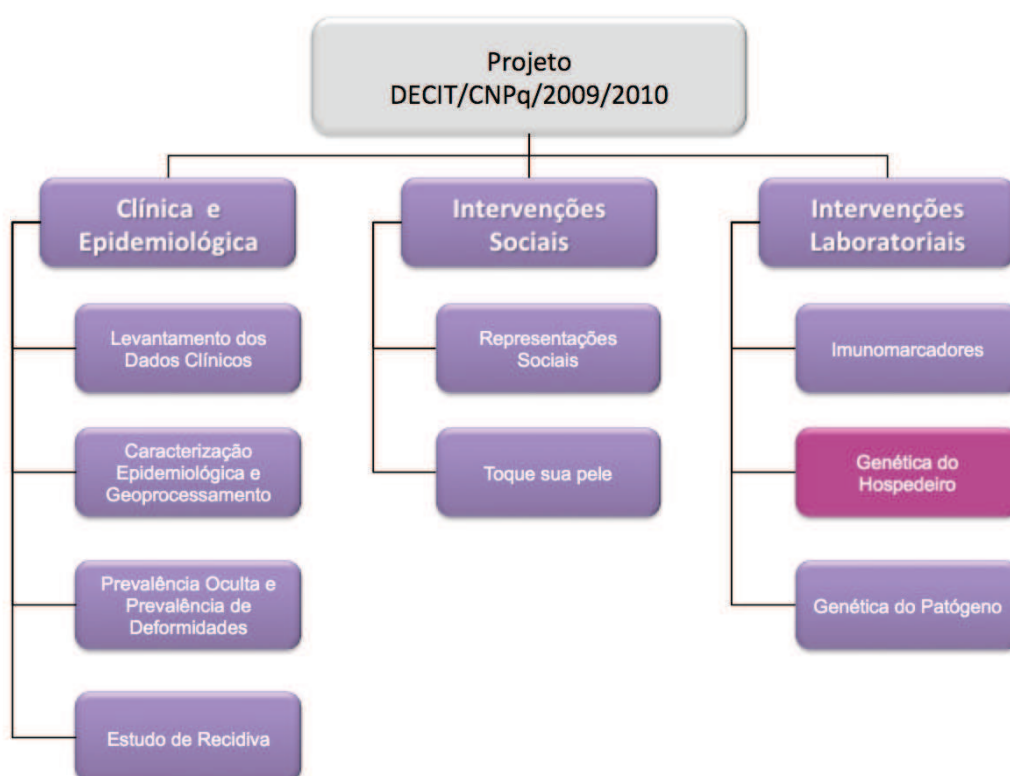


Figura 10. Desenho do estudo do trabalho “Caracterização Epidemiológica e Clínica e Avaliação de Estratégias de Intervenção em Áreas Endêmica de Hanseníase”. Em lilás, encontram-se destacados os três eixos principais e suas subcategorias; em rosa, destaca-se a genética do hospedeiro o qual o presente projeto esta inserido.

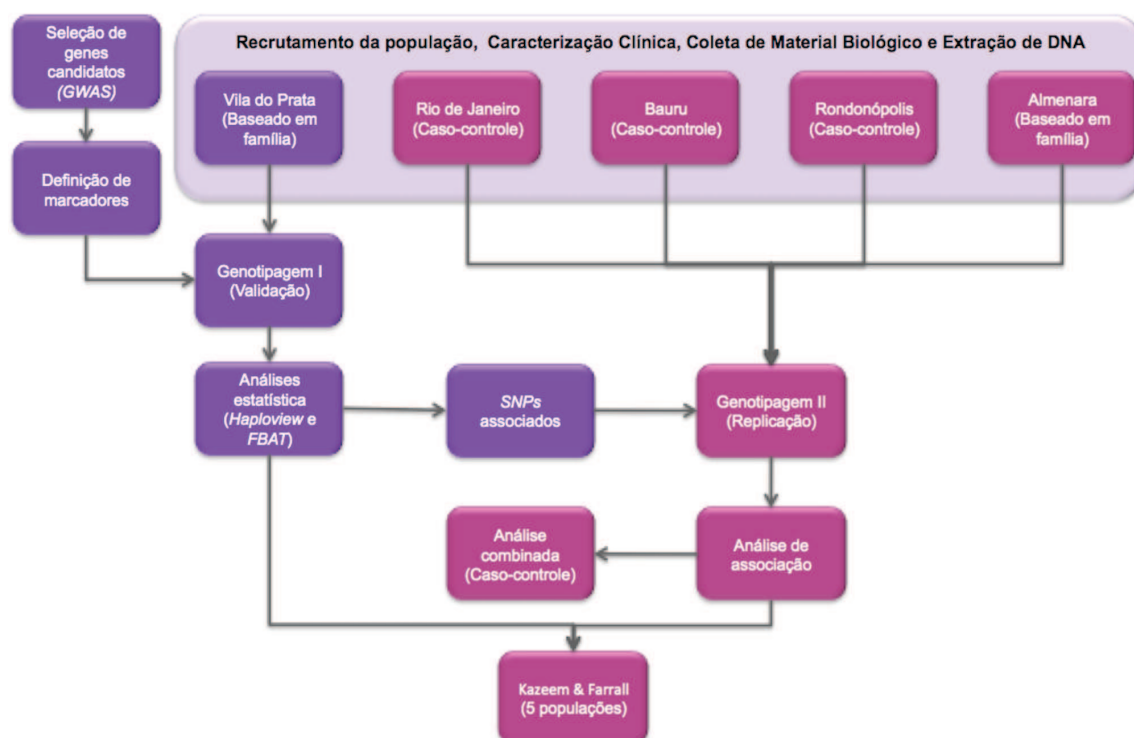


Figura 11. Desenho detalhado da etapa da “Genética do Hospedeiro” envolvendo cinco amostras populacionais. Em roxo, encontram-se destacadas as etapas de validação da população da Vila Santo Antônio do Prata (população de descoberta) do presente projeto de mestrado; em rosa, encontram-se as etapas de replicação do projeto principal.

2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase ainda é um problema de saúde pública no Brasil, onde a taxa de incidência, a mais alta do mundo ($\cong 16,76$), vem permanecendo estável ao longo dos últimos cinco anos. Um sólido corpo de evidência no campo da genética das doenças infecciosas tem se acumulado, ao longo das décadas, no sentido de confirmar que a exposição ao *M. leprae* é necessária mas não suficiente para o desenvolvimento da doença. Sabe-se que a hanseníase é uma doença complexa, pois envolve múltiplos fatores para o seu desenvolvimento, dentre os quais os fatores distais (ambientais, socioeconômicos e culturais) e os fatores proximais (imunológicos, étnicos e mais recentemente, os fatores genéticos). A baixa variabilidade encontrada no genoma do *M. leprae* sugere fortemente que variantes genéticas do hospedeiro têm um papel relevante para o estabelecimento e progressão da doença.

O primeiro GWAS em hanseníase, recentemente publicado, resultou na identificação de cinco *loci* associados com a doença: *CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR* e *RIPK2*. Apesar de representar um enorme avanço, hoje é amplamente aceito que os resultados de estudos genético-epidemiológicos originais de associação entre marcadores genéticos e fenótipos complexos precisam ser validados e replicados em estudos independentes, envolvendo populações etnicamente distintas da original. Neste contexto, até o presente momento, nenhuma validação independente dos achados do estudo chinês não HLA foi realizado em amostras populacionais brasileiras. Quando comprovada a associação dos cinco *loci* candidatos não HLA incluídos no presente estudo (*CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15* e *RIPK2*), terá se avançado no entendimento do componente genético controlando a susceptibilidade à hanseníase *per se*, consolidando-se estes genes como fortes candidatos ao controle da susceptibilidade à hanseníase em populações humanas.

3 OBJETIVO GERAL

Aplicar a ferramenta de análise de associação baseado em famílias para investigar a participação de genes candidatos com a susceptibilidade à hanseníase *per se* em uma amostra populacional composta por trios formados por um filho afetado com hanseníase e seus pais, de um isolado populacional na região Norte do Brasil, a fim de se avançar na compreensão da natureza do componente genético que controla a susceptibilidade humana à doença.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar 36 *tag SNPs*, selecionados de forma a capturar totalmente a informação dos genes candidatos *CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15* e *RIPK2*, para associação à hanseníase *per se*;
2. Avaliar a independência de eventuais sinais positivos de associação, através de análise de desequilíbrio de ligação, para todos os genes associados no presente estudo.

4 ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “*HUMAN GENETICS*”

O primeiro GWAS em hanseníase resultou na identificação de associação de 15 variantes genéticas distribuídas nos genes *CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *RIPK2* e *HLA-DR* com hanseníase *per se* em uma amostra populacional chinesa. Após a publicação deste, alguns grupos efetuaram tentativas de validar a totalidade dos achados genéticos originais, em amostras populacionais independentes utilizando como candidatos os mesmos genes e *SNPs* identificados na abordagem de larga escala. No entanto, as tentativas resultaram na validação somente de parte dos achados genéticos do GWAS e isto impulsionou o nosso grupo e nossos colaboradores a validar e replicar as associações genéticas em amostras populacionais brasileiras.

Sendo assim, a proposta do nosso trabalho foi estudar parte da totalidade dos achados do GWAS (*CCDC122-LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15* e *RIPK2*), e testá-los para associação com hanseníase *per se* em amostras populacionais brasileiras baseadas em famílias e em caso-controles. Para isso, selecionamos 36 *tag SNPs* afim de efetuar a cobertura completa dos genes candidatos na amostra populacional de descoberta – Vila Santo Antônio do Prata – e realizar um estudo de associação baseado em famílias (etapa que compreende o presente mestrado). Posteriormente, os dois *tag SNPs* que apresentaram associação nesta amostra populacional – rs8057341 do *NOD2* e o rs4942254 do *CCDC122-LACC1* – foram replicados em quatro amostras populacionais independentes – Rio de Janeiro, Bauru, Rondonópolis e Almenara. Como resultado final, a variante genética localizada no gene *NOD2* foi fortemente associada à hanseníase *per se* em três amostra populacionais (Rio de Janeiro, Bauru e Rondonópolis), enquanto a variante do *locus CCDC122-LACC1* apresentou forte associação na amostras populacionais do Rio de Janeiro e Rondonópolis. Nossos resultados, reforçam a importância do *NOD2* e do *CCDC122-LACC1* no controle da susceptibilidade à hanseníase *per se*.

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 $OR_{AA} = 0.49$,

$P = 1.39 \times 10^{-6}$; $OR_{CC} = 0.72$, $P = 0.003$, 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, Bauru, 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)
Age, years mean ($\pm$ SD)	14.1 $\pm$ 7.72	29.6 $\pm$ 14.0	42 $\pm$ 16.1	42 $\pm$ 24.5	42 $\pm$ 18.0	36 $\pm$ 10.81
Sex, <i>n</i> ^a (%)						
Female	34 (50.7)	66 (44.9)	161 (39.2)	168 (39.6)	185 (32.5)	127 (33.4)
Male	33 (49.3)	81 (55.1)	250 (60.8)	257 (60.4)	385 (67.5)	253 (66.6)
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)
Caucasian	7 (10.4)	24 (16.4)	147 (35.8)	140 (32.9)	303 (53.1)	240 (63.1)
Mestizo	49 (73.1)	107 (73.3)	247 (60.1)	266 (58.1)	48 (8.4)	104 (27.3)
WHO classification, <i>n</i> ^a (%)						
Paucibacillary	38 (56.7)	67 (48.2)	96 (23.3)	–	108 (20.0)	–
Multibacillary	23 (34.3)	72 (51.8)	310 (75.4)	–	432 (80.0)	–

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

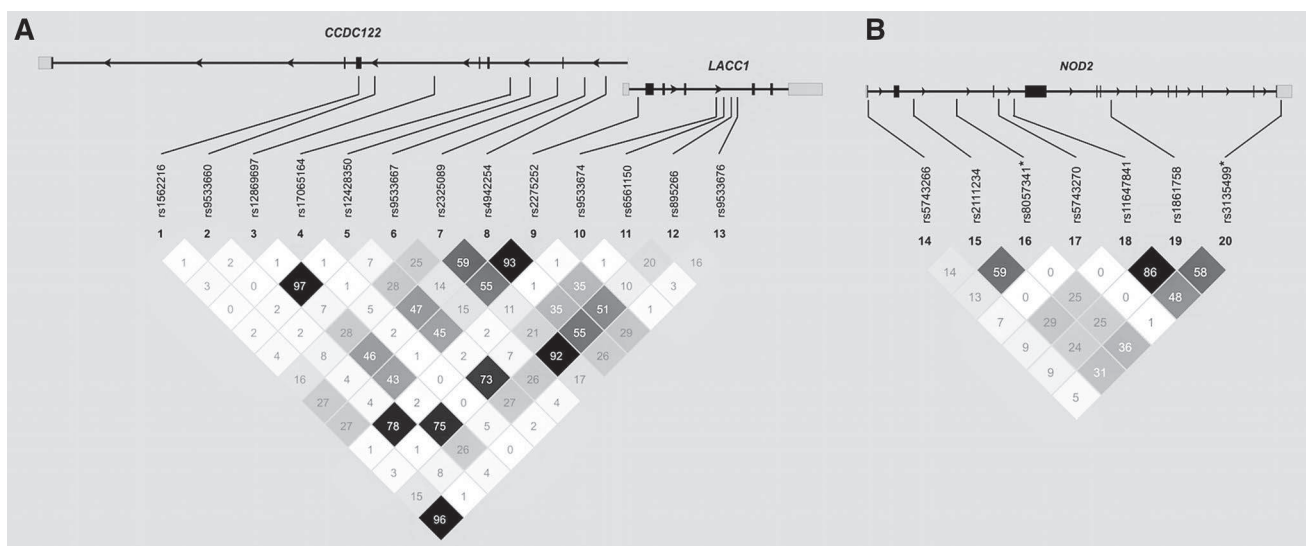


Fig. 1 Relative position and linkage disequilibrium plot (LD) patterns of markers for the coiled-coil domain containing 122 gene (*CCDC122*) and laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1 gene (*LACC1*) in Prata Village sample (a) and nucleotide-

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-alpha 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/NEJM0910690](https://doi.org/10.1056/NEJM0910690)
- 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/NEJM001451](https://doi.org/10.1056/NEJM001451) (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: anacarlal@gmail.com

Journal: Human Genetics

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-LACCI* and *NOD2* genes in a family-based study from Almenara sample.

Gene	SNP	MAF^a	Allele	Z^b	FBAT (P)^c
<i>CCDC122-LACCI</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

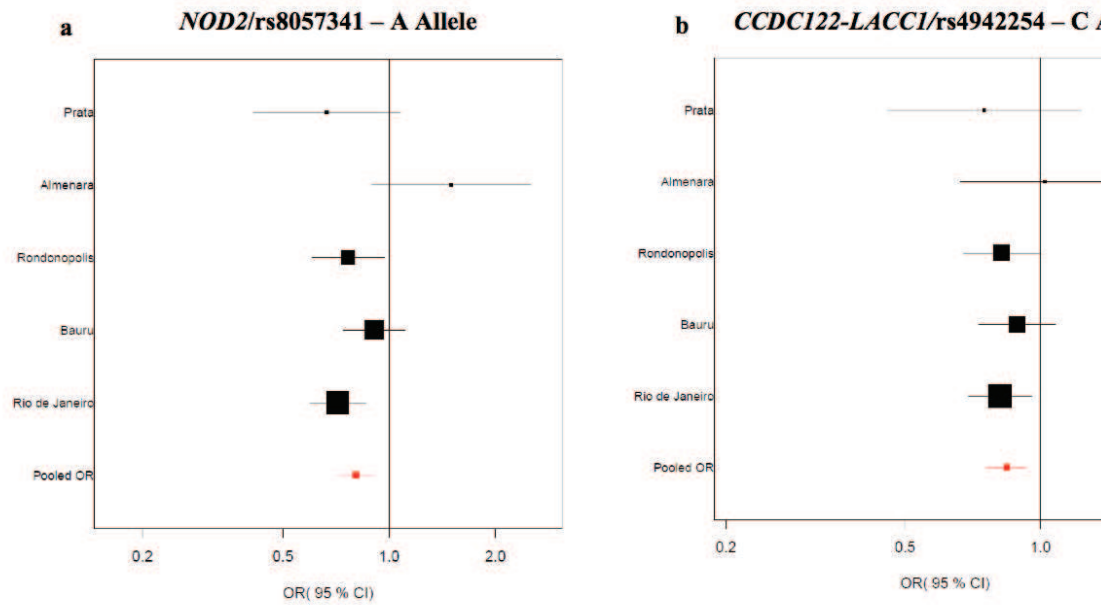


Fig. S1 Representative plots grouping our genetic studies (family-based and case-control studies) and the association of *NOD2* and *CCDC122-LACC1* SNPs with leprosy *per se*. At plot, the bars represent 95% of confidence interval (OR) values. The size of each box indicates the weight of the study in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

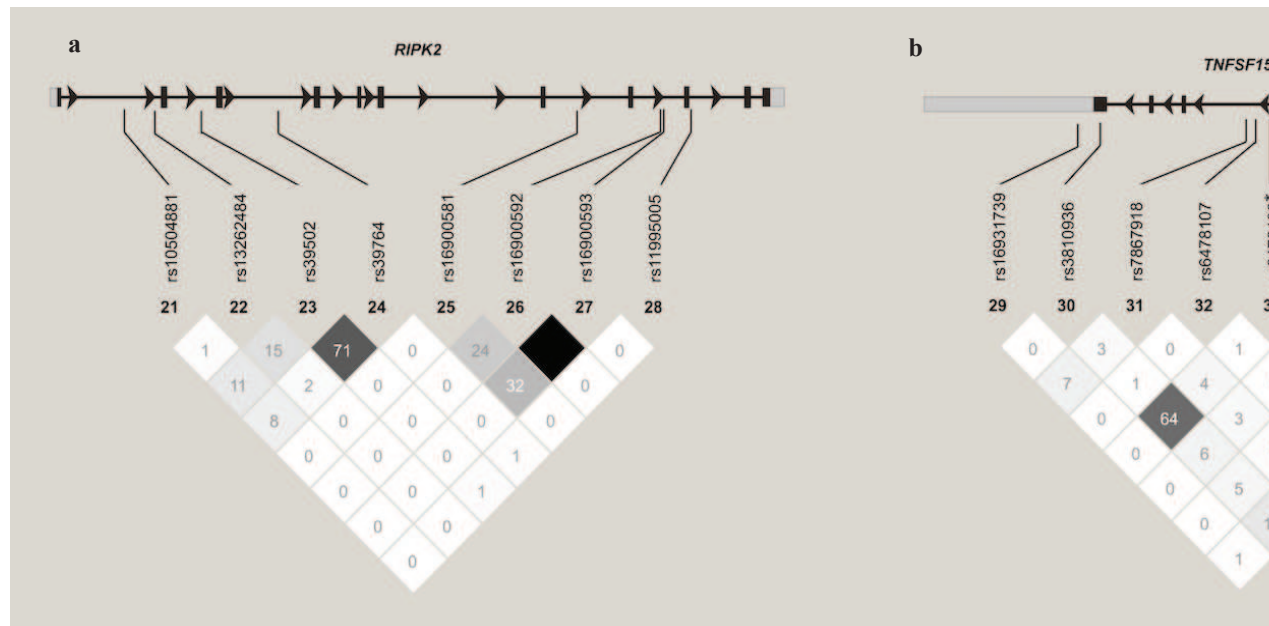


Fig. S2 Relative position and linkage disequilibrium plot (LD) patterns of markers for the receptor - Interacting Serine (RIPK2) (a) and Tumor Necrosis Factor (ligand) superfamily, member 15 gene (TNFSF15) (b) in Prata Village represent LD measured using the r^2 parameter and the intensity of shading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

5 CONCLUSÕES

1. A partir dos dados dos 36 *tag SNP* estudados podemos concluir que:

- O alelo “A” do *tag SNP* rs8057341 ($P = 0,003$) do gene *NOD2* está associado com proteção a hanseníase na amostra populacional estudada;
- Os marcadores rs2111234 ($P = 0,031$) alelo “G” e rs3135499 ($P = 0,023$) alelo “C” do gene *NOD2* apresentaram sinal de associação com hanseníase com significância estatística;
- O alelo “C” do *tag SNP* rs4942254 ($P = 0,013$) e o alelo “A” do *tag SNP* rs2275252 ($P = 0,023$) do *locus* *CCDC122-LACC1* estão associados com proteção a hanseníase na amostra populacional estudada;
- O marcador rs9533667 ($P = 0,089$) do *locus* *CCDC122-LACC1* apresentou sinal de associação com hanseníase, com significância estatística marginal;
- Os marcadores rs7862325 (alelo “G”), rs7867918 (alelo “G”) e rs6478108 (alelo “C”) do gene *TNFSF15* apresentaram respectivamente valores de P de $P = 0,060$, $P = 0,063$ e $P = 0,057$;
- Não foi detectada associação entre variantes do gene *RIPK2* e hanseníase na amostra populacional testada;

2. Através da análise dos *plots* de desequilíbrio de ligação podemos concluir que:

- Os marcadores rs2111234 e rs8057341 do gene *NOD2* encontram-se em DL moderado ($r^2 = 0,59$), sugerindo um único sinal de associação para este *locus*;
- O marcador rs2275252 do *locus* *CCDC122-LACC1* ($P = 0,023$) encontra-se em forte DL ($r^2 = 0,93$) com o marcador associado rs4942254 ($P = 0,013$), novamente sugerindo um único sinal de associação;

- O marcador rs9533667 do *locus CCDC122-LACC1* ($P = 0,089$) apresentou baixo DL ($r^2 = 0,14$) com o marcador associado rs4942254;
- Para o gene TNFSF15, três marcadores apresentaram significância estatística marginal – rs7862325, rs7867918 e rs6478108 – e todos eles se encontram em baixo DL entre si.

REFERÊNCIAS

1. Kaplan G, Cohn ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Leprosy review*. 1986;57 Suppl 2:199-202.
2. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006;8(4):1124-31.
3. Senior K. Stigma, chemoprophylaxis, and leprosy control. *The Lancet infectious diseases*. 2009;9(1):10.
4. Jay V. The legacy of Armauer Hansen. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2000;124(4):496-7.
5. Rodrigues LC, Lockwood D. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet infectious diseases*. 2011;11(6):464-70.
6. Hutchinson J. *On Leprosy and Fish Eating: a statement of facts and an explanation*. London 1906.
7. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PloS one*. 2009;4(5):e5669.
8. Tan SY, Graham C. Armauer Hansen (1841-1912): discoverer of the cause of leprosy. *Singapore medical journal*. 2008;49(7):520-1.
9. Hulse EV. Leprosy and ancient Egypt. *Lancet*. 1972;2(7785):1024-5.
10. Skinsnes OK, Chang PH. Understanding of leprosy in ancient China. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1985;53(2):289-307.
11. Cole ST, Singh P. History and Phylogeography of Leprosy. In: Nunzi E, Massone C, editors. *Leprosy - A Practical Guide* 2012.
12. Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005;308(5724):1040-2.
13. Monot M, Honore N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature genetics*. 2009;41(12):1282-9.
14. Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jager G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science*. 2013;341(6142):179-83.
15. Chakravarti M, Vogel F. A twin study on leprosy. 1973.
16. *Bíblia Sagrada*. 169 ed. São Paulo: Ave-Maria; 2006.
17. Bériac F. *Histoire des lépreux au Moyen Âge. Une société d'exclus*. 1988.
18. CUNHA VDS. *O Isolamento Compulsório em Questão. Políticas de Combate à Lepra no Brasil (1920-1941)*: Fundação Oswaldo Cruz; 2005.
19. WHO. Global leprosy situation, 2013. *Weekly epidemiological record*. 2013;35(88):365 - 80.
20. WHO. Leprosy prevalence rates, 2012 data reported to WHO as of January 2012 2012 [cited 2014]. Available from: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2011.pdf?ua=1.
21. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil - análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. *Boletim Epidemiológico*. 2013;44(11).
22. Ministério da Saúde. *Caderno de Diretrizes, Objetivos, Metas e Indicadores: 2013 - 2015* 2013. 156 p.

23. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique et technique*. 2001;20(1):21-54.
24. Clapasson A, Canata S. Microbiology. In: Nunzi E, Massone C, editors. *Leprosy: A Practical Guide* 2012.
25. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 2001;69(1):1-12.
26. Trombone AP, Pedrini SC, Diorio SM, Belone Ade F, Fachin LR, do Nascimento DC, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(85).
27. Klatser PR, van Beers S, Madjid B, Day R, de Wit MY. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. *Journal of clinical microbiology*. 1993;31(11):2947-51.
28. Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2005;44(3):311-6.
29. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;78(3):518-21.
30. Hatta M, van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;89(4):381-5.
31. van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1999;67(2):119-28.
32. Fine PE, Sterne JA, Ponnighaus JM, Bliss L, Sauji J, Chihana A, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *American journal of epidemiology*. 1997;146(1):91-102.
33. Sales AM, Ponce de Leon A, Duppre NC, Hacker MA, Nery JA, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(3):e1013.
34. Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Leprosy review*. 2004;75(4):310-26.
35. WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organization technical report series. 1998;874:1-43.
36. Truman R. Leprosy in wild armadillos. *Leprosy review*. 2005;76(3):198-208.
37. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *The New England journal of medicine*. 2011;364(17):1626-33.
38. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2008;8(5):627-31.
39. Blake LA, West BC, Lary CH, Todd JR. Environmental nonhuman sources of leprosy. *Reviews of infectious diseases*. 1987;9(3):562-77.

40. Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. Mycobacterium leprae DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. Indian journal of leprosy. 1999;71(1):61-7.
41. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1966;34(3):255-73.
42. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. Lancet. 1999;353(9153):655-60.
43. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science. 1991;254(5029):277-9.
44. WHO. World Health Organization technical report series. 1998(874):1-43.
45. Beiguelman B. Genetics and leprosy. Ciência & Saúde Coletiva. 2002;7(1):117-28.
46. Clapasson A, Canata S. Laboratory Investigations. In: Nunzi E, Massone C, editors. Leprosy: A Practical Guide 2012.
47. Antunes SL, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JA, Corte-Real S, et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2012;107(2):246-53.
48. Klatser PR, de Wit MY, Fajardo TT, Cellona RV, Abalos RM, de la Cruz EC, et al. Evaluation of Mycobacterium leprae antigens in the monitoring of a dapsone-based chemotherapy of previously untreated lepromatous patients in Cebu, Philippines. Leprosy review. 1989;60(3):178-86.
49. Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. Journal of clinical microbiology. 2003;41(5):1991-5.
50. Agis F, Schlich P, Cartel JL, Guidi C, Bach MA. Use of anti-M. leprae phenolic glycolipid-I antibody detection for early diagnosis and prognosis of leprosy. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1988;56(4):527-35.
51. Cartel JL, Chanteau S, Boutin JP, Plichart R, Richez P, Roux JF, et al. Assessment of anti-phenolic glycolipid-I IgM levels using an ELISA for detection of M. leprae infection in populations of the South Pacific Islands. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1990;58(3):512-7.
52. Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of Mycobacterium leprae in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. Leprosy review. 2003;74(1):18-30.
53. de Wit MY, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat N, et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae in skin tissues. Journal of clinical microbiology. 1991;29(5):906-10.
54. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clinical microbiology reviews. 2006;19(2):338-81.
55. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. PLoS neglected tropical diseases. 2011;5(10):e1354.

56. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(7):2124-30.
57. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(11):e328.
58. WHO expert committee on leprosy. World Health Organization technical report series. 1977(607):7-48.
59. Bobin P. Treatment and Prophylaxis. In: Nunzi E, Massone C, editors. *Leprosy: A Practical Guide*: Springer; 2012.
60. Jacobson RR, Hastings RC. Rifampin-resistant leprosy. *Lancet*. 1976;2(7998):1304-5.
61. Chemotherapy of leprosy. Report of a WHO Study Group. World Health Organization technical report series. 1994;847:1-24.
62. WHO. MDT Regimens [cited 2014]. Available from: http://www.who.int/lep/mdt/MDT_Regimens.pdf.
63. Cambau E, Chauffour-Nevejans A, Tejmar-Kolar L, Matsuoka M, Jarlier V. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType *LepraeDR*, a novel ready-to-use molecular test. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(7):e1739.
64. Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *folP1* gene and dapsone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(2):762-6.
65. Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993;37(3):414-8.
66. Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet*. 1997;349(9045):103-4.
67. Merle CS, Cunha SS, Rodrigues LC. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. *Expert review of vaccines*. 2010;9(2):209-22.
68. Naafs B, Noto S. Reaction in Leprosy. In: Nunzi E, Massone C, editors. *Leprosy - A Practical Guide* 2012.
69. Rea TH, Sieling PA. Delayed-type hypersensitivity reactions followed by erythema nodosum leprosum. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1998;66(3):316-27.
70. Fava V, Orlova M, Cobat A, Alcais A, Mira M, Schurr E. Genetics of leprosy reactions: an overview. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl 1:132-42.
71. Sousa AL, Fava VM, Sampaio LH, Martelli CM, Costa MB, Mira MT, et al. Genetic and immunological evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(9):1417-24.
72. van Brakel WH, Nicholls PG, Das L, Barkataki P, Suneetha SK, Jadhav RS, 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. *Leprosy review*. 2005;76(1):14-34.
73. Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Marlowe S, Jain S, Reddy RG, Suneetha 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. *International journal of leprosy and*

other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 2004;72(1):27-34.

74. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scandinavian journal of immunology*. 1999;50(5):541-9.

75. Gelber RH. Hansen's disease. *The Western journal of medicine*. 1993;158(6):583-90.

76. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol*. 2008;83(1):75-82.

77. Lockwood DN, Sinha HH. Pregnancy and leprosy: a comprehensive literature review. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1999;67(1):6-12.

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

79. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future microbiology*. 2011;6(1):57-71.

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

81. Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *The Journal of clinical investigation*. 1987;79(4):1139-43.

82. Ali PM. Genetic influence in leprosy. *Indian journal of public health*. 1966;10(4):145-57.

83. Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *American journal of human genetics*. 1988;42(2):256-66.

84. Lazaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(10):1598-605.

85. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nature genetics*. 2001;27(4):439-41.

86. Alter A, de Leseleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Human genetics*. 2010;127(3):337-48.

87. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nature genetics*. 2003;33(3):412-5.

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

89. Ali S, Vollaard AM, Widjaja S, Surjadi C, van de Vosse E, van Dissel JT. PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. *Clinical and experimental immunology*. 2006;144(3):425-31.

90. Alter A, Fava VM, Huong NT, Singh M, Orlova M, Van Thuc N, et al. Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. *Human genetics*. 2013;132(1):107-16.

91. Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nature genetics*. 2007;39(4):517-22.
92. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(2):530-2.
93. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes and immunity*. 2007;8(4):320-4.
94. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, de Melo FC, et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue antigens*. 2008;72(5):478-82.
95. Alcais A, Sanchez FO, Thuc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181(1):302-8.
96. Abel L, Sanchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *The Journal of infectious diseases*. 1998;177(1):133-45.
97. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(1):187-91.
98. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Human genetics*. 2005;118(2):295-300.
99. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(11):1687-91.
100. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes and immunity*. 2009;10(2):174-80.
101. Gomes HJ, Souza RL, Prevedello FC, Mira MT, Chautard-Freire-Maia EA. Investigation of Association between Susceptibility to Leprosy and SNPs inside and near the BCHE Gene of Butyrylcholinesterase. *Journal of tropical medicine*. 2012;2012:184819.
102. Zhang F, Liu H, Chen S, Low H, Sun L, Cui Y, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nature genetics*. 2011;43(12):1247-51.
103. Grant AV, Cobat A, Van Thuc N, Orlova M, Huong NT, Gaschignard J, et al. CUBN and NEBL common variants in the chromosome 10p13 linkage region are associated with multibacillary leprosy in Vietnam. *Human genetics*. 2014;133(7):883-93.
104. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clinical science*. 2008;114(5):347-60.
105. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(12):1816-9.

106. Marques Cde S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(1):120-9.
107. Yang Q, Liu H, Low HQ, Wang H, Yu Y, Fu X, et al. Chromosome 2p14 is linked to susceptibility to leprosy. *PloS one*. 2012;7(1):e29747.
108. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *The New England journal of medicine*. 2009;361(27):2609-18.
109. Wong SH, Hill AV, Vannberg FO, India-Africa-United Kingdom Leprosy Genetics C. Genomewide association study of leprosy. *The New England journal of medicine*. 2010;362(15):1446-7; author reply 7-8.
110. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS pathogens*. 2010;6:e1000979.
111. Grant AV, Alter A, Huong NT, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the Vietnamese population. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(11):1763-7.
112. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(9):1422-35.

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Susceptibilidade do Hospedeiro à Hanseníase

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) estará realizando um estudo que irá investigar o papel da genética na susceptibilidade à hanseníase (lepra) e na gravidade da doença. Se bem sucedido, o projeto poderá facilitar o tratamento da hanseníase e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, seus familiares e pessoas próximas. Este estudo será coordenado por Dr. Marcelo Távora Mira, professor adjunto e pesquisador do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR.

1) Métodos

Se você concordar em participar ou autorizar seu dependente a participar neste estudo, você responderá a uma entrevista com perguntas sobre dados pessoais, estilo de vida e saúde seus e/ou de seu dependente. Sob sua autorização, informações de prontuários clínicos também poderão ser lidas pelos cientistas e utilizadas no estudo.

2) Local do estudo

A unidade de origem deste estudo é o programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Colaboração entre a PUCPR e outros institutos de pesquisa deverão aumentar as chances de sucesso e o impacto do estudo. Portanto, está sendo requerida sua autorização para o uso de sua amostra em estudos da hanseníase envolvendo outras instituições. Sua autorização só valerá sob a condição de se manter o desenho, objetivos e metodologia do projeto original, além da avaliação e aprovação de eventuais alterações pelo Comitê de Ética da PUCPR.

3) Riscos Físicos para Saúde/Desconfortos

Não existe riscos físicos para sua saúde e/ou de seu dependente decorrente da participação neste estudo.

4) Alternativas

Se você e/ou seu dependente estiver afetado por hanseníase, acesso a procedimentos médicos para diagnóstico e tratamento da doença será providenciado mesmo que não concorde em participar ou não autorize a participação de seu dependente no estudo. Portanto, se você decidir não participar, ou cessar sua participação e/ou de seu dependente no estudo a qualquer momento, todos os procedimentos para diagnósticos e tratamento médico serão mantidos pelo Hospital Santa Casa de Misericórdia da PUCPR e instituições colaboradoras.

Se você e/ou seu dependente não estiver afetado pela hanseníase, sua decisão de participar e/ou autorizar ou não a participação de seu dependente , ou de cessar sua participação a qualquer momento, não irá interferir de nenhuma forma nos procedimentos médicos para diagnóstico ou tratamento da hanseníase que você e/ou seu dependente possa necessitar no futuro. Da mesma forma, sua decisão não irá refletir no acesso a procedimentos médicos necessários à algum familiar ou contato afetado pela hanseníase.

5) Custos para os participantes

No caso de você decidir participar ou autorizar a participação do seu dependente no estudo, você ou seu dependente não terão nenhum custo.

6) Benefícios

A longo prazo, resultados deste projeto podem facilitar a detecção de resistência ao tratamento da hanseníase, tornando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados, com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela hanseníase.

7) Reembolso

Nem você nem seu dependente serão reembolsados por participar deste estudo.

8) Confidenciabilidade dos dados

A participação em projetos de pesquisa pode resultar em perda de privacidade. Além disso, a descoberta de fatores de risco genéticos para hanseníase podem expor susceptibilidades de certos grupos de pessoas, possivelmente levando a outros ou certas empresas a considerar estes grupos diferentes de uma forma negativa. Entretanto, procedimentos serão adotados pelos responsáveis por este estudo no intuito de proteger a confidencialidade das informações que você fornecer e as informações produzidas pelo projeto. Nenhuma informação genética individual será tornada pública. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos de computador, mantidos em local restrito com acesso permitido apenas aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

CONSENTIMENTO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Susceptibilidade do Hospedeiro à Hanseníase

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo consigo. Se você tiver qualquer dúvida no futuro sobre a sua participação neste estudo, você pode e deve utilizar os seguintes meios de contato com o pesquisador responsável: Dr. Marcelo Távora Mira, telefone: (41) 3271-2618, celular: (41) 9164-4045, e-mail: m.mira@pucpr.br

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTÁRIA

Você tem o direito de não concordar a participação de seu dependente, ou mesmo de cessar a participação de seu dependente do estudo em qualquer momento que queira, sem riscos para o seu tratamento dele/dela. Se você autorizar a participação de seu dependente do estudo, permitirá desejar e concordar em participar, deve assinar ou fornecer sua impressão digital na linha apropriada abaixo.

Se você desejar participar do estudo, permitirá que seu endereço e telefone sejam anotados em uma folha separada, para facilitar contato quando necessário. Como já foi esclarecida anteriormente, toda informação, pessoal será mantida em sigilo.

Assinatura ou impressão digital do voluntário

Nome completo e nº do prontuário

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

Assinatura testemunha 1

Assinatura testemunha 2

____/____/____
Data

**ANEXO II E III – APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
(CEP-PUCPR)**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 15 de dezembro de 2004.

Il^m Senhor
Dr. Marcelo Távora Mira

REF: "Estudo de fatores de risco genéticos de suscetibilidade à hanseníase em uma população de Igarapé-Açu, Pará".

O Protocolo de Estudo Clínico intitulado "Estudo de fatores de risco genéticos de suscetibilidade à hanseníase em uma população de Igarapé-Açu, Pará", que será conduzido na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde sob a responsabilidade do senhor pesquisador Dr. Marcelo Távora Mira, foi avaliado por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerado APROVADO.

Para tal aprovação foram seguidas as exigências das Resoluções Nacionais 196/96, e 340/04 relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos. Conforme a resolução nº 340 de 8 de julho de 2004 do Conselho Nacional de Saúde, que aprova diretrizes para análise ética e tramitação de projetos de pesquisa da área temática especial de genética humana, o projeto aqui apresentado se enquadra no item VI.5, e será enviado à CONEP a folha de rosto e este parecer consubstanciado final.

No presente Projeto foram devidamente enfatizados itens que correspondem aos objetivos do Estudo e seu racional, antecedentes científicos justificáveis, adequação dos materiais e métodos, análise criteriosa dos riscos



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

e benefícios, referência bibliográfica pertinente, responsabilidade do pesquisador na condução do Estudo, bem como a possibilidade de interrupção do estudo nos casos em que se verifiquem riscos aos voluntários.

Também foi analisado e considerado APROVADO o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, uma vez que o mesmo segue os padrões normativos, apresentando linguagem acessível ao voluntário do Estudo.

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Emilio José Scheer Neto
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 29 de fevereiro de 2007.
Of. nº 51/07/CEP-PUCPR

Projeto de Pesquisa: "Estudo de Fatores de Risco Moleculares de Susceptibilidade do Hospedeiro à Hanseníase".

Pesquisador Responsável: Marcelo Távora Mira.

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR

Comentários: O projeto de pesquisa: "Estudo de Fatores de Risco Moleculares de Susceptibilidade do Hospedeiro à Hanseníase", a ser desenvolvido junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, sob coordenação do Prof. Marcelo Távora Mira é o resultado da combinação literal, sem qualquer modificação, de dois outros projetos, intitulados "Estudo de Fatores de Risco Genéticos de Susceptibilidade à Hanseníase" e "Estudo funcional de susceptibilidade celular ao *Mycobacterium leprae* em macrófagos primários humanos com mutação no gene *PARK2*". O primeiro projeto foi avaliado e aprovado previamente pelo CEP-PUCPR, pelo CONEP e pelo Comitê de Ética da Organização Mundial da Saúde (OMS), baseado em Genebra, Suíça. O segundo foi aprovado pelo CEP-PUCPR.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96, relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia 28 de fevereiro de 2007, manifesta-se pela reiteração da aprovação conjunta dos projetos acima.

Situação: Aprovado.

Prof. Sergio Surugi de Siqueira

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

**ANEXO IV – APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO CONSELHOR NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA (CONEP)**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 30 de junho de 2006.

Ofício nº 290/06/CEP-PUCPR

Prezado Pesquisador,

Encaminhamos, em anexo, o Parecer nº 578/2006, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/ Registro 12610, referente ao projeto de Pesquisa intitulado "Estudo de fatores de risco genéticos de susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase".

A CONEP emitiu parecer favorável ao projeto, no dia 21 de junho de 2006.

Situação: Projeto aprovado.

Lembramos aos senhores pesquisadores que é obrigatório encaminhar relatório trimestral, anual parcial e relatório final a esta CEP.

Atenciosamente,

Profª M. Sc. Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilmo. Sr.
Marcelo Távora Mira

6 ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “*CLINICS IN DERMATOLOGY*”



Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives

Monica E.D. Sauer, BPharm, PhD candidate^{a,1}, Heloisa Salomão, BPharm, MS^{a,1},
Geovana B. Ramos, BPharm, PhD candidate^a,
Helena R.S. D'Espindula, BPharm, MS candidate^a,
Rafael S.A. Rodrigues, BPharm, PhD candidate^a,
Wilian C. Macedo, BPharm, MS^a, Renata H.M. Sindeaux, PhD^b, Marcelo T. Mira, PhD^{a,b,*}

^aGroup for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^bSchool of Health and Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Abstract A solid body of evidence produced over decades of intense research supports the hypothesis that leprosy phenotypes are largely dependent on the genetic characteristics of the host. The early evidence of a major gene effect controlling susceptibility to leprosy came from studies of familial aggregation, twins, and Complex Segregation Analysis. Later, linkage and association analysis, first applied to the investigation of candidate genes and chromosomal regions and more recently, to genome-wide scans, have revealed several leukocyte antigen complex and nonleukocyte antigen complex gene variants as risk factors for leprosy phenotypes such as disease per se, its clinical forms and leprosy reactions. In addition, powerful, hypothesis-free strategies such as Genome-Wide Association Studies have led to an exciting, unexpected development: Leprosy susceptibility genes seem to be shared with Crohn's and Parkinson's diseases. Today, a major challenge is to find the exact variants causing the biological effect underlying the genetic associations. New technologies, such as Next Generation Sequencing that allows, for the first time, the cost and time-effective sequencing of a complete human genome, hold the promise to reveal such variants. Strategies can be developed to study the functional effect of these variants in the context of infection, hopefully leading to the development of new targets for leprosy treatment and prevention.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Genetics of host susceptibility to infectious diseases

The burden of infectious diseases has been massive throughout history of mankind. Infections have been

responsible for a strong selective pressure; yet, some of them are, still today, major public health problems. Recent advances, such as the development of vaccines and antibiotics, combined with a general increase of the education and socio-economical level of human populations led to an increase of life expectancy, but not to eradication of infectious diseases.¹ To understand this scenario, it is necessary to consider a very complex interplay between environmental (microbial and nonmicrobial) and human

* Corresponding author. Tel.: +55 (41) 3271-2030; fax: +55 (41) 3271-1657.
E-mail address: m.mira@pucpr.br (M.T. Mira).

¹ These authors share first authorship.

(genetic and nongenetic) factors that determines immunity to infection or its clinical outcome.¹

A classic feature of human infections is that only a proportion of exposed individuals develop clinical disease.² Accumulating evidence suggests that host genetic factors play a particularly important role in controlling susceptibility to these diseases.³ Some of the most compelling evidence that human genetics does indeed determine the occurrence of infection comes from primary immunodeficiencies (PIDs). The PIDs are typically monogenic (Mendelian) disorders that impair host defense mechanisms and result in predisposition to multiple infectious diseases. The PIDs are responsible for more than 200 known clinical syndromes, at least 100 of which presenting a well-defined molecular genetic basis. Examples of PIDs include mutations in genes encoding proteins of the IL-12/23-IFN- γ pathway associated with the Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases syndrome; complement defects associated with *Neisseria sp* invasive disease; X-linked lymphoproliferative disease associated with Epstein-Barr virus infection; mutations in genes *EVER1* or *EVER2* associated with Epidermodysplasia *verruciformis*; and apolipoprotein L-1 deficiency, associated with trypanosomiasis.^{1,4–6}

The profound influence of the genetic make-up of the host over resistance to infection has been investigated in several models. Studies in mice, based on reverse (gene-targeted knock-out and knock-in mutations) and forward genetics (natural mutation and random mutagenesis), have provided important insights into the mechanisms controlling infection and immunity in human, natural conditions.⁷ In human genetics, epidemiologic studies of adopted individuals showed that predisposition to infection were largely inherited, paradoxically, even more than diseases associated with less obvious environmental risk factors, such as cancer.^{1,8} Studies comparing concordance rates between monozygotic and dizygotic twins have provided powerful evidence for the existence of a host genetic background controlling susceptibility to different infectious diseases.¹ Finally, several genes have been associated with diseases such as AIDS (*HLA*, *MICA*, *PSORS1 C3*, *KIR*, and *CCR5*); hepatitis B (genes *HLA*); tuberculosis (*MBL*, *VDR*, *NRAMP1*, genes *HLA*); malaria (*HBB*, *SCO1*, *DDC*); and meningococcal disease (*CFH*).^{5,9,10}

In this context, leprosy presents as a very good model for the study of genetic predisposition to infection: *Mycobacterium leprae*, the etiologic agent, is known for its limited diversity between strains of different locations^{11,12}; this near clonal characteristic, together with the observation of a wide range of leprosy clinical phenotypes, strongly suggests that most of the disease variability, including susceptibility to leprosy per se, is dependent upon the genetic background of the host.¹³

Genetics of leprosy

Today, it is widely accepted that the exposure to *M leprae* is necessary but not sufficient to trigger the outcome of the disease, and different sets of genes modify host susceptibility

to leprosy in three different stages, namely: (i) the control of infection per se, that is, the disease regardless of its clinical form manifestation; (ii) after the infection is established, the definition of different clinical forms of the disease; and (iii) the risk of developing leprosy reactions (Figure 1).

Observational studies indicate the presence of a familial component to susceptibility to the leprosy,¹⁴ as well as increased concordance rates of disease per se and its clinical forms among monozygotic compared with dizygotic twins.^{15,16} In addition, several Complex Segregation Analyses have been performed for leprosy in different populations,^{17–19} aiming to identify the best-fit model of inheritance of the phenotype, given a collection of pedigrees. All of these studies supported a polygenic model of inheritance that includes a major gene effect.

Taken together, these results indicate the existence of a strong genetic component controlling susceptibility to leprosy; however, these observational designs do not provide any information about the exact nature of the genetic factors involved, that is, the identity and number of genes, as well as the genetic variants of these genes, causative of the leprosy phenotypes. For that, molecular studies are necessary, and a vast number of these studies have been conducted over the past decades. As a result, several candidate chromosomal regions and genes have been described, such as the MHC/HLA-linked genes of class I and II, *TNFA*, *LTA*, *MICA*, *MICB*, as well as non-HLA genes, such as *CCDC122*, *IFNG*, *IL10*, *IL12 B*, *IL23 R*, *KIR*, *LACC1* (formerly *C13 orf31*), *LTA4 H*, *LRRK2*, *MRC1*, *NOD2*, *PARK2/PACRG*, *RIPK2*, *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*), *TAP*, *TLR*, *TNFSF15*, and *VDR*. Among these, a few candidates have been consistently replicated by independent studies and/or successfully investigated by functional studies. A brief summary of selected genes is presented in Table 1 and expanded next.

Major histocompatibility complex genes

The major histocompatibility complex (MHC), in humans known as the leukocyte antigen complex (HLA), is a cluster of highly polymorphic genes contained within a 3.6 megabase (Mb) interval located on chromosome 6p21. Most of these genes encode for proteins that are essential players in the processing and binding of antigenic peptides during the immune response. The HLA region is organized in 3 classes: HLA class I contains subclasses HLA-A, -B and -C, which present antigenic peptides of intra-cellular origin to CD8+ T cells; HLA class II includes subclasses HLA-DR, -DQ, -DM, and -DP, that primarily bind peptides of extra-cellular origin and present them to CD4+T cells, and HLA class III contains genes coding for cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (*TNFA*) and lymphotoxin alpha (*LTA*), for enzymes involved in steroid synthesis, for heat-shock proteins and for other intermediates of the immune response mechanisms.²⁰

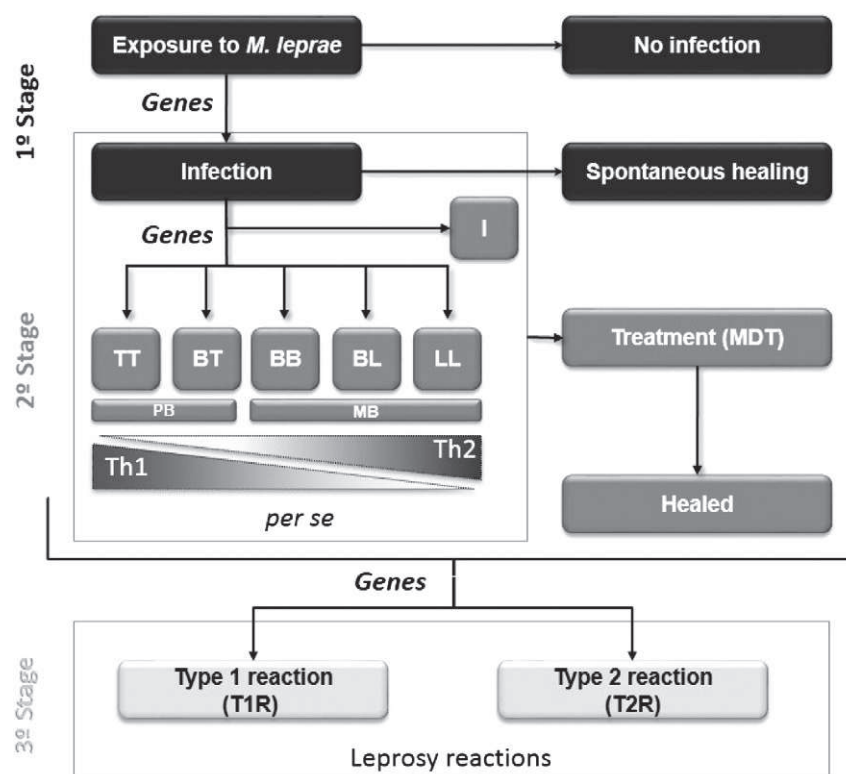


Fig. 1 A schematic stage model of genetic susceptibility to leprosy. The exposure to the mycobacteria does not always result in infection. In an initial stage, a first group of genes confers susceptibility to infection (leprosy *per se*). Among the individuals who develop the disease, a second group of genes determines the type of host immune response and subsequent leprosy subtype. Finally, a third group of genes confers the risk of developing leprosy reactions. TT: Tuberculoid-tuberculoid; BT, Borderline-tuberculoid; BB, Borderline-borderline; BL, Borderline-lepromatous; LL, Lepromatous-lepromatous; I, Indeterminate; PB, Paucibacillary; MB, Multibacillary; Th1, T-helper 1; Th2, T-helper 2; MDT, Multidrug therapy.

The crucial role of the HLA region in immune response regulation makes it the most exhaustively studied genomic candidate region in infection.²¹ It seems reasonable to assume a particularly important role for HLA genes in leprosy, given that clinical manifestation of the disease depends on the type of immune response shown by the host. The exchanges between Th1 and Th2 types of immune response may be partially controlled by a mechanism of antigen presentation involving HLA molecules.²² A large number of linkage and association studies reported the involvement of HLA alleles and haplotypes as important genetic factors controlling susceptibility to leprosy. In particular, HLA-DR alleles have been consistently associated with leprosy²³; Several studies reported an association of the HLA-DR2 alleles HLA-DRB1*04, DRB1*10 DRB1*12, DRB1*15, and DRB1*16 with susceptibility or resistance to leprosy in populations around the world.^{24–30} In addition, HLA-DR3 alleles were also found to be associated with leprosy susceptibility in two different populations.^{31,32}

HLA class I has been also intensively studied in leprosy, and HLA-A*2, A*11, B*40, and C*7 are some examples of alleles detected more often among leprosy cases compared with unaffected controls.³³ A recent study performed a high-resolution association scan of a 1.9 Mb region in the HLA complex in a Vietnamese population, followed by step-wise replication in an

independent sample from Vietnam and a sample from North India. The result was the identification of eight intergenic HLA class I region single nucleotide polymorphisms (SNPs) as novel genetic risk factors for leprosy *per se*, particularly implicating the HLA-C in leprosy susceptibility.³⁴

There is cumulative evidence that class III genes *TNFA* and *LTA* are involved in the immune response against leprosy.³⁵ *TNFA* encodes TNF- α , a proinflammatory and immunostimulatory cytokine that belongs to the TNF superfamily. This cytokine is involved in the regulation of a wide spectrum of biological processes, including the modulation of innate and adaptive immune responses. It is mainly secreted by macrophages, and functions as an important modulator of antigen presentation, through class II molecules, and cytokine production necessary for effective leukocyte response. In leprosy, a large body of functional experimental data indicates that TNF- α plays a central role by mediating the protective response to *M. leprae* invasion. Genetic studies have consistently indicated that *TNFA* variants can influence leprosy phenotypes.^{36,37} Recently, a large association study involving 4 population samples and more than 2500 individuals, followed by a meta-analysis, confirmed association between a promoter variant of *TNFA* and leprosy, interestingly, the effect seems to be restricted to the Brazilian samples.³⁷

Table 1 Selected leprosy associated genes replicated in at least two distinct population samples

Official symbol	Official full name	Function
<i>HLA-DRB1</i>	<i>Major histocompatibility complex, class II, DRB1</i>	Heterodimer anchored in the membrane that present antigenic peptides of extra-cellular origin to CD8+ T cells
<i>TNFA</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Proinflammatory cytokine
<i>LTA</i>	<i>Lymphotoxin alpha</i>	Proinflammatory cytokine
<i>IL10</i>	<i>Interleukin 10</i>	Anti-inflammatory cytokine
<i>PARK2</i>	<i>Parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase</i>	E3 ubiquitin ligase
<i>NOD2</i>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>	Cytoplasmic receptor that plays a role in the immune response to intracellular bacterial lipopolysaccharides
<i>RIPK2</i>	<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>	Member of the receptor-interacting protein (RIP) family of serine/threonine protein kinases
<i>LACC1</i>	<i>Laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1</i>	Unknown
<i>CCDC122</i>	<i>Coiled-coil domain containing 122</i>	Unknown

LTA is also a member of the TNF superfamily, but compared with TNF- α , much less is known about its function.³⁵ This cytokine is produced by lymphocytes and forms heterotrimers with lymphotoxin-beta, which anchor lymphotoxin-alpha to the cell surface. LTA signaling has proven important in controlling infection by intracellular pathogens, including *Mycobacterium tuberculosis* and *M leprae* among others.^{38,39} Interestingly, it seems that, in leprosy, the *LTA* genetic effect is more pronounced in patients with early onset of disease.⁴⁰ A recent study using knockout mice showed that the combination of TNF and LTA are necessary to the formation and maintenance of granulomas in response to *M leprae*: LTA seems to regulate granuloma formation whereas TNF- α is responsible for its integrity.^{35,39}

Finally, variants of additional HLA-linked genes, such MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A), MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B), and TAP (Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B [MDR/TAP]), have also been described in association with leprosy phenotypes in different populations.²²

Of note, the interpretation of genetic association studies involving the HLA complex requires caution, due to the close proximity and very high gene density typical of this locus: Once positive association is detected between a leprosy phenotype and an MHC/HLA marker, the challenge is to determine if the causative gene is the one being investigated or another in close proximity to the marker used, a phenomenon called linkage disequilibrium.²²

Non-HLA genes

Interleukin 10

The *Interleukin 10* (*IL10*) gene is located at the 1q31-q32 chromosomal region and encodes for the anti-inflammatory cytokine IL-10, secreted by cells of the monocyte/macrophage

lineage and T-cell subsets such as Type 1 Tr, regulatory T, and T-helper 17.^{35,41} The IL-10 exerts its anti-inflammatory actions by blocking the production of proinflammatory cytokines by macrophages and their ability to serve as antigen-presenting or costimulatory cells.⁴¹ More specifically, this cytokine inhibits the production of IL-1, IL-6, and TNF- α in LPS- and IFN- γ -activated macrophages.^{36,41–43}

High levels of IL-10 are observed in multibacillary/lepromatous leprosy patients compared with paucibacillary/tuberculoid patients and a low TNF- α /IL-10 ratio is correlated to disease progression.^{35,42} Genetic epidemiology studies have been consistently reporting association between leprosy and SNPs located at the *IL10* gene.^{44–49} The exact reason why *IL10* polymorphisms are associated with leprosy is yet to be cleared. As this cytokine suppress the production of inflammatory mediator and boosts the development of Th2 immunity,⁵⁰ it is plausible that these polymorphisms somehow change *IL10* expression, directing the patient towards one of the poles of the leprosy clinical spectrum.

PARK2/PACRG (Parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase/Parkin co-regulated gene)

A genome-wide linkage analysis conducted in a Vietnamese population mapped a leprosy susceptibility locus to chromosome 6q25-27, an effect distributed along the entire leprosy clinical spectrum.⁵¹ In a follow-up study, the same group performed a systematic association scan of the candidate region and found 17 SNPs associated with leprosy susceptibility,⁵² 15 of them located in and around the promoter region shared by two genes: *PARK2* and *PACRG*. These results were validated in a separate set of unrelated individuals from Brazil. Later, an independent case-control study found significant association between leprosy and *PARK2/PACRG* SNPs in an Indian population sample; however, the signal did not resist correction for multiple testing.⁵³ A study conducted in a geographically isolated Croatian community with a well-documented history

of leprosy showed that the protective alleles of two *PARK2* SNPs associated with the disease in Vietnam and Brazil were enriched in this population,⁵⁴ suggesting positive selection. More recently, a study involving a Vietnamese and an Indian population sample confirmed the *PARK2/PACRG* effect and revealed that age at diagnosis and differences in linkage disequilibrium patterns across different ethnicities are important for the correct interpretation of these association results.⁵⁵ Curiously, association has been also reported between the *PARK2/PACRG* leprosy polymorphisms and typhoid and paratyphoid fever in an Indonesian population.⁵⁶ The finding raised the hypothesis that the *PARK2/PACRG* genetic effect would not be specific to infection with *M leprae*, but related to host responses against intracellular parasites.

The *PARK2* gene encodes Parkin, an E3 ubiquitin ligase involved with the ubiquitin-proteasome complex that mediates the targeting of protein substrates for proteasomal degradation.¹³ Replicated association between leprosy and *PARK2/PACRG* variants revealed a new ubiquitin-dependent pathway of immunity to infection with *M leprae*, an idea supported by a functional study which demonstrated that proteasome function is important for *M leprae*-induced apoptosis.⁵⁷

The Genome Wide Association Studies genes

Genome Wide Association Studies (GWAS) are a powerful study design based on extensive coverage of the entire genome with hundreds of thousands of markers, genotyped in one single experiment, that capture the vast majority of common variants in the genome sequence.^{58,59} The genotyping data are then used in association testing that, if performed in samples large enough to achieve an adequate statistical power, allows for the identification of very small genetic effects, without the need of a previous hypothesis. The first GWAS on leprosy included 491,883 SNPs genotyped in 706 cases and 1225 controls from Eastern China. A total of 93 SNPs showed association with leprosy at the GWAS significance level; these SNPs were then tested in three independent replication sets totaling 3254 patients and 5955 controls from Eastern and Southern China. As a result, 15 SNPs distributed in six genes, *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *RIPK2*, and the *HLA-DR-DQ*, were consistently associated with leprosy across all samples. In addition, a trend toward association was detected between leprosy and one SNP of *LRRK2*.⁶⁰ In 2011, the same group published an expanded GWAS by combining their first data set with additional control subjects—two additional genes were identified associated with leprosy: *IL23R* and *RAB32*.⁶¹ Later, another study identified a relative increase in *IL23R* gene copy number significantly associated with paucibacillary leprosy.⁶²

Given the nature of the GWAS, association studies involving a tremendous number of tests performed on a single experiment, therefore under strong inflation of type I error (false positive), these results, although exciting, must be validated by replication and/or by functional independent studies.⁶³

Association between leprosy and *HLA-DR-DQ* was replicated in an Indian population⁶⁴ and the *LACC1* and *CCDC122* signals were replicated in an Indian and African population.⁶⁵ More recently, a family-based replication study conducted in 474 Vietnamese leprosy families re-tested all 16 SNPs associated with leprosy in the Chinese original GWAS; six of them, located at *CCDC12*, *LACC1*, *NOD2*, *RIPK2*, and the *HLA-DR-DQ* genes were replicated.⁶⁶ Association between *NOD2* and leprosy has also been replicated in Nepal.⁶⁷

Several of the proteins encoded by these genes are involved in microbial sensing and in the early immune and inflammatory responses.⁶³ *NOD2* is located on chromosome 16q12 and encodes an intracellular receptor that recognizes a muramyl dipeptide component of the bacterial wall. After the interaction with activated *NOD2* molecules, *RIPK2* undergoes poly-ubiquitination mediated by an E3 ubiquitin ligase and promotes the activation of the TGF β -activated kinase 1 (TAK1) complex. The activated TAK1 complex, again via poly-ubiquitination of a mediator, leads to degradation of transcriptional regulator nuclear factor κ B (NF- κ B) repressor I κ B, releasing NF- κ B to promote the transcription of pro-inflammatory genes, one of them, *TNFSF15*.^{63,68–70} A functional study reinforced the importance of the *NOD2* cascade in leprosy, by demonstrating that after *NOD2* from monocytes interact with *M leprae*'s muramyl dipeptide, a distinct interleukin-32-dependent induction of innate immune responses takes place, leading to the differentiation of monocytes into dendritic cells.⁷¹ These antigen-presenting cells are competent to define the adaptive immune response in leprosy.^{72–74}

Genetics of leprosy reactions

LRs are sudden and intense inflammatory processes that affect individuals at all stages of the disease, from diagnosis, during treatment and even in the post-cure. The pathophysiologic mechanisms involved are still widely unknown. Leprosy reactions are classified as type 1 (T1R or reversal reaction), which commonly affects patients at the tuberculoid side of the clinical spectrum; or type 2 (T2R, or *Erythema Nodosum Leprosum*), which affects mainly patients from the lepromatous pole of the disease.^{75–79} Only recently, human genetic epidemiology tools have been applied to the investigation of the molecular mechanisms controlling susceptibility to this extreme leprosy phenotype, as recently reviewed by Fava and cols.^{77,80}

The first evidence of association between LR and genetic polymorphisms came from studies involving Toll-like receptor (TLR) genes. An investigation involving a Nepalese population sample revealed polymorphisms on *TLR1* and *TLR2* associated with higher risk for T1R.^{81,82} A functional polymorphism of *TLR1*, which causes a substitution of asparagine to serine (N248S), was found associated with susceptibility to leprosy reactions in a Bangladeshi

population sample.⁸³ Interestingly, a recent study detected association between the same N248S polymorphism and susceptibility to leprosy in a Brazilian population sample.⁸⁴ The TLRs are transmembrane proteins that play a critical role in the inflammatory response to microbial pathogens.^{64,85} *TLR1* is located on chromosome 9q33.1 and its protein forms a heterodimer with TLR2 or TLR6 and mediates the recognition of several mycobacterial motifs: The heterodimer TLR1/TLR2 is involved in the recognition of *M leprae*,⁸⁶ and TLR1/TLR6 seems to be related to *M leprae* persistence in Schwann cells.⁸⁷

A prospective study of a Brazilian population sample resulted in strong evidence implicating variants of the *IL6* gene with susceptibility to T2R. Upon diagnosis, leprosy patients were monitored for at least 1 year for the occurrence of LR. Patients who developed T1R or T2R within the follow-up period were included in the group of cases, and leprosy patients who did not develop reactions were used to compose the control group. Cases of T1R and T2R were matched with controls by clinical form of leprosy and compared for the allele frequencies of markers physically covering the entire *IL6* gene. No association was observed between the *IL6* markers and T1R. Two independent signals of association with T2R were detected; one of them was captured by SNP rs1800795, a variant with known impact over *IL6* expression. These results support an important role of *IL6* in the development of T2R.⁷⁷

Additional studies on genetics of LR have implicated variants of *NOD2* and *VDR* as risk factors for the occurrence of T2R and T1R, respectively.^{67,88} Finally, a study in a Brazilian sample demonstrated an association between a SNP of *SCL11A1* with leprosy reactions.⁸⁹ These findings are yet to be replicated.

Leprosy, Crohn's, and Parkinson's diseases: a common genetic background?

In the past recent years, interesting findings concerning the genetic control of complex diseases have been observed: Some disorders, apparently unrelated, share genetic risk factors. In this context, the identification of leprosy susceptibility genes revealed an unexpected overlap with inflammatory bowel conditions and Parkinson's disease.⁹

Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by a chronic, relapsing intestinal inflammation. The two major types of IBD are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* RNA in mucosal samples of CD and UC patients suggested that the development of the disease, at least in some individuals, might be triggered by mycobacterial infection.^{90,91} This hypothesis have been supported by recent genetic studies revealing CD susceptibility genes that encode proteins responsible for recognition of bacterial structures and/or are present in immunologic pathways.^{9,92}

Some of these CD susceptibility loci are shared with leprosy,⁶³ as clearly exposed by the Chinese leprosy GWAS: Five of the newly described leprosy susceptibility genes have been previously associated with CD: *TNFSF15*, *NOD2*, *LACC1*, *LRRK2*, and *IL23R*.^{60,61} Motivated by this unexpected finding, the same group later performed a systematic, comprehensive association study testing all previously described IBD loci as leprosy susceptibility candidates in a large Chinese leprosy sample, again, two IBD loci were associated with leprosy: *IL18RAP/IL18R1*, and *IL12B*.⁹³ These outstanding results corroborates the hypothesis that IBD, mainly CD, and leprosy share genetic risk factors and sum additional evidence supporting the role of an infectious agent participating in the initial events leading to CD manifestation.

One additional intriguing finding of the Chinese study is that the in silico analysis that places *NOD2*, *RIPK2*, and *TNFSF15* in the same pathway also included *PARK2* and *LRRK2*, genes encoding proteins that directly interact.⁶⁰ Strikingly, *PARK2* and *LRRK2* are well known Parkinson's disease (PD) susceptibility genes. Of particular interest, *LRRK2*, shown to be expressed in macrophage and monocytes,⁹⁴ harbors variants that have been associated with CD⁹⁵ and Parkinson's disease, as well as leprosy.

Based on this results, one can speculate that because *NOD2/RIPK2* initiates a signaling process that involves an ubiquitination process through TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), an E3 ubiquitin ligase, it is possible that parkin, also an E3, plays a role in this process; in addition, *LRRK2* is thought to regulate the ligase activity of *PARK2*⁹⁶; therefore, it may also take part in the signaling control. These observations suggest the existence of a partially shared genetic control of susceptibility to an infectious disease, an inflammatory disease and a neurodegenerative disorder. The complete elucidation of the cross talk between those susceptibility genes is a difficult, yet tremendously exciting task.

Future perspectives

Classic genetic studies on susceptibility to leprosy have been focusing on the identification of common variants that could explain predisposition to disease and, as a result, several common variants were described to be associated with leprosy phenotypes. The assumption made is that a set of these variants in one or several genes of a biochemical pathway would act together to contribute to a clinical outcome. These findings cannot explain the totality of the large genetic effect observed in descriptive genetic epidemiology studies. Interesting, this scenario remain true for a number of complex traits.⁹⁷

With the popularization of the GWAS, it has become increasingly clear that a large part of the genetic effect controlling disease susceptibility was missing⁹⁸: With rare

exceptions, more than 90-95% of the heritable component of a disease has been left unexplained after extensive GWAS on several complex diseases, giving rise to the term “missing heritability”.^{98,99} The idea behind these “missing effect” is that common genetic variability is unlikely to explain the entire genetic predisposition to disease.^{98,100,101}

As a result of intense debate, a new scenario of not one, but two major hypothesis has risen, both aiming to offer a better understanding on how different classes of genetic variations can account for a specific outcome: The “Common Disease-Common Variant (CDCV)” and the “Common Disease-Multiple Rare Variant (CDMRV)” hypothesis. The first one argues that common variants with small effect are responsible for the genetic susceptibility to common diseases; the CDMRV hypothesis defends the idea that multiple rare alleles of large effect, explains the genetic susceptibility to common diseases.^{100,101}

In fact, the idea that rare variants are behind of human susceptibility to common diseases is not new. A remarkable example of the impact of a rare variant over disease phenotypes has been provided by Altare et al. in 1998¹⁰²: By applying molecular biology tools a genetic analysis on the study of a single young girl presenting generalized, atypical *M. bovis*-BCG infection. The authors found a homozygous, 4.4 kb-long deletion in the gene *IL12B* that impaired IL12-dependent, IFN- γ mediated response against a non-virulent mycobacteria. The finding, that clearly implicates the IL-12/IFN- γ axis as critical for the control of the immune response against mycobacterial infection, represents strong support to the idea that a rare structural, homozygous variant can underlie the mechanism controlling host susceptibility to infection. This study and others provided rising evidence that rare variations are important pieces of the puzzle of human phenotypic variation.¹⁰³ Identifying these rare variants without previous indication of their possible location used to be a daunting task, given (i) the need to study rare, extreme cases of disease; and (ii) the limited throughput and the high costs of classic, Sanger-based methods for genome sequencing.

The CDMRV hypothesis gained momentum with the very recent advent of next generation genetic analysis platforms capable of sequencing massive segments of the human genome, whole exomes or even genomes, in short time frames and for a reasonable cost. By reducing the time and cost limitations to a minimum challenge, these platforms of next-generation sequencing (NGS) technologies, also known as massively parallel DNA sequencing, are ideal tools to be used on the search of such rare variations.^{100,104}

Conclusions

The NGS technology has the potential to revolutionize our understanding on how genes or genomic regions are involved in the pathogenesis of human diseases.¹⁰⁵ The use of NGS can be directed to the identification of causative

disease mutation by resequencing the whole genome (or exome) of a small number of affected individuals, typically displaying extreme phenotypes of the disease. The approach has been successfully applied to determine the genetic basis of rare disorders, much of them Mendelian, through the study of a small number of affected individuals. In this scenario, an interesting question would be whether the same strategy could be applied to the identification of rare mutations possibly contributing to the risk of occurrence of a complex disease, such as common infections. In this much more complex context, leprosy has been considered as an excellent model to the study of genetic susceptibility to common infectious diseases.¹⁰⁶ It is reasonable to believe that innovative approaches based on NGS technology could help to unravel much of the “missing heritability” observed in leprosy and other infectious diseases. Also, classic experimental design such as linkage analysis can be coupled to these approaches to increase its power.

References

1. Casanova JL, Abel L. Inborn errors of immunity to infection: The rule rather than the exception. *J Exp Med*. 2005;202:197-201.
2. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13:175-188.
3. Alcais A, Abel L, Casanova JL. *Hum Genet* of infectious diseases: Between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest*. 2009;119:2506-2514.
4. Picard C, Casanova JL, Abel L. Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in humans. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:383-390.
5. Abel L, Casanova JL. *Hum Genet* of infectious diseases: Fundamental insights from clinical studies. *Semin Immunol*. 2006;18:327-329.
6. Quintana-Murci L, Alcais A, Abel L, et al. Immunology in nature: Clinical, epidemiologic and evolutionary genetics of infectious diseases. *Nat Immunol*. 2007;8:1165-1171.
7. Casanova JL, Abel L. The human model: A genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:55-66.
8. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med*. 1988;318:727-732.
9. Orlova M, Di Pietrantonio T, Schurr E. Genetics of infectious diseases: Hidden etiologies and common pathways. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:1427-1437.
10. Bellamy R. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2005;26:233-246. [vi].
11. Monot M, Honore N, Garnier T, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009;41:1282-1289.
12. Truman RW, Singh P, Sharma R, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med*. 2011;364:1626-1633.
13. Schurr E, Alcais A, de Leseleuc L, et al. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol*. 2006;18:404-410.
14. Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *J Clin Invest*. 1987;79:1139-1143.
15. Mohamed AP, Ramanujam K. Leprosy in twins. *Int J Lepr*. 1966;34:405-407.
16. Chakravarti MR, Vogel F. A twin study on leprosy. Georg Thieme Verlag. 1973:1-123.
17. Abel L, Vu DL, Oberti J, et al. Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. *Genet Epidemiol*. 1995;12:63-82.
18. Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet*. 1988;42:256-266.

19. Lazaro FP, Werneck RI, Mackert CC, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis*. 2010;201:1598-1605.
20. Prado Montes de Oca E. Human Polymorphisms as Clinical Predictors in Leprosy. *J Trop Med*. 2011, Article ID 923943, 14 pages (1-14) doi: 10.1155/2011/923943.
21. Trowsdale J. The MHC, disease and selection. *Immunol Lett*. 2011;137:1-8.
22. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect*. 2006;8:1124-1131.
23. Fava VM, Mira MT. Genetics of leprosy. In: Nunzi E, Massone C, eds. *Leprosy: A Practical Guide*. Springer; 2012. p. 19-26.
24. Schauf V, Ryan S, Scollard D, et al. Leprosy associated with HLA-DR2 and DQw1 in the population of northern Thailand. *Tissue Antigens*. 1985;26:243-247.
25. Soebono H, Giphart MJ, Schreuder GM, et al. Associations between HLA-DRB1 alleles and leprosy in an Indonesian population. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1997;65:190-196.
26. Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, et al. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet*. 2006;15:2880-2887.
27. Motta PM, Cech N, Fontan C, et al. Role of HLA-DR and HLA-DQ alleles in multibacillary leprosy and paucibacillary leprosy in the province of Chaco (Argentina). *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2007;25:627-631.
28. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun*. 2007;8:320-324.
29. da Silva SA, Mazini PS, Reis PG, et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: Markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis*. 2009;9:134.
30. Zhang F, Liu H, Chen S, et al. Evidence for an association of HLA-DRB1*15 and DRB1*09 with leprosy and the impact of DRB1*09 on disease onset in a Chinese Han population. *BMC Med Genet*. 2009;10:133.
31. van Eden W, de Vries RR, D'Amato J, et al. HLA-DR-associated genetic control of the type of leprosy in a population from Surinam. *Hum Immunol*. 1982;4:343-350.
32. Gorodezky C, Flores J, Arevalo N, et al. Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. *Lepr Rev*. 1987;58:401-406.
33. Shankarkumar U. HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. *Lepr Rev*. 2004;75:79-85.
34. Alter A, Huang NT, Singh M, et al. Human leukocyte antigen class I region single-nucleotide polymorphisms are associated with leprosy susceptibility in Vietnam and India. *J Infect Dis*. 2011;203:1274-1281.
35. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, et al. Leprosy susceptibility: Genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol*. 2011;6:533-549.
36. Misch EA, Berrington WR, Vary Jr JC, et al. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74:589-620.
37. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. TNF -308 G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis*. 2011;204:1256-1263.
38. Roach DR, Briscoe H, Saunders B, et al. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med*. 2001;193:239-246.
39. Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, et al. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol*. 2009;174:1379-1389.
40. Alcais A, Alter A, Antoni G, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet*. 2007;39:517-522.
41. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, et al. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6065-6069.
42. Ishida H, Hastings R, Thompson-Snipes L, et al. Modified immunologic status of anti-IL-10 treated mice. *Cell Immunol*. 1993;148:371-384.
43. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263-274.
44. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis*. 2002;186:1687-1691.
45. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun*. 2004;5:592-595.
46. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:330-340.
47. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet*. 2005;118:295-300.
48. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, et al. Genetic, epidemiologic and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819 C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun*. 2009;10:174-180.
49. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis*. 2009;13:493-498.
50. Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, et al. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology*. 2004;112:674-680.
51. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, et al. Chromosome 6 q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet*. 2003;33:412-415.
52. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004;427:636-640.
53. 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. *EJHG*. 2006;14:438-442.
54. Bakija-Konsuo A, Mulic R, Boraska V, et al. Leprosy epidemics during history increased protective allele frequency of PARK2/PACRG genes in the population of the Mljet Island, Croatia. *Eur J Med Genet*. 2011;54:e548-e552.
55. Alter A, Fava VM, Huang NT, et al. Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. *Hum Genet*. 2013;132:107-116.
56. Ali S, Vollaard AM, Widjaja S, et al. PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. *Clin Exp Immunol*. 2006;144:425-431.
57. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, et al. The proteasome function is required for Mycobacterium leprae-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol Lett*. 2007;110:82-85.
58. Manry J, Quintana-Murci L. A genome-wide perspective of human diversity and its implications in infectious disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:a012450.
59. Hong EP, Park JW. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. *Genomics Inform*. 2012;10:117-122.
60. Zhang FR, Huang W, Chen SM, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*. 2009;361:2609-2618.
61. Zhang F, Liu H, Chen S, et al. Identification of two new loci at IL23 R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet*. 2011;43:1247-1251.
62. Ali S, Srivastava AK, Chopra R, et al. IL12 B SNPs and copy number variation in IL23 R gene associated with susceptibility to leprosy. *J Med Genet*. 2013;50:34-42.
63. Schurr E, Gros P. A common genetic fingerprint in leprosy and Crohn's disease? *N Engl J Med*. 2009;361:2666-2668.

64. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000979.
65. Wong SH, Hill AV, Vannberg FO, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med.* 2010;362:1446-1447. [author reply 1447-1448].
66. Grant AV, Alter A, Huong NT, et al. Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the Vietnamese population. *J Infect Dis.* 2012;206:1763-1767.
67. 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;201:1422-1435.
68. Hitotsumatsu O, Ahmad RC, Tavares R, et al. The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity.* 2008;28:381-390.
69. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity.* 2007;27:549-559.
70. Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J.* 2008;27:373-383.
71. Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med.* 2012;18:555-563.
72. Krutzik SR, Tan B, Li H, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005;11:653-660.
73. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science.* 1995;269:227-230.
74. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: Correlation with effective host immunity. *J Immunol.* 1999;162:1851-1858.
75. Alter A, Grant A, Abel L, et al. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome.* 2011;22:19-31.
76. Sampaio LH, Stefani MM, Oliveira RM, et al. Immunologically reactive M. leprae antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. *BMC Infect Dis.* 2011;11:26.
77. Sousa AL, Fava VM, Sampaio LH, et al. Genetic and immunologic evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction. *J Infect Dis.* 2012;205:1417-1424.
78. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol.* 2008;83:75-82.
79. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet.* 2004;363:1209-1219.
80. Fava V, Orlova M, Cobat A, et al. Genetics of leprosy reactions: An overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(Suppl 1):132-142.
81. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond).* 2008;114:347-360.
82. 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;28:1055-1065.
83. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, et al. Polymorphism N248 S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis.* 2009;199:1816-1819.
84. de Sales Marques C, Brito-de-Souza VN, Albuquerque Guerreiro LT, et al. Toll-like receptor 1 (TLR1) N248 S single nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2013;208:120-129.
85. 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;197:253-261.
86. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003;9:525-532.
87. Mattos KA, Oliveira VG, D'Avila H, et al. TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: Immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol.* 2011;187:2548-2558.
88. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol.* 2010;71:992-998.
89. Teixeira MA, Silva NL, Ramos AL, et al. NRAMPI gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:281-286.
90. Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:507-514.
91. Jeyanathan M, Boutros-Tadros O, Radhi J, et al. Visualization of Mycobacterium avium in Crohn's tissue by oil-immersion microscopy. *Microbes Infect.* 2007;9:1567-1573.
92. Behr MA, Schurr E. Mycobacteria in Crohn's disease: A persistent hypothesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:1000-1004.
93. Liu H, Irwanto A, Tian H, et al. Identification of IL18 RAP/IL18 R1 and IL12 B as leprosy risk genes demonstrates shared pathogenesis between inflammation and infectious diseases. *Am J Hum Genet.* 2012;91:935-941.
94. Thevenet J, Pescini Gobert R, Hooft van Huijsduijnen R, et al. Regulation of LRRK2 expression points to a functional role in human monocyte maturation. *PLoS One.* 2011;6:e21519.
95. Umeno J, Asano K, Matsushita T, et al. Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:2407-2415.
96. 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 U S A.* 2005;102:18676-18681.
97. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, et al. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet.* 2009;10:241-251.
98. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461:747-753.
99. Maher B. Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature.* 2008;456:18-21.
100. Zhang J, Chiodini R, Badr A, et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics.* 2011;38:95-109.
101. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, et al. Common versus rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:212-219.
102. Altare F, Lammas D, Revy P, et al. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guerin and Salmonella enteritidis disseminated infection. *J Clin Invest.* 1998;102:2035-2040.
103. Pritchard JK. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum Genet.* 2001;69:124-137.
104. Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31-46.
105. Novelli G, Predazzi IM, Mango R, et al. Role of genomics in cardiovascular medicine. *World J Cardiol.* 2010;2:428-436.
106. Alter A, Alcais A, Abel L, et al. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet.* 2008;123:227-235.