



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO COMPLEXA EM UMA POPULAÇÃO
DE FAMÍLIAS ISOLADAS AFETADAS POR HANSENÍASE**

Mestrando: Fernando Panissa Lázaro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

CURITIBA

2009

FERNANDO PANISSA LÁZARO

**ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO COMPLEXA EM UMA POPULAÇÃO
DE FAMÍLIAS ISOLADAS AFETADAS POR HANSENÍASE**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).
Área de Concentração: Medicina e Áreas a fins.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

CURITIBA

2009

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

L431a Lázaro, Fernando Panissa
2009 Análise de segregação complexa em uma população de famílias isoladas afetadas por hanseníase / Fernando Panissa Lázaro ; orientador, Marcelo Távora Mira. -- 2009.
99 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2009
Inclui bibliografias

1. Hanseníase. 2. Mycobacterium leprae. 3. Marcadores genéticos. 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



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Medicina

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 vinte e sete dias do mês de abril de 2009, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação “ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO COMPLEXA EM UMA POPULAÇÃO DE FAMÍLIAS ISOLADAS AFETADAS POR HANSENÍASE” apresentada por FERNANDO PANISSA LÁZARO 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. Vanessa Santos Sotomaior PUCPR	
Prof. Dr. Milton Ozório Moraes FIOCRUZ	

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: Aprovado

Profª. Drª. Vanessa Santos Sotomaior

Conceito: APROVADO

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Conceito: APROVADO

Conceito Final: Aprovado.

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

DEDICATÓRIA

A Deus pela oportunidade, apoio e confiança. Por me dar força, coragem, persistência e sabedoria para concluir esta dissertação. Espero ter retribuído a altura.

Aos meus pais, David e Dirce, por acreditarem mais uma vez em mim, darem confiança e aceitarem minhas decisões. Aos meus irmãos, Fábio e Priscila, pelo incentivo e compreensão durante este processo.

À minha noiva, Dayane, pelo apoio incondicional ao longo desses últimos 3 anos. A pessoa mais presente e importante desta caminhada. Pelo amor, compreensão e por compartilhar todos os momentos ao meu lado, alegrias, conquistas; mais ainda, cansaço, preocupações, decepções, sempre me incentivando a prosseguir.

Ao meu melhor amigo e irmão, Felipe, pelo convite inicial (inclusive financeiro) de começarmos juntos esse novo capítulo em nossas vidas. Pela amizade, compreensão e por estar presente em todos os passos dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcelo Távora Mira, por ter-me aceito em seu grupo desde o período de iniciação científica. Pela oportunidade e confiança depositada na indicação e execução deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, dicas e orientações que certamente contribuíram para meu crescimento intelectual.

Aos colaboradores desse trabalho, Dr. Alexandre Alcaïs e Dr. Laurent Abel, pelo apoio e orientações dadas para execução deste trabalho e pela oportunidade de realizar parte dele no Laboratório de Genética Humana das Doenças Infecciosas (INSERM U.550), na Faculdade de Medicina Necker, Universidade de Paris René Descartes – França. Ao Dr. Erwin Schurr, do Departamento de Genética Humana, Medicina e Bioquímica, no Centro de Estudos de Susceptibilidade ao Hospedeiro da Universidade McGill - Montreal, Canadá.

À colaboradora Dr. Marília Brasil Xavier do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (UFPA) Belém, Pará – Brasil. Pelo auxílio na coleta dos dados e levantamento das informações clínicas dos pacientes da Colônia Santo Antônio do Prata.

Aos Drs. Marco Antônio Masoller Eleutério e Guilherme Vilar da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pelo apoio fornecido na criação do banco de dados.

À equipe de coleta de campo que realizou o completo recrutamento da colônia do Prata: Raphaela de Paula Pimentel, Flávia Costa Prevedello, Geraldo Mariano Moraes de Macedo e a toda equipe da Dr. Marília Brasil Xavier.

À Ciane Cristina de Oliveira Mackert pelo conhecimento e incentivo repassados para o recrutamento da população da Colônia Santo Antônio do Prata.

À Renata Iani Werneck, pela execução da parte estatística do trabalho no laboratório INSERM U.550, na França.

A todos do grupo do Dr. Marcelo Távora Mira, no Núcleo de Investigação Molecular Avançado (NIMA) da PUCPR: Felipe César Gomes Fernandes, Ciane Mackert, Flávia Prevedello, Caio Castro, Renata Werneck, Renata Sindeaux, Liliane Nascimento, Vinícius Fava, Ângela Francio, Raphaela de Paula, Marcela Ferreira, Renan Mattar, Geison Cambri, Denise Endo, Willian Macedo, Mônica, Caroline, Giovanna Galetto, Marina Gonçalves, Maria Fernanda, Marcelo Camargo, Maurício e Cleide.

Aos professores Dr. Roberto Pecoits Filho e Dr. Paula Cristina Trevilatto, pelas orientações e conselhos dados no Comitê Assessor de Pesquisa (CAP).

Às professoras Dr. Andréa Novais Moreno e Dr. Paula Cristina Trevilatto, pela participação e avaliação na banca examinadora de minha qualificação.

Aos professores Dr. Milton Ozório Moraes e Dr. Vanessa Santos Sotomaior, pela participação e avaliação na banca examinadora de minha defesa pública.

A todos os moradores da Colônia Santo Antônio do Prata, no Pará. Em especial aos pacientes, assistentes sociais, a Helisane Santana da Silva e seus pais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa integral de estudo.

Enfim, sou grato a todos que auxiliaram de forma direta e indiretamente a produção deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
Capítulo 1 – Introdução e Revisão da Literatura.....	01
1.1. Hanseníase.....	02
1.1.1. História da Hanseníase.....	02
1.1.2. Epidemiologia e Controle da Hanseníase.....	05
1.1.3. Patogênese.....	07
1.1.3.1. Agente Etiológico.....	07
1.1.3.2. Transmissão.....	09
1.1.3.3. Forma Clínica.....	10
1.1.3.4. Características Clínicas.....	13
1.1.3.5. Diagnóstico.....	15
1.1.3.6. Reação de Mitsuda.....	16
1.1.3.7. Tratamento e Prevenção.....	18
1.1.3.8. Reações da Hanseníase.....	20
1.1.3.9. Mecanismos Moleculares da Patogênese da Hanseníase....	21
1.2. Genética de Traços Complexos.....	24
1.3. Genética do Hospedeiro e Susceptibilidade a Doenças Infecciosas.....	25
1.4. Estratégias de Análise e Primeiros Estudos em Hanseníase.....	27
1.4.1. Estudos Observacionais: Estudos de Agregação Familiar e de Gêmeos.....	27
1.4.1.1. Estudos Observacionais: Estudos de Agregação Familiar e de Gêmeos em Hanseníase.....	28
1.4.2. Análise de Ligação.....	29
1.4.2.1. Análise de Ligação em Hanseníase.....	30
1.4.3. Análise de Associação.....	30

1.4.3.1. Análise de Associação em Hanseníase.....	31
1.5. Análise de Segregação Complexa (ASC).....	32
1.5.1. Conceitos Básicos.....	32
1.5.2. Modelos (História).....	34
1.5.3. Vantagens e Desvantagens das ASC.....	38
1.5.4. Limitações das ASC.....	39
1.5.5. Erros Potenciais.....	40
1.5.5.1. ASC em Hanseníase.....	41
1.5.5.1.1. ASC em uma População Isolada da Papua Nova Guiné.	41
1.5.5.1.2. ASC em uma Amostra Populacional do Sul da Índia.....	42
1.5.5.1.3. ASC em uma Amostra Populacional do Norte da Tailândia.....	43
1.5.5.1.4. ASC em uma População Isolada da Ilha de Desirade.....	44
1.5.5.1.5. ASC em uma Amostra Populacional do Sudeste do Brasil.....	47
1.5.5.1.6. ASC em uma Amostra Populacional do Sul do Vietnã....	48
1.5.5.1.7. ASC em uma Amostra Populacional do Norte do Brasil..	49
1.5.5.1.8. ASC para Reação de Mitsuda em uma Amostra Populacional do Vietnã.....	51
1.5.5.1.9. Outras ASC.....	52
2. Justificativa.....	54
3. Objetivos.....	56
3.1. Geral.....	57
3.2. Específicos.....	57
4. Artigo – A Major Gene Controls Leprosy Susceptibility in a Hiper-Endemic Isolated Population from North of Brazil.....	58
4.1. Abstract.....	63
4.2. Introdução.....	64
4.3. Métodos.....	66
4.4. Resultados.....	69
4.5. Discussão.....	71

4.6. Referências.....	73
4.7. Anexos I (Tabelas).....	78
4.8. Anexos II (Figuras).....	80
5. Conclusões.....	83
6. Referências.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revisão resumida de outras ASC prévias conduzidas para hanseníase.....	53
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de dois estágios para a patogênese da hanseníase.....	12
Figura 2 –Modelo de dois conjuntos diferentes de genes controlando a resposta imune do hospedeiro para o <i>M. leprae</i> , em momentos distintos da patogênese.....	26
Figura 3 – Modelos de análises de segregação ao longo das décadas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. – Antes de Cristo
AIC – Critério de Informação de Akaike
AS – Análise de Segregação
ASC – Análise de Segregação Complexa
ASS – Análise de Segregação Simples
B – *Bordeline*
BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BB – *Bordeline-Bordeline*
BCG – Bacilo Calmette-Guérin
BL – Lepromatoso-*Bordeline*
BT – Tuberculóide-*Bordeline*
C – Citosina
D – Dimorfo
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DZ – Dizigoto
ENH – Eritema Nodoso da Hanseníase
G – Guanina
HLA – Complexo de Antígeno Leucocitário Humano
I – Indeterminada
IFN- γ – Interferon gama
IL-10 – Interleucina 10
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
L – Lepromatoso
LL – Lepromatoso-Lepromatoso
MB – Multibacilar
MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal
MZ – Monozigoto

OMS – Organização Mundial da Saúde
PB – Paucibacilar
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PGL-1 – Glicolípido Fenólico – 1
PQT – Poliquimioterapia
RR1 – Reação Reversa 1
RT1 – Reação do Tipo 1
SW – Swiss White
T – Tuberculóide
TT – Tuberculóide-Tuberculóide
V – Virchoviano

RESUMO

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que ainda afeta ~250.000 indivíduos em países em desenvolvimento todos os anos, com a maioria dos casos concentrados na Índia e no Brasil. Embora estudos moleculares de ligação e associação tenham tido sucesso na identificação de genes controlando suscetibilidade do hospedeiro à hanseníase, não se sabe precisamente a amplitude deste complexo efeito genético. Essa dificuldade em dissecar o componente genético, em parte, é justificada pelas respostas discordantes obtidas em análises de segregação complexa (ASC) realizadas com o objetivo de definir o modelo de herança para o fenótipo de suscetibilidade à doença. O objetivo deste estudo foi conduzir uma ASC utilizando os dados fenotípicos de uma população isolada de hansenianos e suas famílias. A população do estudo foi formada por famílias recrutadas na Vila Santo Antônio do Prata, uma antiga colônia de hansenianos localizada na cidade de Igarapé-Açú, nordeste do Estado do Pará, que possui as seguintes características: grande número de famílias hansenianas multigeracionais, multiplex; alta frequência da doença; alto grau de isolamento, com baixo fluxo migratório; homogeneidade ambiental, socioeconômica e de background étnico. Nossa estratégia de recrutamento permitiu a inclusão de toda a população da colônia, totalizando 2868 indivíduos (225 afetados), distribuídos em 112 pedigrees multigeracionais. A ASC foi realizada utilizando o programa REGRESS, que estima o melhor modelo de análise de regressão logística multivariada para avaliar a probabilidade de uma pessoa ser afetada, dado um conjunto de variáveis explicativas. A ASC identificou o modelo co-dominante, com frequência do alelo de predisposição estimado em 0.22 ($p = 5,04 \times 10^{-7}$), como o que melhor explica os dados observados. Dadas as características únicas da população estudada, acreditamos que estes resultados podem contribuir significativamente para a evidência acumulada de um forte componente genético na susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase.

Palavras-chaves: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, análise de segregação complexa.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects 250.000 new individuals worldwide every year, with the majority of cases concentrated in India and Brazil. Genetic analysis has been successfully applied to the identification of host genetic factors impacting on susceptibility to leprosy. However, a consensus regarding the exact mode of inheritance is yet to be achieved, in part due to the heterogeneity of the studied populations. The objective of this study was to conduct a Complex Segregation Analysis (CSA) on leprosy using data from the Prata Colony, an isolated former leprosy colony founded in the 1920's on the outskirts of Brazilian Amazon presenting: large multiplex, multigeneration leprosy families; high disease frequency; homogenous environmental and socioeconomical variables. Our enrollment strategy was complete ascertainment leading to the examination and inclusion of the whole colony, totalizing 2868 individuals (225 affected) distributed in 112 pedigrees. CSA was performed by using REGRESS, which specified a regression relationship between the probability of a person to be affected and a set of explanatory variables. CSA identified a best fit codominant model, with the frequency of predisposing allele estimated as 0.22 ($p\text{-value} = 5.04 \text{ e-}07$). Given the unique characteristics of the studied population, we believe these results may contribute significantly to the cumulative evidence of a strong genetic component in host susceptibility to leprosy.

Key words: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, complex segregation analysis.

Capítulo 1

Introdução e Revisão da Literatura

1.1. Hanseníase

1.1.1. História da Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que tem marcado e acompanhado a humanidade por milhares de anos, sendo ainda um problema de saúde pública em alguns países subdesenvolvidos (1). A doença é reconhecida em antigas civilizações como na Índia, Egito e China (2). A primeira referência escrita registrada da doença foi datada em 600 a.C. (3). Esta data também coincide com recentes achados de pesquisadores, que encontraram fortes marcas distintivas da hanseníase em restos ósseos de duas múmias localizadas no cemitério de El-Bigha, Egito (3). Outros autores encontraram e confirmaram, após exames, clara evidência da hanseníase mutilante em extremidades ósseas e em crânios de antigos esqueletos (4, 5). A hanseníase era considerada um castigo divino no Antigo Testamento e um carma no budismo (6). No Antigo Testamento, em Levítico, capítulos 13 e 14, encontram-se toda uma orientação sobre a doença, seus sinais para identificação e cuidados em relação aos doentes. Notavelmente, somente a Bíblia relata mais de 50 referências à doença (7, 8). Entretanto, dificilmente se pode comprovar que realmente se tratava de hanseníase, sendo possível que as lesões dermatológicas reportadas fossem de outra etiologia (elefantíase, sífilis ou infecções de pele). A hanseníase, como outras doenças, era algo anormal e ameaçador, que confrontava a saúde (8).

As concepções religiosas sobre a hanseníase como uma punição divina, altamente contagiosa, incurável, herdada, causadora de graves deformidades e incapacidades, resultou em uma forte estigmatização do doente (9, 10). A posição de doença associada ao maior estigma da história afeta não somente os doentes, mas também seus familiares, parentes e incrivelmente até os médicos (11). Assim, já antigas sociedades, como na Índia, adotavam leis de isolamento como medida de prevenção da doença e proteção da população (12).

Durante a idade média, as medidas de exclusão e isolamento se tornaram ainda mais expressivas. Muitas comunidades adotavam ações drásticas para o

isolamento social dos indivíduos com a doença. A forte rejeição dos cidadãos preocupados com o contato forçava os governantes a aplicar leis em que os indivíduos com a doença não poderiam residir ou possuir propriedades dentro de determinadas cidades (13, 14), como por exemplo o decreto do Rei Eduardo I em 1346, expulsando os hansenianos da cidade de Londres (15). Em algumas comunidades medievais, os hansenianos eram vestidos com roupas especiais, de fácil identificação. Estas vestes tinham no peito um desenho em formato de cruz ou a letra “L” e utilizavam túnicas de pano com mangas longas, compridas até os tornozelos, tingidas de castanho avermelhado e com capuz (16). Em alguns casos os indivíduos afetados eram obrigados a usar sinos para alertar outras pessoas de sua presença (17). Por outro lado, existiam comunidades que se caracterizavam pela compaixão aos doentes, fornecendo comida, escola e permissão de compartilhar ambientes públicos (13).

Embora entre membros da igreja e da maioria das pessoas da época fosse comum o conceito de que a hanseníase era infligida por Deus, isso não era completamente aceito no âmbito dos cientistas e médicos medievais, que caracterizaram inúmeras causas e tratamentos para a doença. Entre as causas e explicações foram listados: a transmissão sexual, mordidas de vermes peçonhentos, ingestão de alimentos deteriorados (vinho, peixes e carne) e desequilíbrio de fluidos corporais. Na época medieval, se utilizava uma grande variedade de tratamentos para cuidar, mas não necessariamente curar a doença. Os médicos utilizavam ervas, curas químicas, lírio branco e até relíquias religiosas como por exemplo, os ossos da Santa Milburga (18).

Diante desta incapacidade clínica em tratar a doença, a estratégia de isolamento se tornou uma medida amplamente aceita tanto entre os médicos quanto pelas comunidades. Esforços públicos levaram à construção dos primeiros “Lazaretos” ou “casas-de-leprosos” (hoje conhecidos como leprosários) durante a idade média na Europa. Tipicamente, estes hospitais tinham jardins privados, capelas, cemitérios e eram localizados fora do limite urbano. Apesar do isolamento, esses hospitais permitiam a visita dos parentes (13). Posteriormente, os leprosários se espalharam pelo mundo e ainda hoje estão operando em países

com alta prevalência da hanseníase. No entanto, a função dessas instalações passou a ser de puro isolamento, para centros de caridade dedicada a melhoria das condições de vida das pessoas afetadas pelas deformidades físicas causadas pela doença.

Somente em 1873, com o médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912), foi identificado o agente causador da hanseníase (19), através do isolamento do *Mycobacterium leprae* de lesões de indivíduos afetados, tornando a hanseníase a primeira doença para qual um agente infeccioso foi identificado (20, 21). G. H. A. Hansen foi somente o primeiro cientista de uma grande lista na luta contra um desafio que persiste até os dias de hoje. Desde então, a impossibilidade de cultivo do microrganismo *in vitro*, o tempo de duplicação da bactéria extremamente lento e a dificuldade de transferência para modelos animais têm sido os maiores obstáculos no avanço da pesquisa em hanseníase (22). Em 1960, Charles Shepard contribuiu com importante avanço, conseguindo uma multiplicação limitada de *M. leprae* nas patas de camundongos (23). No início dos anos 70 foi descoberto que o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) poderia ser infectado e que quantidades suficientes de *M. leprae* eram obtidas neste modelo animal para análises biológicas e imunológicas (24). Das várias tentativas posteriores de cultivo do *M. leprae* em laboratório, nenhuma superou o modelo do tatu, que forneceu material para o sequenciamento completo do *M. leprae* (25). Nos últimos anos, laboratórios de todo o mundo têm identificado modelos experimentais alternativos, como os camundongos *Swiss White (SW)*, e os atímicos *nude mice*, que permitem uma rotina de produção satisfatória de *M. leprae* viáveis para uso experimental. Certas espécies de macacos (*Cercocebus sp* e *Mangabey sp*) e camundongos *knockout* para genes de citocinas e quimiocinas (26, 27) também têm sido considerados; entretanto, nenhum desses modelos apresenta a diversidade clínica observada entre pacientes humanos com hanseníase.

O título de hanseníase como doença incurável permaneceu até meados do século XX. Em 1940, o primeiro avanço no tratamento da hanseníase ocorreu com a aplicação da dapsona. No início, essa droga era capaz de deter o avanço da

doença. Porém, após alguns anos de pesquisa e tratamento, percebeu-se que a monoterapia da dapsona estava induzindo resistência bacteriana (28, 29). Assim, em 1982 foi introduzida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a poliquimioterapia (PQT), que torna a hanseníase 100% curável e com baixa taxa de recaída (1, 28). Hoje, o tratamento é disponibilizado gratuitamente através da OMS para todos os pacientes do mundo (30).

Recentemente, um novo capítulo da história desta doença milenar tem sido escrito no sentido de desvendar sua exata origem. Stuart Cole e colaboradores (31) com a ajuda da genética molecular, utilizaram ferramentas genômicas comparativas para suportar a hipótese que a hanseníase tenha tido origem na África Oriental ou próxima ao Oriente, espalhando-se para o resto do mundo por sucessivas migrações humanas. Os autores sugerem que soldados gregos, de regresso das campanhas Índicas de Alexandre, “o Grande”, tenham disseminado a doença para a Europa e Norte da África. Os Europeus ou Norte-Africanos teriam introduzido a hanseníase na África Ocidental e nas Américas ao longo dos últimos 500 anos (31).

1.1.2. Epidemiologia e Controle da Hanseníase

O sucesso proveniente da combinação da PQT e o desenvolvimento de um conceito global de eliminação levaram a uma redução drástica da prevalência mundial da hanseníase de 5.351.408 casos em 1985 para 212.802 casos registrados no início de 2008 (32-34). Em 1991, uma ambiciosa campanha de eliminação da hanseníase foi lançada. A iniciativa tomada pela Assembléia Mundial da Saúde (um fórum mantido pela OMS, que incorpora membros de vários países para definir campanhas, metas, medidas e etc), tinha como meta à “eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública para o ano de 2000”. Esta eliminação foi definida com a redução da taxa de prevalência da hanseníase para menos que 1 por 10.000 indivíduos (35). Como resultado, se em 1985, 122 países no mundo tinham a taxa de prevalência da hanseníase maior de que 1/10.000, este número diminuiu para 24 países em 2000, para 15 países em

2001, para 12 países em 2002, para 6 em 2006, para 4 países em 2007 e para 3 países (Brasil, Nepal e Timor-Leste) em 2008 (33). Juntos eles representaram durante 2007, 17% dos novos casos detectados no mundo. Em adição, 118 países reportaram relatórios a OMS para avaliação estatística global da doença, excluindo a região europeia.

Em particular, a incidência mundial da doença, que estava estável no período de 1994 a 2003 com ~600.000 casos novos/ano, recentemente diminuiu em nível global em 2007 para ~254.000 casos novos/ano (32). A principal região responsável pelo abrupto declínio foi o Sudeste Asiático. Os motivos para estas oscilações não são totalmente compreendidos. Existem alguns fatores que podem distorcer os valores globais da incidência, como por exemplo: (i) o longo período de incubação da doença, variando de 2 à 20 anos (36, 37); (ii) pacientes recentemente diagnosticados com a hanseníase, transmitindo a doença para outros familiares ou indivíduos da comunidade muito antes da doença ser detectada (1); (iii) a variável proporção de casos em mulheres no mundo 21-60%, provavelmente devido à dificuldade de acesso das mulheres aos serviços de saúde em alguns países (38); (iv) a proporção de casos em crianças, também possui altas oscilações que variam de 1-2% na Argentina e China, de 10-20% no Sri Lanka e República Dominicana, e para mais de 30% na Micronésia (38); (v) principalmente, as diferenças operacionais de diagnóstico constatadas entre os programas de combate de diferentes países. No entanto, esses fatores sugerem novos critérios para computar os valores da incidência global, os quais atualmente não estão sendo levados em conta pela OMS e os tornam de difícil comparação.

Apesar de esforços na redução da hanseníase, como por exemplo, a nova meta de eliminação global da OMS reagendada para 2010 (39), a sustentação na manutenção de combate à doença e campanhas de eliminação local, ainda é incerto afirmar quando a hanseníase será eliminada como um problema de saúde pública. Modelos matemáticos indicam que, com as atuais ferramentas disponíveis de combate, a doença ainda permanecerá por várias décadas como um grande problema de saúde pública (1, 38-40).

1.1.3. Patogênese

1.1.3.1. Agente Etiológico

O *M. leprae* é uma bactéria que pertence ao gênero *Mycobacterium*, da classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales* e da família *Mycobacteriaceae* (41). Morfologicamente é um bastonete imóvel, não formador de esporos, microaerófilo, gram positivo, álcool-ácido resistente (BAAR), parasita intracelular obrigatório e que possui tropismo para macrófagos e células de Schwann (40). Normalmente tem um formato reto ou ligeiramente curvado, possuindo de 4.0-7.0 µm de comprimento por 0.3-0.5 µm de largura (21, 29). Na microscopia eletrônica, verifica-se que sua parede celular apresenta duas camadas, uma interna eletrodensa e outra externa eletro-transparente, e abaixo dela a membrana plasmática (42, 43). Um importante lipídio abundante encontrado na parede celular e na cápsula é o glicolipídio fenólico-1 (PGL-1), um antígeno exclusivo do *M. leprae*, o qual confere especificidade imunológica (1, 40, 43). Estudos recentes, indicam que PGL-1 está envolvido na interação do *M. leprae* com a laminina das células de Schwann, sugerindo um papel para o PGL-1 na interação do bacilo com os nervos periféricos do hospedeiro (44).

O *M. leprae* possui três notáveis características que o diferenciam de outras bactérias patogênicas humanas. Primeira, pelo método de Ziehl-Neelsen, os bacilos viáveis (sólidos e íntegros) se coram uniformemente em vermelho, se apresentando isolados ou agrupados em “globias”. Este tipo de disposição apresentada pela bactéria a torna única na natureza (42). Segundo, a bactéria se multiplica muito lentamente, variando entre 12 a 14 dias (40, 45), tornando-se o patógeno humano com o maior tempo de duplicação conhecido. Terceiro, o *M. Leprae* tem seu melhor crescimento em torno de ~30°C, consequentemente, preferindo áreas mais frias do corpo humano (21, 46, 47). Os principais tecidos alvos para infecção do *M. leprae* são, primariamente, a pele e o sistema nervoso periférico (10).

Após o completo seqüenciamento do genoma do *M. leprae*, um grande avanço no sentido da elucidação das características únicas deste organismo foi alcançado (25). Apesar das análises no genoma em micobactérias terem sido iniciados na década de 80, mais uma vez o *M. leprae* perdeu a disputa com *M. tuberculosis*, cujo seqüenciamento completo do genoma foi publicado em 1998 (48). Isto colaborou futuramente para o seqüenciamento do genoma do *M. leprae*, que após sua conclusão, ofereceu a possibilidade de uma análise comparativa com o *M. tuberculosis*. Esta comparação sugere que o genoma do *M. leprae* sofreu um processo dramático de evolução reductiva (20), resultando em um genoma menor (3.27 Mb para *M. leprae* versus 4.41 Mb para *M. tuberculosis*) e uma redução significativa no conteúdo G+C (57,8% para *M. leprae* versus 65,6% para *M. tuberculosis*). Somente (49,5%) do seu genoma é composto por genes codificadores de proteínas, enquanto, (27%) são formados por pseudogenes reconhecíveis. O restante (23,5%) do genoma parece não ser codificante, e pode corresponder a seqüências regulatórias ou genes residuais mutados a ponto de se tornarem irreconhecíveis. A distribuição dos 1.116 pseudogenes do *M. leprae*, contra somente seis pseudogenes em seu parente próximo, o *M. tuberculosis*, é essencialmente aleatória em todo o genoma. Dos 1.604 genes potencialmente ativos, 1439 genes são comuns a ambos os patógenos. Entre os 165 genes restantes, sendo nenhum ortólogo no *M. tuberculosis*, somente 29 podem ter funções atribuídas. Muitas das 136 seqüências codificantes restantes no *M. leprae*, não mostram nenhuma similaridade com genes conhecidos, podendo também representar pseudogenes (25).

Portanto, assumindo que o genoma do *M. leprae* foi uma vez equivalente topologicamente e funcionalmente a outras micobactérias, a perda maciça de genes na sua evolução proporcionou ao bacilo uma elevada especificidade por seus alvos celulares no homem e no tatu, os macrófagos e nas células de Schwann do sistema nervoso periférico. Suspeita-se que o *M. leprae* perdeu mais de ~2.000 genes comprometendo várias vias metabólicas, catabólicas e suas funções respiratórias, obrigando a ser um parasita intracelular (25, 43, 49). Hoje, a manutenção de um conjunto mínimo de genes pode ser a explicação para

algumas características únicas do *M. leprae*, tais como a impossibilidade de ser cultivado em meio artificial e seu longo tempo de duplicação.

1.1.3.2. Transmissão

É surpreendente que ainda não se saiba com precisão a forma com a qual a hanseníase é transmitida. Alguns autores defendem supostamente duas principais rotas de infecção: o contato físico com pacientes com a hanseníase multibacilar virgens de tratamento e através da via respiratória.

Uma das hipóteses é de que a disseminação da doença seria pelo contato da pele de pacientes multibacilares não tratados com a pele de indivíduos saudáveis. Pacientes contaminantes seriam casos extremos da doença, apresentando trauma ou reações com ulceração, deixando a epiderme exposta e permitindo a saída direta do bacilo pela pele, já que não há evidências de que o *M. leprae* possa transversar a pele intacta em qualquer direção (1). Assim, o contato pele-para-pele não é atualmente considerado uma rota comum de transmissão da doença (50).

Por outro lado, a rota amplamente aceita de transmissão é provavelmente por propagação do aerossol de secreções nasais e de captação nasal ou mucosa respiratória de pacientes portadores da hanseníase lepromatosa não expostos ao tratamento com PQT (37). Diversos estudos encontraram a micobactéria em secreções nasais dos pacientes portadores da hanseníase lepromatosa virgens de tratamento (51, 52). O DNA do *M. leprae* também pode ser encontrado em swab nasal de até 5% dos indivíduos saudáveis da Índia e Indonésia, o que sugere que uma infecção subclínica ocorre mais freqüentemente em áreas endêmicas (51, 53-55). Mesmo que a maioria dos indivíduos com infecção subclínica não desenvolvam a doença clínica, a simples proximidade com pacientes de hanseníase pode ser um fator determinante na transmissão (37, 56). O risco relativo para a doença hanseníase em contatos domésticos é de 8-10 para a forma lepromatosa e de 2-4 para a forma tuberculóide (37, 50). Com a prevalência da doença em declínio em todo o mundo, a importância relativa da transmissão

doméstica se torna fundamental para uma terapia profilática no controle da hanseníase.

Outras possíveis rotas alternativas de transmissão têm sido propostas, incluindo o contato com os tatus, insetos (57, 58), inoculação dérmica direta (do solo (59) e em tatuagem (60, 61)) e através de secreções orgânicas (leite, esperma, suor e secreção vaginal (29)), mas nenhum desses modelos alternativos propostos conseguem comprovar qualquer relevância epidemiológica.

1.1.3.3. Forma Clínica

A patogênese da hanseníase pode ser descrita em dois estágios: no primeiro, uma pequena quantidade (42) de indivíduos intrinsecamente susceptíveis à hanseníase são infectados pelo *M. leprae* e podem desenvolver poucas lesões ou uma lesão única, caracterizadas pelo aparecimento de manchas hipocrômicas e com alteração de sensibilidade. Frequentemente, apenas a sensibilidade térmica encontra-se alterada. Nesta forma clínica não há comprometimento de troncos nervosos (apenas em pequenas ramificações nervosas cutâneas) e a pesquisa de BAAR, revela-se negativa (29). Cerca de três quartos destes pacientes evoluem com cura espontânea (62-64). O restante dos indivíduos são descritos como susceptíveis a hanseníase *per se*, isto é, a hanseníase independente do tipo de manifestação clínica. Esses indivíduos que não obtiveram a cura espontânea e que não são tratados podem progredir para o segundo estágio, onde a doença se manifesta em um espectro de formas clínicas, de acordo com o tipo de resposta imune predominante no hospedeiro. Em um dos pólos deste espectro reside uma forma mais localizada, chamada de tuberculóide, que está associada com uma eficiente e vigorosa resposta imunológica do tipo Th1 (mediada por células); no outro pólo, uma forma sistêmica que está associada predominantemente com a resposta imunológica do tipo Th2 (humoral), chamada de lepromatosa (Figura 1). Esses padrões de resposta imune são o resultado dos perfis de citocinas produzidas pelo hospedeiro quando exposto ao *M. leprae*, por exemplo, a interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ) nos indivíduos

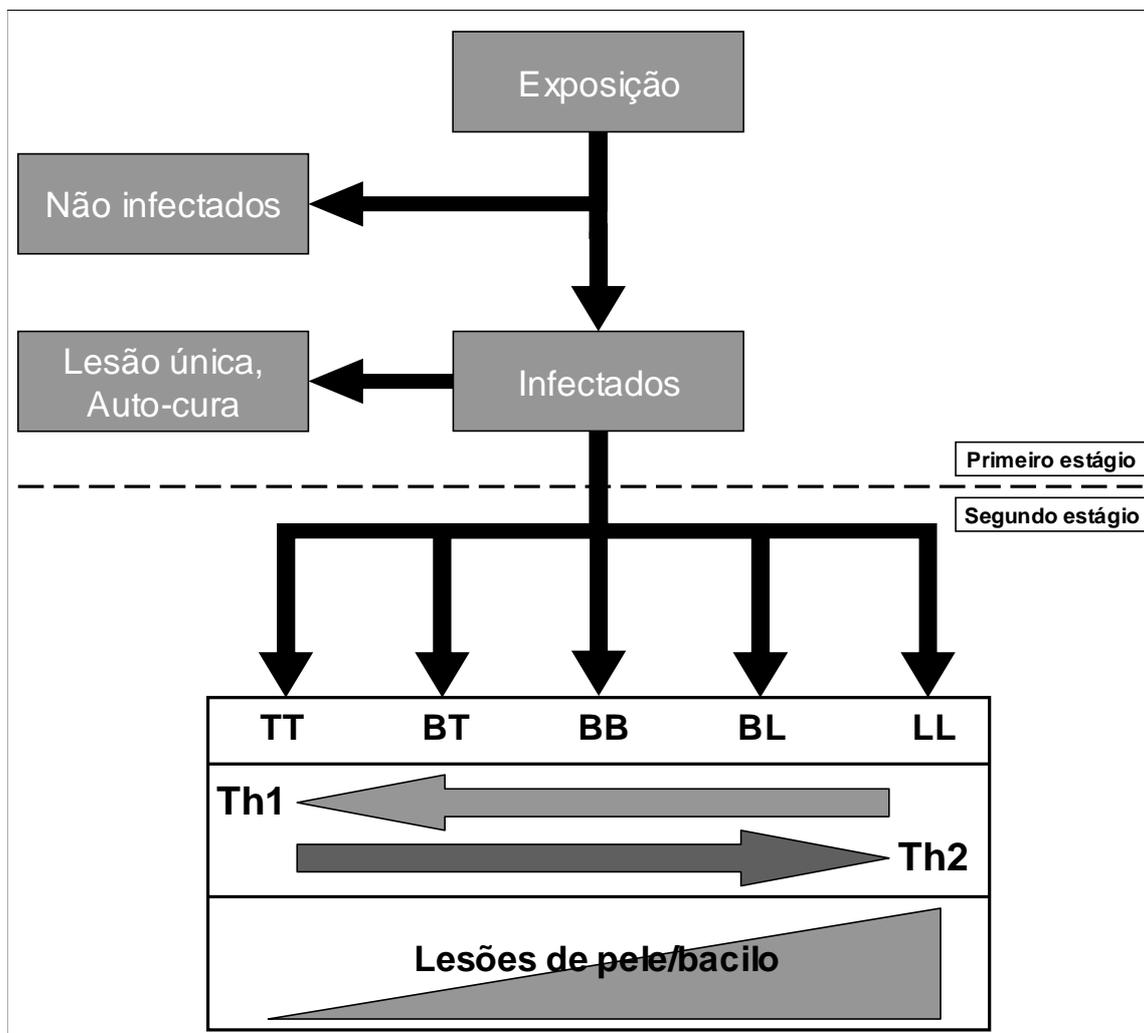
tuberculóides e as interleucinas 4, 5, 10 nos indivíduos lepromatosos (65, 66). Portanto, a dicotomia das respostas Th1-Th2 é um fator determinante no tipo de defesa do hospedeiro, direcionando a apresentação clínica da doença.

Historicamente, várias classificações da hanseníase foram propostas e utilizadas em seus determinados períodos de acordo com o conhecimento disponível na ocasião. A primeira tentativa de classificação é datada de ~500 a.C., conforme apresentado em um compêndio médico indiano chamado *Sushruta samita* que relatava a doença sob duas formas, uma com nódulos e ulcerações e outra com anestesia e deformidades. Porém, somente em 1953 no Congresso Internacional de Hanseníase realizado em Madrid (67), uma classificação universal das formas clínicas da doença foi proposta e aceita, sendo que nenhum outro congresso internacional se dispôs a alterá-la (42, 68). A chamada Classificação de Madrid, adota critérios de polaridade, baseados principalmente em fundamentos clínicos (variando em número, extensão, definição de margens e simetria de distribuição das lesões) e histológicos da doença (variação de granulomas bem definidos a infiltrado difuso linfo-histiocitário) (68-71), definindo os grupos polares em tuberculóide (T) e virchoviano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma borderline (B) ou dimorfa (D) (67).

Em 1966, Ridley e Jopling (72) propuseram uma classificação para ser utilizada por pesquisadores. A justificativa desta nova proposta era de que, apesar do espectro da doença possuir dois pólos bem definidos, entre eles existia um grande número de pontos intermediários que, pela classificação da época (Madrid, 1953) que adotava critérios baseados somente em aspectos clínicos e histológicos, levava facilmente a confusões e a erros na definição das formas clínicas. Esta nova classificação adotava subgrupos dentro do espectro, definidos segundo critérios clínicos (número, tamanho, aparência de lesões na pele e outros achados clínicos) e bacteriológicos (índice bacterial em esfregaços da pele), e enfatiza os aspectos imunológicos (grau de receptividade do teste da lepromina) e histopatológicos (biópsia do granuloma da pele) (68, 72). Assim, cinco grupos foram descritos rigorosamente: tuberculóide-tuberculóide (TT), borderline-

tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL) e lepromatoso-lepromatoso (LL).

Figura 1 – Modelo de dois estágios para a patogênese da hanseníase.



Fonte: Adaptado de Jacobson e Krahenbuhl (62).

Nota: No primeiro estágio, a maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não é infectada; porém, uma pequena quantidade de indivíduos intrinsecamente susceptíveis à hanseníase é infectada e podem desenvolver uma lesão única que permanece não detectada e freqüentemente cura-se espontaneamente. Aqueles que não curam espontaneamente e que não são tratados podem progredir para o segundo estágio, onde a doença se manifesta em um espectro de formas clínicas, de acordo com o tipo de resposta imune predominante no hospedeiro (Th1 e Th2), que varia desde uma forma localizada até a forma sistêmica, de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (72). Nesse critério, a hanseníase é classificada fenotipicamente em um espectro com dois pólos extremos: de um lado do espectro, o pólo tuberculóide (TT), com lesões bem definidas e ausência de bacilos na pele e nervos; do outro lado, a forma lepromatosa (LL), com múltiplas lesões de pele e presença de bacilos na pele e nervos. Entre esses pólos estão as formas intermediárias (BT, BB e BL), que são caracterizadas pela instabilidade imunológica.

Em 1982, a OMS propôs também uma classificação com fins operacionais para a utilização dos esquemas multiterápicos de tratamento da hanseníase. Nessa classificação, os pacientes são divididos em: paucilbacilares (PB), caso apresentem cinco ou menos lesões cutâneas com baciloscopia negativa, abrangendo assim todos os tuberculóides e indeterminados; e os multibacilares (MB), caso apresentem seis ou mais lesões cutâneas com baciloscopia positiva, dos quais fazem parte todos os virchovianos e dimorfos (68, 73).

Alguns estudiosos cogitam a possibilidade de fazer correlações equivalentes das formas clínicas entre os sistemas de classificação (42, 69), apesar de que, definitivamente não há perfeita sobreposição dos esquemas existentes. A correlação mais aceita é entre as classificações da OMS e de Ridley & Jopling, sendo que pacientes com as formas TT e parte de BT (Ridley e Jopling) são geralmente equivalentes para a doença PB (OMS), enquanto que pacientes com as formas LL, parte de BT, BB e BL (Ridley e Jopling) são equivalentes para a doença MB (OMS).

1.1.3.4. Características Clínicas

As manifestações clínicas da hanseníase acontecem predominantemente na pele, mucosas e nos nervos periféricos. Doentes apresentam comumente lesões cutâneas, dormência e fraqueza causada pelo envolvimento dos nervos periféricos ou mais raramente úlceras anestésicas nas mãos ou pés. Em alguns casos, pode ocorrer o comprometimento de outros tecidos e órgãos, tais como olhos, nariz e testículos. Em resumo, as características clínicas da doença podem ser agrupadas em três partes: (i) manifestações devido à proliferação bacteriana; (ii) manifestações devido à resposta imunológica do hospedeiro ao *M. leprae*; e (iii) manifestações devido à neurite periférica causada pelos dois primeiros processos (63).

Em um pólo do espectro, a hanseníase tuberculóide é caracterizada pela exacerbada resposta imune celular, ocorrendo formação de granuloma bem definido e manifestando-se geralmente com lesões cutâneas e/ou neurais únicas

ou em pequeno número com distribuição assimétrica. As lesões são freqüentemente escamosas, secas e com alopecia parcial ou total. Os distúrbios sensitivos nas lesões cutâneas são bastante acentuados (hipoestesia ou anestesia), assim como as alterações da sudorese e vasomotoras (42). Os danos nos nervos periféricos são limitados, devido à destruição das fibras nervosas dérmicas. O teste de Mitsuda é fortemente positivo e a baciloscopia nas lesões é negativa. Essa forma clínica tem tendência à cura espontânea (69).

Em outra extremidade do espectro, a hanseníase virchowiana é caracterizada pela alta susceptibilidade do hospedeiro devido à deficiência da resposta imune celular. Esta forma apresenta uma alta proliferação bacilar resultando em lesões na pele, em nervos periféricos, e em alguns casos, evoluindo para os órgãos internos, testículos e olhos. As lesões cutâneas se distribuem principalmente em áreas mais frias do corpo e são ricas em bacilos (74). Nos nervos periféricos, existe acometimento múltiplo que os tornam espessados à palpação (tipicamente, o nervo tibial posterior é o mais comumente afetado, seguido pelo ulnar, mediano, poplíteo lateral e nervos faciais (75, 76)). A hipoestesia das extremidades e das lesões deve-se à destruição dos nervos periféricos. Edemas nos pés e nas pernas são comuns; com a progressão da doença, os casos lepromatosos apresentam espessamento da pele facial (face de leonino), decorrente da infiltração dérmica (29, 77). Deformidades nas mãos e nos pés são comuns em doentes não tratados. A baciloscopia é fortemente positiva e a reação de Mitsuda é negativa (69). Esta forma clínica é importante do ponto de vista epidemiológico, pois os pacientes tendem a apresentar bacilos nas lesões cutâneas na proporção de 10^{10} *M. leprae* por grama de tecido (63), sendo portanto, potencialmente infectantes.

Entre os pólos, a hanseníase dimorfa é caracterizada por sua instabilidade imunológica, o que faz com que haja grande variação em suas manifestações clínicas, principalmente na pele e nos nervos periféricos. As lesões de pele são numerosas e sua morfologia combina aspectos das formas tuberculóide e lepromatosa, podendo haver tendência na dominância para uma das formas. As lesões neurais são precoces, assimétricas e, com freqüência, levam a

incapacidades físicas (29, 78). A baciloscopia pode ser negativa ou positiva com índice bacilar variável e a reação de Mitsuda varia de negativa a positiva fraca (69).

Apesar do bacilo possuir uma alta infectividade em uma pequena população susceptível, sua baixa patogenicidade não leva diretamente à morte. Entretanto, um período anterior à atual quimioterapia efetiva, em raros casos, alguns pacientes desenvolviam uma obstrução laríngea que em associação com outras doenças (como pneumonia e tuberculose) poderia levar o paciente a situações de alto risco de óbito.

1.1.3.5. Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é clínico e baseado na presença de um ou mais dos seguintes sinais cardeais: (i) manchas hipopigmentadas ou avermelhadas com perda definitiva de sensação; (ii) nervos periféricos espessados; (iii) bacilos em esfregaços de pele ou em material de biopsia (73). O diagnóstico através desses três sinais é amplamente reconhecido. Estudos na Índia retratam que a utilização destes critérios resultou em uma alta sensibilidade (>97%) e especificidade (>92%) para o diagnóstico da hanseníase (79, 80). Em amostras populacionais de Bangladesh e da Etiópia, 96% e 91% dos casos multibacilares e 86% e 76% dos casos paucibacilares tinham o alargamento de um ou mais nervos, respectivamente (81, 82). Esfregaço de pele, coletados para detectar a presença intradérmica do bacilo, possui alta especificidade mas baixa sensibilidade, porque cerca de 70% de todos os portadores de hanseníase têm o esfregaço negativo (83). No entanto, esfregaços de pele são importantes porque eles identificam os pacientes mais infecciosos e os pacientes que oferecem um maior risco de recaída. O diagnóstico histológico, quando disponível, é importante para dar consistência ao diagnóstico. A presença de inflamação neural diferencia, histologicamente, a hanseníase de outros distúrbios granulomatosos.

A proposta de que a hanseníase possa ser diagnosticada pela presença de um único sinal de lesão de pele com perda sensorial, por si só, não passa no

critério de avaliação. Embora, 70% das lesões de pele de hanseníase tenham sensação reduzida, os 30% das lesões não anestésicas ocorrem em pacientes com a doença multibacilar (83), que são infecciosas e têm um risco aumentado de desenvolver deficiências em comparação com aqueles com a doença paucibacilar. Portanto, outros critérios, como alargamento de nervos periféricos e esfregaços de lesões, também devem ser empregados para aumentar a precisão do diagnóstico.

Recentemente, novas ferramentas no auxílio ao diagnóstico da hanseníase e na identificação do *M. leprae* tem sido propostas. Por exemplo, a detecção de anticorpos PGL-1 (84-87). Testes baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são potencialmente sensíveis e específicos, mas detectam o *M. leprae* em 95% dos pacientes multibacilares e somente 55% dos pacientes paucibacilares (88-92). A utilidade destes novos métodos de diagnósticos na hanseníase ainda precisa ser investigada.

1.1.3.6. Reação de Mitsuda

A lepromina, no Brasil chamada de mitsudina, é uma suspensão esterilizada de bacilos de hanseníase mortos pelo calor, extraídos mecanicamente de hansenomas de pacientes virgens de tratamento (lepromina H) ou de tecidos de tatus infectados por *M. leprae* (lepromina A). A denominação “mitsudina” foi adotada no Brasil para homenagear Kensuke Mitsuda, o primeiro a relatar, na III Conferência Internacional de Hanseníase, realizada em 1923 (Estrasburgo), os resultados das experiências realizadas com a suspensão de *M. leprae* em larga escala (93, 94). A lepromina é utilizada em uma intradermoreação conhecida como Teste de Mitsuda.

O teste de Mitsuda consiste na aplicação de uma injeção intradérmica de 0,1 ml de lepromina na face volar do antebraço, que pode provocar uma reação precoce que é lida 48 horas após a inoculação dessa suspensão (reação de Fernandez) (95), e uma reação tardia que é denominada reação de Mitsuda. Os resultados da induração da reação de Mitsuda são obtidos medindo o diâmetro (mm) dos nódulos formados após 21-30 dias da injeção de lepromina. A

interpretação desses resultados é tipicamente binária, negativa ou positiva. A reação negativa é quando há ausência de resposta clínica ou aparecimento de pápula, nódulo e infiltração (< 3 mm), enquanto que uma reação positiva é caracterizada por respostas clínicas com diâmetro \geq 3 mm (96). Este teste fornece uma mensuração da capacidade do indivíduo em montar uma resposta imune granulomatosa contra a mistura de antígenos presentes, mas não é um marcador para resposta imune específica para o bacilo de hanseníase (97). Assim, uma resposta negativa está associada com a forma lepromatosa da hanseníase, ou seja, com uma incapacidade do hospedeiro em responder ao *M. leprae* e de eliminá-lo. Uma resposta positiva da reação de Mitsuda está associada com a capacidade de desenvolver uma resposta granulomatosa, envolvendo células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas) e participação de linfócitos CD4⁺ em pacientes com hanseníase, ou seja, uma eliminação bem sucedida do bacilo (40, 98). A combinação da biópsia e o exame histopatológico fortalecem a confirmação dos resultados (40). Portanto, do ponto de vista clínico, a reação de Mitsuda é um interessante indicador de eficácia da imunidade anti-hanseníase, porque tem um elevado valor de prognóstico para a susceptibilidade ou resistência para a forma lepromatosa da doença em indivíduos infectados com o *M. leprae* (99-102).

Contudo, entre todos os testes cutâneos usados para diagnóstico ou investigação de doenças infecciosas (por exemplo: tuberculina, histoplasmina, toxoplasmina e candidina), a lepromina é provavelmente o único antígeno amplamente estudado que reflete a capacidade de um indivíduo em gerar uma resposta granulomatosa. Por esta razão, a possibilidade de influência genética na falta de resposta a lepromina, ou seja, associada ao fenótipo Mitsuda-negativo, pode ser de grande importância para geneticistas interessados na herança de aspectos imunológicos da resposta granulomatosa (103-106). Encontrar o *locus* responsável pelo controle da reação de Mitsuda parece ser um caminho promissor na localização dos alelos responsáveis pela susceptibilidade e/ou resistência à hanseníase lepromatosa e outras doenças granulomatosas.

1.1.3.7. Tratamento e Prevenção

O primeiro agente microbiano efetivo contra o *M. leprae* foi a dapsona, mundialmente introduzida na década de 50 como quimioterapia padrão no tratamento das formas paucibacilares e multibacilares da hanseníase. Entretanto, sua utilização como monoterapia por quatro décadas resultou no aparecimento de resistência medicamentosa de até 40% em algumas áreas do mundo (107). Paralelamente, outras drogas foram desenvolvidas e testadas no tratamento da hanseníase, como por exemplo: rifampicina, clofazimina, minociclina, ofloxacina e claritromicina. Porém, o emprego dessas drogas como monoterapia resultaram em resistência medicamentosa, fraco desempenho bactericida, hepatotoxicidade e outros efeitos colaterais (40).

Para superar o problema de resistência do *M. leprae* a drogas e encontrar uma melhor eficácia no tratamento da doença, a OMS padronizou um tratamento poliquimioterápico para a hanseníase em 1981 (28). Atualmente, esse tratamento é composto por três drogas combinadas: dapsona, rifampicina e clofazimina, recomendados para os pacientes paucibacilares e multibacilares por períodos de seis e doze meses, respectivamente (108).

A PQT tem sido de grande sucesso e contribuiu significativamente na diminuição da prevalência mundial (109). No entanto, mesmo com essa poderosa combinação de drogas, o número de novos casos registrados no mundo não sofreu diminuição considerável, e relatos sobre resistência medicamentosa ao PQT ocorrem esporadicamente. Estudos indicam que regiões específicas do DNA do *M. leprae* têm importante papel no controle da resistência a drogas. Vários autores sugerem variantes específicas ligadas aos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA* sendo responsáveis pela resistência para a dapsona, rifampicina e ofloxacina, respectivamente (110-112). Um estudo em Karigiri no distrito de Tamil Nadu na Índia, utilizou 265 biopsias de pacientes hansenianos para avaliar estirpes resistentes de *M. leprae*: 18,49% das biopsias apresentaram cepas resistentes do bacilo para diversas concentrações de dapsona, rifampicina e clofazimina. No mesmo estudo, utilizando uma amostra de 369 pacientes multibacilares com

baciloscopia positiva foi detectado uma resistência de 6,23% para uma ou mais drogas (113). Contudo, apesar de vários estudos evidenciarem a resistência natural do *M. leprae* a drogas, a descontinuidade no tratamento PQT e a monoterapia podem colaborar para o aparecimento de bacilos resistentes (114).

Desenvolver estratégias para erradicar a doença é necessário, tanto a nível profilático (pré-exposição) como terapêutico (pós-exposição). Esforços têm sido direcionados para a produção de vacinas, as quais oferecem vantagens do ponto de vista imunológico, como por exemplo, a quebra na cadeia de transmissão da doença. Na hanseníase diversas vacinas já foram desenvolvidas, mas nenhuma ofereceu elevados níveis de proteção contra o *M. leprae*. Ensaio controlados randomizados e estudos de caso-controle mostram que o bacilo Calmette-Guérin (BCG) proporciona variável proteção contra a hanseníase. Em Burma, os resultados demonstraram proteção com eficiência para BCG de (20%; 95% IC: 12-28) (115), em Malawi (49%; 95% IC: 1-74) (116) e em Uganda com eficiência de (80%; 95% IC: 72-85) (117). Em adição, uma combinação de BCG com bacilos mortos de *M. leprae* (HKML) melhoraram significativamente a proteção contra a doença na Índia (64%; 95% IC: 54-81) (118). Entretanto esse efeito não é evidenciado em outras populações, como da própria Índia (42%; 95%, IC: 1-66) (119), Venezuela (120) e Malawi (116). Na região amazônica, a vacinação neonatal do BCG tem resultado na proteção contra a doença, com eficiência de (74%; 95% IC: 57-86) (121), sugerindo evidências de um importante impacto na ocorrência e transmissão da hanseníase. Entretanto, os mesmos autores não encontraram evidência de proteção conferida na segunda dose da vacina BCG contra a hanseníase (122).

Continuando a busca por novas vacinas, diversos estudos em camundongos têm demonstrado, historicamente, proteção contra o *M. leprae* (123-125). Em um exemplo recente, Ngamyang *et al* mostraram que o uso de componentes celulares do *M. leprae* localizados no citosol e frações de membrana podem conferir proteção significativa contra o crescimento bacteriano nas patas de camundongos (126). Embora promissor, a eficácia dessas vacinas ainda devem ser testadas em grandes populações humanas com apropriada segurança.

1.1.3.8 Reações da Hanseníase

As reações da hanseníase (ou hansênicas) são complicações inflamatórias agudas que representam a principal causa de danos e morbidade neurais em grande parte dos pacientes hansenianos. Essas reações são um fenômeno imunológico que ocorre antes, durante ou depois da conclusão da PQT, e que podem afetar de 30% a 50% de todos os pacientes com hanseníase (40, 127). Essas manifestações da hanseníase são resultantes das alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o *M. leprae* (63). A contribuição das reações é enorme para o ônus da hanseníase, e precisam ser diagnosticadas e tratadas precocemente para evitar o comprometimento da função nervosa (definido como qualquer redução na função motora e sensorial), com perda subsequente de sensibilidade, paralisia e deformidade.

Existem dois tipos principais de reações hansênicas: as reações do tipo 1 (RT1) ou Reação Reversa (RR1), e as reações do tipo 2 ou Eritema Nodoso da Hanseníase (ENH). Evidências indicam que a RT1 é o resultado do aumento espontâneo da imunidade mediada por células e da hipersensibilidade tardia aos antígenos de *M. leprae*, mas as causas e mecanismos deste aumento permanecem pouco esclarecidos (40). Esses episódios ocorrem na maioria das vezes, em pacientes da porção bordeline do espectro (BL, BB e BT). Reações do tipo 1, geralmente, se desenvolvem de forma gradual e seu curso natural pode durar várias semanas (128). As lesões cutâneas ocorrem em lesões existentes que se tornam mais eritematosas e edematosas, sendo possivelmente seguido com novas lesões agudas em outros locais. Em reações graves, as lesões podem tornar-se úlceras. Nos nervos, a presença de neurite aguda leva ao comprometimento da função nervosa, que se não for tratada rapidamente e de forma adequada causa a perda permanente da função nervosa, ocasionando neuropatia periférica sensitiva e motora (42). O tratamento das reações do tipo 1 é destinado a controlar a inflamação aguda, aliviando dores e inversão do dano neural, através da administração de corticosteróides orais, como por exemplo a prednisolona.

A reação do tipo 2 ou ENH incide em pacientes com imunidade celular deficiente ao *M. leprae*, abundantes bacilos em lesões nervosas periféricas ou cutâneas e uma resposta a anticorpo policlonal com altos níveis de imunoglobulinas circulantes. Autores propuseram que a reação tipo 2 representa um fenômeno mediado por imunocomplexos, porém essa teoria ainda não foi comprovada (40). O ENH ocorre normalmente em pacientes multibacilares (LL e BL), causando lesões cutâneas e neurites. As manifestações cutâneas da ENH são generalizadas com nódulos eritematosos que se desenvolvem na face, extremidades ou tronco e sem relação com lesões previamente existentes. As neurites ocorrem freqüentemente e de forma severa. A maioria destes pacientes apresenta febre alta (40,5 °C) (50), dores no corpo, aumento doloroso de linfonodos, mal estar, e graus de neurite com neuropatia sensorial e motora. No ENH grave, algumas lesões cutâneas podem tornar-se ulcerosas (eritema nodoso necrotizante). O curso natural das reações do tipo 2 é de 1 a 2 semanas, mas muitos pacientes têm episódios múltiplos recorrentes ao longo de vários meses (77). O tratamento para o ENH se inicia através de corticoesteróides e, se necessário, emprega-se a talidomina (129).

Uma vez que as reações e a neuropatia ainda são as principais causas de incapacidades na hanseníase, entender estes episódios torna-se prioridade. Uma melhor compreensão e maior especificidade é necessária para definir mecanismos e fatores de risco. Portanto, entende-se que o diagnóstico precoce e a eficácia de tratamentos alternativos de droga são essenciais para reduzir riscos inerentes ao tratamento de esteróides ao longo prazo, deformidades e deficiência.

1.1.3.9. Mecanismos Moleculares da Patogênese da Hanseníase

A expressão clínica da infecção com o *M. leprae* é o resultado de interações complexas entre fatores (genéticos e não genéticos) do hospedeiro com os fatores (microbiais e não-microbiais) da bactéria (130). O mecanismo molecular destas interações tem sido o objetivo de investigação intensa por parte de muitos pesquisadores (131). Em particular, a susceptibilidade para a hanseníase *per se*

depende provavelmente de mecanismos de interação entre o bacilo e suas células-alvo, os macrófagos e células de Schwann do sistema nervoso periférico.

Em pacientes lepromatosos, os bacilos são encontrados em uma variedade de tecidos e tipos de células, mas no interior dos macrófagos essas bactérias podem sobreviver e multiplicar (132). Esses macrófagos interiorizados localizados em tecidos específicos e em sítios de infecção podem desempenhar um importante papel na patogênese da hanseníase, sendo provavelmente veículos de disseminação da doença. Embora candidatos para mediar a interação *M. leprae*-macrófago tenham sido descritos (133, 134), a identidade dos receptores macrófágicos para o *M. leprae* ainda permanece desconhecida. Além disso, estes achados não conseguem explicar a alta afinidade específica do *M. leprae* pelas células de Schwann.

Estudos clínicos e histopatológicos realizados na década de 50 já indicavam que o *M. leprae* invade primariamente as células de Schwann dos nervos periféricos (135), causando danos nervosos e resultando nas deformidades e incapacidades da doença (136-138). A base molecular dessa interação entre *M. leprae* e células de Schwann de humanos era praticamente desconhecida até a década de 90, quando intensa pesquisa foi direcionada para a elucidação dos mecanismos envolvidos. Esses estudos contribuíram imensamente para o entendimento da biologia básica da hanseníase e das interações do *M. leprae* com células hospedeiras. Rambukkana *et al* (139) demonstraram como o *M. leprae* tem especificamente como alvo os nervos periféricos, acoplando-se no domínio-G da cadeia alfa da laminina-2, uma molécula presente na lâmina basal das células de Schwann. O complexo formado pela laminina-2/*M. leprae* acopla-se, por sua vez, à cadeia α da distroglicana (α -DG), um receptor para laminina presente na membrana plasmática da célula de Schwann (140), em um evento que media a invasão celular.

Entretanto, evidências indicam nitidamente que esse mecanismo de ligação na superfície da célula de Schwann através das lamininas α 2 não é único para o *M. leprae*. Outras espécies de micobactérias, incluindo *M. tuberculosis*, *M. chelonae* e *M. smegmatis* têm demonstrado uma rápida capacidade de ligar-se a

laminina $\alpha 2$ (141) e essas espécies interagem inteiramente com linhagem celular de células Schwannoma (neoplasia da célula de Schwann) humano. Isso sugere que a habilidade de aderência às lamininas $\alpha 2$ é conservada dentro do gênero *Mycobacterium* (40).

De forma natural, a próxima questão a ser respondida seria quais fatores bacteriais específicos estariam contribuindo para o tropismo observado nas células de Schwann. Uma maneira de limitar que fatores bacterianos estão envolvidos nessa interação do *M. leprae*/célula de Schwann é comparando a parede celular do *M. leprae* com *M. tuberculosis* e de outras micobactérias, e determinar quais moléculas são exclusivas do *M. leprae*. Uma dessas moléculas emergentes é o PGL-1, que além de ser único para o *M. leprae*, tem sido evidenciado como ligante específico da cadeia $\alpha 2$ da laminina na camada da lâmina basal da unidade célula de Schwann *in vitro* (44), através do seu trissacarídeo terminal.

Além da interação do PGL-1 do *M. leprae* com a laminina-2 do hospedeiro, outra molécula protéica da parede celular específica de adesão, denominada pelos autores MB-LBP21, potencializa a interação do bacilo com a célula de Schwann. Codificado pelo gene do *M. leprae* *ML1683*, a proteína de 21 kDa (MB-LBP21) também se liga especificamente à laminina-2 nos nervos periféricos (142). Esses experimentos indicam um específico papel para MB-LBP21 na adesão do *M. leprae* com as células de Schwann. Essa proteína foi identificada por dois grupos simultaneamente (142, 143).

Em resumo, a descrição dos mecanismos envolvidos na invasão específica do sistema nervoso periférico pelo *M. leprae* é um importante passo em direção ao melhor entendimento da neuropatologia da doença. Entretanto, há evidências para a existência de mecanismos moleculares adicionais, ainda não descritos, envolvidos nos eventos precoces da infecção na hanseníase (140, 141). Uma combinação de diferentes abordagens experimentais, por exemplo, estudos funcionais de genes identificados por análise genética, podem ajudar a superar as limitações das técnicas clássicas da biologia molecular, fornecendo evidências

adicionais que contribuirão para a elucidação da complexa natureza da interação entre o *M. leprae* e suas células-alvo.

1.2 Genética de Traços Complexos

A genética foi revolucionada durante a década de 80 através da aplicação de mapeamento genético, por clonagem posicional, para localização de genes responsáveis pelas doenças mendelianas simples, ou seja, doenças associadas a uma perfeita correlação entre genótipo e fenótipo. Hoje, sabemos que muitas das doenças e traços não seguem padrões clássicos de herança mendeliana, sendo nomeadas então como “doenças ou traços complexos”. Essas doenças complexas ocorrem devido à combinação de fatores genéticos (oligogênica ou poligênica) associados a fatores ambientais (exposição ao patógeno), sócio-econômicos e culturais (tabagismo, etilismo, etc) – que em parte são previsíveis e, em parte, devido ao acaso (144). Assim, podemos assumir que fenótipos de doenças complexas (multifatoriais), incluindo as doenças infecciosas, são ao menos em parte controlados por fatores genéticos (145).

Em 2001, o completo sequenciamento do genoma humano (146, 147) proporcionou aos cientistas interessados um novo e empolgante desafio no sentido de dissecar o componente genético para susceptibilidade do hospedeiro a fenótipos complexos. Diversas metodologias foram desenvolvidas (148) com a proposta de obter o exato número e localização de genes causadores de impacto sobre esses fenótipos complexos. Classicamente, o primeiro passo nessa direção é realizado por uma ampla estratégia de estudos observacionais, como por exemplo, a agregação familiar, estudos comparativos de gêmeos e as análises de segregação. Estas estratégias têm como objetivo somente caracterizar a participação de um componente genético influenciando o fenótipo, porém nenhuma delas tem o poder suficiente de definir a exata localização e a quantidade de genes envolvidos. Para tal, outros estudos são utilizados, como estudos de ligação e associação, que empregam marcadores genéticos moleculares com o objetivo de refinar a busca por genes. Estes estudos

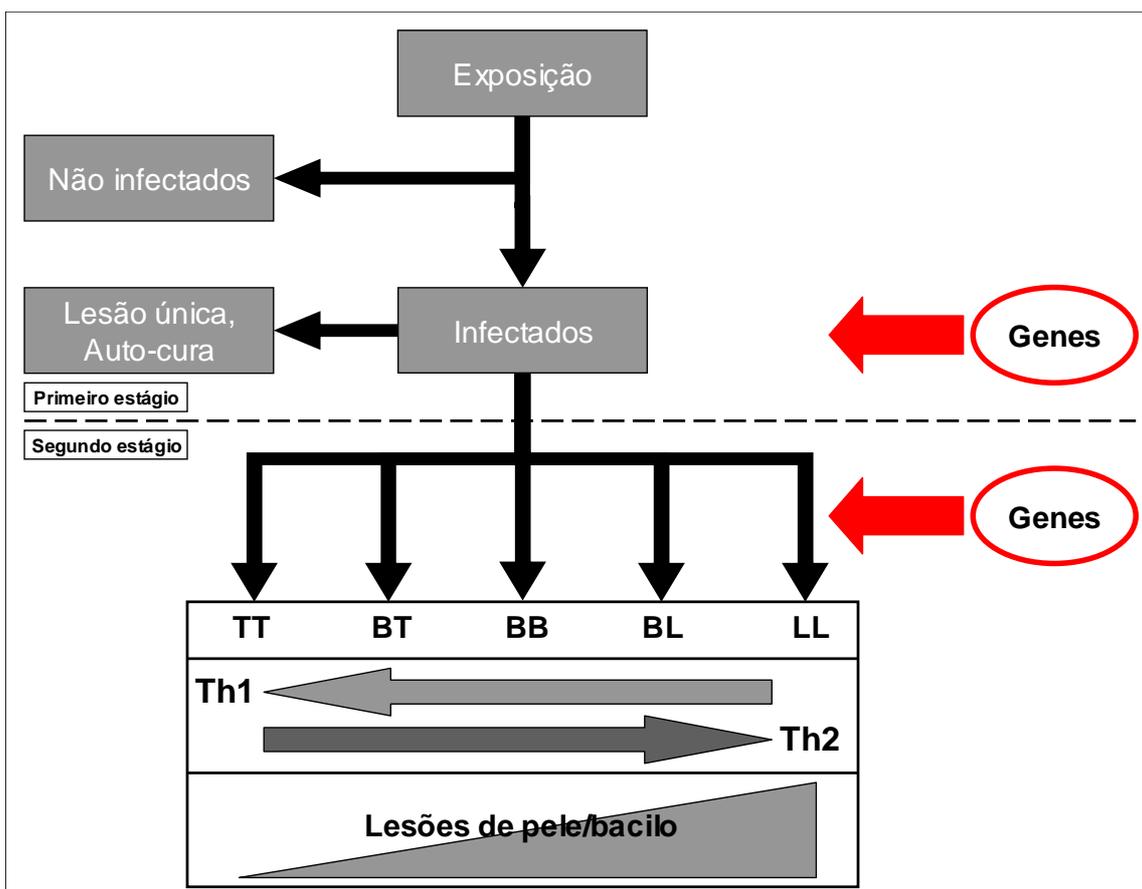
moleculares podem usar ou não as informações extraídas dos estudos observacionais para incrementar a força da análise. A combinação de métodos observacionais e moleculares tem obtido sucesso na localização e identificação de genes de diversas doenças infecciosas (149).

1.3. Genética do Hospedeiro e Susceptibilidade a Doenças Infecciosas

As doenças infecciosas são responsáveis por grande parte do problema de saúde global, afetando principalmente as populações de países em desenvolvimento. Na maioria dessas doenças, somente uma pequena fração de indivíduos expostos a um determinado agente patogênico torna-se infectada, e uma fração ainda menor desenvolve doença clinicamente evidente. Isso levanta a questão de qual é a natureza das diferenças entre os indivíduos susceptíveis à infecção em relação aos que não desenvolvem. Essa questão já intrigava cientistas e médicos, que sugeriam um componente de herança ligado a doenças infecciosas, em especial tuberculose e hanseníase (40). Um exemplo clássico e desastroso é o acidente de Lübeck na Alemanha em 1926 (150), onde 249 bebês foram acidentalmente inoculados com uma cepa virulenta de *M. tuberculosis*, apresentando um amplo espectro de patologia clínica, que foi da ausência da doença clínica até a morte. Deles, 173 bebês sobreviveram, indicando que a maioria da população tinha resistência inata efetiva contra tuberculose. Esta variabilidade interindividual é determinada, em parte, pelo efeito combinado de proteínas codificadas do hospedeiro por uma série de genes, que controlam a quantidade e qualidade da interação parasita-hospedeiro e a resposta imunológica do hospedeiro (151). Haldane em 1949 (152) concluiu, através de metodologias observacionais e experimentais, que variações genéticas em genes da hemoglobina podem fornecer resistência à malária. Em adição, diversos estudos de gêmeos e de agregação familiar suportam forte evidência da existência de fatores hereditários de controle da susceptibilidade para diversas doenças infecciosas (153-158). Assim, evidências acumuladas ao longo da história têm

contribuído para consolidar o conceito de que fatores genéticos são importantes parâmetros de susceptibilidade para doenças infecciosas (159).

Figura 2 – Modelo de dois conjuntos diferentes de genes controlando a resposta imune do hospedeiro para o *M. leprae*, em momentos distintos da patogênese.



Fonte: Adaptado de Jacobson e Krahenbuhl (62).

Nota: O modelo é suportado por dados experimentais e moleculares indicando que dois conjuntos diferentes de genes estão controlando a patogênese da hanseníase.

Especificamente na hanseníase, inúmeros estudos de diversas estratégias têm sido empregados com o objetivo de elucidar as bases moleculares do controle da susceptibilidade do hospedeiro ao *M. leprae*. A idéia de que pelo menos dois genes possam estar controlando a resposta imune do hospedeiro foi inicialmente proposta por de Vries (160) em 1976 e posteriormente suportada por Abel (161) e Wagener (162) em 1988. Atualmente, evidência acumulada indica a presença de conjuntos diferentes de genes influenciando a resposta imune do hospedeiro para

o *M. leprae*, em pelo menos dois momentos: (i) na resistência ou susceptibilidade para a infecção *per se*; e (ii) uma vez o indivíduo infectado, na definição de diferentes formas clínicas da doença (163) (Figura 2).

A identificação de genes de impacto na resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção irá proporcionar um melhor entendimento da patogênese de doenças como a hanseníase, e facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prevenção e terapêutica dessas doenças no futuro.

1.4. Estratégias de Análise e Primeiros Estudos em Hanseníase

1.4.1. Estudos Observacionais: Estudos de Agregação Familiar e de Gêmeos

O primeiro passo na investigação de um eventual papel genético corroborando para o aparecimento da doença em um grupo de famílias é através da detecção e estimativa de agregação familiar de casos (por exemplo, altas taxas de ocorrência da doença em irmãos ou filhos de indivíduos afetados). Os estudos de agregação familiar para um determinado traço é uma condição necessária, porém não suficiente para inferir a importância do componente genético no controle da susceptibilidade à doença, porque as influências ambientais e culturais podem também ser compartilhadas em agregados familiares (164). Nesses estudos, um importante ponto a ser destacado é a definição do fenótipo a ser estudado: fenótipos dicotômicos oferecem resultados mais consistentes do que fenótipos quantitativos (96).

Outro delineamento tradicional para distinguir efeitos familiares compartilhados não genéticos dos efeitos genéticos é o de estudos de gêmeos. Estes estudos são desenhados para estimar a contribuição genética para um traço através da comparação de pares de gêmeos monozigóticos (MZ, qual compartilha todos os seus genes) com os dizigóticos (DZ, qual compartilha metade de seus genes). Uma taxa de concordância de ocorrência da doença aumentada entre gêmeos MZ quando comparada a gêmeos DZ é considerada evidência da participação de fatores genéticos (165).

1.4.1.1. Estudos Observacionais: Estudos de Agregação Familiar e de Gêmeos em Hanseníase

Na hanseníase, diversos estudos têm retratado agregação familiar, principalmente, a partir da década de 60, quando ficou provada a ocorrência de agregação familiar da doença em uma população brasileira (166, 167). Em 1987, Shields *et al* (158) realizaram um estudo com 238 irmãos hansenianos de uma população isolada e endêmica da região de Karimui, sul de Papua Nova Guiné. Foi identificada forte agregação familiar de casos de hanseníase, com 22% (52 de 238) de *pedigrees* contendo 58% (301 de 521) dos indivíduos afetados. Em particular, os habitantes eram organizados em uma ordem única familiar, vivendo em comunidade e não na unidade familiar, ou seja, marido e mulher não coabitavam. Outros hábitos culturais eram peculiares, tais como a distribuição compartilhada de alimentos e outros parâmetros econômicos por toda comunidade. Assim, essas características sociais levaram os autores a concluir que a influência ambiental poderia ser excluída, devido ao comum compartilhamento desses fatores. Diante disso, a natureza familiar da distribuição da doença observada em Karimui pode ser devida exclusivamente a fatores de susceptibilidade genética, ainda mais em vista a uma proposta de contato uniforme da população com o *M. leprae*.

Em outro cenário, vários estudos de gêmeos foram realizados ao longo da história para hanseníase, todos na tentativa de se obter um resultado definitivo (168, 169). Entre essas tentativas, Mohammed Ali e Ramanujam em 1966 (170) realizaram um estudo com uma amostra recrutada em três áreas diferentes da Índia, composta em sua totalidade de 35 pares de gêmeos (MZ = 23 e DZ = 12). Os resultados desse estudo identificaram uma alta taxa de concordância de 82.6% em gêmeos MZ e 16.7% em gêmeos DZ, para hanseníase *per se*. Ainda neste estudo foi identificada uma taxa de concordância de 89.5% em gêmeos MZ, para tipo clínico da doença. Sete anos depois, um definitivo estudo foi realizado por Chakravarti e Vogel em uma nova amostra indiana (153). Essa amostra era composta por 102 pares de gêmeos (o qual foi adicionada toda a amostra do

estudo de Mohammed Ali e Ramanujam) divididos em MZ = 62 e DZ = 40. Os autores identificaram uma taxa de concordância para gêmeos MZ de 59.7% para hanseníase e 51,63% para tipo clínico de hanseníase; para gêmeos DZ foi encontrada uma taxa de concordância de 20% para hanseníase e 15% para tipo clínico de hanseníase. Esses resultados de genética epidemiológica sugerem fortemente que existem fatores genéticos controlando e/ou compartilhando a susceptibilidade do hospedeiro para a infecção da hanseníase e também de seus tipos clínicos.

1.4.2. Análise de Ligação

A análise de ligação é uma ferramenta poderosa que busca encontrar regiões no genoma que estejam influenciando o fenótipo de estudo. Neste tipo de análise, o objetivo é testar co-segregação de marcadores de uma região genômica e um fenótipo, a fim de se estabelecer se o marcador e a característica estão fisicamente ligados (171). Essa potente ferramenta genética tem sido amplamente utilizada para mapear doenças complexas (172). Classicamente, a análise de ligação se divide em dois tipos, os métodos paramétricos e os não-paramétricos. Os métodos paramétricos, ou *model-based* exigem a definição de um modelo especificando a relação entre o fenótipo e um gene putativo. Os parâmetros deste modelo são: o modo de herança, penetrância de cada genótipo e frequências gênicas, os quais são habitualmente estimados pelas análises de segregação complexas (ASC) (173). Entretanto, a inexistência de um modelo simples de herança para características complexas e, especialmente, que a mesma pode depender de co-variáveis (idade de início da doença, sexo e etc), somadas a dificuldade na obtenção de genealogias multigeracionais informativas, tornam a aplicação desse método sujeito a resultados falso-positivos (164, 174). Dessa forma, os métodos não-paramétricos ou *model-free* são fortemente recomendados quando pouco se sabe sobre a relação entre fenótipo e um gene putativo; ou quando a AS não foi realizada ou se realizada, o “gene principal” não é claramente inferido (164, 173). Nesses estudos, não é necessário estabelecer *a priori*,

freqüências gênicas e penetrâncias, o que os tornam freqüentemente utilizados. Por fim, ambos os métodos tem conduzindo, com sucesso, à localização e identificação de genes nas análises de diversos fenótipos, como por exemplo, em doenças infecciosas (175, 176).

1.4.2.1. Análise de Ligação em Hanseníase

Durante os últimos 40 anos, a hipótese de um componente genético controlando a susceptibilidade do hospedeiro ao *M. leprae* têm sido confirmada através dos estudos de ligação realizados em diversas amostras populacionais. Estes estudos aplicados na hanseníase *per se* e formas clínicas da doença apontam para variantes genéticas ligadas ao complexo de antígeno leucocitário humano (HLA): *HLA de classe I e II* (revisado por (163)), *HLA/TNFA* (177) e variantes não ligadas a região HLA: *NRAMP1* (103, 106, 178). Em adição, três *scans* genômicos baseados na análise de ligação não-paramétrica têm demonstrado ligação significativa para a hanseníase paucibacilar no cromossomo 10p13 (em estudo subsequente 20p12 (179)) em uma população Indiana (180) e para a hanseníase *per se* no cromossomo 17q11-q21 em população Brasileira (181) e, no cromossomo 6q25-q26 e 6p21 em população Vietnamita (182). Porém, somente esse último cromossomo 6q25-q26 e 6p21 resultou na identificação de novos genes de susceptibilidade para hanseníase: os genes *PARK2/PACRG* (183) e *LTA* (184), respectivamente.

1.4.3. Análise de Associação

As análises de associação são ferramentas utilizadas para refinar e/ou detectar a participação de genes candidatos causando impacto sobre um determinado fenótipo, complementando o achado da análise de ligação ou simplesmente testando genes candidatos. Essas análises têm como objetivo determinar o excesso ou déficit de alelos de marcadores entre casos quando comparados com um grupo controle (149, 185). Em outras palavras, analisar se

um alelo A está associado com a doença D e, se as pessoas que têm D também têm o alelo A mais ou menos vezes do que seria esperado com base nas frequências individuais de A e de D na população (171). Estudos de associação são mais poderosos do que os de ligação para detectar alelos com efeito genético moderado a fraco, exercendo impacto sobre o fenótipo estudado (186).

1.4.3.1. Análise de Associação em Hanseníase

Através das análises de associação, maior precisão foi alcançada para avaliar o eventual impacto dos genes candidados sobre a hanseníase. Diversas metodologias foram empregadas em amostra populacionais espelhadas pelo mundo. Com isso, o atual cenário demonstra que pelo menos 10 genes destacáveis estão implicados na susceptibilidade/resistência do humano para o *M. leprae*. Por exemplo, genes na região HLA: *HLA classe I e II* (revisado por (163)), *MICA* e *MICB* (187), *TAP* (188), *TNF- α* (177, 189-192), *KIR* (193) e *LTA* (184); e genes não HLA: *IL-10* (194-196), *VDR* (197, 198), *NRAMP1* (199) e na região regulatória comum dos genes *PARK2/PACRG* (183) têm sido associados com hanseníase *per se* e formas clínicas da doença. Portanto, apesar dos avanços importantes obtidos através de estudos moleculares de ligação e associação, nenhum destes genes sugeridos responde pelo amplo efeito genético detectado em diversas análises de segregação complexa (161, 177, 200) e as altas taxas de concordância notada em estudos de gêmeos monozigóticos (153, 170). Com isso, a exata natureza do componente genético da hanseníase (como por exemplo: o número preciso de genes envolvidos), ainda permanece amplamente desconhecidos; talvez em parte devido a não definição do exato modelo de herança. O melhor entendimento do impacto da genética na hanseníase pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prevenção e terapêutica no futuro.

1.5. Análise de Segregação Complexa (ASC)

1.5.1. Conceitos Básicos

A análise de segregação (AS) é o primeiro passo no sentido de identificar a natureza dos fatores genéticos envolvidos na expressão de doenças humanas complexas, como as doenças infecciosas. Basicamente, o objetivo deste método é estudar dados de agregados familiares com a finalidade de inferir estatisticamente o modo de herança de um determinado fenótipo, especialmente com o objetivo de detectar a existência de um gene principal (201). Mendel, no século XIX, foi o pioneiro nesse tipo de análise, que o conduziu à descoberta das leis básicas de hereditariedade. Entretanto, esta não é uma tarefa simples, em particular para fenótipos complexos, para os quais a análise básica visual de heredogramas não é suficiente para proporcionar resultados confiáveis de segregação. Portanto, realizar essas análises em computadores é uma necessidade, tendo em vista a complexidade dos diversos formatos populacionais e do grande número de variáveis que hoje podem ser incluídas neste estudo (164).

A técnica de AS é dividida historicamente em: (i) análise de segregação simples (ASS) ou clássica; e (ii) análise de segregação complexa (ASC). As ASS eram restritas para estudar fenótipos simples, que são determinados, em grande parte, pela ação de um único gene (202). A finalidade desta análise era de buscar um componente genético e testar somente a existência de um único gene mendeliano através das taxas de segregação nos filhos (144, 164). Assim, essa análise não investigava a existência de um gene principal e muito menos testava outras hipóteses (como por exemplo: modelos ambientais compartilhados, modelos de dependência familiares, modelos de genes múltiplos, penetrância incompleta, interação gene/ambiente e etc.), o que é comumente realizado nas ASC (201). Adicionalmente, a transição de traços mendelianos simples para traços complexos gerou dificuldades adicionais que não foram resolvidas até o início da década de 70, quando foram desenvolvidas as primeiras técnicas de ASC (144).

As ASC têm como principal finalidade, além de discriminar os fatores genéticos entre variáveis ambientais, culturais, socioeconômicos e dependência familiar; testar a existência de um gene principal. A presença de um gene principal é interpretada não como a existência de um único gene controlando o fenótipo, mas sim como, entre todos os genes envolvidos, há um cujo efeito é grande o suficiente para se distingui-lo dos outros (172). As ASC podem ser aplicadas em qualquer estrutura de *pedigree* e funciona tanto para fenótipos qualitativos quanto quantitativos (203). Particularmente, nos fenótipos clínicos qualitativos ou binários (afetado ou não afetado pela doença, por exemplo), este efeito pode ser expresso em termos de Risco Relativo (a razão entre a probabilidade de ser afetado dado um genótipo AA e a probabilidade de ser afetado dado um genótipo aa) (173). Esta análise permite testar se a distribuição familiar observada de um fenótipo é compatível com distribuições esperadas sob diferentes hipóteses de transmissão, incluindo o efeito de um gene principal mendeliano e adicionando separadamente ou simultaneamente os efeitos de co-variáveis (como por exemplo fatores ambientais) e correlações (dependências) familiares na determinação do fenótipo (204). As diferentes hipóteses (modelos genéticos e não genéticos) estimadas são introduzidas no método de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*), no qual a *likelihood* é maximizada para cada modelo de transmissão genética. A comparação de diferentes modelos é realizada com a finalidade de obter o que melhor explica os dados observados, levando em conta a significância do achado comparativo diante de um modelo mais restrito (que estima menos parâmetros) (203). O Critério de Informação de Akaike (AIC) (205) pode ser usado como uma avaliação adicional para escolher o modelo mais enxuto, com o melhor ajuste de dados. Em outras palavras, um modelo com o menor AIC explica melhor os dados observados utilizando um número mínimo de parâmetros que não são rejeitados quando comparado com o modelo geral. O critério de AIC não pode ser usado para excluir uma hipótese se esse modelo não foi rejeitado contra o modelo mais geral, usando o teste da taxa de *likelihood*. Finalmente, se for identificado um gene principal, o método permite a estimativa dos parâmetros frequência alélica e penetrância (probabilidade de ser afetado dado um determinado genótipo de

susceptibilidade) (172). Esses parâmetros estimados podem ser, então, utilizados em uma análise de ligação paramétrica, uma ferramenta poderosa para mapear *loci* de susceptibilidade à doença, por exemplo.

1.5.2. Modelos (História)

No início do século passado, a AS foi uma importante ferramenta na investigação de fatores genéticos influenciando as doenças. Inicialmente as ASS eram aplicadas no estudo de traços raros de doenças binárias em irmãos para analisar se eles ocorriam devido à simples segregação mendeliana de alelos dominantes ou recessivos (201). Esta análise era exclusiva para famílias nucleares, onde cada tipo de acasalamento era tratado sob um modelo com dois parâmetros: frequência de segregação (p) e a de probabilidade recrutamento (π). Não era possível usar *pedigrees* extensos ou multigeracionais. Diante disso, alguns pesquisadores, como Weinberg em 1912 (206) e Fisher em 1934 (207), tentaram implementar sistemas de correções, mas ainda os resultados oscilavam sensivelmente devido às formas de recrutamento e metodologia de avaliação empregadas (172, 208).

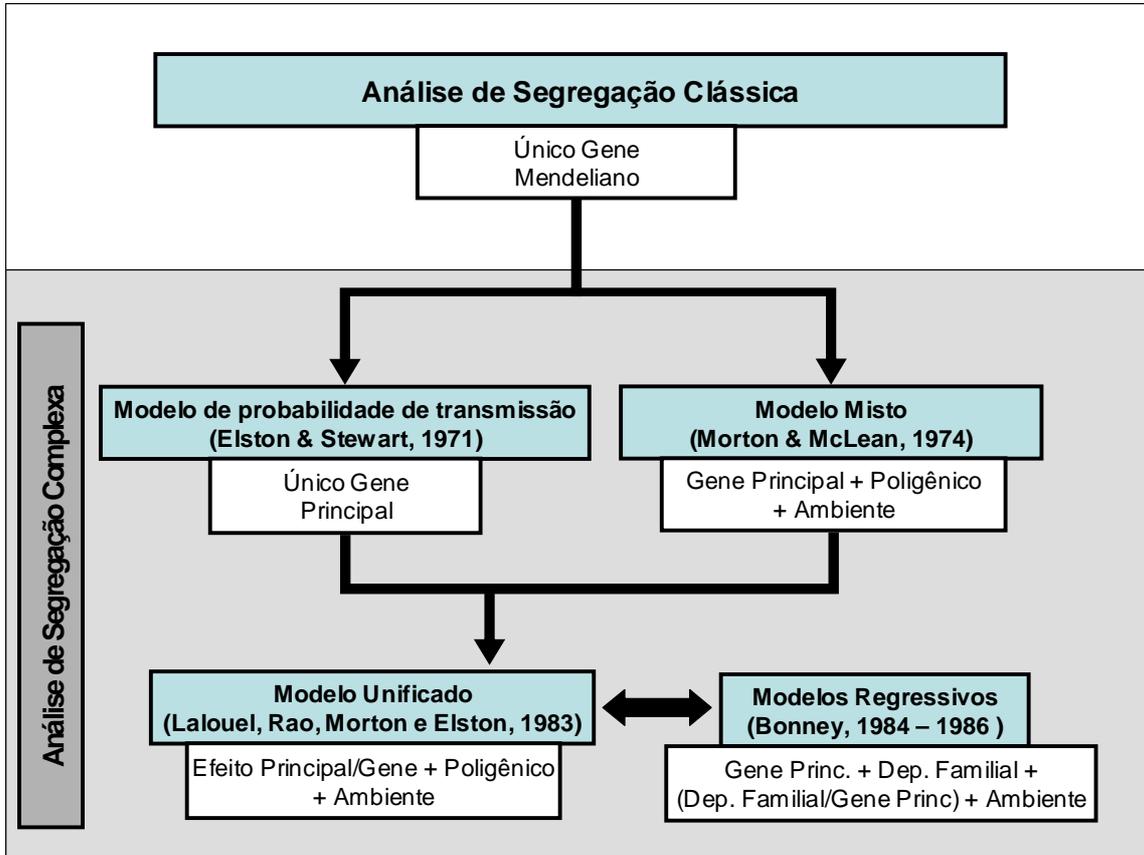
Além disso, a adequação dessa metodologia revelou-se limitada quando aplicada a fenótipos não-mendelianos, e a complexidade na estrutura dos *pedigrees* deixava os pesquisadores da época incapazes de superar essas dificuldades (209). Após a segunda Guerra Mundial, o avanço na capacidade computacional permitiu estender a análise da frequência de segregação (p) e a verificação da probabilidade (π) entre as famílias (210). Notavelmente, no início da década de 70 surgiu o que conhecemos hoje como ASC, que permitiu analisar parâmetros de cruzamento em nível populacional e não mais restrito a famílias isoladas. Esta década foi caracterizada por iniciar o desenvolvimento de inúmeras metodologias (211-213) que proporcionaram a análise de estruturas de *pedigrees* maiores apresentando fenótipos não-mendelianos.

Três representativos trabalhos revolucionaram os estudos nesta área e criaram o conceito de ASC (Figura 3). O primeiro deles foi postulado por Elston &

Stewart em 1971 (211). Esses autores desenvolveram um modelo geral para análise genética de dados de *pedigrees*, batizado de “Modelo de Probabilidade de Transmissão”. Basicamente, esse modelo investiga a possível segregação de dois alelos (A e a), de um *locus* principal. Três componentes básicos do modelo são sintetizados: (i) a frequência genotípica dos pais aleatoriamente acasalados em famílias são expressos em termos de frequência do alelo deletério (q), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg; mais interessantemente (ii) a distribuição genotípica dos filhos é condicional aos genótipos dos pais, os quais são parametrizados em três probabilidades de transmissão: $\tau_{AAA} = P$ (um indivíduo AA transmitir A para cada filho); $\tau_{AaA} = P$ (um indivíduo Aa transmitir A para cada filho); $\tau_{aaA} = P$ (um indivíduo aa transmitir A para cada filho). Sob a simples hipótese mendeliana, essas probabilidades de transmissão são, respectivamente, igual para 1, $\frac{1}{2}$ e 0; (iii) analisa somente fenótipos dicotômicos (por exemplo: afetados e não afetados). Por outro lado, o modelo não tem parâmetros consistentes para avaliar as hipóteses ambientais.

No segundo estudo, produzido por Morton & MacLean em 1974 (212), foi desenvolvido uma nova metodologia direcionada para lidar com fenótipos quantitativos. Para os autores, esses estudos proporcionavam maior poder para as análises de doenças complexas, tendo em vista que todas as análises de segregação até o momento tratavam somente de fenótipos dicotômicos (qualitativos). Este modelo foi chamado pelos geneticistas como “Modelo Misto”, cujo conceito já havia sido introduzido por Morton em 1967 (214). Em resumo, este modelo de herança assume um *locus* principal com transmissão mendeliana, um componente poligênico e efeitos ambientais aleatórios. Refinamento posterior do método permitiu realizar a análise de dados de *pedigrees* complexos através dos *pointers* (215). Os *pointers* são uma estratégia que permite dividir os *pedigrees* em grupos de famílias nucleares, sendo possível incluir um ou vários parentes de fora da família nuclear (denominados *pointers*) para qualquer um dos três componentes da família nuclear (pai, mãe ou conjunto de crianças); assim contribuindo para um recrutamento fixado do *pedigree*.

Figura 3 – Modelos de análises de segregação ao longo das décadas.



Nota: Na primeira metade do século passado, as AS eram aplicadas restritamente para fenótipos simples (dicotômicos), com a finalidade de buscar um componente genético e testar somente a existência de um único gene mendeliano através das taxas de segregação nos filhos. Com o avanço computacional e a exigência de tratar fenótipos complexos, duas linhas de AS (Elston & Stewart (211) e Morton & McLean (212)) surgiram e criaram o conceito de ASC. Após isso, um grupo seleto de pesquisadores (Lalouel, Rao, Morton e Elston (213)) unificaram os dois modelos anteriores, possibilitando para a análise utilizar também hipóteses ambientais. Por fim, Bonney (204, 216) proporcionou avanço as ASC através dos modelos regressivos aplicados para analisar as hipóteses genéticas, dependências familiares e ambientais; com isso, possibilitando trabalhar com *pedigrees* maiores e multigeracionais.

O terceiro estudo, publicado por Lalouel e importantes colaboradores da época, como Morton, Elston e Rao em 1983 (213), propunha a unificação das duas propostas anteriores. Esse modelo unificado assume que o fenótipo seja influenciado pela contribuição aditiva e independente de um efeito principal transmissível (gene principal), um componente multifatorial/poligênico transmissível e um efeito aleatório ambiental não-transmissível. Sob a hipótese genética, o efeito principal é resultado da segregação de dois alelos (A e a) de um

único *locus* e; a frequência do alelo de predisposição (q). Dentro de cada genótipo g (aa , Aa ou AA), a distribuição de um fenótipo é assumida para ser normal, com média " μ " e variância " σ ". Outros parâmetros desse modelo são o grau de dominância do gene (d), a herdabilidade (H) e as taxas de transmissão entre gerações (τ).

Embora grandes avanços, esses modelos populares ainda continuavam restritos no sentido de ter uma razoável abordagem do componente ambiental, o que poderia ocasionar distorções na estimativa de um componente genético multifatorial. Com a introdução dos modelos regressivos, em meados da década de 80, esse problema foi parcialmente resolvido. Em uma seqüência de vários trabalhos, George E. Bonney introduziu os modelos regressivos como uma alternativa aos modelos mistos para serem aplicados nas análises de segregação de fenótipos complexos. Esses modelos foram desenvolvidos para ambos fenótipos quantitativos (1984) (216) e qualitativos (1986) (204), cujo princípio é especificar uma relação de regressão entre a probabilidade de uma pessoa ser afetado e um conjunto de variáveis explicativas, incluindo o genótipo, fenótipos dos ancestrais (pais e irmãos mais velhos) e outras co-variáveis explicativas de interesse. O efeito do gene principal é especificado da mesma forma que no modelo unificado de Lalouel *et al* (213), com parâmetros idênticos. Interessantemente, o modelo de classe D de dependência (204) permite testar separadamente e/ou simultaneamente o efeito de um fenótipo binário de um gene principal sob padrões complexos de dependência familiar, incluindo a correlação pai-mãe (esposo-esposa), correlação pai-filho, correlação mãe-filho, e correlação irmão-irmão. A idade foi introduzida nesse modelo como uma covariável, a fim de que parâmetros da regressão polinomial na idade possam ser estimados simultaneamente com a genética e parâmetros de correlação familiar. Os modelos regressivos têm metodologicamente várias vantagens comparadas ao modelo de Lalouel *et al* (213), entre elas: (i) evitar problemas numéricos ocasionados por várias integrações múltiplas na análise de grandes *pedigrees*; (ii) não é necessário especificar a origem genética ou ambiental de correlações familiares e; (iii) importantemente, permite estimar simultaneamente os parâmetros genéticos, de

covariáveis ambientais e de dependência familiar e de buscar as interações entre esses fatores.

Existem vários programas de computadores que realizam os cálculos das fórmulas geradas nos trabalhos acima citados, como por exemplo: SAGE (*Statistical Analysis for Genetic Epidemiology*); POINTER/COMDS; GENPED; FINESSE; PAP (*Pedigree Analysis Package*); SOLAR (*Sequential Oligogenic Linkage Analysis Routines*); REGRESS. Alguns desses programas podem ser encontrados na Internet (217).

1.5.3. Vantagens e Desvantagens das ASC

A ASC é claramente uma poderosa ferramenta utilizada na elucidação das bases genéticas de doenças humanas complexas. A grande vantagem desse método é que, uma vez caracterizado um efeito genético forte, relativo a um único gene ou pelo menos oligogênico, seria então justificável um investimento em grandes estudos de ligação ou associação voltados para identificação de genes responsáveis pelo efeito e das variações genéticas destes genes causadores do impacto biológico (218). Assim, cronologicamente, as ASC seriam o primeiro passo de uma cascata de investigação e identificação de genes responsáveis por um determinado fenótipo. Conseqüentemente, os resultados dessas análises podem ser utilizados tanto de forma direta (219) quanto para gerar estimativas que aumentariam a resolução de análises de ligação paramétrica (173, 220). Esta segunda abordagem adotada tem proporcionado sucesso no mapeamento de *loci* de várias doenças (177, 221). Em outro cenário menos otimista, a ausência de um ou poucos genes principais reduziria as chances de sucesso de eventuais investigações moleculares adicionais: a detecção de inúmeros genes, cada um responsável por um pequeno efeito sobre o fenótipo, pode se tornar difícil, cara e demorada o suficiente para inviabilizar o projeto, como evidenciado em estudos de simulação (222). Assim, as ASC exercem um importante papel no contexto global da investigação genética molecular, direcionando ou restringindo os próximos passos na direção da eventual identificação dos genes envolvidos.

Apesar das AS terem desempenhado um papel clássico na genética, sua aplicação vem se reduzindo, em particular desde a revolução tecnológica do DNA. Este declínio, em parte, é justificado pelo aumento abrupto da força computacional, que hoje possibilita tratar modelos de análise de ligação não-paramétrica com tanto poder quanto ao dos métodos paramétricos (218). Assim, diversas análises de ligação e *scan* genômicos para doenças complexas vem sendo realizadas utilizando-se métodos não-paramétricos (180-182), em parte devido a resultados discordantes obtidos em ASC prévias, como evidenciado na Hanseníase.

1.5.4. Limitações das ASC

Como todo método de análise, as ASC possuem limitações, sendo a principal delas a necessidade de coleta de um grande número de variáveis. O recrutamento e caracterização de uma amostra populacional apropriada é de grande importância, porque os resultados de uma ASC podem ser muito sensíveis a desvios sutis introduzidos na coleta de dados (208). Com isso, autores sugerem que as amostras mais adequadas seriam as de base populacional para as quais: (i) correções no recrutamento podem ser implementadas controladamente através de um esquema de recrutamento baseado em fenótipos (172, 223); ou mais interessante, (ii) caso toda a população a ser investigada seja recrutada, não seria necessária a correção para recrutamento (203). Outros pesquisadores apresentaram formas similares de recrutamento e coleta de dados, na tentativa de diminuir os desvios de recrutamento, obtendo sucesso na aplicação em diversas doenças complexas (97, 200, 224, 225).

Outra restrição das ASC é que uma grande quantidade de dados é necessária para ser proporcional ao número de parâmetros a serem estimados. Por ser um método inteiramente estatístico, na prática isso cria uma dificuldade adicional ocasionando uma limitação ou perda de força na capacidade de avaliar modelos mais complexos. Além disso, um método viável para determinar o exato tamanho da amostra a ser aplicado, com um desejado nível de poder para

detectar um *locus* Mendeliano, ainda não está disponível (203). Entretanto, uma estratégia alternativa para se evitar esses problemas é aumentar o número da amostra, não em quantidade de indivíduos, mas de *pedigrees*, de preferência multigeracionais. *Pedigrees* grandes, multigeracionais e com alta frequência de indivíduos afetados são esperados para, além de reduzir o tamanho da amostra, proporcionar um aumento da transmissão da informação. Jarvik em 1998 (203) sugere que os tamanhos amostrais variem de centenas para milhares em fenótipos qualitativos e quantitativos, respectivamente.

Uma limitação peculiar operacional que a ASC pode apresentar é a incapacidade de distinguir entre o efeito de um único *locus* (que eventualmente pode representar “falsamente” o gene principal de um traço) e os efeitos de dois ou mais *loci* agindo independentemente com padrões de transmissão semelhantes (203), como o observado para uma doença multifatorial controlada por vários *loci* recessivos, por exemplo. Esses *loci* podem ser detectados como se fosse um único *locus*, com uma frequência do alelo da doença igual à soma de todos os *loci* envolvidos. A falsa estimativa da frequência alélica pode proporcionar uma estimativa equivocada da força estatística para detectar um *locus* principal e, conseqüentemente reduzir o poder de detecção da contribuição de cada *locus*, usado nas análises de ligação.

1.5.5. Erros Potenciais

Um erro comum que pode acontecer na fase de implementação da ASC é encontrar uma falsa conclusão de uma segregação Mendeliana. Isto normalmente acontece pela incapacidade de ajustar, de forma adequada, o recrutamento não-aleatório dos *pedigrees*. Como os *pedigrees* podem ser selecionados para múltiplos indivíduos afetados, uma despreocupação no estágio de recrutamento pode distorcer e apresentar um padrão Mendeliano de herança espúrio. Na prática, se houve falha em testar as probabilidades de transmissão Mendelianas, ou seja, o contraste na comparação entre o melhor modelo geral e o modelo de transmissão Mendeliana – esse resultado pode proporcionar uma conclusão falsa

de que existe um *locus* Mendeliano (203). Por exemplo, os resultados de um estudo realizado em uma população Brasileira com 10.886 indivíduos, distribuídos em 1568 famílias (226), sugeriram a presença de um gene principal recessivo controlando a susceptibilidade a hanseníase *per se*. Entretanto, não foi identificada a existência de transmissão Mendeliana. Com isso, os autores tiveram dificuldades em suportar o achado do gene principal sem a comprovação da segregação Mendeliana. Atualmente, faz parte da rotina de muitos laboratórios, testar a probabilidade de transmissão Mendeliana nas ASC, independente da amostra e/ou população.

1.5.5.1. ASC em Hanseníase

1.5.5.1.1. ASC em uma População Isolada da Papua Nova Guiné

Em 1987, Shields *et al* (158) realizaram uma ASC em uma comunidade isolada de Karimui na Papua Nova Guiné. Essa população chamou a atenção dos pesquisadores por ser uma comunidade isolada, endêmica (com 552 casos) e, principalmente, por não possuir em uma unidade familiar clássica: os moradores conviviam em regime comunitário. Por exemplo, maridos não co-habitavam com suas esposas e alimentação era distribuída igualmente entre os indivíduos. Além disso, a uniformidade de diagnóstico, realizado por um *dream team* de leprologistas (D. A. Russel – diagnóstico; D. S. Ridley – histopatologista e C. Shepard – microbiologista) e o recrutamento total por um período de 19 anos levaram os autores assumirem a igualdade de contato ao *M. leprae*.

Para avaliar a influência dos fatores genéticos nesta comunidade, uma ASC foi conduzida para hanseníase *per se*. Os dados do recrutamento foram levantados através da aplicação de questionários em todos os residentes. Essa informação familiar foi avaliada e inserida em um banco de dados para construção dos *pedigrees*. Porém, somente uma pequena amostra de um único *pedigree* multigeracional composto de 89 indivíduos (19 afetados) foi utilizado na ASC. Esta análise foi baseada no modelo de probabilidade de transmissão de Elston &

Stewart (1971) (211), através do qual as seguintes hipóteses foram testadas: (i) hipótese Mendeliana simples e; (ii) uma hipótese ambiental não assumindo transmissão entre gerações. Operacionalmente, cada hipótese mendeliana (dominante, recessivo e co-dominante) foi testada contra o modelo não restrito. Como resultado, nenhuma hipótese genética pode ser rejeitada quando testada ($P > 0.05$) e, igualmente para a hipótese ambiental, quando testada ($P > 0.05$). Portanto, a identificação da presença de um gene principal controlando a susceptibilidade a hanseníase *per se* nesse estudo não pode ser detectada, talvez por falta de informação suficiente contida neste único *pedigree* para distinguir entre as hipóteses mendelianas (genéticas) e as ambientais.

1.5.5.1.2. ASC em uma Amostra Populacional do Sul da Índia

Em 1985, Haile *et al* (227) aplicaram uma ASC em uma população da área de Gudiyathan Taluk ao norte do distrito de Arcot, no estado de Tamil Nadu – sul da Índia. O objetivo deste estudo foi realizar uma ASC seguida de uma análise de ligação paramétrica. Provavelmente, este foi o primeiro estudo em hanseníase a utilizar uma estratégia combinada de ferramentas genéticas aplicadas passo a passo. Os dados familiares deste estudo foram obtidos através de um critério de recrutamento que se iniciava nos probandos e era estendido aos familiares, tanto no sentido ascendente como descendente dos *pedigrees*. Como resultado, 72 *pedigrees* foram obtidos com casos múltiplos da doença. Após isso, esses *pedigrees* foram inseridos no programa POINTER[®] (215, 228), uma extensão do modelo misto de Morton & MacLean (212). Este programa utiliza um esquema de *pedigree*-fixado, obtido através dos *pointers*. Assim, os 72 *pedigrees* iniciais foram divididos em 77 famílias nucleares com *pointers*. Por fim, a ASC foi conduzida para três fenótipos: (i) hanseníase *per se*; (ii) hanseníase tuberculóide (TT e BT) e; (iii) hanseníase lepromatosa, segundo os critérios de Ridley e Jopling (72).

Os resultados da ASC para a hanseníase *per se* sugeriram um gene principal recessivo, porém com uma pobre discriminação observada entre os modelos. Por outro lado, resultados mais animadores foram alcançados quando a

análise foi conduzida para a hanseníase tuberculóide, com a detecção de um gene principal recessivo observado com grande discriminação entre os modelos. Por último, na análise para a hanseníase lepromatosa, os resultados não foram conclusivos. Os autores justificaram a pobre discriminação encontrada para a forma *per se* e a ausência de efeito genético para a forma lepromatosa, devido ao pequeno número de *pedigrees* e aos poucos casos lepromatosos contidos na amostra, respectivamente. Além disso, os resultados da penetrância extraídos do modelo recessivo estimam elevados valores que chegam a 100% para indivíduos homocigotos com o alelo de predisposição à doença.

No segundo estágio deste estudo, os parâmetros obtidos da ASC foram inseridos em uma análise de ligação paramétrica envolvendo marcadores da região do MHC/HLA no cromossomo 6p21. Porém, utilizando-se os parâmetros do modelo recessivo, não houve evidência significativa para ligação entre os fenótipos de hanseníase testados (doença *per se* e formas clínicas) e a região candidata. Importante, a população em estudo estava enriquecida para a forma tuberculóide da doença. É possível que uma amostra com uma distribuição mais homogênea entre formas clínicas e um maior número de *pedigrees* tivesse maior poder de resolução.

1.5.5.1.3. ASC em uma Amostra Populacional do Norte da Tailândia

Em 1988, Wagener *et al* (162) conduziram uma ASC em amostra populacional situada ao Norte da Tailândia. O recrutamento desta amostra foi realizado através de consulta aos registros do Instituto de Reabilitação McKean em Chiang Mai, um importante centro de atendimento aos portadores da doença no norte do país. O critério de inclusão adotado para as famílias foi de que pelo menos dois ou mais parentes de primeiro e segundo grau tivessem a doença. Assim, dos 568 prontuários analisados somente 228 (40%) foram validados segundo esses critérios, o que resultou na identificação de aproximadamente 80 famílias. Destas, somente 63 famílias aceitaram participar do estudo, das quais todos os membros e os parentes de primeiro, segundo e terceiro grau foram

entrevistados através de questionários. Esses 63 *pedigrees* (com um total amostral de 626 indivíduos) foram inseridos no programa POINTER[®] (215, 228) e divididos em 110 famílias nucleares compostos pelos *pointers*. Para cada indivíduo nas famílias, incluindo o probando, foi atribuída uma classe de *liability*. As classes de *liability* são subgrupos de uma população que são definidos por nível de risco para a doença. Essas classes foram definidas por sexo e idade dos indivíduos. Por fim, a ASC foi executada para dois fenótipos: (i) hanseníase *per se*; e (ii) hanseníase tuberculóide, segundo os critérios de Ridley e Jopling (72).

Para a hanseníase *per se*, os resultados sugerem o modelo generalizado de um gene principal dominante ($d = 0,9$) como o melhor ajustado para os dados observados. Contrariamente, na segunda análise para hanseníase tuberculóide, os resultados apontaram para um modelo de gene principal recessivo como o melhor que explica os dados observados; porém, com uma pobre discriminação em relação ao modelo dominante. Em adição, os resultados do modelo poligênico (gene principal mais herança poligênica) não alcançaram valores conclusivos para ambos os fenótipos. Por fim, a estimativa da penetrância para a hanseníase *per se* indica efeito aditivo (100% para homens “AA” e 66% para mulheres “AA”, todos acima de 50 anos).

Estes resultados são discordantes dos observados em estudos anteriores. A justificativa dos autores para a tal discrepância foi a heterogeneidade do *background* genético encontrado nas diversas populações mundiais, o que exigiria modelos exclusivos para determinadas amostras populacionais. Além disso, a forma de recrutamento utilizada claramente embute um viés de recrutamento, diminuindo assim o poder de detecção de um eventual efeito genético.

1.5.5.1.4. ASC em uma População Isolada da Ilha de Desirade

Este estudo pode ser considerado o mais expressivo no âmbito de análises de segregação realizadas para a hanseníase. Laurent Abel e Florence Demanais realizaram uma ASC em uma população isolada da ilha caribenha Desirade, em 1988 (161). Esta ilha possui características que a tornam muito particular,

principalmente a respeito do seu histórico e geografia. A partir de 1728, todos os indivíduos afetados por hanseníase das ilhas vizinhas foram deportados para Desirade, esses indivíduos pertenciam a diferentes grupos étnicos (brancos, negros e mulatos). Em 1959, o leprosário da ilha foi desativado e a maioria dos pacientes permaneceu como moradores. Desirade possui 22 km² e está localizada a 8 km de ilha vizinha de Guadeloupe; porém, seus 1.600 moradores habitam somente a costa sul da ilha. Na época a frequência de indivíduos afetados era de ~30/1.000, considerado uma das frequências mais elevadas do mundo; a anterior, estimada para a ilha vizinha de Guadeloupe, era de 5/1.000 (229). Em destaque, estas peculiaridades geográficas e históricas levaram os autores a assumir homogeneidade ambiental e, especialmente, de exposição uniforme dos moradores ao *M. leprae*. Os dados dos pacientes afetados foram obtidos junto aos arquivos dos pacientes da ilha, mantido pelo Instituto Pasteur de Guadeloupe. Para o recrutamento da amostra, foram aplicados questionários nos probandos e em todos os seus parentes de primeiro e segundo grau, no qual era possível inserir os dados dos indivíduos que viveram por um determinado período na ilha ou já haviam falecido. Como resultado, dados completos de 82 indivíduos afetados (53 probandos e 29 parentes afetados e; 28 lepromatosos e 54 não-lepromatosos) foram obtidos, o que proporcionou a reconstrução de 27 *pedigrees* multigeracionais, composto por 953 indivíduos. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre hanseníase e sexo ou correlação familiar (esposo-esposa) ($\chi^2_1 = 0.39$ e $\chi^2_1 = 0.69$), respectivamente. Para a ASC, utilizou-se o programa POINTER[®] (215, 228), que dividiu os 27 *pedigrees* multigeracionais em 227 famílias nucleares. Em adição, para cada indivíduo, incluindo o probando, foi atribuída uma classe de *liability*. Por fim, a ASC foi conduzida sob o modelo unificado de Lalouel *et al* (213) para três fenótipos da hanseníase: (i) *per se*; (ii) tuberculóides (TT, TB e BB) e; (iii) lepromatosos (LL e BL), segundo os critérios Ridley & Jopling (72).

Os resultados da ASC demonstraram evidência significativa da presença de um gene principal recessivo ou co-dominante controlando susceptibilidade para a hanseníase *per se* e hanseníase tuberculóide, ($P < 0.02$ para ambos os fenótipos).

Para ambos fenótipos, forte rejeição foi notada para o modelo esporádico (ambiental; $P < 10^{-6}$); verificou-se que a inclusão de um componente multifatorial não era necessária para explicar o efeito do gene principal; a transmissão Mendeliana era compatível com o achado do gene ($P < .40$), e a hipótese de não-transmissão desse efeito principal foi excluída ($P < .05$). Com os dados extraídos do modelo recessivo, estimativa da penetrância demonstrou que aos 68 anos, um homocigoto para o alelo de predisposição "A" tem um risco de 62% de desenvolver a doença. Para hanseníase lepromatosa, os resultados não foram conclusivos, ocorrendo pobre discriminação entre os modelos. Finalmente, os autores demonstraram formalmente, através de teste estatístico, a homogeneidade da amostra.

O achado principal deste estudo foi à evidência de um gene principal controlando a susceptibilidade para a hanseníase *per se* e tuberculóide, sem a necessidade de incluir um componente multifatorial. Esses resultados somados a prévios estudos de associação (que demonstram variantes genéticas na região HLA associadas ao controle da susceptibilidade para os subtipos da hanseníase (230, 231)) e a prévios estudos experimentais (que mostraram diversos genes atuando em diferentes estágios da resposta imune (232-234)) sugerem que a susceptibilidade do hospedeiro para hanseníase é um processo que ocorre em dois estágios, com grupos diferentes de genes controlando a infecção para hanseníase *per se* e a progressão da doença para as formas clínicas. A proposta está de acordo com a idéia extraída de estudos anteriores que já sugeriam este modelo de patogênese em dois estágios (160, 162). No entanto, este estudo foi o primeiro a demonstrar, de maneira consistente, o efeito de um componente genético na susceptibilidade à hanseníase *per se*. Por outro lado, mesmo com uma amostra isolada, endêmica (3%) e exposta homogeneamente ao bacilo, a estratégia de recrutamento adotada (através dos probandos) resultou na inclusão parcial da população da ilha e na introdução de um viés de recrutamento, que pode em algum grau dificultar a interpretação dos resultados.

1.5.5.1.5. ASC em uma Amostra Populacional do Sudeste do Brasil

Em 1995, uma ASC em grande escala foi realizada por Feitosa *et al* (226) em uma amostra populacional de Campinas, sudeste do Brasil. Nesta região, a prevalência da doença era estimada em 3 casos por 1.000 indivíduos, bem menor do observado para a população da ilha Desirade. Os dados de indivíduos afetados no período entre 1960 e 1970 foram levantados junto aos arquivos de pacientes do Leprosário de Campinas. A partir da identificação dos probandos, estes e seus familiares foram submetidos a questionário a fim de levantar informação complementar. Como resultado, 1.568 famílias foram recrutadas em um total de 10.886 indivíduos, a maioria caucasiana. A distribuição da hanseníase lepromatosa foi maior nos homens do que nas mulheres (57% e 52%, respectivamente). Para cada probando ou familiar foi atribuída uma classe de *liability*, baseada na prevalência local para cada tipo clínico. Um único médico leprologista examinou todos os pacientes e seus familiares, seguindo os critérios do Congresso Internacional de Hanseníase de Madrid (67). Finalmente, a ASC foi conduzida para hanseníase *per se* e tipos clínicos sob o modelo unificado de Lalouel *et al* (213) de 1983.

Os resultados da ASC sugerem a presença de um gene principal recessivo controlando a susceptibilidade para a hanseníase *per se*, com frequência aproximada de 0.05. Entretanto, a transmissão Mendeliana desse efeito principal não pôde ser comprovada ($P < 0.001$). Para os fenótipos lepromatoso e tuberculóide, os resultados foram similares aos da hanseníase *per se*, principalmente no aspecto de evidência de um gene principal; porém, novamente se observou rejeição da transmissão Mendeliana para ambos os fenótipos. Por fim, a penetrância foi estimada para a hanseníase *per se* utilizando os valores do modelo recessivo, e a probabilidade de ser afetado chegou a 90% para o genótipo “aa”, em indivíduos com 60 anos ou mais.

Apesar de encontrar um gene principal recessivo influenciando a susceptibilidade para hanseníase *per se*, a estratégia estranhamente falhou na identificação da hipótese Mendeliana nos dados de Campinas. Este resultado

inesperado levou os autores a sugerir que fatores ambientais e culturais têm um importante papel na transmissão da doença, os quais podem obscurecer o mecanismo genético principal envolvido.

1.5.5.1.6. ASC em uma Amostra Populacional do Sul do Vietnã

O objetivo deste estudo foi de testar a hipótese, levantada em estudos anteriores (160-162), que sugeria que a susceptibilidade a hanseníase é controlada por um processo de dois estágios, com grupos diferentes de genes atuando na infecção *per se* e na progressão da doença para as formas clínicas. Para tal, novamente Abel *et al* (200) realizaram uma ASC com uma ampla amostra populacional residente na cidade de Ho Chi Minh, sul do Vietnã. Os dados dos indivíduos afetados pela hanseníase foram identificados através de consulta aos prontuários do Hospital Dermatológico de Ho Chi Minh, Centro de Referência para diagnóstico e tratamento da hanseníase na região. Em destaque, a metodologia de recrutamento aplicada nesta análise foi de selecionar de forma aleatória 10% dos pacientes com hanseníase do hospital. A partir destes probandos foram recrutadas as famílias estendidas. Como resultado, foram incluídas 402 famílias nucleares compostas por 2.346 indivíduos, dos quais 517 pacientes de hanseníase (402 probandos e 115 parentes afetados). Do total, 285 famílias eram de origem Vietnamita (1.644 indivíduos com 374 afetados) e 117 famílias eram de origem Chinesa (702 indivíduos com 143 afetados). Todos esses indivíduos foram avaliados e classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (72). Forte associação entre hanseníase e sexo foi observada ($P < 10^{-6}$): dos 517 pacientes, 365 eram homens e 152 eram mulheres. Por fim, a ASC foi conduzida utilizando modelo denominado *Time-dependent Logistic Hazard Function* desenvolvido por Abel e Bonney em 1990 (235), e considerando três fenótipos: (i) hanseníase *per se*; (ii) hanseníase lepromatosa e; (iii) hanseníase tuberculóide; sendo que para cada fenótipo análises foram realizadas tanto para a amostra total como para subgrupos étnicos (Vietmanitas e Chineses).

Interessantemente, resultados da análise global foram diferentes de acordo com a origem étnica das famílias: Quando a análise foi realizada para hanseníase *per se*, tanto na amostra total como incluindo apenas as famílias Chinesas, não demonstraram convincente evidência de um gene principal. Em contraste, nas famílias Vietnamitas foi detectada evidência de um gene principal co-dominante com presença de dependência familiar (esposo-esposa, pais-filho e irmão-irmão). Para hanseníase tuberculóide, a mesma evidência de um gene principal co-dominante com a presença de dependência familiar (pais-filho e irmão-irmão) foi observada nas famílias Vietnamitas; entretanto, a hipótese Mendeliana sofreu rejeição *bordeline* ($P < 0.02$). Este resultado foi replicado para hanseníase tuberculóide na amostra total e no sub-grupo de famílias Chinesas. Por fim, as análises realizadas para a hanseníase lepromatosa não foram conclusivas, um baixo valor discriminatório foi observado entre os modelos; provavelmente, devido ao menor número de casos lepromatosos e sua distribuição heterogênia entre os grupos étnicos.

Em resumo, a análise da sub-amostra Vietnamita demonstrou evidência para um gene principal co-dominante controlando a susceptibilidade para hanseníase *per se*. Entretanto, a presença de uma forte dependência familiar residual dificulta a interpretação dos parâmetros do gene principal. Além disso, a estratégia alternativa que os autores adotaram para a identificação dos probandos não foi suficiente para eliminar o viés de recrutamento. Assim, a replicação dos achados da ilha de Desirade (161) e muito menos a confirmação do modelo de dois estágios controlando a susceptibilidade a hanseníase não foi alcançada nesta amostra populacional.

1.5.5.1.7. ASC em uma Amostra Populacional do Norte do Brasil

A atual década tem sido caracterizada por uma escassez de ASC realizadas para a hanseníase, apesar da falta de consenso observada para os diversos resultados já publicados. Uma exceção é um grande estudo combinando ASC seguida de análise de ligação paramétrica realizado por Shaw *et al* (177) em

uma amostra populacional localizada no município de Marituba, região metropolitana de Belém. A finalidade deste estudo combinado foi de investigar o eventual papel dos genes MHC no controle da doença. Para tal, dados dos probandos foram obtidos junto aos prontuários médicos dos centros locais do Ministério da Saúde e do Hospital de Hanseníase de Belém. Após a identificação dos probandos, o recrutamento foi estendido para o restante dos familiares para reconstituição dos *pedigrees*. Como resultado, foram obtidos 76 *pedigrees* compostos por 1.166 indivíduos. A classificação adotada para os indivíduos afetados foi de acordo com os critérios de Ridley & Jopling (72). Para cada indivíduo nas famílias (afetado ou não afetado), foi atribuída uma classe de *liability*, obtidas dividindo a prevalência cumulativa pela população do estado do Pará em seus respectivos grupos de idade. Por último, a ASC foi conduzida para a hanseníase *per se* utilizando o programa COMDS[®] (209), o qual possibilita testar modelos de um único gene e de dois *locus*. Este programa dividiu os 76 *pedigrees* em 160 famílias nucleares através da estratégia de *pointers*, de acordo com os métodos de Morton *et al* (236) e Shields *et al* (237).

Os resultados da ASC sugerem o modelo de dois *locus* como o mais bem ajustado quando comparado ao modelo de único *locus* ($P = 0.0007$). Este modelo de dois *locus* é constituído por um gene principal recessivo com a freqüência do alelo de predisposição à doença $q = 0.0388$ e um gene (ou vários genes) modificador (es) recessivo (s) com freqüência do alelo de predisposição à doença $q = 0.0159$. Parâmetros deste modelo foram usados na análise de ligação paramétrica, onde forte evidência para ligação foi alcançada entre marcadores da região HLA de classe II e III com a doença (*HLA-DQB1*, LOD = 4.978, $P = 0.000002$; *HLA-DQA1*, LOD = 4.870, $P = 0.000002$; *HLA-DRB1*, LOD = 5.783, $P = 0.0000003$; e *TNF*, LOD = 4.000, $P = 0.00002$).

Estes achados contrariam todos os achados anteriores indicando a existência de um gene principal controlando susceptibilidade à hanseníase *per se*. Esta nova proposta sugere que um modelo oligogênico de herança pode influenciar na susceptibilidade para a hanseníase, o qual está ligado à região HLA

de classe II e III. Este modelo oligogênico já havia sido demonstrado pelos mesmos autores em uma outra doença complexa, a tuberculose (238).

1.5.5.1.8. ASC para Reação de Mitsuda em uma Amostra Populacional do Vietnã

Nos últimos anos, estudos de agregação familiar (105), análise de segregação (104) e estudo de ligação (103) têm indicado evidência de um componente genético influenciando a reação de Mitsuda. Ranque *et al* (97) realizaram uma análise combinada (ASC seguida análise de ligação paramétrica) com o objetivo de testar a existência de gene principal envolvido no controle da reação de Mitsuda. Dados dos pacientes com hanseníase foram identificados a partir dos prontuários do Hospital de Dermatologia de Ho Chi Minh, sul do Vietnã, através de recrutamento aleatório dos probandos seguido da extensão aos seus familiares. Todos os indivíduos afetados foram classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (72). Para obtenção do fenótipo quantitativo, o teste de Mitsuda foi realizado através de injeção intradérmica de 0.1 mL de lepromina A. A leitura da reação foi realizada 28-30 dias após a inoculação, e o diâmetro da induração (em milímetros) foi mensurado por dois leprologistas independentes. Um total de 168 famílias foi incluído no estudo (1.118 indivíduos), sendo 104 famílias de origem Vietnamita (738 indivíduos; 66%) e 64 famílias de origem Chinesa (380 indivíduos; 34%). Forte efeito do status de hanseníase ($P < 10^{-5}$), grupo étnico ($P < 10^{-4}$) e sexo ($P = 0.004$) sobre a resposta à lepromina foram notados. A ASC foi conduzida utilizando o programa REGRESS® (239).

Os resultados da ASC independente do status clínico sugerem a existência de um gene principal recessivo com a presença de dependência familiar (pais-filho e irmão-irmão) como o modelo mais bem ajustado para os dados observados ($P < 10^{-9}$). A frequência estimada do alelo de predisposição "A" para o modelo recessivo foi de 0.34. Em complemento à ASC, os autores realizaram uma análise de ligação paramétrica utilizando os parâmetros estimados pela ASC para detectar ligação entre marcadores e o gene *NRAMP1*. Para tal, 20 famílias nucleares (16 Vietmanitas e 4 Chinesas) com pelo menos 2 irmãos afetados (total de 118

irmãos) foram recrutadas na cidade de Ho Chi Minh. Os resultados desta análise não proporcionaram nenhuma evidência de ligação entre o gene *NRAMP1* e resposta à reação de Mitsuda.

Os autores concluem que, embora o *NRAMP1* não responda pelo efeito do gene principal observado na ASC, este gene pode estar contribuindo para o forte efeito residual familiar encontrado na mesma análise. Interessantemente, em 2007 (106) o mesmo grupo, realizando um *scan* genômico, encontrou ligação sugestiva entre Mitsuda e duas regiões cromossômicas, em uma destas, o *locus* 2q35 ($P = 9 \times 10^{-4}$), no qual está situado o gene *NRAMP1*.

1.5.5.1.9. Outras ASC

Além dos estudos principais apresentados acima, várias análises de segregação têm sido realizadas em diversas amostras populacionais de diferentes composições étnicas usando uma variedade de métodos analíticos, com o objetivo de identificar o melhor modelo de herança para a susceptibilidade à hanseníase *per se* e seus sub-tipos clínicos. Uma apresentação resumida destes estudos pode ser encontrada na Tabela 1. Nota-se uma baixa concordância entre as ASC, que pode ser parcialmente explicada pela heterogeneidade das amostras populacionais estudadas, que freqüentemente as afastam de uma hipotética população ideal para estudos desta natureza. Nesse sentido, uma população ideal para ASC teria as seguintes características: (i) elevada presença de famílias estendidas multigeracionais com múltiplos casos de hanseníase; (ii) alta freqüência da doença igualmente distribuída por toda comunidade; (iii) elevado grau de isolamento, com baixo fluxo migratório; (iv) homogeneidade ambiental, socioeconômica e *background* étnico; e (v) a possibilidade de recrutamento total da população, evitando qualquer viés de recrutamento.

Tabela 1 – Revisão resumida de outras ASC prévias conduzidas para hanseníase.

Referência	Tipo de amostra	Método de análise	Conclusão
Smith (1979) (240)	91 famílias da Filipinas, no qual pelo menos um filho desenvolveu a forma lepromatosa da doença	Análise de segregação clássica, segundo o método de Elandt-Johnson (1970) (241)	Consistente com uma hipótese recessiva autossomal para susceptibilidade a forma lepromatosa da hanseníase
Serjeantson <i>et al</i> (1979) (242)	340 probandos da Papua Nova Guiné e seus parentes de primeiro grau	Modelos multifatoriais e de gene único para herança de traços semi-contínuos, desenvolvido por Wilson (1979) (243)	Distribuição familiar de ambos casos: lepromatosos e não-lepromatosos, compatível com o modelo de herança Multifatorial, porém os resultados não são conclusivos
Demenais <i>et al</i> (1985) (244)	16 <i>pedigrees</i> multigeracionais da ilha de Desirade	Modelo de probabilidade de transmissão desenvolvido por Elston e Stewart (1971) (211). Considerando três fenótipos: <i>per se</i> , lepromatosos e não lepromatosos	Para susceptibilidade a hanseníase <i>per se</i> : evidência de um gene principal foi notada, porém a hipótese de transmissão Mendeliana foi rejeitada. Em adição, para hanseníase não lepromatosa: os resultados sugerem um gene principal recessivo Mendeliano
Abel <i>et al</i> (1992) (224)	402 famílias nucleares do sul do Vietnã (Chineses (117) e Vietnamitas (285))	Dois modelos foram aplicados nesta análise: o modelo baseado em uma função logística de risco de Abel e Bonney, 1990 (235) e o modelo logístico regressivo de Bonney, 1986 (204). Os dois modelos foram aplicados para hanseníase <i>per se</i>	Os resultados obtidos com ambos os modelos foram similares. Para as famílias Chinesas, obteve evidência para um gene principal co-dominante (frequência do gene 0.024) com dependência familiar residual, porém a transmissão Mendeliana foi rejeitada. Para as famílias Vietnamitas, obteve a presença de um gene principal altamente significativo ($P > 0.0001$) e, compatível com a hipótese Mendeliana. Em adição, dois modelos genéticos ajustados não puderam ser diferenciados: (i) um gene co-dominante (frequência 0.002) com dependência familiar residual e; (ii) um gene dominante (frequência 0.001) também com dependência familiar residual.

Nota: ASC realizadas para a hanseníase *per se* e tipos clínicos, utilizando uma variedade de métodos analíticos em diversas amostras populacionais.

Capítulo 2

Justificativa

2. Justificativa

Na hanseníase, diversos estudos moleculares de ligação e associação têm tido sucesso na identificação de genes controlando susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase *per se* e formas clínicas. Porém, questões básicas a respeito do modelo genético envolvido ainda não foram respondidas, em parte devido a resultados discordantes das diversas ASC realizadas ao longo das últimas décadas. Embora a maioria desses estudos indique a presença de um gene principal recessivo ou co-dominante controlando a susceptibilidade à hanseníase, diferentes resultados são comumente notados. É possível que estas discrepâncias sejam devido a dificuldades clássicas de controle de variáveis ambientais, socioeconômicas, culturais e relativas ao patógeno, como por exemplo, em hanseníase, nível de exposição da população ao *M. leprae*. Além disso, a possibilidade de desvios de recrutamento não pode ser descartada em estudos amostrais. Finalmente, nenhum destes estudos genético-epidemiológicos foi realizado em populações isoladas e hiper-endêmicas. Como resultado, o modelo de herança genético que melhor explica o controle da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase ainda permanece desconhecido.

Capítulo 3

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Geral

O objetivo geral deste estudo é de estimar parâmetros do modelo de herança genética que melhor explique os *pedigrees* observados na Colônia Santo Antônio do Prata, uma população isolada e hiper-endêmica de hansenianos localizada no Pará, norte do Brasil.

3.2. Específicos

- Descrever a população em estudo para as variáveis epidemiológicas: (i) idade; (ii) gênero e; (iii) etnia;
- Descrever o padrão de distribuição geográfica de casos de hanseníase na comunidade;
- Utilizar dados de parentesco de primeiro grau de toda a população da Colônia do Prata para reconstruir os *pedigrees* a serem incluídos na Análise de Segregação Complexa;
- Realizar uma Análise de Segregação Complexa para hanseníase *per se* na coleção de *pedigrees* reconstruídos, a fim de descrever o modo de herança mais adequado para explicar os padrões dos *pedigrees* observados;
- Estimar a frequência do alelo de predisposição à doença e a penetrância, de acordo com a idade, genótipo e gênero na população estudada.

Capítulo 4

A Major Gene Controls Leprosy Susceptibility in a Hiper-Endemic Isolated Population from North of Brazil

A Major Gene Controls Leprosy Susceptibility in a Hyper-Endemic Isolated Population from North of Brazil

Running Title: Major leprosy susceptibility gene

Fernando P. Lázaro^{1,#}, Renata I. Werneck^{1,#}, Ciane C. O. Mackert¹, Aurélie Cobat^{3,4}, Flávia C. Prevedello¹, Raphaela P. Pimentel¹, Geraldo M. M. Macedo², Marco A. M. Eleutério¹, Guilherme Vilar¹, Laurent Abel^{3,4}, Marília B. Xavier², Alexandre Alcaïs^{3,4}, Marcelo T. Mira¹

¹ Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil; ² Tropical Medicine Core, Federal University of Pará, Belém, Brazil; ³ Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U550, Paris, France and ⁴ Université Paris René Descartes, Faculté Médecine Necker, Paris, France

These authors contributed equally to this work

Names of all the authors, highest academic degree obtained and their affiliations:

Fernando Panissa Lázaro, MsC.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Renata Iani Werneck, MsC, PhD candidate.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Ciane Cristina de Oliveira Mackert, MD, MsC.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Aurélie Cobat, MD, PhD candidate.

Affiliations: Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U550, Paris, France and Université Paris René Descartes, Faculté Médecine Necker, Paris, France.

Flávia Costa Prevedello, MD, MsC.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Raphaela de Paula Pimentel, MsC candidate.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Geraldo Mariano Moraes de Macedo, MD.

Affiliation: Tropical Medicine Core, Federal University of Pará, Belém, Brazil.

Marco Antonio Masoller Eleutério, PhD.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Guilherme Vilar, PhD.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Laurent Abel, MD, PhD.

Affiliations: Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U550, Paris, France and Université Paris René Descartes, Faculté Médecine Necker, Paris, France.

Marília Brasil Xavier, MD, PhD.

Affiliation: Tropical Medicine Core, Federal University of Pará, Belém, Brazil.

Alexandre Alcaïs, MD, PhD.

Affiliations: Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U550, Paris, France and Université Paris René Descartes, Faculté Médecine Necker, Paris, France.

Marcelo Távora Mira, PhD.

Affiliation: Advanced Molecular Investigation Core, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

The authors declare no conflict of interest.

Footnote page:

The authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest (e.g., pharmaceutical stock ownership, consultancy, advisory board membership, relevant patents, or research funding);

This investigation received financial support from the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) and from Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), projects 410470/2006-6 (MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 25/2006 - Estudo de Doenças Negligenciadas) and 401057/2005-4 (MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 35/2005 – Estudo da Hanseníase). Fernando P.

Lázaro was supported by a CAPES/PROSUP scholarship; Renata I. Werneck was supported by CAPES/PDEE and CAPES/PROSUP scholarships.

Correspondence: Dr MT Mira, Advanced Molecular Investigation Core, Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), Imaculada Conceição 1155 – Prado Velho, Curitiba, Paraná, CEP: 80215-901, Brazil.

Phone: 55-41-3271 2618

Fax: 55-41-3271 1657

E-mail: m.mira@pucpr.br

ABSTRACT

Background: Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects 250.000 new individuals/year worldwide. Genetic analysis has been successfully applied to the identification of host genetic factors impacting on susceptibility to leprosy; however, a consensus regarding its mode of inheritance is yet to be achieved.

Methods: We conducted a Complex Segregation Analysis (CSA) on leprosy using data from the Prata Colony, an isolated, highly endemic former leprosy community located at the outskirts of Brazilian Amazon presenting large multiplex, multigenerational pedigrees. Our enrollment strategy was complete ascertainment leading to the inclusion of the whole colony (2005 individuals, 225 affected) distributed in 112 pedigrees. CSA was performed using REGRESS, which specified a regression relationship between the probability of being affected and a set of explanatory variables.

Results: CSA identified a best fit co-dominant model, with a major gene accounting for the entire familial effect observed. The frequency of predisposing allele was estimated at 0.22. Penetrance for homozygous individuals for the predisposing allele older than 30 years old ranged from 56% to 85%, depending on gender.

Conclusions: A strong major gene effect in the isolated, hyper-endemic Prata Colony indicates enrichment of genetic risk factors, suggesting a population particularly suitable for leprosy gene identification studies.

Keywords: *leprosy; Mycobacterium leprae; complex segregation analysis.*

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects 250,000 new individuals worldwide every year, with the majority of cases concentrated in India and Brazil [1]. Clinical manifestation of the disease is a consequence of the interaction between the bacteria and the immune system of the host. After exposure, most individuals develop efficient immunity against *M. leprae* with no signs of clinical disease. However, in a small proportion of exposed individuals, leprosy manifests in a wide spectrum of clinical forms, ranging from the localized, tuberculoid to the systemic, lepromatous disease [2], associated with a Th1 or Th2 type of immune response presented against the pathogen, respectively [3]. Despite a global leprosy elimination effort coordinated by the World Health Organization since 1991, the disease persists in 118 countries, with Brazil, Nepal and Timor-Leste still to achieve the elimination goal of a prevalence rate lower than 1/10,000 [1].

Clinical outcome of infection is the result of interaction between variables related to the host, the pathogen and the environment [4, 5]. In this complex scenario, an important role for host genetic risk factors controlling susceptibility to disease has become increasingly evident. Recent genetic analysis has been based on the investigation of candidate genes, genomic regions or genome-wide searches. For example, variants of the HLA class I and II [6], HLA-linked genes *MICA* and *MICB* [7], *TAP* [8], *TNFA* [9-11], *KIR* [12]; and non-HLA genes *IL-10* [13, 14], *VDR* [15, 16] and *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) [17, 18] have been implicated with leprosy phenotypes. In addition, three model-free genome-wide linkage studies involving different leprosy phenotypes have been performed, localizing loci harboring susceptibility genes on chromosomal regions 10p13 [19], 17q11-q21 [20], 6q25-q26 and 6p21 [21]. However, only from chromosomes 6q25-q27 and 6p21 new leprosy candidate genes have emerged: high density association mapping resulted on the positional cloning of leprosy *per se* susceptibility variants located on the shared regulatory region of the *PARK2* and *PACRG* genes on chromosome 6q25-

q27 [22, 23] and of a functional regulatory site of the *LTA* gene located on 6p21 [24].

In addition to molecular, DNA-dependent studies, classic observational genetic epidemiology tools, such as Complex Segregation Analysis (CSA), have been used to contribute for the advance of the understanding of the genetic basis of complex diseases [5]. Several CSA have been performed in leprosy affected population samples of different ethnical background using a variety of analytical methods, with the objective to identify the best fit model of inheritance for leprosy phenotypes. While a few studies could not distinguish between environmental and genetic effects or suggested a predominant environmental effect controlling susceptibility to disease [25, 26], a larger number indicate the existence of a recessive major gene (MG) controlling susceptibility to lepromatous [27], non-lepromatous [28-30] and leprosy *per se* [30, 31]. Of note, the term “major gene” means its effect is important enough to be distinguished from other genes effects but does not assume it is the only gene involved. In contrast, two studies concluded in favor of the existence of a dominant or co-dominant MG related with susceptibility to leprosy *per se* in families from Thailand [32] and Vietnam [33]. More recently, Shaw *et al.* [9] described a best fit model for leprosy *per se* susceptibility that included two *loci*, being one a recessive MG and the other, a recessive modifier.

Importantly, none of these previous studies have been performed using an isolated, hyper-endemic leprosy population homogenously exposed to the disease. In addition, enrollment strategies are always prone to ascertainment bias that is only completely controlled if the entire target population is included. For example, complete ascertainment was applied in two CSA performed for susceptibility to Human T Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) and Human Herpes Virus 8 (HHV-8) using an isolated hyper-endemic population from French Guiana, with notable results [34, 35]. In leprosy, the CSA conducted in 1988 in the Desirade Island involved 1600 individuals recruited from an area with disease frequency of

~30/1000, the highest at the time [30]. To date, the Desirade study is the closest to a theoretical ideal design for a CSA on leprosy, in which the entire population from an isolated hyper-endemic area would be recruited.

Here we present the results of a CSA performed in a unique collection of leprosy multiplex, multigenerational families corresponding to the complete population of the Colony of Santo Antônio do Prata (the Prata Colony), located at the Amazonic state of Pará, north of Brazil. The Prata is a former leprosy colony created in the early 20's with the objective to isolate leprosy affected individuals. Isolation was compulsory up to 1962; however, the population of the colony remains isolated up to date, probably due to the strong stigma still associated with the disease. Preliminary assessment indicated the highest disease prevalence ever reported worldwide, homogenous environmental and socioeconomic variables and a predominance of a mixed ethnic group.

MATERIALS and METHODS

Population Recruitment

The entire population of the Prata Colony was contacted by the research team over a period from April 2006 to December 2007. The investigation was approved by the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná, by the Brazilian National Board for Ethics in Research and by the Ethics Research Committee of the World Health Organization.

To assure that all households were contacted, visits were planned following a previously existing sub-division of the colony in six sectors. All households of one sector were visited before the entire research team moves on to the next sector. The procedure was repeated until all sectors were systematically included. All adult individuals were independently interviewed by trained personnel. Information regarding individuals under 18 years old was provided by the parents.

Epidemiological data collection and phenotype definition

Demographic (gender, age, ethnicity, location of the household) and affection status was collected for all individuals, who were classified as affected or not by leprosy *per se*, i.e., leprosy independent of the clinical form. Ethnicity was defined by trained personnel based on the following phenotypic characteristics: color of the skin, hair type and nose and lips format [36]. Age and disease status were self-reported at the interview. For self-reported affected individuals, both covariates were confirmed upon cross-checking using three independent sources available at the local health care center: (i) the medical record of the patient; (ii) a copy of the compulsory notification form and (iii) a registry book used for treatment follow-up.

Pedigree Reconstruction

To allow for pedigree reconstruction, parental information was also obtained for all individuals. Pedigree drawing was performed using Cranefoot[®] v3.2.2 [37]. Information regarding members of informative pedigrees but not living in the colony (moved or deceased) – therefore not personally interviewed – was used upon confirmation of epidemiological and clinical status, as described above. If checking of disease status was not possible, these individuals were coded as “unknown”. One very large pedigree (figure 1) was decomposed, due to computational limitations, following systematic criteria that reduced the loss of information [38], before included in the CSA. If necessary to link nuclear pedigrees, individuals were duplicated or created (“dummies”), a procedure that did not impact over the outcome of both the epidemiological description and the CSA (figure 1).

Statistical methods

The phenotype of interest for the CSA was a binary trait – that is, affected or non-affected by leprosy. To investigate the influence of covariates, age was coded as the natural logarithm of age in years, which was the best-fitting age function based

on Akaike's information criterion (AIC) [39]. Ethnicity was coded as a categorical variable with 3 classes: white (the reference class), black and mixed. The analyses were performed using logistic regression analysis as implemented in the LOGISTIC procedure of SAS software v.9.1; (SAS Institute, Cary, NC).

Segregation analysis was done by using the regressive logistic model [40], which specified a regression relationship between the probability of a person to be affected and a set of explanatory variables, including MG, phenotype of preceding relatives, and other covariates. The regressive model allowed to analyze large families as a whole, to estimate simultaneously genetic and risk factor effects, and to consider different patterns of familial correlations for leprosy status. The class D pattern of familial dependence (FD) [40] was applied. Four types of phenotypic FD were considered: father-mother (FM), father-offspring (FO), mother-offspring (MO), and sib-sib (SS), with corresponding regression coefficients denoted as " Γ_{FM} ," " Γ_{FO} ," " Γ_{MO} ," and " Γ_{SS} ," respectively. To account for the phenotype "unaffected", each Γ parameter is a vector of 2 coefficients [40] – $\Gamma_{FM}=\gamma_{FMunaf}, \gamma_{FMaff}$, $\Gamma_{FO}=\gamma_{FOunaf}, \gamma_{FOaff}$, $\Gamma_{MO}=\gamma_{MOunaf}, \gamma_{MOaff}$ and $\Gamma_{SS}=\gamma_{SSunaf}, \gamma_{SSaff}$. The interpretation of the Γ s raises some difficulties that have been considered in details by Abel and Bonney [41] since they are usually not directly interpretable in terms of odds ratio because the phenotypes are both dependent and explanatory variables.

The estimated parameters of the MG were Q (the frequency of allele a predisposing to be affected by leprosy) and α_{AA} , α_{Aa} , and α_{aa} (the 3 baseline risks of being affected on the logit scale for the 3 genotypes, "AA", "Aa", and "aa", respectively). Furthermore, the parent-offspring transmission of the major effect was parametrized in terms of the three classical transmission probabilities as defined by Elston and Stewart [42]: τ_{AAa} , τ_{Aaa} , and τ_{aaa} which denote the probabilities of transmitting "a" for individuals "AA", "Aa", and "aa", respectively [42]. Mendelian transmission is obtained by setting $\tau_{aaa}=1$, $\tau_{Aaa}=0.5$ and $\tau_{AAa}=0.0$; in this case the major effect is actually a MG. Two additional models including a major effect were considered: (i) a model in which three types of individuals - aa,

Aa and AA - are specified but in which absence of parents-offspring transmission is obtained by setting $\tau_{aaa} = \tau_{Aaa} = \tau_{AAa}$; and (ii) a more general transmission model in which the three τ s are estimated. Segregation of a MG can be inferred if we failed to reject the Mendelian transmission of the major effect when compared with the general transmission model and we reject the non transmission hypothesis when compared with the general transmission model. Parameter estimation and hypothesis testing were performed using classic likelihood strategies. Because of the study design, i.e. exhaustive collection of the whole population, there was no need for ascertainment correction. CSA was performed as implemented in REGRESS [43], which incorporates the regressive approach into the LINKAGE package [44].

RESULTS

Population description

From all 2007 individuals invited, only two denied to participate; therefore, a total of 2005 individuals (1012 males, 993 females) signed an informed consent and were enrolled in the study. Leprosy prevalence was 12.82% (257 confirmed cases/2005 individuals), distributed equally throughout the colony (figure 2). For the CSA, after removal of single subjects and uninformative families, a total of 1867 individuals (225 affected and 1642 unaffected) were included, distributed in 112 pedigrees. Therefore, the observed prevalence in the CSA families was 12.05%, very close to the global one. All clinical forms of disease were represented, with 104 (40.5%) of the cases being lepromatous, 53 (20.6%) tuberculoid, 53 (20.6%) borderline and 47 (18.3%) of indeterminate clinical form. The mean and median age of diagnosis was 27.2 years old and 25 years old, respectively.

Analysis of Covariates

In the univariate analysis, there was a strong effect of age over disease status (table 1). Distribution of the disease according to age class shows an increase of the proportion of leprosy affected individuals in each age class as age increases up to >60 years old. Males were more often affected (13.8%) than females (10.2%). The distribution of leprosy across ethnicity shows a higher proportion of affected among blacks (19.2%) as compared to whites (10.6%) and mixed (11%) ($p = 0.002$). Multivariate logistic regression analysis confirmed the strong effect of age ($p < 10^{-4}$) and gender ($p = 0.002$); however, the ethnicity effect became not significant as it was due to an age confounding effect.

Complex Segregation Analysis

Results of CSA are shown on table 2. Since we never observed significant FM correlation, these results were not included in the table (data not shown). Also, in the different analyses we never observed a significant difference between FO and MO dependence, therefore, only a global parents-offspring (PO) dependence ($\gamma_{FOunaf/aff} = \gamma_{MOunaf/aff} = \gamma_{POunaf/aff}$) was considered.

There was evidence of a strong FD, since the sporadic model without FDs was rejected against the model that included PO plus SS correlation (model I vs IIc, $\chi_2(2df) = 22$ $p=10^{-5}$). When comparing the model with SS correlation versus the model with PO plus SS correlation, the first model was rejected (model IIb vs IIc, $\chi_2(2df) = 13$ $p=0.0015$). The inclusion of a codominant major effect to PO plus SS familial dependencies resulted in a highly significantly better-fit (model IIc vs III, $\chi_2(3df) = 26$ $p=10^{-5}$). Interestingly, removal of residual PO plus SS dependence did not significantly impact on the fitness (model III vs IVa, $\chi_2(4df) = 2$ $p=0.73$). The codominant model was significantly better than a recessive model (IVb vs IVa; $\chi_2(1df) = 9$ $p=0.0027$). Finally, the transmission of the codominant major effect was compatible with the Mendelian hypothesis (IVa vs VI; $\chi_2(3df) = 5$ $p=0.17$), and the

hypothesis of no transmission was rejected (V vs VI , $\chi^2(2df) = 27$ $p=10^{-6}$); In summary, the CSA is in favour of a codominant MG influencing leprosy per se. Under this codominant MG model ($\alpha_{AA} \neq \alpha_{Aa} \neq \alpha_{aa}$), the frequency of the predisposing allele “a” was estimated at 0.22. The same analysis was performed using the mixed population only, with similar results (data not shown).

DISCUSSION

With the development of powerful tools for molecular genetic analysis, studies of genetic risk factors for complex traits have been concentrated on linkage and association analysis and new, exciting susceptibility loci and/or candidate genes have been described [45, 46]. For leprosy, even though several initiatives have been successfully used to identify genes related with host susceptibility to disease phenotypes [6, 47], basic questions regarding the genetic model involved are still not precisely known, as reflected by discordant results of several CSA conducted to date [9, 25-33]. These discrepancies may be due to the tremendously difficult task of accounting for all environmental, socioeconomic, cultural variables involved, such as the level of exposure of the population to the pathogen, as well as limitations regarding population enrolment. For example, the large number of individuals required for a powerful CSA often imply in population sample heterogeneity and ascertainment bias – except if the population is exposed to very high disease risk and/or is entirely included in the study.

The objective of this study was to conduct a CSA using data obtained from the entire population of the Colony of Santo Antonio do Prata, a former leprosy colony with unique characteristics such as very high disease frequency with equal distribution across the community (no clustering of cases), indicating homogenous exposure to the pathogen, high degree of isolation and homogenous socio-economical, environmental and ethnic backgrounds. We hypothesize that, since the colony has been founded almost exclusively by leprosy affected individuals, genetic risk factors are enriched within the community, today composed by a large

number of extended, multiplex, multigenerational families. Of note, almost 80% of the population can be related to a single, very large pedigree (figure 1). In this context, the Prata CSA detected the existence of a MG controlling leprosy *per se* susceptibility, inherited following a co-dominant model with the frequency of the predisposing allele “a” estimated at 0.22. Our results are not far from a recessive model as observed in a previous CSA performed using a population from the Desirade Islands [30] - small discrepancies may be due to ascertainment correction procedures adopted in the Desirade and not necessary in the Prata study. Under this co-dominant, recessive-like model, ~5% of the population is “aa” homozygous, therefore highly predisposed to leprosy. As shown in figure 3, in addition to the strong effect of the underlying genotype, disease penetrance was also influenced by gender and age; as an example, at 30 years old, penetrance ranged from 0.85 for “aa” males to 0.56 for “aa” females and 0.0006 for “AA” females.

A previous, classic study of a population from Malawi demonstrated an increased risk for leprosy among dwelling contacts of a leprosy case. Disease risk decreased for household contacts and was the lowest for no contacts, leading the authors to conclude an environmental or behavioral cause for familial aggregation [48]. In the Prata colony, the MG effect was detected in the presence of familial dependency; however, when taking out these dependencies, the effect could be better noticed, indicating that the observed familial aggregation was entirely explained by genetics. Interestingly, the median age of diagnosis of leprosy in the Prata (25 years old) is lower than the Brazilian national median of 39 years old [49]. Although early diagnosis of cases in a hyper-endemic population under constant monitoring is somewhat expected, this observation is compatible with recent findings suggesting that early leprosy cases are more likely to have a genetic basis [24]. Unfortunately, more precise inference about the nature of the MG effect observed is limited by the impossibility of CSA to distinguish between one single, co-dominant gene with very strong effect or several co-dominant genes with milder

effect that will play additively on the risk. For further investigation, molecular, DNA-based studies are necessary.

The results of the Prata CSA support the hypothesis of an enrichment of genetic risk factors in this particular population, making it ideal for future gene mapping analysis. For example, parameters of genetic model generated by the CSA may be used for model-based linkage analysis followed by high density association mapping using the already mapped Prata families. Such positional cloning strategy has already proven successful in the context of model-free linkage analysis with the identification of the *PARK2/PACRG* [22, 23] and *LTA* [24] as leprosy susceptibility genes. The use of a model-based approach in the first step (i.e. linkage analysis) should provide even more powerful to detect new genes in such highly susceptible population. This will pave the way for a better understanding of the physiopathology of this still devastating disease in the context of natural condition of infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all affected individuals and their families for agreeing to participate in the study. We also thank the local team from the Federal University of Pará, as well as the leaders and health workers of the Prata Colony for their help guiding our team through the community, socially and geographically. A special acknowledgment is addressed to Dr. Erwin Schurr for critical reading and valuable suggestions during the development of the study and preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. WHO. Global leprosy situation. Weekly epidemiological record **2008**; 83:293-300.
2. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis **1966**; 34:255-73.

3. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* **2006**; 19:338-81.
4. Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol* **2004**; 4:55-66.
5. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* **2002**; 20:581-620.
6. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect* **2006**; 8:1124-31.
7. Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AV, Pitchappan R. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet* **2006**; 15:2880-7.
8. Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens* **1997**; 49:168-72.
9. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* **2001**; 2:196-204.
10. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* **1997**; 176:530-2.
11. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* **2002**; 186:1687-91.
12. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* **2008**; 72:478-82.
13. 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**; 5:592-5.
14. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms

suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun* **2009**; 10:174-80.

15. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* **1999**; 179:187-91.

16. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* **2004**; 71:330-40.

17. Abel L, Sánchez FO, Oberti J, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis* **1998**; 177:133-45.

18. Alcaïs A, Sanchez FO, Thuc NV, et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *J Infect Dis* **2000**; 181:302-8.

19. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet* **2001**; 27:439-41.

20. Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun* **2004**; 5:63-7.

21. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* **2003**; 33:412-5.

22. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* **2004**; 427:636-40.

23. Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin in Immunol* **2005**; 17:44-8.

24. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* **2007**; 39:517-22.

25. Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *J Clin Invest* **1987**; 79:1139-43.

26. Serjeantson S, Wilson SR, Keats BJ. The genetics of leprosy. *Ann Hum Biol* **1979**; 6:375-93.

27. Smith DG. The genetic hypothesis for susceptibility to lepromatous leprosy. *Hum Genet* **1979**; 50:163-77.
28. Haile RW, Iselius L, Fine PE, Morton NE. Segregation and linkage analysis of 72 leprosy pedigrees. *Hum Hered* **1985**; 35:43-52.
29. Demenais F, Goulet V, Feingold N, et al. Genetic study of leprosy in a Caribbean island: Desirade. In: Skamene E, ed. Genetic control of host resistance to infection and malignancy. New York: Alan R. Liss, **1985**:319-24.
30. Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet* **1988**; 42:256-66.
31. Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet* **1995**; 56:1179-85.
32. Wagener DK, Schauf V, Nelson KE, Scollard D, Brown A, Smith T. Segregation analysis of leprosy in families of northern Thailand. *Genet Epidemiol* **1988**; 5:95-105.
33. Abel L, Vu DL, Oberti J, et al. Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. *Genet Epidemiol* **1995**; 12:63-82.
34. Plancoulaine S, Gessain A, Joubert M, et al. Detection of a major gene predisposing to human T lymphotropic virus type I infection in children among an endemic population of African origin. *J Infect Dis* **2000**; 182:405-12.
35. Plancoulaine S, Gessain A, van Beveren M, Tortevoeye P, Abel L. Evidence for a recessive major gene predisposing to human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in a population in which HHV-8 is endemic. *J Infect Dis* **2003**; 187:1944-50.
36. Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevêdo E, Freire-Maia A, Yasuda N. Racial admixture in north-eastern Brazil. *Ann Hum Genet* **1965**; 29:113-25.
37. Mäkinen VP, Parkkonen M, Wessman M, Groop PH, Kanninen T, Kaski K. High-throughput pedigree drawing. *Eur J Hum Genet* **2005**; 13:987-9.
38. Liu F, Kirichenko A, Axenovich TI, van Duijn CM, Aulchenko YS. An approach for cutting large and complex pedigrees for linkage analysis. *Eur J Hum Genet* **2008**; 16:854-60.

39. Akaike H. A new look at statistical model identification. *IEEE trans Automatic Control* **1974**; 19:716-23.
40. Bonney GE. Regressive logistic models for familial disease and other binary traits. *Biometrics* **1986**; 42:611-25.
41. Abel L, Bonney GE. A time-dependent logistic hazard function for modeling variable age of onset in analysis of familial diseases. *Genet Epidemiol* **1990**; 7:391-407.
42. Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered* **1971**; 21:523-42.
43. Demenais F, Lathrop GM. REGRESS: a computer program including the regressive approach into the LINKAGE programs. *Genet Epidemiol* **1994**; 11:291.
44. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**; 81:3443-6.
45. Abel L, Dessein AJ. Genetic epidemiology of infectious diseases in humans: design of population-based studies. *Emerg Infect Dis* **1998**; 4:593-603.
46. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* **2005**; 366:941-51.
47. Alter A, Alcais A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet* **2008**; 123:227-35.
48. Fine PE, Sterne JA, Pönnighaus JM, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol* **1997**; 146:91-102.
49. Ministério da Saúde. Hanseníase. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=27445. Accessed 21 August 2009.

TABLES

Table 1. Factors influencing the onset of leprosy: results from univariate and multivariate logistic regression analysis.

Covariate	N*	Affected (%)	<i>P</i>	
			Univariate analysis	Multivariate analysis
Age (years)			< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
0 – 20	1019	28 (2.7)		
21 – 40	520	54 (10.38)		
41 – 60	233	86 (36.9)		
> 60	95	57 (60)		
Gender			0.01	0.002
Male	933	129 (13.8)		
Female	934	96 (10.2)		
Ethnicity			0.002	0.365
White	187	20 (10.6)		
Mixed	1451	161 (11)	0.08 ^a	0.57
Black	229	44 (19.2)	0.01 ^b	0.67

* Only informative individuals included in the CSA.

^a mixed vs white.

^b black vs white.

N sample size.

Table 2. Segregation analysis of leprosy *per se* in the Prata population.

Model	Q_a	α_{AA}	α_{Aa}	α_{aa}	γ_{PO} unaf	γ_{PO} af	γ_{SS} unaf	γ_{SS} af	β_{gender}	β_{log age}	τ_{AAA}	τ_{Aaa}	τ_{aaa}	-2lnL+C
I. Sporadic	(0)	-3.67	[α AA]	[α AA]	(0)	(0)	(0)	(0)	-0.52	2.27	-	-	-	55
II. FD														
a. PO	(0)	-3.78	[α AA]	[α AA]	-0.44	0.62	(0)	(0)	-0.51	2.33	-	-	-	42
b. SS	(0)	-3.85	[α AA]	[α AA]	(0)	(0)	-0.06	0.61	-0.51	2.24	-	-	-	46
c. PO+SS	(0)	-3.90	[α AA]	[α AA]	-0.23	0.56	-0.08	0.49	-0.48	2.31	-	-	-	33
III. MG and FD														
PO+SS	0.21	-7.62	-5.38	0.29	-0.23	0.28	-0.06	0.06	-0.66	4.50	(0)	(0.5)	(1)	7
IV. MG														
a. codominant	0.22	-7.98	-5.94	-0.68	(0)	(0)	(0)	(0)	-0.75	4.26	(0)	(0.5)	(1)	5
b. recessive	0.27	-6.49	[-6.49]	-0.97	(0)	(0)	(0)	(0)	-0.72	3.82	(0)	(0.5)	(1)	14
V. Absence of Transmission	0.06	-6.76	-6.75	-0.87	(0)	(0)	(0)	(0)	-0.69	4.32	0.68	[τAAA]	[τAAA]	27
VI. General Transmission	0.15	-7.59	-5.60	-1.05	(0)	(0)	(0)	(0)	-0.64	4.13	0.00	0.31	1.00	0

NOTE. Abbreviation: FD, familial dependence; SS, sibling-sibling; PO, parent-offspring; MG, major gene.

“-” non-relevant parameter in the model.

“()” fixed parameter for hypothesis.

“[]” parameter fixed to the same value as the preceding estimated parameter.

“Q” frequency of leprosy predisposing allele “a”

“α” baseline risk of being affected on logit scale corresponding to 3 genotypes: AA (αAA), Aa (αAa), aa (αaa).

“γ_{PO} and γ_{SS}” regression coefficients associated with familial dependences PO and SS, respectively.

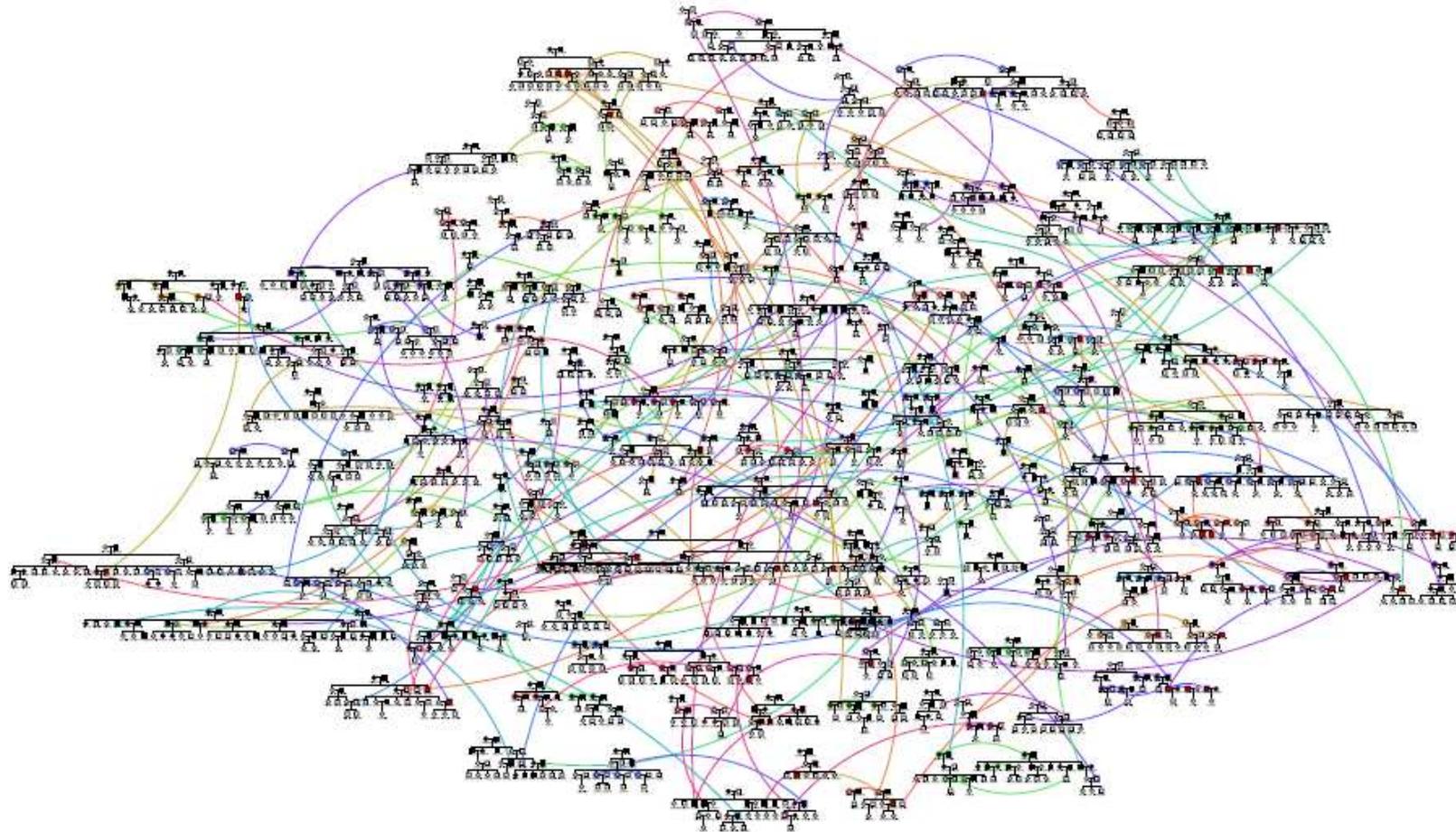
“β” covariable regression coefficients.

“τ” τ_{AAA}, τ_{Aaa}, τ_{aaa} probabilities of transmitting “a” for individuals AA, Aa, and aa, respectively.

C = -1015, corresponding to twice the logarithm of the likelihood (2lnL) of the best-fitting model (model VI).

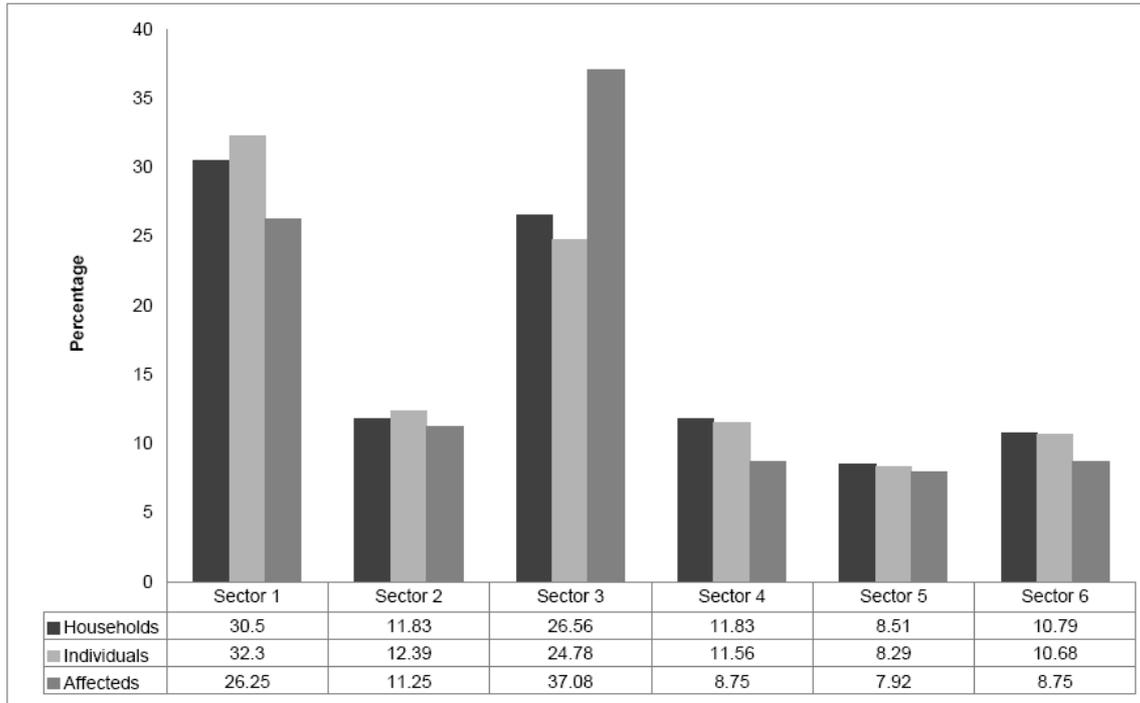
FIGURES –Titles and legends

Figure 1. Pedigree 1 constituted by 2238 individuals including residents and non-residents at the colony, duplicates and dummies.



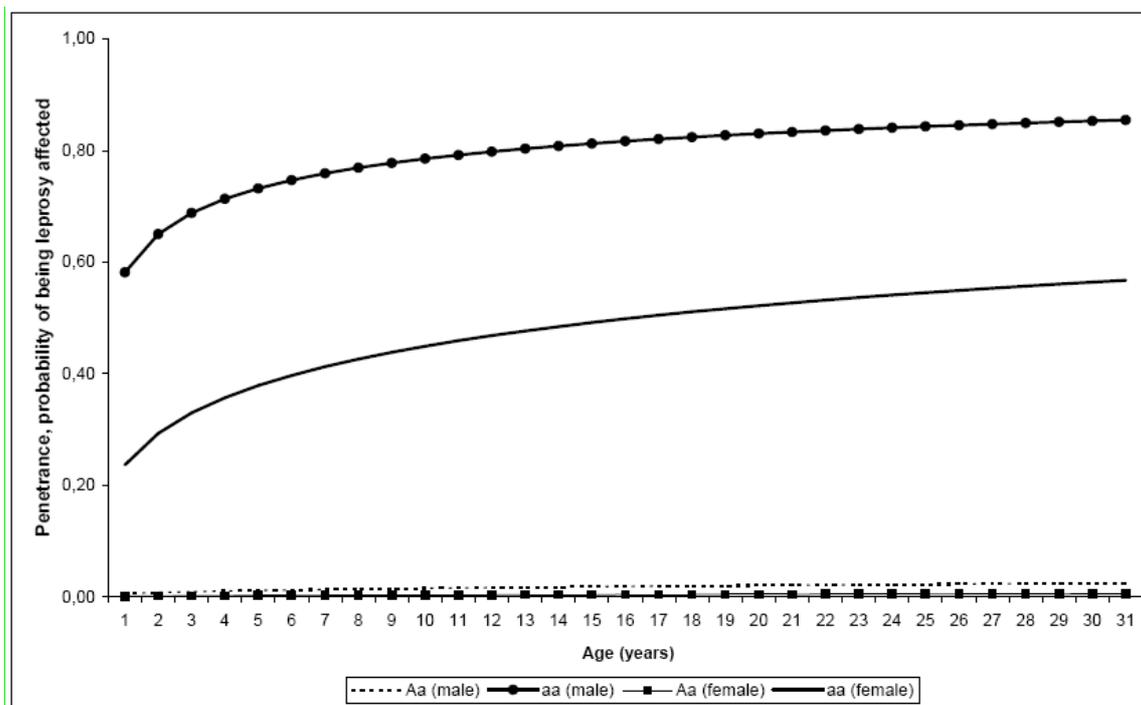
Individuals that link two or more nuclear families appear duplicated and connected by colored lines. Pedigrees were drawn using Cranefoot® v 3.2.2 [37].

Figure 2. Distribution of households, all individuals and leprosy affected individuals across the six sectors of the colony.



Values inside the cells correspond to the exact percentage of households, total individuals and leprosy affected individuals distributed in each sector of the colony. An apparent increase of leprosy cases in sector 3 is due to the location, in this sector, of the permanent shelter for old leprosy cases with no relatives living in the colony.

Figure 3. Penetrance (i.e. probability of being leprosy affected) according to age, genotype and gender, as predicted in the model IVa (table1). “a” is the leprosy predisposing allele.



Exact penetrance values at 30 years old are: for females, 0.56 for “aa” and 0.005 for “Aa”; for males, 0.85 for “aa” and 0.024 for “Aa”. Penetrance for homozygous “AA” individuals at 30 years old was 0.003 for males and 0.0006 for females (not included in the figure).

Capítulo 5

Conclusões

5. Conclusões

- Forte efeito da idade foi observado sobre o status da doença. Embora presente em todas as classes de idade, existe um aumento da doença com a idade, variando de (2,7%) em indivíduos < 20 anos de idade para (60%) em indivíduos > 60 anos de idade (p univariada < 10^{-4} ; p multivariada < 10^{-4});
- A proporção de homens afetados foi maior (13,8%) do que a notada entre as mulheres afetadas (10,2%) (p univariada = 0,01; p multivariada = 0,002);
- A distribuição da hanseníase através da etnia demonstra uma concentração maior de indivíduos da etnia negra entre os afetados (19,2%) em comparação aos da etnia branca (10,6%) e mista (11%) (p univariada = 0,002);
- Os casos de hanseníase estavam distribuídos igualmente através dos seis setores da colônia, indicando exposição uniforme da população da comunidade à doença;
- Foi detectada a presença de um gene principal co-dominante controlando a susceptibilidade para a hanseníase *per se* na população estudada;
- A frequência do alelo de predisposição “a” foi estimada em 0.22 ($p = 5,04 \times 10^{-7}$);
- A penetrância variou de acordo com a idade, genótipo e gênero, atingindo ~85% entre homens “aa” com idade de 30 anos.

Capítulo 6

Referências

REFERÊNCIAS

1. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet*. 2004;363:1209-19.
2. World Health Organization. Leprosy: History. 2009 [cited 2009 14/03/2009]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/index.html>
3. Browne SG. The history of leprosy. In R. C. Hastings - Leprosy. Edinburgh: Ed. Churchill Livingstone 1985.
4. Smith GE, Dawson WR. Egyptian mummies. London: George Allen and Unwin; 1924.
5. Moller-Christensen V, Inkster RG. Cases of leprosy and syphilis in the osteological collection of the Department of Anatomy, University of Edinburgh. *Danish Medical Bulletin*. 1965;12:11-8.
6. Matsuo E. Leprosy as a Challenge to Science on the Ability to Decode Its Enigma. A Hypothesis on How to Respond. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2005;58:59-64.
7. Garmus, L. Bíblia Sagrada. 4º ed: Vozes; 1983.
8. Arthur WM. Medieval Leprosy in the British Isles. *Leprosy Review*. 1953;24:8-19.
9. Santosh K. Chaturvedi, Gurcharan Singh, Nitin Gupta. Stigma Experience in Skin Disorders: An Indian Perspective. *Dermatology Clinics*. 2005;23:635-42.
10. Ishii N. Recent advances in the treatment of leprosy. *Dermatology Online Journal*. 2003;9(2):5.
11. Ramanathan U, Ramu G. Attitude of doctors to working in leprosy. *Leprosy India*. 1982;54:695-9.
12. Jacob JT, Franco-Paredes C. The Stigmatization of Leprosy in India and Its Impact on Future Approaches to Elimination and Control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(1):e113 (1-3).
13. Covey HC. People with leprosy (Hansen's disease) during th Middle Ages. *The Social Science Journal*. 2001;38:315-21.
14. Brody, S. N. *The Disease of the Soul: Leprosy in Medieval Literature*. N. Y: University Press; 1974.
15. Bayless, J. H. Leprosy in Medieval England. *Leprosy Review*. 1977;48:291-2.
16. Carmichael, A. G. *Leprosy*. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.
17. Rogers L, Muir E. *Leprosy*. M.A: Baltimore; 1946.
18. Kealey EJ. *Medieval Medicus: A Social History of Anglo-Norman Medicine*. M. A: The Johns Hopkins University Press.; 1981.
19. Hansen GHA. Undersogelser angaaende spedalskhedens aasager. *Norsk Magazin for Laegervidenskaben*. 1874;4(supplement):1±88.
20. Young D, Robertson B. Genomics: Leprosy — a degenerative disease of the genome. *Current Biology* 2001;11:381-3.
21. Sasaki S, Takeshita F, Okuda K, Ishii N. *Mycobacterium leprae* and Leprosy: a compendium. *Microbiol Immunol*. 2001;45(11):729-36.
22. Shepard CC, McRae DH. *Mycobacterium leprae* in Mice: Minimal Infectious Dose, Relationship Between Staining Quality and Infectivity, and Effect of Cortisone. *Journal of Bacteriology*. 1965;89(2):365-72.

23. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into footpads of mice *Journal Exp Med.* 1960;112:445-54.
24. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novencinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. *Int J Lepr.* 1971;39:693-702.
25. 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.
26. Rees RJ, McDougall AC, Weddell AG. The testis in mice infected with *Mycobacterium leprae*. *J Pathol.* 1975;115:73-9.
27. Birdi TJ, Shetty VP, Antia NH. Differences in *M. Leprae*-induced nerve damage in Swiss white and C57BL/6 mice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1995;63:573-4.
28. WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. World Health Organization Technical Report Series. 1982;675:1-33.
29. Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2003;36(3):373-82.
30. World Health Organization. Leprosy Today. 2009 [cited 2009 14/03/2009]; Available from: <http://www.who.int/lep/en/>
31. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, *et al.* On the Origin of Leprosy. *Science.* 2005;308(5724):1040-2.
32. Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bulletin of the World Health Organization.* 2005;83:230-5.
33. WHO. Global leprosy situation. *Weekly Epidemiological Record.* 2008;83:293-300.
34. WHO. Global leprosy situation. *Weekly epidemiological record.* 2002;1(77):1-8.
35. WHO. Elimination of leprosy: resolution of the 44th World Health Assembly. Geneva. 1991;World Health Organization:(Resolution No. WHA 44.9).
36. Fine PE. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. *Epidemiologic Reviews.* 1982;4:161-88.
37. Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, ed. *Leprosy*, 2nd ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1994.
38. Fine PE. Global leprosy statistics: a cause for pride, or frustration? *Leprosy Review.* 2006;77:295-7.
39. WHO. Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities (Plan period: 2006-2010). WHO. 2005;53.
40. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):338-81.
41. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech.* 2001;20:21-54.
42. Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia.* 2^o ed. São Paulo: Artes Médicas; 2001.
43. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology.* 2001;2(8):1023.
44. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts J, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 2000;103:511-29.

45. Gill AL, Bell DR, Gill GV, Wyatt GB, Beeching NJ. Leprosy in Britain: 50 years experience in Liverpool. *Q J Med.* 2005;98:505-11.
46. Brand, P. W. Temperature variation with leprosy deformity. *Int J Lepr.* 1959;27:1-7.
47. Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *Journal of Bacteriology.* 1965;90:1271-5.
48. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393:537-44.
49. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, Gutierrez MA, Navab M, Reddy ST, Witztum JL, Fogelman AM, Rea TH, Eisenberg D, Berliner J, Modlin RL. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2917-28.
50. Gelber RH. Hansen's disease. *West J Med.* 1993;158:583-90.
51. 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:381-5.
52. Klaster PR, van Beers S, Madjib B, Day R, de Wit MYL. Detection of *Mycobacterium leprae* Nasal Carriers in Populations for Which Leprosy Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology.* 1993 Nov;31(11):2947-51.
53. Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, Rao JR, Edward VK, Samson PD, *et al.* . Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. *Leprosy Review.* 1997;68:301-15.
54. de Wit MYL, Douglas JT, McFadden J, Klaster PR. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium leprae* in Nasal Swab Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 1993 Mar;31(3):502-6.
55. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Faber WR, van Beers SM, Klatser PR, Oskam L. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. *International Journal of Epidemiology.* 2004;33:1329-36.
56. van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999;67:119-28.
57. Narayanan E, Raj ADS, Kirchheimer WF, Bedi BM. Transfer of leprosy bacilli from patients to mouse footpads by *Aedes aegypti*. *Leprosy India.* 1977;49:181-6.
58. Banerjee R, Banerjee BD, Chaudhury S, Hati HK. Transmission of viable *Mycobacterium leprae* by *Aedes aegypti* from lepromatous leprosy patients to the skin of mice through interrupted feeding. *Leprosy Review.* 1991;62:21-6.
59. Blake LA, West BC, Lary CH, Todd JR 4th: Environmental nonhuman sources of leprosy. *Rev Infect Dis.* 1987;9:562-77.
60. Porritt RJ, Olsen RE. Two simultaneous cases of leprosy developing in tattoos. (Ext Abstr) *Int J Lepr.* 1948;16:514-20.
61. Ghorpade A. Inoculation (tattoo) leprosy: a report of 31 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002;16:494-9.
62. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *The Lancet.* 1999;353:655-60.

63. Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG. Leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*. 1988 348;1(3):330.
64. Fine PE. Natural history of leprosy – Aspects relevant to a leprosy vaccine. *Int J Leprosy*. 1983;51:553-5.
65. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991;254:277-9.
66. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein CH, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 1991;254:279-82.
67. International Congress Madrid. Classification. Technical Resolutions, VIth Internac. Congr. Leprol. Madrid. *Int J Leprosy*. 1953;21:504-16.
68. Dharmendra. Classifications of leprosy. In *Leprosy - Hastings RC*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985.
69. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto*. 1997;30:325-34.
70. Languillon J, Carayon A. Lésions cutanées. In: *Précis de léprologie*. 2^o ed. Paris; 1986.
71. Brasil. Guia de controle da hanseníase. 2^o ed: MS/FNS/CENEPI/CNDS; 1994.
72. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255-73.
73. WHO. Expert Committee on Leprosy. Seventh report. Geneva: WHO 1998(WHO Tech Rep Ser no 874).
74. Hastings RC, Brand PW, Mansfield RE, Ebner JD. Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature. *Leprosy Review*. 1968;39:71-4.
75. Croft RP, Richardus JH, Nicholls PG, Smith WC. Nerve function impairment in leprosy: design, methodology, and intake status of a prospective cohort study of 2664 new leprosy cases in Bangladesh: the Bangladesh Acute Nerve Damage Study. *Leprosy Review*. 1999;70:140-59.
76. Saunderson P, Gebre S, Desta K, Byass P, Lockwood DNJ. The pattern of leprosy-related neuropathy in the AMFES patients in Ethiopia: definitions, incidence, risk factors and outcome. *Leprosy Review*. 2000;71:285-308.
77. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *British Medical Bulletin*. 2006;November:1-19.
78. Goulart IBM, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(4):365-75.
79. Kumar A, Durai V, Sivaprasad N, Sirumban P. Diagnostic efficiency of paramedical workers in leprosy. *Leprosy Review*. 1985;56:309-14.
80. Neelan PN, Noordeen SK, Ramu G, Desikan KV, Prabhu KPM, Christian M. Inter-observer variations in diagnosis and classification of early lesions of leprosy. *Leprosy India*. 1982;54:485-8.

81. Groenen G, Saha NG, Rashid MA, Hamid MA, Pattyn SR. Classification of leprosy cases under field conditions in Bangladesh: II, reliability of clinical criteria. *Leprosy Review*. 1995;66:134-43.
82. Saunderson P. The epidemiology of reactions and nerve damage. *Leprosy Review*. 2000;71 (suppl):S106-S10.
83. I.L.A. Report of the International Leprosy Association Technical Forum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2002;70 (suppl):S1-S62.
84. Butlin CR, Soares D, Neupane KD, Failbus SS, Roche PW. IgM anti-phenolic glycolipid-I antibody measurements from skin-smear sites: correlation with venous antibody levels and the bacterial index. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1997;65(4):465-8.
85. Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, Olmos A. 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.
86. Roche PW, Failbus SS, Britton WJ, Cole R. Rapid method for diagnosis of leprosy by measurements of antibodies to the *M. leprae* 35-kDa protein: comparison with PGL-I antibodies detected by ELISA and "dipstick" methods. *Int J Lepr*. 1999;67:279-86.
87. Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Ludwig H, Theuvenet WJ, Adiga RB. Heterogeneity of serological responses in paucibacillary leprosy--differential responses to protein and carbohydrate antigens and correlation with clinical parameters. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1990;58(2):319-27.
88. Hartskeerl RA, de Wit MY, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*. 1989;135(9):2357-64.
89. Katoch VM. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2002;4(15):1-14.
90. Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(3):311-6.
91. Kramme S, Bretzel G, Panning M, Kawuma J, Drosten C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Med Microbiol Immunol*. 2004;193(4):189-93.
92. Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1998;66(66):16-21.
93. Mitsuda K. Les lépreux maculo-nerveux, d'une part, les tubéreux, d'autre part, se comportent différemment a la suite d'une inoculation d'émulsion de tubercule lépreux. III Conférence Internationale de Lèpre (Strasbourg). J B, Baillièrre et Fils, Paris. 1924:219-20.
94. Mitsuda K. On the value of a skin reaction to suspension of leprosy nodules. *Int J Lepr*. 1953;21:347-58.
95. Fernandez JMM. The early reaction induced by lepromin. *Int J Lepr*. 1940;8(1-14).
96. Beiguelman B. Genetics and leprosy. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2002;7(1):117-28.

97. Ranque B, Alcais A, Thuc NV, Woynard S, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Khoa PX, Schurr E, Abel L. A Recessive Major Gene Controls the Mitsuda Reaction in a Region Endemic for Leprosy. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(8):1475-82.
98. Curtis J, Turk JL. Mitsuda-Type Lepromin Reactions as a Measure of Host Resistance in *Mycobacterium lepraemurium* Infection. *Infection and Immunity*. 1979;24(2):492-500.
99. Sansonetti P, Lagrange PH. The immunology of leprosy: speculations on the leprosy spectrum. *Rev Infect Dis* 1981;3:422-69.
100. Godal T. Immunological aspects of leprosy: present status. *Prog Allergy*. 1978;25:211-42.
101. Amezcua ME, Escobar-Gutierrez A, Barba-Rubio J, et al. Prospective immunological follow-up in household contacts of Mexican leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1990;58:651-9.
102. Prince MA. Cell-mediated immunologic status of healthy members of families with a history of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1975;43:307-13.
103. Alcais A, Sanchez FO, Thuc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, Schurr E, Abel L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *J Infect Dis*. 2000;181(1):302-8.
104. Feitosa M, Krieger H, Borecki I, Beiguelman B, Rao DC. Genetic epidemiology of the Mitsuda reaction in leprosy. *Hum Hered*. 1996;46:32-5.
105. Beiguelman B, Quagliato R. Nature and familial character of the lepromin reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1965;33:800-7.
106. Ranque B, Alter A, Mira M, Thuc NV, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Khoa PX, Schurr E, Abel L, Alcais A. Genomewide linkage analysis of the granulomatous mitsuda reaction implicates chromosomal regions 2q35 and 17q21. *J Infect Dis*. 2007;196:1248-52.
107. WHO. Expert Committee on Leprosy. Fifth report. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1977.
108. WHO. Chemotherapy of leprosy (WHO Tech Rep Ser n°847). Geneva: WHO. 1994.
109. Lockwood DNJ, Kumar B. Treatment of leprosy. *BMJ*. 2004;328:1447-8.
110. Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Multidrug Resistant *Mycobacterium leprae* from Patients with Leprosy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(12):3635-9.
111. Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet*. 1997;349:103-4.
112. Honore N, Cole ST. Molecular Basis of Rifampin Resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993;37(3):414-8.
113. Ebenezer GJ, Norman G, Joseph GA, Daniel S, Job CK. Drug resistant-*Mycobacterium leprae*--results of mouse footpad studies from a laboratory in south India. *Indian J Lepr*. 2002;74(4):301-12.
114. Williams DL, Gillis TP. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. *Leprosy Review*. 2004;75(6):118-30.

115. Lwin K, Sundaresan T, Gyi MM, Bechelli LM, Tamondong C, Garbajosa PG, Sansarricq H, Noordeen SK. BCG vaccination of children against leprosy: fourteen-year findings of the trial in Burma. WHO. 1985;63:1069-78.
116. Karonga PTG. Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed Mycobacterium leprae vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. Lancet. 1996;348:17-24.
117. Stanley SJ, Howland C, Stone MM, Sutherland I. BCG vaccination of children against leprosy in Uganda: final results. J Hyg (London). 1981;87:233-48.
118. Gupte MD, Vallishayee RS, Anantharaman DS, Nagaraju B, Sreevatsa, Balasubramanyam S, de Britto RL, Elango N, Uthayakumaran N, MahalingamVN, Lourdusamy G, Ramalingam A, Kannan S, Arokiasamy J. Comparative leprosy vaccine trial in south India. Indian J Lepr. 1998;70:369-88.
119. Chaudhury S, Hazra SK, Saha B, Mazumder B, Biswas PC, Chattopadhyaya D, Saha K. An eight-year field trial on antileprosy vaccines among high-risk household contacts in the Calcutta metropolis. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1994;62:389-94.
120. Convit J, Sampson C, Zuniga M, Smith PG, Plata J, Silva J, Molina J, Pinardi ME, Bloom BR, Salgado A. Immunoprophylactic trial with combined Mycobacterium leprae/BCG vaccine against leprosy: preliminary results. Lancet. 1992;339:446-50.
121. Cunha SS, Rodrigues LC, Pedrosa V, Dourado IM, Barreto ML, Pereira SM. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. Leprosy Review. 2004;75(4):357-66.
122. Cunha SS, Alexander N, Barreto ML, Pereira ES, Dourado I, de Fátima MM, Ichihara Y, Brito S, Pereira S, Rodrigues LC. BCG Revaccination Does Not Protect Against Leprosy in the Brazilian Amazon: A Cluster Randomised Trial. PLoS Negl Trop Dis. 2008;13;2(2):e167.
123. Shepard CC, Ribic E Cell walls from Mycobacterium tuberculosis (BCG) as vaccine against Mycobacterium leprae infections in mice. Proc Soc Exp Biol Med. 1968;127:517-21.
124. Gelber RH, Brennan PJ, Hunter SW, Munn MW, Monson JM, Murray LP, Siu P, Tsang M, Engelman EG, Mohagheghpour N. Effective vaccination of mice against leprosy bacilli with subunits of Mycobacterium leprae. Infection and Immunity. 1990;58:711-8.
125. Gelber RH, Mehra V, Bloom B, Murray LP, Siu P, Tsang M, Brennan PJ. Vaccination with pure Mycobacterium leprae protein inhibits *M. leprae* multiplication in mouse footpads. Infection and Immunity. 1994;62:4250-5.
126. Ngamyang M, Sawanpanyalert P, Butraporn R, Nikasri J, Cho S, Levy L, Brennan PJ. Effect of Vaccination with Refined Components of the Organism on Infection of Mice with *Mycobacterium leprae*. Infection and Immunity. 2003;71(3):1596-8.
127. Scollard, D. M. Treatment Gets Better, but Leprosy Remains a Global Problem. Annals Academy of Medicine. 2008;37(1):1-2.
128. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. An Bras Dermatologia. 2008;83(1):75-82.
129. Perri AJI, Hsu S. A review of thalidomide's history and current dermatological applications. Dermatology Online Journal. 2003;9(3):5.

130. Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(1):55-66.
131. Finlay BB, Cossart P. Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens. *Science.* 1997;276:718-25.
132. Ramasesh N, Adams LB, Franzblau SG, Krahenbuhl JL. Effects of Activated Macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infection and Immunity.* 1991;59(9):2864-9.
133. Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993;150(7):2920-30.
134. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A Macrophage Invasion Mechanism of Pathogenic Mycobacteria. *Science.* 1997;277:1091-3.
135. Lumsden CE. Leprosy and the Schwann cell *in vitro* and *in vivo*. In: Cochrane R. D. editor. *Leprosy in theory and practice.*: John Wright and Sons, Ltd; 1959.
136. Skinsnes OK. *Mycobacterium leprae* and its affinity for nerves. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1971;39:762-5.
137. Stoner GL. Importance of the neural predilection of *Mycobacterium leprae* in leprosy. *Lancet.* 1979;10:994-6.
138. Job CK. Nerve damage in leprosy. *Int J Lepr.* 1989;57:532-9.
139. Rambukkana A., Salzer J. L., Yurchenco P. D., Tuomanen E. I. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell.* 1997;88(6):811-21.
140. Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science.* 1998;282:2076-9.
141. Marques MA, Antonio VL, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani MC. Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J Med Microbiol.* 2001;50:23-8.
142. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:9557-62.
143. Marques MAM, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, et al. . Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann Cells. *Microbes and infection.* 2000;2(1407-1417).
144. Rao DC, Provincea MA. The Future of Path Analysis, Segregation Analysis, and Combined Models for Genetic Dissection of Complex Traits. *Hum Hered.* 2000;50:34-42.
145. Lander ES, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics.* 1995;11:241-7.
146. Venter JC, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291:1304-51.
147. Lander ES, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409:860-921.
148. Risch N. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000;405:847-56.

149. Prevedello FC, Mira MT. Leprosy: a genetic disease? *An Bras Dermatologia*. 2007;82(5):451-9.
150. Dubos R, Dubos J. *The White plague: Tuberculosis, Man and Society*. Boston: Brown and Co.; 1952.
151. Marquet S, Schurr E. Genetics of Susceptibility to Infectious Diseases: Tuberculosis and Leprosy as Examples. *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*. 2001;29(4):479-83.
152. Haldane JBS. Disease and evolution. *Ricerca Sci*. 1949;19 (suppl.):68-76.
153. Chakravarti MR, Vogel F. A twin study in leprosy. In *Topics in Human Genetics*. Stuttgart: Georg Thieme; 1973.
154. Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis*. 1978;117:621-4.
155. Jepson AP, Banya WA, Sisay-Joof F, Hassan-King M, Bennett S, Whittle HC Genetic regulation of fever in *Plasmodium falciparum* malaria in Gambian twin children. *J Infect Dis*. 1995;172:316-9.
156. Lin TM, Chen CJ, Wu MM, Yang CS, Chen JS, Lin CC, Kwang TY, Hsu ST, Lin SY, Hsu LC. Hepatitis B virus markers in Chinese twins. *Anticancer Res*. 1989;9:737-42.
157. Herndon CN, Jennings RG. A twin-family study of susceptibility to poliomyelitis. *Am J Hum Genet*. 1951;3:17-46.
158. Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *J Clin Invest*. 1987;79(4):1139-43.
159. Frodsham AJ, Hill AVS. Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet*. 2004;13(2):187-94.
160. de Vries RR, Fat RF, Nijenhuis LE, Van Rood JJ. HLA-linked genetic control of host response to *Mycobacterium leprae*. *The Lancet*. 1976;2:1328-30.
161. 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(2):256-66.
162. Wagener DK, Schauf V, Nelson KE, Scollard D, Brown A, Smith T. Segregation analysis of leprosy in families of northern Thailand. *Genet Epidemiol*. 1988;5(2):95-105.
163. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes infect*. 2006;8(4):1124-31.
164. Feitosa MF, Krieger H. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2002;7(1):73-83.
165. Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis*. 2006;6(10):653-63.
166. Beiguelman B, Dall'Aglio FF, Silva E. Análise da recorrência familiar de lepra. *Revista Paulista de Medicina*. 1968;72:105-10.
167. Beiguelman B. An appraisal of genetic studies in leprosy. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae*. 1972;17:21-52.
168. Spickett SG. Genetic mechanism in leprosy. In: *Leprosy in Theory and Practice*. Bristol: John Wright & Sons; 1964.
169. Ali MP, Ramanujam K. Genetics and Leprosy. A study of leprosy in twins. *Leprosy India*. 1964;36:77-85.

170. Ali MP, Ramanujam K. Leprosy in twins. *Int J Lepr.* 1966;34:405-6.
171. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *Introdução a Genética.* 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2002.
172. Strachan T, Read AP. *Genética Molecular Humana.* 2^o ed; 2002.
173. Abel L, Dessein AJ. Genetic epidemiology of infectious diseases in humans: design of population-based studies. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):593-603.
174. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *Am J Hum Genet.* 1990;46:229-41.
175. Hill AVS. Genetics of infectious disease resistance. *Curr Opin Genet Dev.* 1996;6:348-53.
176. Abel L, Dessein AJ. The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases. *Current Opinion in Immunology.* 1997;9:509-16.
177. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* 2001;2(4):196-204.
178. Abel L, Sánchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, Skamene E, Lagrange PH, Schurr E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998;177(1):133-45.
179. Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR, Balakrishnan K, Ghei S, Golding M, Sengupta U, Pitchappan RM, Hill AV. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1190-3.
180. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, Golding M, Shanker Narayan NP, Sitaraman T, Sengupta U, Pitchappan R, Hill AV. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet.* 2001;27(4):439-41.
181. Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, Cordell HJ, Shaw MA, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004;5(1):63-7.
182. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Verner A, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet.* 2003;33(3):412-5.
183. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, Mai CP, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Sarno EN, Alter A, Montpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Doré C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van De Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004;427(6975):636-40.
184. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, Vanderborcht PR, Katoch K, Mira MT, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Moraes M, Mehra N, Schurr E, Abel L. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet.* 2007;39(4):517-22.
185. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic Epidemiology 3 - Genetic association studies. *The Lancet.* 2005;366:1121-31.
186. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996;273:1516-7.

187. Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AV, Pitchappan R. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet.* 2006;15(19):2880-7.
188. Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens.* 1997;49(2):168-72.
189. Blackwell JM, Black GF, Peacock CS, Miller EN, Sibthorpe D, Gnananandha D, Shaw JJ, Silveira F, Lins-Lainson Z, Ramos F, Collins A, Shaw MA. Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997;352(1359):1331-45.
190. Blackwell JM. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Int J Parasitol.* 1998;28(1):21-8.
191. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, Kwiatkowski D. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1997;176(2):530-2.
192. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis.* 2002;186(11):1687-91.
193. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, de Melo FC, Braga MA, Peixoto PR, Visentainer JE. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens.* 2008;72(5):478-82.
194. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 2004;5(7):592-5.
195. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Leprosy Review.* 2006;77(3):189-202.
196. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, Villani-Moreno FR, Pacheco AG, Moraes MO. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009;10(2):174-80.
197. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis.* 1999;179(1):187-91.
198. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, Fine PE, Hill AV. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(3):330-40.
199. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AV. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):733-5.

200. Abel L, Vu DL, Oberti J, Nguyen VT, Van VC, Guilloud-Bataille M, Schurr E, Lagrange PH. Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. *Genet Epidemiol.* 1995;12(1):63-82.
201. Elston RC. Some recent developments in the theoretical aspects of segregation analysis. In: Majumder PP (ed.) *Human Population Genetics*. New York; 1993.
202. Elston RE, Thompson EA. A Century of Biometrical Genetics. *Biometrics.* 2000;56:659-66.
203. Jarvik GP. *Complex Segregation Analyses: Uses and Limitations*. The American Society of Human Genetics. 1998;63:942-6.
204. Bonney GE. Regressive logistic models for familial disease and other binary traits. *Biometrics.* 1986;42(3):611-25.
205. Akaike H. A new look at statistical model identification. *IEEE trans Automatic Control.* 1974;19:716-23.
206. Weinberg W. Weitere Beiträge zur Theorie der Vererbung. 4. Über Methode und Fehlerquellen der Untersuchung auf Mendelsche Zahlen beim Menschen. *Arch Rass Gesellschaftsbiol.* 1912;9:165-74.
207. Fisher RA. The effect of methods of ascertainment upon the estimation of frequencies. *Annals of Eugenics.* 1934;6:13-25.
208. Elston RC, Sobel E Sampling considerations in the gathering and analysis of pedigree data. *Am J Hum Genet.* 1979;31:62-9.
209. Morton NE, Shields DC, Collins A. Genetic epidemiology of complex phenotypes. *Am J Hum Genet.* 1991;55:301-14.
210. Morton NE. Segregation analysis in human genetics. *Science.* 1958;127:79-80.
211. Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered.* 1971;21(6):523-42.
212. Morton NE, MacClean CJ. Analysis of familial resemblance. III. Complex segregation analysis of quantitative traits. *Am J Hum Genet.* 1974;26:489-503.
213. Lalouel JM, Rao DC, Morton NE, Elston RC. A Unified Model for Complex Segregation Analysis. *Am J Hum Genet* 1983;35:816-26.
214. Morton NE. The detection of major genes under additive continuous variation. *Am J Hum Genet.* 1967;19:23-34.
215. Lalouel JM, Morton NE. Complex segregation analysis with pointers. *Hum Hered.* 1981;31:312-21.
216. Bonney GE. On the statistical determination of major gene mechanisms in continuous human traits: regressive models. *Am J Med Genet.* 1984;18:731-49.
217. The Rockefeller University. Laboratory of Statistical Genetics at Rockefeller University 2009 [cited 2009 14/03/2009]; <http://linkage.rockefeller.edu/>. Available from: 14/03/2009
218. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet.* 2005;366(9489):941-51.
219. Palmer LJ, Cookson WO, James AL, Musk AW, Burton PR. Gibbs sampling-based segregation analysis of asthma-associated quantitative traits in a population-based sample of nuclear families. *Genet Epidemiol.* 2001;20(3):356-72.
220. Teare DM, Barrett JH. Genetic linkage studies. *The Lancet.* 2005;366:1036-44.

221. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: Evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:3044-8.
222. Hodge SE. An Oliogenic Disease Displaying Weak Marker Associations: A Summary of Contributions to Problem 1 of GAW9. *Genet Epidemiol*. 1995;12:545-54.
223. Distl O. Segregation analysis to determine the mode of inheritance. *European Journal of Companion Animal Practice (EJCAP)*. 2007;17(1):71-3.
224. Abel L, Oberti J, Lap VD, Thuc NV, Guilloud-Bataille M, Schurr E, Lagrange PH. Segregation analysis of leprosy in Vietnam. *Am J Hum Genet*. 1992;51:A335 (Abstract).
225. Abel L, Demenais F, Prata A, Souza A. E, Dessein A. Evidence for the Segregation of a Major Gene in Human Susceptibility/Resistance to Infection by *Schistosoma mansoni*. *Am J Hum Genet*. 1991;48:959-70.
226. Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B, Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet*. 1995;56(5):1179-85.
227. Haile RW, Iselius L, Fine PE, Morton NE. Segregation and linkage analysis of 72 leprosy pedigrees. *Hum Hered* 1985;35(1):43-52.
228. Lalouel JM, Yee S. POINTER: a computer program for complex segregation analysis with pointers: Population Genetics Laboratory, University of Hawaii, Honolulu; 1980.
229. Millan J, Lecoeur H. Résultats préliminaires d'une enquête sur la répartition démographique de la lèpre en Guadeloupe. *Acta leprol (Geneve)*. 1979;77:129-39.
230. van Eden W, de Vries RR. Occasional review--HLA and leprosy: a re-evaluation. *Leprosy Review*. 1984;55(2):89-104.
231. van Eden W, Gonzalez N M, de Vries RR, Convit J, van Rood JJ HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J Infect Dis*. 1985;151:9-14.
232. Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PA, St Charles C, Taylor BA. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature*. 1982;297(5866):506-9.
233. Skamene E, Gros P, Forget A, Patel PJ, Nesbitt MN. Regulation of resistance to leprosy by chromosome 1 locus in the mouse. *Immunogenetics*. 1984;19(2):117-24.
234. Curtis J, Akuffo-Adu H, Turk JL. H-2-linked genes which modify resistance of C57BL/10 mice to subcutaneous infection with *Mycobacterium lepraemurium*. *Infect Immun*. 1984;46(3):635-8.
235. Abel L, Bonney GE. A Time-Dependent Logistic Hazard Function for Modeling Variable Age of Onset in Analysis of Familial Diseases. *Genet Epidemiol*. 1990;7:391-407.
236. Morton NE, Rao DC, Lalouel J-M. *Methods in Genetic Epidemiology*. Switzerland: Basel; 1983.
237. Shields DC, Collins A, Marlow A. Coding of pointers in the segregation analysis program POINTER. *Genet Epidemiol*. 1994;11:385-7.
238. Shaw MA, Collins A, Peacock CS, Miller EN, Black GF, Sibthorpe D, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in a Brazilian population is under two-

locus oligogenic control which is not linked to the candidate genes NRAMP1 or TNF-A. *Tuber Lung Dis.* 1997;78(1):35-45.

239. Demenais F, Lathrop GM. REGRESS: a computer program including the regressive approach into the LINKAGE programs. *Genet Epidemiol.* 1994;11(3):291.

240. Smith DG. The genetic hypothesis for susceptibility to lepromatous leprosy. *Hum Genet.* 1979;50(2):163-77.

241. Elandt-Johnson RC. Segregation analysis for complex modes of inheritance. *Am J Hum Genet.* 1970;22:129-44.

242. Serjeantson S, Wilson SR, Keats BJ. The genetics of leprosy. *Ann Hum Biol.* 1979;6(4):375-93.

243. Wilson SR. On the use of multiple thresholds for the determination of the mode of inheritance of semicontinuous traits. *Ann Hum Genet.* 1979;42:513-22.

244. Demenais F, Goulet V, Feingold N, Millan J, Blanc M, Raffoux C, Bois E. Genetic study of leprosy in a Caribbean island: Desirade. In: Skamene E, editor. *Genetic control of host resistance to infection and malignancy.* New York: Alan R. Liss; 1985. p. 319-24.