

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

VINICIUS MEDEIROS FAVA

**ESTUDOS DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDADE A
ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE
GENES CANDIDATOS**

CURITIBA

2011

VINICIUS MEDEIROS FAVA

**ESTUDOS DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDADE A
ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE
GENES CANDIDATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

Co-orientadora: Prof. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

CURITIBA

2011

DEDICATÓRIA

Dedicado à meus pais, Rui Fava e Silvana Millek Medeiros, pelo apoio incondicional nessa caminhada e à minha querida Suellen Cristina Coelho; que a veemência compartilhada pela ciência e conhecimento sempre reforce nosso amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a meus pais, **Rui Fava e Silvana Millek Medeiros**, por toda a educação, carinho, amor e incentivo. A eles devoto todo meu respeito e admiração, por suas batalhas particulares, as quais sempre contribuíram para o fortalecimento de meu caráter e personificaram exemplos a serem seguidos.

A minha querida família: avós, **Dirce, Carlos, Ramona e Waldemar**, irmãos **Rui Leonardo e Matheus**, segunda mãe **Rejani** e tios. Alguns presentes, outros ausentes em meu dia a dia, mas que nos estantes compartilhados sempre trouxeram muitas felicidades. Nunca chegaria até aqui sem vocês. Aos meus irmãos um conselho; nunca desistam da busca pelo aprimoramento, acredito fielmente na capacidade de vocês e tenho certeza que chegarão a pontos tão altos quanto os quais eu ambiciono.

A minha fiel companheira **Suellen**, “chero”, pelo amor, apoio, compreensão e ideais compartilhados, que possamos continuar juntos na busca pelo conhecimento.

Agradeço a meu “pai” científico, orientador e conselheiro **Marcelo Távora Mira**, cuja a forma de fazer ciência e produzir conhecimento me encantaram desde os tempos de graduação. Que um dia eu tenha a honra de tornar-me um pesquisador tão bom quanto você: culto, ético, inteligente e perspicaz. A você dedico as frases da epígrafe. Obrigado por todo apoio e confiança em mim depositados.

A meus mentores, **Mariane Stefani, Alexandre Alcaís, Erwin Schurr**; a todos amigos, colegas de laboratório, pesquisadores do NIMA; em especial a **Ana Lúcia Sousa**, meu muito obrigado; compartilhar estes anos de doutorado, os quais considero os maiores de minha vida em evolução intelectual, foi imprescindível para minha formação. Não esquecendo de todos os irmãos por escolha, os quais chamo de amigos, sempre presentes nos bons e maus momentos.

Por fim, agradeço aos pacientes envolvidos no estudo. Os esforços de todos os pesquisadores são dedicados ao bem da sociedade, para que em um futuro próximo outros não sofram da mesma aflição que vocês. Meus sinceros agradecimentos a todos na batalha pela construção de um mundo melhor.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Every great advance in science has issued from a new audacity of imagination”
(John Dewey)

“If I have seen further it is only by standing on the shoulders of giants”
(Isaac Newton)

“Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought”
(Albert Szent-Gyorgyi)

“We don't have the money, so we have to think”
(Ernest Rutherford)

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os Estados Reacionais (ER), Reação Reversa (RR) e Eritema Nodoso Hansênico (ENH) são episódios inflamatórios extremos, de início abrupto, que acometem cerca de 30% dos indivíduos afetados por hanseníase ao diagnóstico, durante e até mesmo após o término do tratamento para a doença. Atualmente, esses episódios imprevisíveis são os maiores responsáveis por estigmas associadas à hanseníase. Neste contexto, a descrição de fatores preditivos para ER teriam um grande impacto sobre estratégias de prevenção destes eventos tão estigmatizantes, os quais somente nos últimos anos vêm estado em foco de pesquisadores em hanseníase. Em um estudo prévio comparando um amplo painel de citocinas, utilizando soro de indivíduos afetados por RR e ENH, nosso grupo identificou *IL6* e *CXCL10* como fortes candidatos genéticos à susceptibilidade a ER. Paralelamente, nove genes das vias envolvendo TNF- α , associados a RR em estudo realizado por nossos colaboradores (dados não publicados), e o gene *TLR2* selecionado da literatura foram testados como candidatos a replicação.

OBJETIVO: Investigar a participação de genes candidatos ao controle da susceptibilidade a ER em indivíduos diagnosticados com hanseníase.

RESULTADOS: No presente trabalho, demonstramos os resultados de um estudo prospectivo envolvendo 409 indivíduos afetados por hanseníase, monitorados por pelo menos um ano para averiguar a ocorrência de ER. No fim do período de acompanhamento, 154 indivíduos desenvolveram RR, 39 desenvolveram ENH e os 216 remanescentes foram considerados controles. Para a obtenção dos genótipos utilizou-se de metodologia TaqMan, baseada na captação de fluorescência. As frequências genótípicas foram comparadas entre casos de ER (RR ou ENH) versus controles pareados por forma clínica. Foi observada associação entre as variantes dos genes *TLR2* rs3804099 ($p=0,06$) e *NLRP12* rs4539722 ($p=0,01$) e a ocorrência de RR; os genes *CXCL10* rs4859587 ($p=0,002$) e *MAP2K2* rs12459484 ($p=0,02$) demonstram-se associados ao desenvolvimento de ENH. O resultado de maior impacto, foi a detecção da forte correlação entre polimorfismos do gene *IL6* e ENH: foram encontradas evidências estatisticamente significativa de associação entre os três *tag* SNP do gene *IL6* e ENH: rs2069832 ($p=0,002$), rs2069840 ($p=0,03$) e rs2069845 ($p=0,04$). Um polimorfismo funcional presente na região regulatória do gene *IL6* (rs1800795), também demonstrou-se associado a ENH ($p=0,005$). Análise de regressão logística subsequente, incluindo estes marcadores, revelou dois sinais independentemente associados a ENH. Análises haplotípicas demonstraram associação significativa para a combinação de alelos de risco dos dois sinais observados e ENH. Por fim, foi detectada correlação estatisticamente significativa entre genótipos de risco dos marcadores rs2069832 ($p=0,04$), rs2069840 ($p=0,02$) e rs1800795 ($p=0,04$) e níveis séricos de IL6 em uma amostra contendo 49 indivíduos selecionados. Não foi observada associação entre ER e os genes *RNF216*, *PRKCZ*, *MAP2K5*, *MAP3K5*, *NLRP4*, *JAK1* e *TRAF1* no grupo estudado.

CONCLUSÃO: Em conjunto, os resultados do presente estudo implicam novos genes e polimorfismos associados ao controle da susceptibilidade a estados reacionais da hanseníase, com destaque para o *IL6*.

PALAVRAS CHAVE: Genética. Estados reacionais em hanseníase. Reação reversa. Eritema nodoso hansênico. Estudo de associação. SNP.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Type 1 (T1R) and Type 2 (T2R) leprosy reactions (LR) are aggressive inflammatory episodes of sudden onset that occur in 30% of leprosy affected individuals, often several months after successful completion of treatment. Today, these unpredictable episodes are the major cause of permanent disabilities associated with leprosy. In this scenario, the description of innate predictive factors for LR will have a major impact over preventive strategies against the effects of such a stigmatizing event, which only recently has come under leprosy research focus. In a previous comparative screening of a large panel of cytokines in the serum of individuals affected by T1R and T2R, our group identified *IL6* and *CXCL10* as strong candidates for genetic analysis. In parallel, several genes from pathways linked to TNF- α , associated with T1R in a Vietnamese sample in a study performed by our collaborator (unpublished data), and the *TLR2* from the literature, to be tested as replication candidates.

OBJECTIVE: To investigate the role of the studied candidate genes on susceptibility control for LR in leprosy diagnosed patients.

RESULTS: Here, we present the results of a prospective follow-up study in a cohort of 409 leprosy-affected individuals monitored for at least one year for the occurrence of LR. By the end of the follow-up, 154 individuals had developed T1R, 39 had developed T2R and the remaining 216 were considered as controls. Fluorescence-based TaqMan technology was applied to produce genotypes of all individuals. Genotype frequencies were compared between LR cases (T1R or T2R) versus controls matched by leprosy clinical form. Association was observed between T1R and variant on genes *TLR2* rs3804099 ($p=0.06$) and *NLRP12* rs4539722 ($p=0.01$), for T2R outcome the polymorphism of *CXCL10* rs4859587 ($p=0.002$) and *MAP2k2* rs12459484 ($p=0.02$) were significantly associated. Most importantly, we found independent, positive evidence for association between T2R and three *IL6* tag SNPs – rs2069832 ($p=0.002$), rs2069840 ($p=0.03$) and rs2069845 ($p=0.04$), as well as with the known functional *IL6* regulatory variant rs1800795 ($p=0.005$). Subsequent logistic regression analysis, including these markers, showed two independent bins associated with T2R phenotype. Haplotype analysis demonstrated significant association between risk alleles of the two bins and T2R. Finally, we produced functional data showing statistically significant correlation between risk genotypes of rs2069832 ($p=0.04$), rs2069840 ($p=0.02$) and rs1800795 ($p=0.04$) and serum levels of IL6 in a sample of 49 selected individuals. No association was observed between LR and the genes *RNF216*, *PRKCZ*, *MAP2K5*, *MAP3K5*, *NLRP4*, *JAK1* and *TRAF1* in the studied group.

CONCLUSION: Taken together, these results strongly implicate new genes and polymorphisms in the control of susceptibility to leprosy reaction, with emphasis on *IL6*.

KEYWORDS: Genetic. Leprosy reaction. Type 1 reaction. Type 2 reaction. Association studies. SNP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Crânio humano fossilizado de aproximadamente 4.000 anos apresentando características compatíveis com hanseníase.
- Figura 2** – Disseminação de hanseníase no mundo – a diferenciação do bacilo acompanhando as rotas migratórias humanas.
- Figura 3** – Variação no número de hospitais responsáveis pelo tratamento de hansenianos na Inglaterra entre os séculos XI e XVI.
- Figura 4** – Variação da prevalência de hanseníase na Noruega entre 1855 e 1935.
- Figura 5** – Colônia Santo Antônio do Prata, 1918.
- Figura 6** – Distribuição dos asilos-colônias no Brasil em 1936.
- Figura 7** – Gráfico de prevalência de hanseníase em 2009.
- Figura 8** – Comparação entre o coeficiente de prevalência e detecção de novos casos de hanseníase no Brasil de 1990 – 2009.
- Figura 9** – Coeficiente de detecção de hanseníase no Brasil e regiões de 1990 – 2008.
- Figura 10** – Patogênese da Hanseníase.
- Figura 11** – Representação de paciente em reação reversa.
- Figura 12** – Representação de paciente com lesões características de Eritema Nodoso Hansênico.
- Figura 13** – Desenho do estudo.
- ARTIGO Figure 1.** Plasma levels of IL6 among 16 reaction-free controls, 54 T1R and 33 T2R cases from the genetic study dataset.
- ARTIGO Figure 2.** Relative position and linkage disequilibrium (LD) pattern of IL6 markers.
- ARTIGO Figure 3.** Plasma levels of IL-6 according to *IL6* genotypes.
- Figura 14** – Desequilíbrio de ligação entre marcadores *tag* SNP do gene *TRAF1*.
- Figura 15** – Desequilíbrio de ligação entre marcadores *tag* SNP do gene *NLRP12*.
- Figura 16** – Desequilíbrio de ligação entre marcadores *tag* SNP do gene *JAK1*.
- Figura 17** – Hipótese do mecanismo celular e molecular de doença em Crohn .induzida por micobactéria.
- Figura 18** – Influência da secreção de TNF na Produção de citocinas.
- Figura 19** – Desenho de estudo de associação baseado em famílias incluindo endofenótipos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de países com incidência de hanseníase superior a 1000 novos casos.

Tabela 2 – Postulado de Hanle-Kock.

Tabela 3 – Tratamento poliquimioterápico em hanseníase.

Tabela 4 – Análise de regressão logística condicional dos genes envolvido à TNF- α .

Tabela 5 – SNP de genes candidatos.

Tabela 6 – *Tag* SNP de genes candidatos.

ARTIGO Table 1. Ridely Jopling and epidemiological data of leprosy T1R-controls and leprosy T2R-controls.

ARTIGO Table 2. Association between IL6 genetic variants and occurrence of type 1 and type 2 leprosy reaction.

ARTIGO Supplementary Table 3. Haplotypic analysis including the two IL6 tag-SNPs independently associated with T2R

Tabela 7 – Regressão logística multivariada entre marcadores de *IL6*.

Tabela 8 – Análise de associação entre o *tag* SNP rs4859587 do gene *CXCL10* e estado reacional.

Tabela 9 – Análise dos SNP previamente associados a estados reacionais.

Tabela 10 – Análise de associação de *tag* SNP do gene *TRAF1* e estado reacional.

Tabela 11 – Análise de associação de *tag* SNP do gene *NLRP12* e estado reacional.

Tabela 12 – Análise de associação de *tag* SNP do gene *JAK1* e estado reacional.

Tabela 13 – Genes associados a RR na população vietnamita e suas funções já descritas.

LISTA DE ABREVIações

AMFES	<i>All-Africa Leprosy Rehabilitation and Training Multidrug Therapy Field Evaluation Study</i>
AR	Artrite reumatoide
BB	Borderline borderline
BL	Borderline lepromatoso
BT	Borderline tuberculóide
CCDC122	<i>Coiled-coil domain containing 122</i>
CEU	<i>Utah residents with ancestry from northern and western europe</i>
CHB	<i>Chinese Han in Beijing</i>
chr	<i>Chromossome</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
Cols	Colaboradores
CXCL9	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>
CXCL10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
CXCL11	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>
CXCR3	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 3</i>
DL	Desequilíbrio de ligação
dbSNP	<i>Data base single nucleotide polymorphism</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weimberg
ENH	Eritema nodoso hansênico
ENL	<i>Erithema nodosum leprosum</i>
ER	Estado reacional
FAM	Frequência alélica mínima
FL	Fenômeno de lúcio
gly	Glicina
GWAS	<i>Genomewide association study</i>
hab	habitantes
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IB	Índice baciloscópico
IC	Intervalo de confiança
iDC	<i>Inative dendritic cells</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INSERM U980	<i>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 980</i>
IP10	<i>IFN-gamma-inducible protein 10</i>
IPTSP	Instituto de patologia tropical e saúde publica
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
LL	Lepromatoso lepromatoso
LR	<i>Leprosy reaction</i>
LTA	<i>Linfotoxin alfa</i>

<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MAP2k2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>
MAP2k5	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
MAP3K5	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
mDC	<i>Mature dendritic cell</i>
MDT	<i>Multi drug therapy</i>
MDM	<i>Monocyte derived macrophage</i>
MEK1	<i>MAPK/ERK kinase 1</i>
MEK2	<i>MAPK/ERK kinase 2</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
NA	Não aplicável
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
NLRP4	<i>NLR family, pyrin domain containing 4</i>
NLRP12	<i>NLR family, pyrin domain containing 12</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
NRAMP1	<i>Natural resistance-associated macrophage protein 1</i>
NS	Não significativo
OMS	Organização mundial da saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
<i>orf</i>	<i>Open reading frame</i>
PACRG	<i>PARK2 co-regulated</i>
PARK2	<i>Parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PGL1	<i>Phenolic glycolipid 1</i>
pM	<i>p multivariada</i>
PQT	<i>Poliquimioterapia</i>
pT	<i>Precursor T helper cell</i>
pU	<i>p Univariada</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
rev	<i>revisado</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RIPK2	<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>
RNF216	<i>Ring finger protein 216</i>
RR	<i>Reação reversa</i>
SAA	<i>Serum Amyloid A</i>
Ser	<i>Serina</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T1R	<i>Type 1 reaction</i>
T2R	<i>Type 2 reaction</i>
TDT	<i>Teste de desequilíbrio de transmissão</i>
Th	<i>T helper</i>

TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrose factor</i>
Tr1	<i>Regulatory T cell</i>
TRAF1	<i>TNF receptor-associated factor 1</i>
TRIAD3	<i>Triad domain-containing protein 3</i>
TT	<i>Tuberculoide tuberculoide</i>
UTR	<i>Untranslates region</i>
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
WHO	<i>World health organization</i>
YRI	<i>Yoruba in Ibadan, Nigéria</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 HANSENÍASE – ASPECTOS GERAIS	3
1.1.1 Histórico da hanseníase	3
1.1.2 Hanseníase no Brasil	3
1.1.3 Dados epidemiológicos	8
1.1.4 Hereditária ou adquirida? O agente etiológico da hanseníase	1
1.1.5 Patogênese da hanseníase	2
1.1.6 Tratamento da hanseníase	4
1.1.7 Estados reacionais em hanseníase	5
1.1.7.1 Reação reversa ou reação do tipo 1 - RR	4
1.1.7.2 Eritema nodoso hansênico - ENH	1
1.1.7.3 Fenômeno de Lúcio - FL	4
1.1.8 Imunologia e estados reacionais	9
1.1.9 Tratamento em estados reacionais	9
1.1.10 Susceptibilidade a doenças complexas	9
1.2 GENÉTICA DA HANSENÍASE	9
1.2.1 Genética do <i>M. leprae</i>	23
1.2.2 Genética da susceptibilidade à hanseníase	3
1.2.3 Genética da susceptibilidade à estados reacionais	6
1.2.4 Genes mediadores imunológicos de interesse em ER	7
2 JUSTIFICATIVA	6
3 OBJETIVOS	0
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	0
4 MÉTODOS COMPLEMENTARES	1
4.1 SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS AO CONTROLE DA SUSCEPTIBILIDADE A ESTADOS REACIONAIS	1
4.1.1 Genes provenientes de estudo de perfil de citocinas	1
4.1.2 Genes provenientes de estudo de vias e genes candidatos	1
4.1.2.1 Estratégia de replicação	2
4.1.2.2 Estratégia de cobertura completa de genes	2
4.2 MÉTODOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPLEMENTARES	1
4.3 DESENHO DO ESTUDO	4

5 MANUSCRITO DO ARTIGO ACEITO NO PERIODICO THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASE	52
6 RESULTADOS COMPLEMENTARES	52
6.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ADICIONAIS PARA O GENE <i>IL6</i>	52
6.1.1 Análise de regressão logística multivariada incluindo SNP de <i>IL6</i>	52
6.2 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE <i>CXCL10</i> E ESTADO REACIONAL.	52
6.3 ESTUDO DE REPLICAÇÃO DE MARCADORES DO TIPO SNP PREVIAMENTE ASSOCIADOS A ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE.	52
6.4 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE <i>TRAF1</i> E ESTADO REACIONAL.	52
6.5 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE <i>NLRP12</i> E ESTADO REACIONAL.	52
6.6 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE <i>JAK1</i> E ESTADO REACIONAL.	52
7 DISCUSSÃO COMPLEMENTAR	52
7.1 EXPERIMENTOS DE REPLICAÇÃO	52
7.1.1 SNP selecionado da literatura	52
7.1.2 SNP selecionados de estudos colaborativos	52
7.2 EXPERIMENTO DE COBERTURA FÍSICA COMPLETA	52
7.2.1 Análise de Cobertura física completa de genes previamente descritos	52
7.2.2 Análise de Cobertura física completa de genes inéditos	82
7.2.2.1 Discussão complementar para o gene <i>IL6</i>	82
7.2.2.2 <i>CXCL10</i> e ENH	82
7.3 LIMITAÇÕES	82
7.3.1 Limitações do estudo	82
7.3.2 Limitações gerais da estratégia de análise	82
7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
8 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 HANSENÍASE – ASPECTOS GERAIS

3

1.1.1 Histórico da hanseníase

Hanseníase é uma doença milenar de características clínicas e fisiopatológicas bem conhecidas e agente etiológico bem descrito. As primeiras referências à doença provêm de papiros egípcios datados de mais de 4.000 a.C. [1]. Além disto, restos mortais escavados na Índia e datados de aproximadamente 2.000 a.C. apresentam deformidades características da doença (figura 1). Escrituras deixadas pelos povos chineses e indianos há mais de 600 a.C. também contêm referências à hanseníase [2].

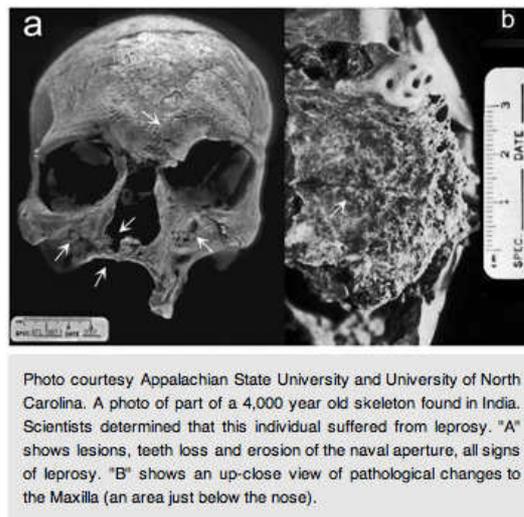


Figura 1 – Crânio humano fossilizado de aproximadamente 4.000 anos apresentando características compatíveis com hanseníase.

Fonte: [3]

A doença “lepra”, cujo agente patogênico é o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), muito provavelmente teve sua origem no norte/nordeste do continente

africano, mesmo local onde supostamente surgiu o ser humano moderno; com as sucessivas migrações do homem, o patógeno foi carregado para Ásia e Europa, sendo introduzido nas Américas somente no período das navegações, retornando a costa oeste do continente africano com o intercâmbio de escravos [4, 5]. A inferência da rota de disseminação da doença foi estimada verificando a presença de variantes muito raras que surgiram no genoma do *M. leprae* ao longo dos séculos e só estavam presentes em cepas coletadas em certas regiões do globo (Figura 2).

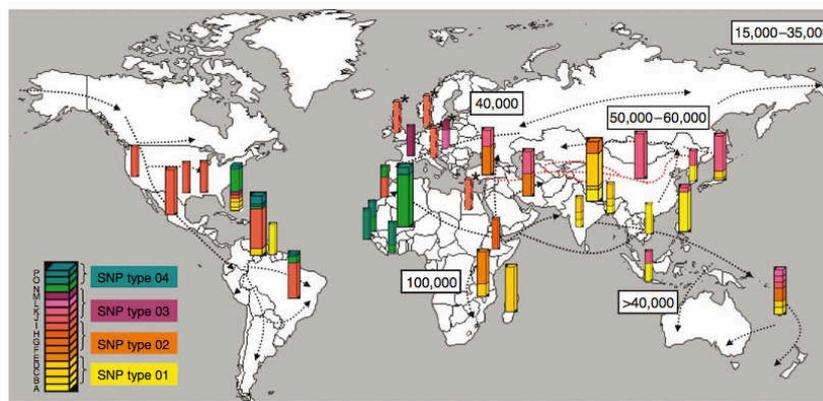


Figura 2 – Disseminação de hanseníase no mundo – a diferenciação do bacilo acompanhando as rotas migratórias humanas.
Fonte: [5]

A bíblia, em sua forma atual, conta com aproximadamente 50 citações do termo “lepra” em diversas passagens. Curiosamente, o denominação hebraica, *zara’at*, originalmente utilizada para designar lesões cutâneas consideradas “impuras”, pode ter sido distorcida em sua tradução para o grego “lepra” (*lepros*, “áspero, descamativo” e *lepis* “escama, casca”) na septuaginta [6]. Há uma grande discussão na comunidade científica se realmente a “lepra” dos tempos bíblicos é a mesma doença à qual conhecemos hoje ou um agrupamento de múltiplas doenças dermatológicas, como a psoríase, vitiligo, elefantíase entre outras.

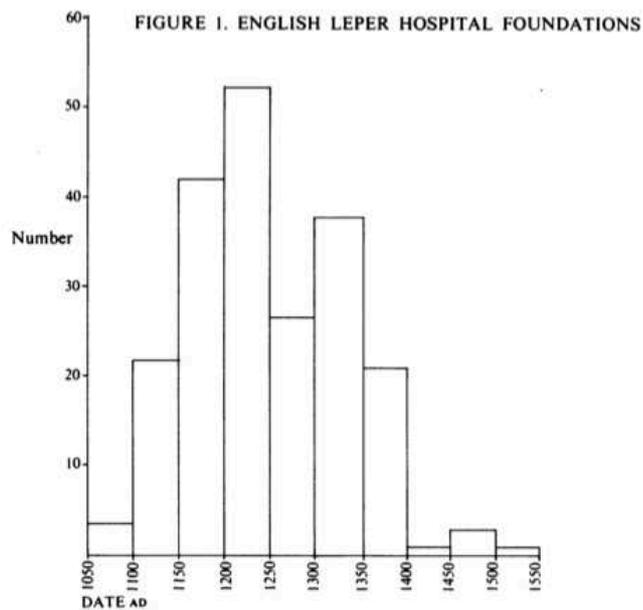
Durante a idade média o diagnóstico da “lepra” e, conseqüentemente, a segregação social, era de responsabilidade dos sacerdotes e senhores feudais, e baseada em fatores clínicos imprecisos, boa parte deles descritos em *Levítico*, capítulo 13 [7]. A passagem do *Levítico* não julga a moral do suposto “leproso”,

entretanto, define-o como ritualmente impuro, alegando que a doença seria uma “forma de punição pelos pecados cometidos” [6].

O impacto de ser considerado “leproso” e todo o estigma psicossocial criado em torno da doença na idade média era de ordem cultural e disseminada por uma política de segregação imposta pelos líderes religiosos. A ordem da época era temer a doença por ser considerada altamente contagiosa. Devido a isto, indivíduos considerados *leprosos* obrigatoriamente tinham de usar vestimentas que cobrissem todo o corpo, incluindo a face, e recebiam um sino que deveria ser tocado para avisar de sua presença ao adentrarem cidades, pois os mesmos deveriam se manter afastados do convívio diário da população [8].

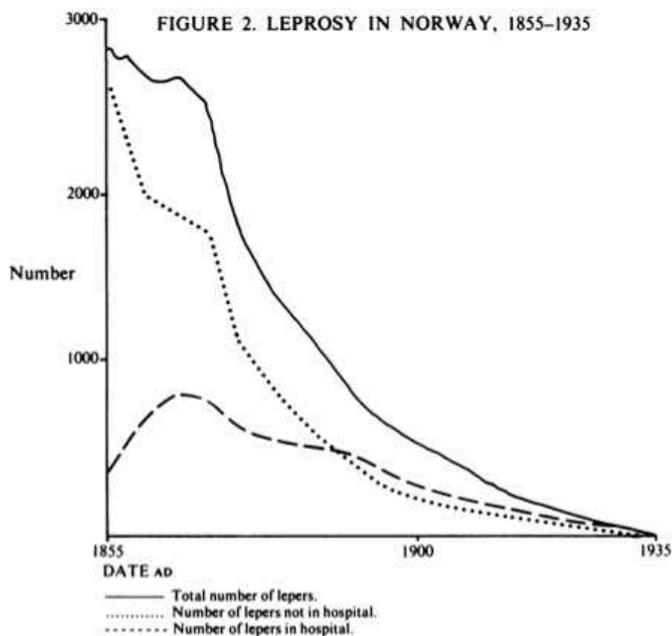
Historiadores acreditam que a prevalência de “lepra” atingiu seu ápice entre os séculos XII e XIII, fato este baseado no número de “leprosários” (recantos para isolamento e tratamento dos doentes) documentados na França e Inglaterra (figura 3) [7, 8]. Houve uma diminuição na incidência da doença na Europa entre os séculos XIX e XX (Figura 4), possivelmente devido ao isolamento dos indivíduos portadores de formas contagiosas da doença nos *leprosários*. Porém, os principais fatores determinantes da queda na incidência da doença foram relacionados com a melhoria na qualidade de vida das populações, tais como saneamento básico e nos hábitos de higiene pessoal. Curiosamente o declínio na incidência de “lepra” coincide com o aumento do número de casos de tuberculose. Essas doenças são causadas por patógenos do mesmo gênero e desenvolvem uma resposta imunológica semelhante. Devido a alta mortalidade por tuberculose no século XIX e XX, pesquisadores sugerem um evento de seleção dos indivíduos resistentes a micobacterioses.

O estigma associado ao termo *lepra*, gerado na idade antiga e média, permanece até os tempos atuais. No Brasil, o decreto N° 76.078/1975 e posteriormente a lei N° 9.010/1995 obriga a substituição do termo *lepra* e seus derivados por hanseníase, divergindo da nomenclatura em relação ao resto do mundo, visando diminuir o preconceito aos portadores da doença.



(Source of figures: R. M. Clay, *The mediaeval hospitals of England*, London, Frank Cass, 1966.)

Figura 3 – Variação no número de hospitais responsáveis pelo tratamento de hansenianos na Inglaterra entre os séculos XI e XVI.
 Fonte: [7] © the trustee, Wellcome Trust.



(Compiled from P. Richards, *The mediaeval leper and his northern heirs*, Cambridge, D. S. Brewer, 1977.)

Figura 4 – Variação da prevalência de hanseníase na Noruega entre 1855 e 1935.
 Fonte: [7] © the trustee, Wellcome Trust.

1.1.2 Hanseníase no Brasil

O histórico de hanseníase no Brasil coincide com a colonização portuguesa. A doença em nosso país assolava principalmente europeus nativos e seus descendentes, não havendo registro da doença entre os índios [9].

No século XVIII a endemia e o grande aumento no número de hansenianos, levou as autoridades coloniais e filantrópicas a fundarem as sociedades protetoras dos lázaros, denominação dada aos portadores de hanseníase, com a finalidade de tratamento. Com a contínua propagação da doença, no final do século XIX e início do século XX foram instituídos os denominados asilos-colônias, tais como o Asilo São Roque no Paraná, o Asilo Aimorés em São Paulo e a Colônia Santo Antônio do Prata no Pará (figura 5) entre outros. Os denominados “leprosários” eram bem distribuídos em todo o Brasil no início do século passado (figura 6) [10]. O Governo passou a controlar a endemia com o isolamento compulsório, com o primeiro decreto N° 5.156/1904; os indivíduos diagnosticados com hanseníase eram imediatamente levados para um desses asilos e só saíam mediante a alta concedida pelo serviço médico. As colônias ocupavam áreas extensas e eram consideradas pequenas cidades fechadas, contando com área urbana e rural. O isolamento dos afetados por hanseníase foi abolido por decreto federal somente em 1962. Entretanto, muitos moradores permaneceram nesses locais, por falta de reintegração à sociedade [9].

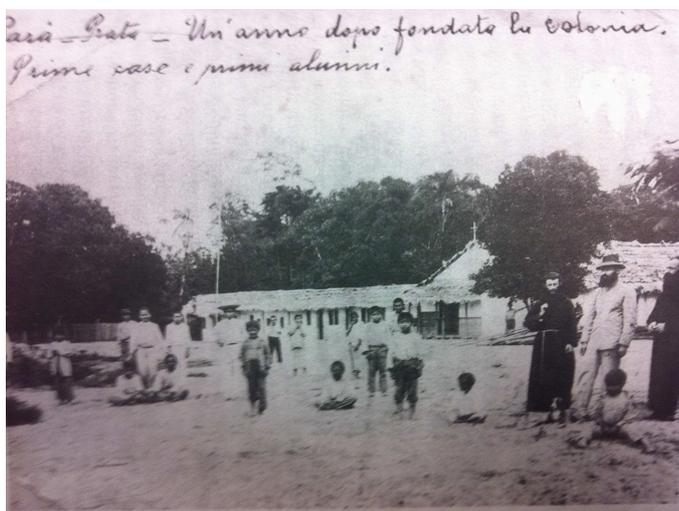


Figura 5 – Colônia Santo Antônio do Prata, 1918.
Fonte: [11].



Figura 6 – Distribuição dos asilos-colônias no Brasil em 1936.
Fonte: [10]

1.1.3 Dados epidemiológicos

Em 1991 foi implementada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma meta global de eliminação de hanseníase como problema de saúde pública. A proposta consistia na redução da taxa de prevalência para menos de um caso a cada dez mil habitantes (1/10.000 hab.) até o ano 2000 [12], porém, em 2010, três países ainda não atingiram essa meta, incluindo o Brasil (figura 7).

Apesar de esforços globais para eliminação de hanseníase e a redução de cinco milhões de novos casos estimados em 1985 para 244.796 em 2009, a hanseníase continua sendo um grande problema de saúde pública em muitos países de terceiro mundo [13]. O número global de novos casos detectados declinou ao longo dos últimos anos, de 620.638 em 2002 para 244.796 em 2009 (dados de 141

países), porém, a incidência da doença vem se mantendo semelhante, se não igual à prevalência, desde 1997 (figura 8).

Em 2009, o Brasil e mais 16 países localizados nos continentes africano e asiático representaram 93% dos novos casos de hanseníase (tabela 1). Neste ano, 37.610 novos casos foram detectados em nosso país, representando 15,4% do número global; estes valores têm oscilado entre 30.000 e 40.000 desde 1993. A incidência de hanseníase no Brasil é observada em maior proporção nas regiões norte, nordeste e centro-oeste. Na região sul e sudeste há relato de novos casos; no entanto, a taxa de detecção é inferior em comparação as outras regiões (figura 9).

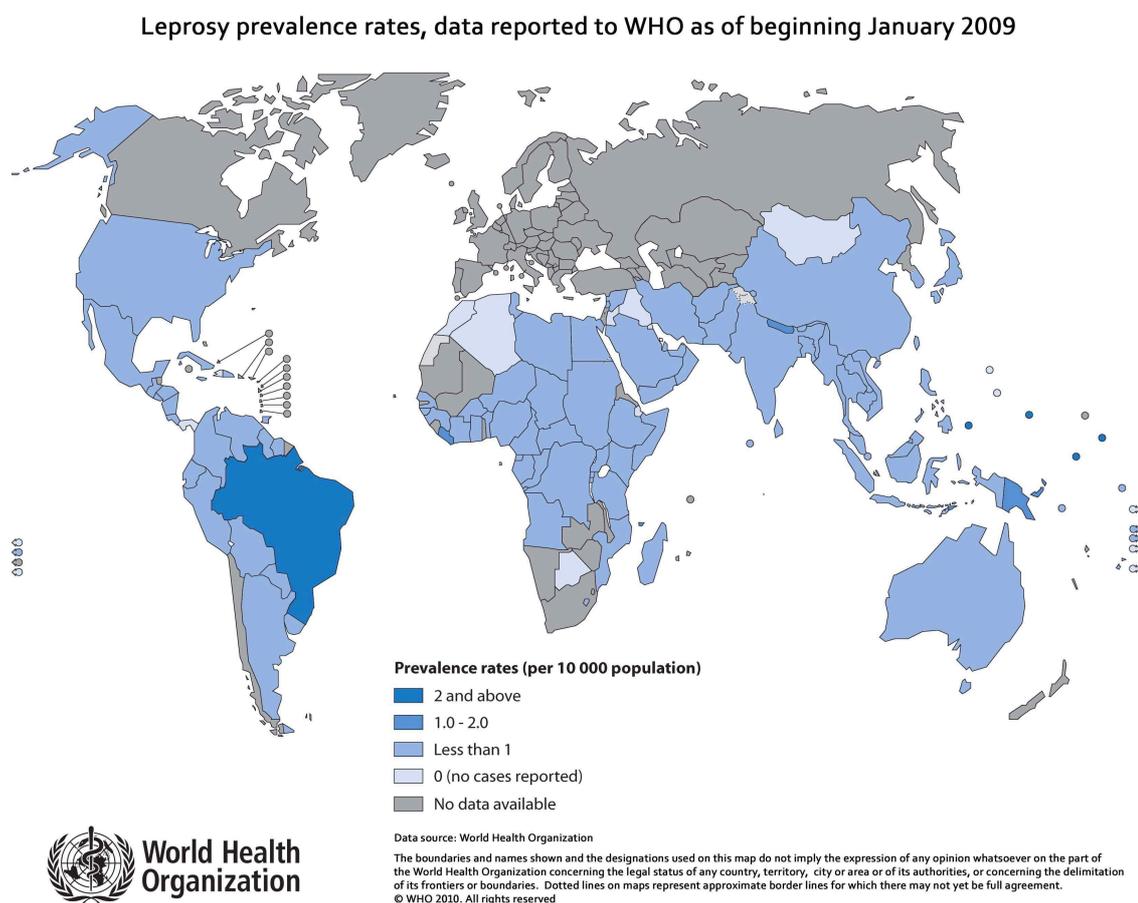


Figura 7 – Gráfico de prevalência de hanseníase em 2009.

* O Nepal alcançou a meta da OMS em 2010.

Fonte: [13, 14].

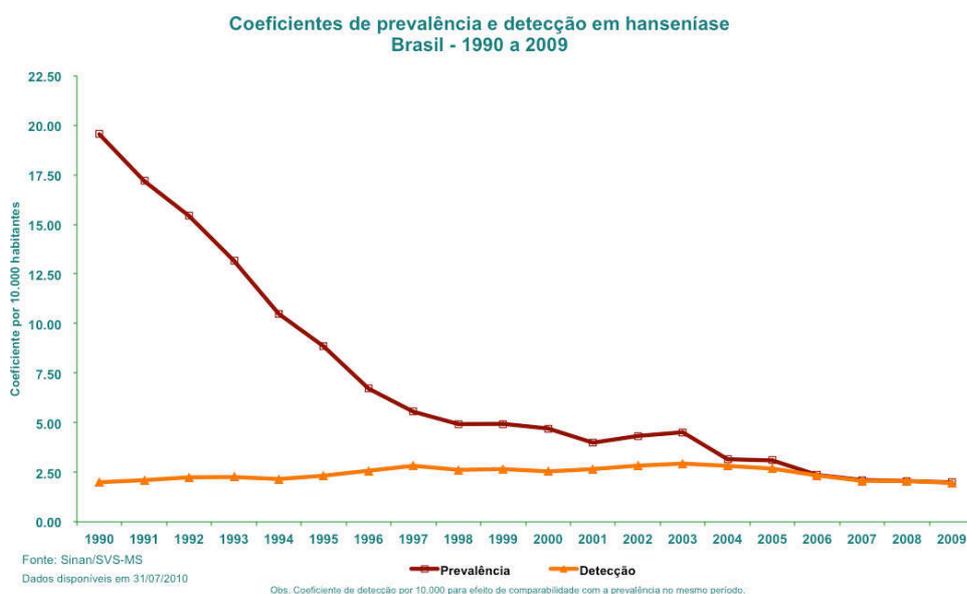


Figura 8 – Comparação entre o coeficiente de prevalência e detecção de novos casos de hanseníase no Brasil de 1990 – 2009.

Fonte: [15]

Tabela 1 – Dados de países com incidência de hanseníase superior a 1000 novos casos

Country – Pays	No. of new cases detected – Nombre de nouveaux cas dépistés						
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Bangladesh	8 712	8 242	7 882	6 280	5 357	5 249	5 239
Brazil – Brésil	49 206	49 384	38 410	44 436	39 125	38 914	37 610
China – Chine	1 404	1 499	1 658	1 506	1 526	1 614	1 597
Democratic Republic of the Congo – République démocratique du Congo	7 165	11 781	10 369	8 257	8 820	6 114	5 062
India – Inde	367 143	260 063	169 709	139 252	137 685	134 184	133 717
Ethiopia – Éthiopie	5 193	4 787	4 698	4 092	4 187	4 170	4 417
Indonesia – Indonésie	14 641	16 549	19 695	17 682	17 723	17 441	17 260
Madagascar	5 104	3 710	2 709	1 536	1 644	1 763	1 572
Mozambique	5 907	4 266	5 371	3 637	2 510	1 313	1 191
Myanmar	3 808	3 748	3 571	3 721	3 637	3 365	3 147
Nepal – Népal	8 046	6 958	6 150	4 235	4 436 ^a	4 708 ^a	4 394 ^a
Nigeria – Nigéria	4 799	5 276	5 024	3 544	4 665	4 899	4 219
Philippines	2 397	2 254	3 130	2 517	2 514	2 373	1 795
Sri Lanka	1 925	1 995	1 924	1 993	2 024	1 979	1 875
Sudan – Soudan	906	722	720	884	1 706 ^b	1 901 ^b	2 100 ^b
United Republic of Tanzania – République-Unie de Tanzanie	5 279	5 190	4 237	3 450	3 105	3 276	2 654
Total (%)	491 635 (96)	386 424 (95)	285 257 (95)	247 022 (93)	240 664 (93)	233 263 (94)	227 849 (93)
Global total – Total général	514 718	407 791	299 036	265 661	258 133	249 007	244 796

^a New cases detected from mid-November 2008 to mid-November 2009. – Nouveaux cas dépistés entre la mi-novembre 2008 et la mi-novembre 2009.

^b Includes data from southern Sudan. – Comprend les données du Sud-Soudan.

Fonte: [13].

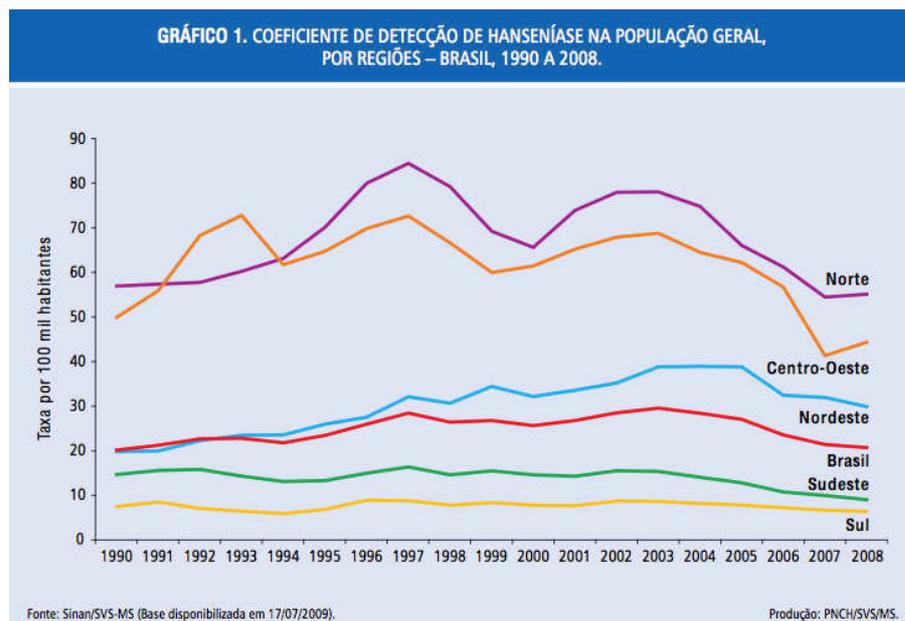


Figura 9 – Coeficiente de detecção de hanseníase no Brasil e regiões de 1990 – 2008.
Fonte: [16].

1.1.4 Hereditária ou adquirida? O agente etiológico da hanseníase

Por volta de 1800, um dos maiores nomes da pesquisa em hanseníase, o Dr. Daniel Danielssen, escreveu o livro *On leprosy*, juntamente com o dermatologista Carl Boeck. O livro endossava o fato de a hanseníase ser uma doença hereditária. Hoje sabemos a importância da genética do hospedeiro no controle da susceptibilidade à doença, o que explica parcialmente a hipótese de hereditariedade proposta no século XVII. Ironicamente, o pupilo mais famoso de Danielssen, Gerard T. Armauer Hansen, veio a derrubar a teoria da transmissão vertical, descrevendo a hanseníase como uma doença adquirida, causada por um agente etiológico. Em 1874, Hansen observou em seus experimentos a presença de pequeninos corpos em formas de bastão, semelhantes a bactérias, no interior de células provenientes de biopsias de lesões de pacientes com hanseníase [17, 18].

O *M. leprae* descrito por Hansen, foi o primeiro patógeno de doença infecciosa humana a ser identificado. Entretanto, este fato é contestado por puristas até hoje, devido a divergências no enquadramento do *M. leprae*, como fator causa, em hanseníase pelo postulado de Henle-Kock, publicado pelo contemporâneo de Hansen, Robert Koch em 1890 [19]. O postulado de Henle-Kock consiste em quatro

critérios para definir um agente etiológico como causa de uma doença; os critérios com comentários encontram-se descritos na tabela 2.

1

1

Tabela 2 – Postulado de Hanle-Kock

Critério	Comentário
Um agente microbiano específico deve estar sempre presente em pacientes com a devida doença	A presença do <i>M. leprae</i> em teste de raspado dérmico é específico para confirmação do agente como causa de hanseníase, porém, é pouco sensível; pacientes com baixa carga bacilar apresentam poucos ou nenhum bacilos visível no teste. Em contrapartida, técnicas muito sensíveis de biologia molecular, demonstram a presença de <i>M. leprae</i> em vias aéreas superiores com alta sensibilidade, no entanto, com especificidade baixa; indivíduos assintomáticos apresentam positividade [20], tornando restrita a homologiação do <i>M. leprae</i> nesse item.
O microrganismo deve ser isolado e cultivado em meio laboratorial puro.	Em estudo de genômica comparativa entre o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e cepas de <i>M. leprae</i> , é possível inferir que o último apresenta redução evolutiva, devido a drástica diminuição no número de genes transcritos [5, 21], muito provavelmente devido a sua especialização como parasita intracelular humano e tropismo por linhagens celulares específicas, macrófagos e células de schwann. Em adição, há baixa variabilidade genética entre cepas de <i>M. leprae</i> de diversas partes do mundo, a concordância chega a 99,995% [22, 23], tornando-o dependente de meios complexos ao ponto de não ser possível, até o presente momento, sua manutenção <i>in vitro</i> .
A cultura pura do microrganismo deve desenvolver a mesma doença primária quando inoculado em um animal susceptível	Em experimentos realizados por Shepard <i>et al.</i> inoculando cepas de <i>M. leprae</i> em patas de camundongos <i>nude (Foxn1nu/Foxn1nu)</i> foi possível induzir a formação de granuloma, mimetizando as mesmas características apresentadas em hanseníase [24]. Posteriormente, outro modelo animal utilizando tatus da espécie <i>Dasypus novemcinctus</i> provou ser a única espécie além dos humanos a desenvolver hanseníase [25]. Em estudo recente, pode-se averiguar uma provável zoonose causado por esta espécie de tatu no sul dos Estados Unidos, no qual animais selvagens e portadores de hanseníase apresentam concordância quanto a cepa de <i>M. leprae</i> [22]. Mesmo com esse novo insight, uma zoonose não explica completamente a constância na incidência de hanseníase, outras formas de contágio devem ser estabelecidas. Uma segunda hipótese de transmissão seria o convívio prolongado com indivíduos que apresentam alta carga bacilar nas vias aéreas superiores.
Retirada e identificação do microrganismo do animal infectado experimentalmente	É possível e amplamente utilizada a retirada de <i>M. leprae</i> viável proveniente dos modelos animais citados acima.

1.1.5 Patogênese da hanseníase

Após o contato com o bacilo a patogênese da hanseníase pode ser dividida em três estágios: no primeiro, indivíduos intrinsecamente susceptíveis ao *M. leprae* podem desenvolver uma lesão única, que com frequência permanece não detectada e cura-se espontaneamente, infecção sub-clínica [26, 27]. Estes indivíduos são descritos como susceptíveis a hanseníase *per se*, isto é, a doença independente da sua manifestação clínica. Aqueles que não curam espontaneamente e que não são tratados, no segundo estágio, apresentam manifestações clínicas da doença

enquadradas em um espectro de formas clínicas que varia de acordo com a resposta imune predominante no hospedeiro [28].

Nos critérios clássicos de Ridley-Jopling [29], as formas clínicas da hanseníase são distribuídas entre dois pólos extremos e três formas intermediárias: o pólo tuberculóide (TT), com lesões bem definidas e ausência de bacilos na pele e nervos, está associado a um predomínio de resposta imunológica do tipo Th1; o pólo oposto, lepromatoso (LL), com múltiplas lesões de pele e presença de bacilos na pele e nervos, ocorre em indivíduos que apresentam perfil Th2 de resposta imune. Entre os dois pólos da doença, existem as formas intermediárias, definidas como borderline-tuberculóide (BT), bordeline-borderline (BB) e bordeline-lepromatosa (BL); da primeira à última, ocorre uma progressiva redução da resposta imune mediada por células, acompanhada pelo aumento da carga bacilar, nível de anticorpos anti-PGL-1 (*Phenolic Glico-Lipid 1*, específico para *M. leprae*), número de lesões cutâneas e de nervos periféricos [30]. Alternativamente, a OMS classifica a doença, para fins de tratamento, em paucibacilar (incluindo TT e parte de BT) e multibacilar (parte de BT, BB, BL e LL), com base no número, localização das lesões e índice baciloscópico.

No que pode ser considerado um terceiro estágio da doença, podem ocorrer os Estados Reacionais (ER): episódios inflamatórios extremos que acometem indivíduos em todos os estágios da doença, incluindo o momento do diagnóstico de hanseníase, durante o tratamento e mesmo no pós-cura (Figura 10).

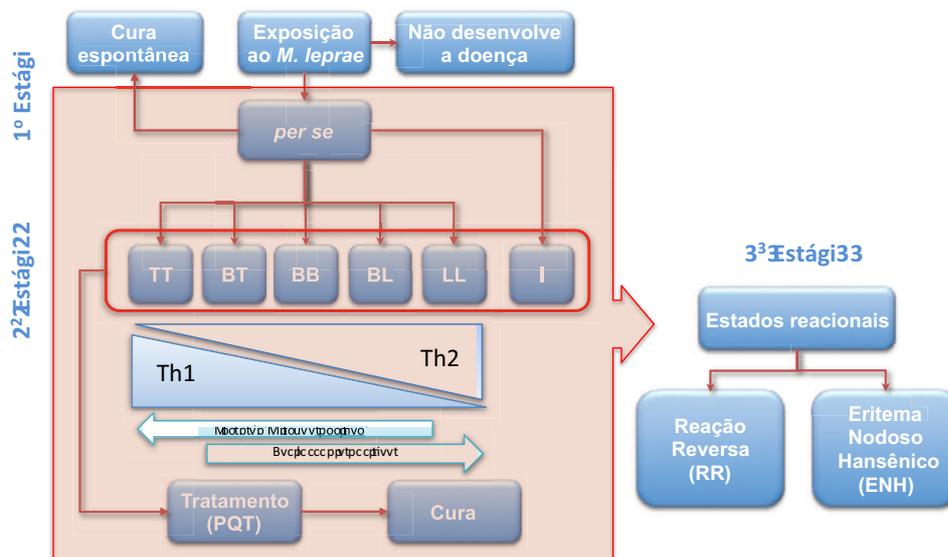


Figura 10 – Patogênese da Hanseníase

1.1.6 Tratamento da hanseníase

A busca de um tratamento efetivo para a cura de hanseníase foi uma longa batalha travada principalmente no século passado. Os resultados mais efetivos no tratamento medicamentoso foram observados com a utilização de sulfona (dapsona) na década de 40 e, posteriormente com antibiótico rifampicina, muito eficaz no combate ao *M. leprae* mesmo em dose única. No entanto, com a utilização de monoterapia, começaram a surgir cepas resistentes em algumas regiões, chegando a 50% dos novos casos diagnosticados para dapsona e 19% para rifampicina [12, 31].

Em 1981, a OMS propôs o uso global de um tratamento poliquimioterápico (PQT), formado pelas drogas rifampicina, dapsona e clofazimina [12]. Com a introdução da PQT, houve uma drástica redução do número de cepas de *M. leprae* resistentes. A dosagem da PQT é diferenciada de acordo com o enquadramento na classificação clínica operacional, para fins de tratamento, proposta pela OMS, conforme sumarizado na tabela 3.

Tabela 3 – Tratamento poliquimioterápico em hanseníase

Forma Clínica/OMS	Droga	Dose	Modo de administração	Duração do tratamento/meses
Paucibacilar				
	rifampicina: dapsona:	600 mg/dose única 100 mg/dia	supervisionada auto administrada	6 - 9
Multibacilar				
	rifampicina: dapsona: clofazimina:	600 mg/dose única 100 mg/dia 300 mg/dose única 50 mg/dia	supervisionada auto administrada supervisionada auto administrada	24 - 36

Hoje o uso da PQT é considerado pela OMS efetiva em 99,99% dos casos no entanto, em casos de resistência, a inserção de outras terapias medicamentosas se faz necessária. Como alternativa terapêutica a resistência, intolerância ou toxicidade à rifampicina e/ou dapsona, pode-se fazer uso de ofloxacina, minociclina ou claritromicina.

1.1.7 Estados reacionais em hanseníase

Os estados reacionais são caracterizados pela ativação de um processo imuno-inflamatório repentino e intenso, com frequente envolvimento de nervos periféricos [32]. Estudos populacionais demonstram que de 16 a 56% dos pacientes com hanseníase desenvolvem grau 2 de incapacidade [26], parâmetro desenvolvido pela OMS que caracteriza danos neural irreversível, com perda da sensibilidade, deficiência motora e/ou deformidades anatômicas. Cerca de 30 a 50% dos pacientes que desenvolvem hanseníase apresentam algum tipo de ER, sendo estes considerados os principais responsáveis pelo alto índice de grau 2 de incapacidade em casos de hanseníase na atualidade [28].

Em 2009 no Brasil, cerca de 6,4% dos novos casos de hanseníase apresentaram grau 2 de incapacidade ao diagnóstico; esses números vêm se mantendo entre 5 – 8 % desde 2004 [14]. Aproximadamente 30% dos novos casos de hanseníase e de ER são diagnosticados simultaneamente [33], o que explica em parte o alto índice de dano neural irreversível observado no diagnóstico da doença; Por ser hanseníase considerada uma doença “silenciosa”, o paciente muitas vezes recorre ao atendimento médico de forma tardia, devido aos sintomas dos ER.

Existem dois tipos principais de ER: Reação do Tipo 1, ou Reação Reversa (RR), e Reação do Tipo 2, ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH). Pacientes com hanseníase podem também desenvolver uma forma muito agressiva de reação denominada Fenômeno de Lúcio (FL), ou ainda, somente neurite; porém, estes episódios representam uma pequena parcela dos ER. Raramente, um mesmo paciente pode apresentar ambos (ENH e RR), no entanto em períodos distintos [34]. Interessantemente, um estudo clínico demonstra que o perfil de expressão de citocinas em lesão neste caso é muito semelhante [35].

O tratamento e a manifestação clínica dos episódios são distintos; entretanto, pode-se especular que ambas as formas de ER podem compartilhar um mesmo mecanismo de controle de susceptibilidade, visto que as teorias mais aceitas para o mecanismo de ação dos ER baseiam-se em um aumento repentino na produção de citocinas da resposta Th1 [36, 37].

1.1.7.1 Reação reversa ou reação do tipo 1 - RR

A reação do tipo 1 é também denominada reação reversa devido a observações clínico/histopatológicas clássicas evidenciarem o aumento inesperado da resposta imune celular em lesões, e caracteriza-se por uma hipersensibilidade tardia a antígenos de *M. leprae* [28, 38]. Os achados dermatopatológicos de RR são um aumento do número de linfócitos na derme, e perda da organização normal do granuloma, com posterior aumento do número de células gigantes de Langhans [28, 32]. Estudos imuno-histoquímicos demonstram o papel crucial de linfócitos Th1 no desenvolvimento de RR [rev. em [28].

A RR afeta de 20 – 30% dos pacientes com hanseníase, sendo mais frequente que o ENH [39]. As manifestações clínicas são: Inflamação aguda das lesões existentes, com o envolvimento de nervos periféricos ou não, bem como o surgimento de novas lesões (figura 11). Efeitos sistêmicos raramente estão presentes. Pacientes classificados nas formas borderline da hanseníase são considerados sob maior risco de desenvolverem RR quando comparado com formas polares, principalmente devido ao seu perfil de resposta imunológica instável [33]. Outros fatores associados com susceptibilidade à RR são: (i) idade: indivíduos jovens (< 20 anos) tem menor chance de desenvolver RR quando comparados com adultos-jovens (entre 20 e 40 anos) e adultos (> 40 anos) [33, 40]; (ii) raspado dérmico superior à 4+, valor quantitativo representando o número de bacilos visíveis em cada sítio analisado; (iii) maior número de lesões ao diagnóstico [33]; e (iv) detecção de DNA do *M. leprae* em lesões de pacientes com lesão única [40].

Cerca de 95% dos casos de RR ocorrem dois anos após o início do tratamento [33, 41]. Os sinais e sintomas de RR surgem muito rapidamente e necessitam de atendimento emergencial para amenizar a chance de dano neural. Mesmo com tratamento adequado, cerca de 40% dos pacientes com RR não recuperam-se completamente, desenvolvendo dano neural permanente [42]. Episódios de RR pode ocorrer muitos anos após o tratamento, porém nesses casos é difícil diferenciar um estado reacional de uma reincidência da doença [43].



Figura 11 – Representação de paciente em reação reversa.
Fonte: [44]

1.1.7.2 Eritema nodoso hansênico - ENH

O ENH acomete pacientes com resposta imunológica predominantemente humoral. Há grande variação geográfica na prevalência de ENH. Em estudo envolvendo um grupo populacional do Brasil, 37% dos pacientes classificados como BL e LL desenvolveram ENH, enquanto na Índia, Nepal e Tailândia, a prevalência varia de 19 a 26% nestas formas clínicas [rev. em [32]. No entanto, o Brasil registra maior número de casos multibacilares quando comparado com países do sudeste asiático, nos quais casos de hanseníase paucibacilar são mais frequentes.

Em estudo prospectivo, um grupo de 481 indianos portadores de hanseníase classificados nas formas BL e LL foram acompanhando por 11 anos, destes, menos de 10% dos pacientes desenvolvem um único episódio de ENH, cerca de 62% apresentam ENH de forma crônica [41]. No ENH, assim como no RR, o primeiro evento é mais comumente observado no primeiro ano após o início da PQT, e cerca de um terço dos casos de ENH são diagnosticados simultaneamente à hanseníase [41, 45]. Além de forma clínicas BL e LL, um índice baciloscópico superior à 4+ é considerado como fator de risco para ENH [41, 46].

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela imunidade transitória caracterizada pelo aumento repentino na produção de citocinas Th1, tais como IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-6 em pacientes com resposta Th2, desencadeando o ENH, ainda são pouco conhecidos [47, 48]. Sabe-se também que em pacientes do pólo lepromatoso há a deposição de imunocomplexos nas lesões [49]; a ativação da resposta imune celular, em pacientes com resposta imunológica predominantemente Th2, provoca uma reação sistêmica envolvendo os imunocomplexos, ativando um processo inflamatório extenso e agressivo, podendo levar a sérios danos teciduais.

As manifestações clínicas de ENH incluem lesões eritematosas generalizadas, nódulos e pápulas superficiais ou profundas, podendo tornar-se ulcerativas ou necróticas (Figura 12). Alguns nódulos atingem cronicidade, sendo muito dolorosos e levando a fibrose e cicatrizes. Os principais efeitos sistêmicos relatados são febre alta, edema e mal estar prolongado com duração de dias até semanas [50]. Os achados histopatológicos em biópsias de lesões eritematosas agudas são: presença predominantemente de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos; já em biópsias de lesões crônicas há redução no número de neutrófilos e aumento de linfócitos e plasmócitos [51]. De fato, estudos confirmam a importância dos neutrófilos na secreção de TNF- α em pacientes com forma aguda de ENH [52].



Figura 12 – Representação de paciente com lesões características de Eritema Nodoso Hansênico.
Fonte: [44]

1.1.7.3 Fenômeno de Lúcio - FL

O Fenômeno de Lúcio é um subtipo de ER pouco comum que acomete pacientes classificados nos grupos LL e BL de Ridley & Joplin, principalmente indivíduos de origem latina ou ancestralidade mexicana [53]; no entanto, também há relatos fora da América Central, como na costa oeste dos Estados Unidos, América do Sul e África [54]. A patologia foi inicialmente descrita por Lúcio e Alvarado em 1852 e posteriormente revisada por Latapi em 1948 [55, 56].

As reações apresentadas neste tipo de ER são agudas, severas e necrotizantes, com características clínicas de um infiltrado cutâneo difuso e presença de múltiplos bacilos no endotélio; em estágios avançados causam ulcerações extensas e muito dolorosas, nas extremidades ou muitas vezes generalizada, acarretando infecções secundárias e sépsis, muito característicos do fenômeno que está frequentemente associado a altas taxas de mortalidade [28, 57].

Pouco se sabe sobre o mecanismo fisiopatológico do FL. Estudos demonstram um papel importante de imunocomplexos formados por IgG e/ou C3 do sistema complemento depositados em lesões e vasos sanguíneos periféricos, bem como a presença de imunocomplexos circulantes [54]. As características clínicas dos pacientes em risco e o mecanismo de ação, apesar de teórico, do FL, assemelha-se muito ao de ENH; por muitos anos FL foi considerado uma forma agressiva de ENH denominada Eritema Necrótico. Porém, através do sequenciamento de regiões do patógeno presente no tecido autopsiado de pacientes com FL foi possível averiguar diferença significativa em genes que deveriam ser conservados no *M. leprae*, sugerindo a existência de uma nova subespécie, o *Mycobacterium lepromatosis sp*, responsável pelo FL [57].

1.1.8 Imunologia e estados reacionais

Mesmo com a alta incidência de ER, pouco se sabe sobre os mecanismos imunológicos envolvidos no processo. Nenhum ensaio laboratorial desenvolvido até

hoje pode prever com exatidão qual paciente é susceptível à ER, visando assim um acompanhamento médico mais próximo e com maiores cuidados. O monitoramento de pacientes assintomáticos de hanseníase se baseia nos níveis circulantes de anticorpo anti-PGL-1. A utilização desta metodologia para prognóstico de ER já foi investigada, porém devido a pacientes com hanseníase apresentarem níveis elevados de PGL-1 independente de seu status de reação, esse teste não é aplicável para ER [58]. Estudo recente demonstra a utilização de proteínas recombinantes para o diagnóstico precoce de hanseníase, em adição ao teste anti-PGL-1 [59, 60].

Quanto a mediadores imunológicos, estudos demonstram variações nos níveis de expressão de citocinas como TNF- α , IL6, IL1, IL2, IL12, IFN- γ e quimiocinas IL8, IP10, MCP-1, RANTES durante os ER [48, 52, 61, 62]. A citocina TNF- α mostra-se particularmente interessante, devido a seus níveis demonstram-se super expressos na circulação e em sítios cutâneos em pacientes com RR e ENH e em nervos periféricos de pacientes RR (rev. em [28]). A secreção desta citocina envolve diversas vias como a dos *Toll Like Receptors* (TLR), e das MAP quinases, *Mitogen Activated Protein* (MAP) *kinases* e da apoptose. O TNF- α é secretado por diversas linhagens celulares, incluindo macrófagos, neutrófilos e linfócitos T e parece desempenhar um papel fundamental na formação de granulomas pós-infecção durante tuberculose pulmonar [63], porém, também é amplamente descrita como responsável por dano tecidual em processos inflamatórios.

Em estudo caso-controle realizado por colaboradores da Universidade Federal de Goiás, no qual níveis séricos de 16 citocinas pró-inflamatórias, 4 anti-inflamatórias e 7 fatores de crescimento foram dosados em casos de RR, ENH e controles portadores de hanseníase sem ER, dois principais fatores emergiram como candidatos ao controle da susceptibilidade a ER. Pacientes que desenvolveram RR demonstraram maiores níveis séricos da quimiocina IP10 ($p=0,004$) e de interleucina 6 ($p=0,013$); apesar de uma significância *borderline*, IL6 também apresentou-se em níveis mais elevados nos casos de ENH quando comparados a controles sem reação ($p=0,05$) [62]. Níveis de RNA mensageiro de IL6 também são expressos em maior proporção em pacientes em ER nas formas clínicas BL e LL quando comparados com pacientes sem ER [48]. Em estudo independente, IP10 também demonstrou-se elevada no soro de pacientes com RR e em biopsia de lesão, quando comparados com pacientes sem ER [64]. Em modelo

animal, a secreção de IP10 parece estar intimamente associada a níveis de TNF- α em camundongos com tuberculose pulmonar [63].

1.1.9 Tratamento em estados reacionais

Os pacientes diagnosticados com hanseníase devem ser informado, no momento do diagnóstico, sobre os sinais e sintomas característicos dos ER, e orientados de forma que, ao percebê-los, se direcione imediatamente a um centro de atendimento médico, o mais breve possível, para o início da terapia medicamentosa, evitando assim a progressão de eventuais danos neurais e conseqüentemente, a ocorrência de sequelas permanentes.

O tratamento a base de corticóide preconizado para ER foi iniciado na década de 50 [65]. A terapêutica convencional para RR visa controlar a inflamação aguda, diminuindo os danos neurais e reduzindo a dor do paciente. O medicamento de referência é a prednisona, 30 – 40mg/dia, sendo reduzida gradativamente, 5mg a cada 14 dias com a melhora do paciente. Os tratamentos são prolongados, com duração média de 3 – 6 meses, podendo estender-se [32, 66]. Mesmo com tratamento adequado somente 40% dos casos demonstram melhora na função neural após três meses de tratamento [42].

O tratamento de ENH é realizado à base de prednisona, muitas vezes associada à talidomida; contudo, a utilização deste fármaco deve ser cautelosa com mulheres em idade fértil, devido à sua teratogenicidade [67]. A dose inicial de prednisona é entre 40 – 60 mg/dia no tratamento de ENH de leve a moderado, a associação do corticoide com talidomida é utilizada em casos de ENH de moderado a severo [32]. A talidomida tem efeito rápido no controle da inflamação sistêmica devido sua ação inibitória sobre o TNF- α [68]. A dose usual inicial para casos severos é de 400mg/dia e reduzida a 300mg/dia assim que possível. Pacientes com a doença crônica podem fazer uso de 100mg/mês [69, 70]. Outro fármaco de escolha para o tratamento de ENH é a pentoxifilina. Em estudo medindo a expressão de citocinas em biópsia de lesão, foi possível verificar a redução nos níveis de TNF- α , INF- γ e IL6 em pacientes após o tratamento com a droga, sendo esta considerada efetiva no tratamento a ENH bem como a talidomida [71, 72].

O uso de corticóides como escolha terapêutica deve ser muito bem acompanhado, pois seus efeitos adversos são múltiplos e medidas para minimizá-los devem ser empregadas. O uso prolongado pode causar desmineralização óssea levando a osteoporose, hipertensão e aumento na susceptibilidade a infecções devido a ação imunossupressora destes medicamentos.

1.1.10 Susceptibilidade a doenças complexas

Hanseníase e seus ER são ditos fenótipos complexos, pois necessitam ou envolvem múltiplos fatores para o seu advento [73]. Fatores ambientais, hábitos de higiene pessoal, fatores nutricionais e socioeconômicos, bem como o contato com o agente patogênico são importantes no desenvolvimento de doenças infecciosas, contudo, não explicam porque certos indivíduos adoecem e outros não, ou porque apresentam formas mais severas da doença, ou ainda, porque desenvolvem os episódios reacionais.

Com o avanço da biologia molecular, pode-se perceber que somente esses fatores não são suficientes; o perfil genético do hospedeiro e do parasita tem um papel importantíssimo na susceptibilidade a doenças ditas complexas [73]. A variabilidade genética de cada indivíduo pode facilitar ou dificultar a ação infectante dos agentes etiológicos. Em hanseníase, a genética do hospedeiro tem um papel bem mais relevante do que a do próprio *M. leprae* na infecção, já que o mesmo tem um genoma muito conservado [21, 23]. No caso dos ER, alguns fatores "ambientais" já foram associados a susceptibilidade e foram relatados anteriormente no texto; entretanto, a real contribuição de fatores genéticos do hospedeiro no ER ainda é um campo aberto cujos primeiros estudos vêm sendo publicados nos últimos anos.

1.2 GENÉTICA DA HANSENÍASE

1.2.1 Genética do *M. leprae*

Devido a baixa variabilidade do genoma do *M. leprae*, como citado anteriormente, pode-se dizer que apenas um clone é responsável por todos os casos de hanseníase [4]. Este fato reforça a hipótese de uma contribuição maior da genética do hospedeiro no controle da susceptibilidade à hanseníase e suas manifestações clínicas quando comparado com outras doença infecciosas, nas quais a genética do patógeno também é um grande contribuinte, principalmente na patogenicidade.

Em análises de expressão gênica do *M. leprae* foi possível demonstrar que, mesmo tendo 27% de pseudogenes inativos em seu genoma, 43% destes são transcritos. Interessantemente, grande parte do transcriptoma do *M. leprae* é constituído por genes sem função pré-estabelecida e que aparentemente não trazem benefício algum ao patógeno [74]. Estes achados geram perguntas intrigantes sobre qual o papel destes pseudogenes transcritos na manutenção, sobrevivência ou até mesmo o potencial de infecção do *M. leprae*.

1.2.2 Genética da susceptibilidade à hanseníase

Pesquisas conduzidas ao longo dos últimos 100 anos têm resultado em sólido corpo de evidência em favor da existência de fatores genéticos atuando no controle da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase. Estudos observacionais indicam a presença de um componente familiar de susceptibilidade à doença [75], bem como um aumento da concordância de fenótipos da hanseníase entre gêmeos monozigóticos quando comparados com gêmeos dizigóticos [76]. Seguidas análises de segregação complexa, incluindo a realizada por nosso grupo recentemente, após recrutamento completo de toda a população da Vila Santo Antônio do Prata (ex-côlonia de hansenianos no estado do Pará, em que a hanseníase apresenta-se de forma hiperendêmica), indicam a existência de um forte componente genético

controlando a susceptibilidade à doença, apesar de divergirem quanto ao modelo de herança [77, 78].

Com os avanços da biologia molecular e o desenvolvimento de métodos e ferramentas de análise genética, como estudos de ligação envolvendo regiões genômicas candidatas ou genomas completos, estudos de associação de genes ou vias candidatas e os recentes *scan* genômicos de associação, muitos resultados interessantes têm sido produzidos. Um primeiro *scan* genômico de ligação para genes de susceptibilidade à hanseníase encontrou evidência de ligação entre a região cromossômica 10p13 e hanseníase paucibacilar em uma população de famílias da Índia [79]. Em estudo posterior um polimorfismo não-sinônimo (p.Gly396Ser) presente no éxon 7 do gene *MRC1*, localizado na região 10p13, demonstrou-se associado a hanseníase *per se* e forma multibacilar em dois grupos populacionais distintos do Vietnã e Brasil [80].

Um segundo *scan* genômico resultou na identificação de variantes genéticas localizadas na região compartilhada por dois genes, *PARK2* e *PACRG*, como fatores de risco para susceptibilidade à hanseníase *per se* em duas populações etnicamente distintas do Vietnã e Brasil [81, 82]. A associação de uma destas variantes com hanseníase *per se* foi replicada em um estudo caso-controle utilizando um grupo populacional da Índia [83]. Por fim, os mesmos polimorfismos de susceptibilidade à hanseníase nos genes *PARK2/PACRG* no Vietnã e Brasil foram descritas em associação com febre tifóide e paratifóide em uma população da Indonésia [84], sugerindo um papel para estes genes no controle da susceptibilidade a outros patógenos intracelulares além do *M. leprae*.

Em desdobramento adicional do *scan* genômico realizado na população vietnamita, estudo em larga escala envolvendo mais de 400 marcadores genéticos da região HLA encontrou forte evidência de associação entre alelos do gene *LTA* e susceptibilidade à hanseníase *per se* em duas amostras populacionais independentes do Vietnã do Sul. No mesmo estudo, o achado foi replicado em uma amostra populacional da Índia [85]. Interessantemente, evidência para associação, se mostrou mais forte em indivíduos mais jovens.

Vários estudos seguem evidenciando genes em associação à hanseníase, porém a grande maioria com efeitos de susceptibilidade de moderados a fracos. Múltiplos estudos em hanseníase *per se* e suas formas clínicas demonstram associação de variantes do complexo MHC/HLA [86], que parecem ser

independentemente modificadas por polimorfismos nos genes *TNFA* [87, 88], *TAP* [89] e *HLA-DRB1/DQA1* [90, 91] e nos sorotipos de HLA classe I, A*2, A*9, A*10, A*32, B*5, B*21, B*40, Bw*4, Bw*6, Cw*1, Cw*2 e Cw*7, frequentes, e A*3, A*28, B*12, B*44 e Cw*3 pouco frequentes em pacientes com hanseníase [19]. Em estudo recente, um SNP em forte desequilíbrio de ligação com o sorotipo HLA-C*15:05 demonstrou-se associado a hanseníase *per se* em três grupos populacionais independentes [92]. Além disto, marcadores de genes não-MHC, tais como *NRAMP1* [93, 94], *VDR* [95], *IL10* [96-99], *IFNG* [100] e *KIR* [101] já foram descritos em associação com fenótipos da doença.

Em 2009 foi publicado o primeiro *scan* genômico de associação em hanseníase, demonstrando os genes *CCDC122*, *C13orf31*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR* e *RIPK2* associados a doença [102]. Pode-se averiguar a interação deste genes (exceto os genes vizinhos *C13orf31* e *CCDC122*) na mesma via de *PARK2*, demonstrando novamente a importância de variantes desta via na susceptibilidade a hanseníase. Interessantemente, o achado estatisticamente mais expressivo do *scan* genômico, para o gene *NOD2*, bem como para os outros cinco genes participantes da via proposta, não foram replicados em estudo subsequente publicado por Wong e cols. utilizando grupo-populacional da Índia; apenas as variantes dos genes de função desconhecida *CCDC122* e *C13orf31*, foram replicados nesta população [103]. No entanto, variações na região promotora do gene *NOD2* foram descritas em associação a hanseníase em trabalho subsequente [104]. Um posterior *scan* genômico de associação demonstrou a variante funcional I602S no gene *TLR1* em associação com hanseníase *per se* em três populações distintas [90]. Em trabalho anterior aos estudos genético-epidemiológicos em ER, a presença do alelo codificador do aminoácido alanina na variação funcional p.asp110ala do gene *NINJ1* demonstrou-se associada à susceptibilidade a dano neural em pacientes com hanseníase. Embora o foco deste estudo não tenha sido ER, o achado pode ser importante no contexto de reação em hanseníase, já que mais de 75% dos pacientes com grau de incapacidade < 0 também apresentaram estatus de ER [105].

1.2.3 Genética da susceptibilidade à estados reacionais

Recentemente foram publicados os primeiros estudos relacionando genes candidatos e ER, e até o presente momento, apenas cinco artigos relatam polimorfismos associados a ER. No primeiro deles, de 2008, foram investigadas variações no gene *TLR2* [106], que codifica uma proteína transmembrana envolvida na maturação de células dendríticas, mediando a secreção de citocinas tanto para resposta Th1 quanto Th2, e que representa um papel importante na resposta inflamatória a patógenos [107]. Para tanto, utilizou-se uma amostra populacional contendo 638 indivíduos etíopes, de três etnias distintas (Oromo, Amhara e Gurage), sendo 197 controles sadios e 441 casos classificados de acordo com os critérios de Ridley-Joplin e acompanhados por no mínimo cinco e no máximo 11 anos após o diagnóstico. Este acompanhamento foi realizado no contexto do AMFES (*All-Africa Leprosy Rehabilitation and Training Multidrug Therapy Field Evaluation Study*). Do total de casos acompanhados, 216 apresentaram algum tipo de estado reacional, 66 RR (15,0%) , 17 ENH (3,8%) e 133 neurites (30,2%).

Quatro marcadores do tipo SNP foram selecionados: rs3804099 +597 C/T, rs3804100 +1350 T/C, R677W +2029 C/T e rs5743708 +2258 G/A. Os autores encontraram evidência significativa de associação entre o marcador rs3804099 e o desenvolvimento de RR: dos 66 casos de RR, 38,3% eram heterozigotos, enquanto que 56,1% dos 150 controles sem RR, apresentaram o mesmo genótipo (OR = 0,31, $p = 0,003$), com o alelo T enriquecido no grupo controle. Já para os SNPs rs3804100, rs5743708 e p.R677W, não se encontrou diferenças significativas na distribuição alélicas. Além disso, um marcador do tipo microssatelite localizado entre 162 e 100 bp acima do primeiro códon do *TLR2* foi testado, com o alelo 280 bp encontrado enriquecido entre os indivíduos que desenvolveram RR (OR = 7,09, $p = 0,001$) [106].

Em um segundo estudo, utilizando uma amostra populacional de 933 nepaleses afetados por hanseníase com 238 casos de RR (25,5%) e 124 ENH (13,3%) acompanhados por no mínimo 3 anos, demonstrou-se um polimorfismo funcional, o SNP rs5743618 +1805 T/G (I602S) do gene *TLR1*, associado a proteção a RR, na comparação por frequências alélicas, [OR = 0,51 (0,29 – 0,87) $p = 0,01$] e genotípicas ($p_{\text{fisher}}=0,05$) [108]; posteriormente este mesmo marcador mostrou-se

associado a hanseníase *per se* em estudo independente [90]. Uma segunda variação funcional do gene *TLR1* (N248S), causadora de uma substituição de asparagina por serina no sítio externo de reconhecimento da proteína *Toll-like* – a presença da serina garante uma resposta efetiva no reconhecimento de patógenos, reduzida pela asparagina [109] – foi testada para associação a ER; para tanto, estudou-se uma amostra populacional de 742 indivíduos distribuídos em 656 casos de hanseníase sem ER, 11 casos de ENH (1,5%) e 75 casos de RR (10,1%). Para o polimorfismo p.N248S, o intervalo de confiança da *odds ratio* (OR) apresentada é compatível com significância para associação a ENH ($p < 0,05$) [OR = 0,40 (0,16 – 0,99) p =não demonstrado]. Homozigose para o alelo codificador do aminoácido serina em casos de ENH foi menos frequente: apenas um caso (9%) e 211 controles sem reação (32%) quando comparados, sob um modelo dominante, à frequência do alelo codificador de asparagina: 10 casos de ENH (91%) contra 160 controles (68%). Infelizmente os autores não descreveram os métodos de análise utilizado, dificultando a interpretação dos resultados [110].

Polimorfismos do gene *NOD2*, investigados na mesma população nepalense utilizada no estudo do gene *TLR1*, foram demonstrados em associação a RR e ENH; Os SNP rs8044345 e rs2287195 estão associado a RR ($p=0,02$ e $p=0,04$) e ENH ($p=0,01$ e $p=0,006$) respectivamente, sendo os alelos de proteção para ENH os de susceptibilidade para RR [111]. No trabalho mais recente em genética de ER, a variação funcional causada pela troca de uma citosina por timina na posição 274 do gene *NRAMP1* demonstrou-se em associação a RR ($p_{fisher}=0,03$) e ENH ($p_{fisher}=0,04$), novamente sendo o alelo de risco para RR o de proteção para ENH [112].

1.2.4 Genes mediadores imunológicos de interesse em ER

Em estudo de associação, baseado em famílias, realizado por nossos parceiros das universidades McGill, Montreal, Canadá e Renée Descartes (INSERM U980), Paris, França, foram selecionados 117 genes das vias envolvendo TNF- α como candidatos ao controle da susceptibilidade a RR. Para cobertura destes genes, 1043 *tag* SNP foram selecionados, seguindo os seguintes critérios: Desequilíbrio de ligação (DL), conforme estimado pelo parâmetro r^2 , superior a 0.8, e

frequência alélica mínima (FAM) de 5% na população Asiática. Estes marcadores foram genotipados em 193 famílias Vietnamitas (pais e mães de 202 filhos afetados, sendo 9 pares de gêmeos). Os marcadores que apresentaram baixa qualidade na genotipagem, FAM<5% e/ou estavam fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW, $p<0,001$), foram retirados da análise. Múltiplos sinais de associação ($p<0,01$) foram observados após a correção para testes múltiplos (erro do tipo I), por teste de *Monte Carlo*. Ao aplicar regressão logística condicional para os marcadores associados, foi possível determinar quais destes estavam independentemente associados a RR. (tabela 4) [113]. Os genes descritos no trabalho em questão são potenciais marcadores genéticos para ER, bem como outros mediadores imunológicos (*IL6*, *IL1*, *IP10*, *TLR1*, *TLR2* e *NOD2*) citados anteriormente; porém, nenhum estudo, até o presente momento, confirma os achados descritos até agora. Como um importante passo para estabelecer marcadores de previsão para o desfecho ER em pacientes com hanseníase, fazem-se necessário estudos de replicação destes achados.

Tabela 4 – Análise de regressão logística condicional dos genes envolvido à TNF- α .

Gène	marqueur	modèle	OR [95%]	p value	p value RR*sexe	p value RR*âge
<i>JAK1</i>	rs310202	additif	0.46 [0.30-0.69]	0.0002	0.78	0.46
<i>JAK1</i>	rs3818753	dominant	0.40 [0.19-0.86]	0.0190	0.95	0.73
<i>MAP2K2</i>	rs12459484	dominant	0.526 [0.33-0.97]	0.0390	0.92	0.95
<i>MAP2K5</i>	rs3784712	dominant	0.37 [0.17-0.82]	0.0150	0.87	0.56
<i>MAP3K5</i>	rs4351280	dominant	0.44 [0.26-0.75]	0.0024	0.99	0.84
<i>NALP12</i>	rs7259148	dominant	3.26 [1.77-6.01]	0.0001	0.99	0.98
<i>NALP4</i>	rs4801639	additif	1.62 [0.11-2.36]	0.0110	0.80	0.82
<i>PRKCZ</i>	rs262672	dominant	2.65 [1.42-4.93]	0.0037	0.86	0.80
<i>TRIAD3</i>	rs3779096	récessif	3.43 [1.16-10.2]	0.0260	1.00	0.10
<i>TRAF1</i>	rs3761847	récessif	0.38 [0.23-0.62]	0.0020	0.90	0.84

Gène; gene associado

Marqueur; SNP associado após a análise de regressão logística multivariada incluindo somente os marcadores de cada gene

modele; modelo genético associado considerando o alelo de maior frequência

OR [intervalo de confiança 95%]; do modelo associado

p value; proveniente da regressão logística condicional do teste de *pseudo-sibs*

p value RR*sexe; termo de interação entre RR e gênero

p value RR*sexe âge; termo de interação entre RR e idade

Fonte: [113]

2 JUSTIFICATIVA

O uso de métodos de biologia molecular e ensaios genéticos para diagnóstico e prognóstico de doenças vêm se destacando como importantes ferramentas de uso laboratorial, com potencial de ampla aplicação em um futuro próximo. Entretanto, anteriormente ao desenvolvimento de novos ensaios, as bases moleculares envolvidas na susceptibilidade as diversas patogêneses ditas complexas precisam ser melhor compreendidas.

Embora estudos tenham demonstrado um forte componente genético controlando a susceptibilidade do hospedeiro a fenótipos variados da hanseníase, tais como a doença *per se* e posteriormente suas formas de manifestação clínica, pouco tem-se avançado na investigação das bases genéticas e moleculares no controle da ocorrência de ER.

Os ER são considerados um dos maiores problemas de intervenção médica em hanseníase, sendo hoje os maiores responsáveis pelas sequelas nestes pacientes. O desenvolvimento de métodos laboratoriais visando um prognóstico para ER, contribuiria tanto com o Estado, com economia de verbas em medicação e área hospitalar, quanto com a diminuição do uso de medicamentos considerados de risco, como a talidomida e uso prolongado de corticóides. No entanto, os principais beneficiados seriam os pacientes, os quais teriam acompanhamento médico mais próximo e tratamento imediato aos primeiros sintomas de ER, evitando assim os danos neurais e as conseqüente sequelas.

Neste sentido, recentemente, os primeiros estudos envolvendo variantes genéticas associadas ao desencadeamento dos ER vem sendo produzidos, com o primeiro em 2008, entretanto, frequentemente com resultados inconclusivos. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos e posteriormente a replicação dos achados em populações independentes, confirmando assim a importância e o impacto da genética neste patologia.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi investigar a participação de genes candidatos ao controle da susceptibilidade a ER em indivíduos diagnosticados com hanseníase.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Testar *tag* SNP, capturando totalmente a informação do gene *IL6*, para a associação com susceptibilidade a ER em um grupo-populacional de casos de ER e controles pareados por forma clínica de risco;
- b. Testar *tag* SNP, capturando totalmente a informação do gene *CXCL10* (IP10), para a associação com susceptibilidade a ER em um grupo-populacional de casos de ER e controles pareados por forma clínica de risco;
- c. Testar sete SNP localizados nos genes, *MAP3K5/MAP7*, *MAP2K2*, *MAP2K5*, *NLRP4*, *PRKCZ*, *RNF216* e *TLR2* previamente associados a RR, para replicação em um grupo-populacional de casos de ER e controles pareados por forma clínica de risco;
- d. Testar *tag* SNP, capturando totalmente a informação de três genes candidatos, *TRAF1*, *NALP12* e *JAK1* e suas regiões promotoras, previamente associados a RR, para replicação dos achados em um grupo-populacional de casos de ER e controles pareados por forma clínica de risco;
- e. No caso de sinais positivos de associação, investigar a correlação genótipo/fenótipo entre marcadores do gene associado e níveis sérios ou funcionais da proteína correspondente.

4 MÉTODOS COMPLEMENTARES

A descrição do grupo populacional recrutado no Centro de Referência e Diagnóstico de Doenças Tropicais, localizado em Goiânia, Goiás, assim como os métodos de discriminação alélica e análises estatísticas utilizados no presente estudo, encontram-se descritos no capítulo 5.

4.1 SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS AO CONTROLE DA SUSCEPTIBILIDADE A ESTADOS REACIONAIS

4.1.1 Genes provenientes de estudo de perfil de citocinas

Os genes codificadores das proteínas IL6 (*IL6*) e IP10 (*CXCL10*) foram selecionados, no presente estudo, como genes candidatos ao controle à susceptibilidade a ER. Para cobertura física completa destes e de suas regiões promotoras, foram selecionados três *tag* SNP para o gene *IL6* e um para o gene *CXCL10*, seguindo os critérios de DL $r^2=0.8$ e FAM = 20% na população caucasiana (CEU) (Tabela 5).

4.1.2 Genes provenientes de estudo de vias e genes candidatos

Para a investigação dos genes candidatos revelados pelo estudo de vias e SNP associados a ER em outras populações, duas abordagens distintas foram aplicadas na seleção dos marcadores, conforme descrito a seguir.

4.1.2.1 Estratégia de replicação

Considera-se replicação, em estudos genéticos, a associação significativa entre o fenótipo em questão e o mesmo marcador molecular descrito anteriormente, com a concordância para o alelo de risco em ambos os grupos.

Para o estudo de replicação, selecionamos seis SNP, presentes nos genes *MAP3K5/MAP7*, *MAP2K2*, *MAP2K5*, *NLRP4*, *PRKCZ* e *RNF216* respectivamente, derivados do estudo de genes da via do TNF- α , os quais apresentaram associação significativa a RR ($p > 0,05$), após a correção por testes múltiplos e regressão logística condicional. Por fim, selecionamos como candidato a variante do gene *TLR2* previamente associada a RR em um grupo-populacional Etíope (Tabela 5).

Tabela 5 – SNP de genes candidatos

Gene	dbSNP	Varição
<i>MAP3K5</i>	rs4351280	[A/G]
<i>MAP2K2</i>	rs12459484	[A/G]
<i>MAP2K5</i>	rs3784712	[A/G]
<i>NLRP12</i>	rs4801639	[C/T]
<i>PRKCZ</i>	rs262672	[T/G]
<i>RNF216</i>	rs3779096	[C/T]
<i>TLR2</i>	rs3804099	[C/T]
<i>IL6</i>	rs1800795	[C/G]

4.1.2.2 Estratégia de cobertura completa de genes

Selecionamos para cobertura física completa, os genes *NLRP12*, *JAK1* e *TRAF1*, que apresentaram os sinais de maior significância estatística no estudo de genes da via do TNF- α ($p=0,0001$, $p=0,0002$ e $p=0,002$ respectivamente). Para a discriminação dos *bins*, capturados por um *tag* SNP, seguiram os critérios de DL $r^2=0.8$ e FAM=5% na população Africana (YRI) (Tabela 6).

Tabela 6 – Tag SNP de genes candidatos

Gene	dbSNP	Variação	Gene	dbSNP	Variação
CXCL10	rs4859587	[A/C]	JAK1	rs3818753	[A/G]
IL6	rs2069832	[A/G]		rs12135754	[A/C]
	rs2069840	[C/G]		rs310202	[A/G]
	rs2069845	[A/G]		rs310199	[A/G]
NLRP12	rs2866111	[C/T]		rs4916005	[C/T]
	rs10410581	[G/T]		rs12093269	[C/T]
	rs8110965	[C/G]		rs310198	[C/T]
	rs889163	[A/G]		rs2256298	[A/G]
	rs4419163	[A/T]		rs2151572	[A/C]
	rs4806773	[C/T]		rs310228	[A/C]
	rs10416363	[A/G]		rs310225	[A/G]
	rs4539722	[A/G]		rs4916004	[A/G]
	TRAF1	rs2416804	[C/G]		rs310247
rs13440146		[G/T]		rs310244	[A/G]
rs3761847		[A/G]		rs2780816	[A/C]
rs7021880		[C/G]		rs2254002	[A/C]

4.2 MÉTODOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPLEMENTARES

Para os genes que demonstraram mais de um sinal de associação nas análises caso-controle após a correção por co-variáveis, realizou-se o teste de regressão logística multivariada incluindo somente SNP associados com um grau de significância estatística próximo de 5% ($p < 0,05$). Os marcadores que apresentaram valores de *p likelihood ratio* próximos de 0,05 na regressão logística foram considerados como sinal de associação independente dos demais. Para os marcadores independentes realizou-se as análises de associação haplotípica conforme implementada no software Thesis 3.1 [114]. As análises de regressão logística incluindo marcadores foram efetuadas conforme implementado no software SAS v9.1.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

O diagrama abaixo resume o desenho geral do estudo. Detalhes dos métodos utilizados encontram-se descritos no capítulo 5.

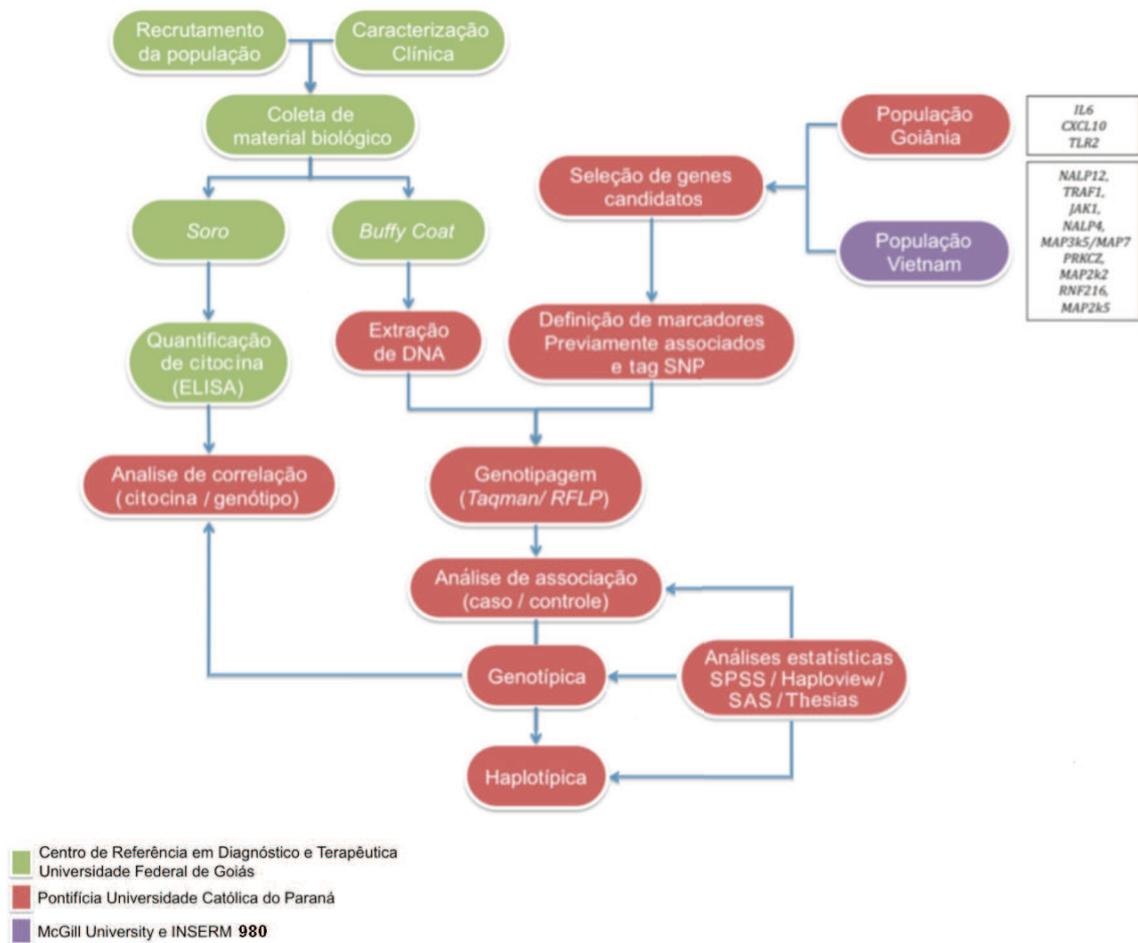


Figura 13 – Desenho do estudo

5 MANUSCRITO DO ARTIGO ACEITO NO PERIODICO *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASE*

Genetic and serologic evidences implicate IL6 as a susceptibility gene for Leprosy Type

2 Reaction

Sousa ALM^{1*}, Fava VM^{2*}, Sampaio LH¹, Martelli CMT¹, Costa MB¹, Mira MT^{2#}, Stefani MMA^{1#}

¹*Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiania, Goiás, Brazil;* ²*Core for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Parana, Brazil.*

*These authors contributed equally to the work; #These authors share senior authorship

Corresponding Author:

Mariane Stefani

Rua 235, sala 335, IPTSP, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, GO, 74605050, Brasil. Phone: (62) 3209 6111. Email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

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

Ana Lúcia Maroclo Sousa, MD, PhD.

Affiliation: Immunology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Vinicius Medeiros Fava, PhD.

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

Lucas Henrique Sampaio, MSc.

Affiliation: Immunology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Goiânia, Goiás, Brazil.

Celina Maria Turchi Martelli, MD, PhD.

Affiliation: Epidemiology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Mauricio Barcelos Costa, MD, MSc.

Affiliation: Pathology Department, Faculty of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Marcelo Távora Mira, PhD.

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

Mariane Martins de Araújo Stefani, PhD.

Affiliation: Immunology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Word count of the abstract: 145

Word count of the text: 3510

Footnote page:

The authors do not have any 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 work was supported by a grant from the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development/CNPq (grant # 401276/2005-8). MMA Stefani is a recipient of fellowship from CNPq (grant#304869/2008-2). MT Mira is a recipient of grants 410470/2006-6 (MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 25/2006 - *Estudo de Doenças Negligenciadas*), The Order of Malta Grants for Leprosy Research – 2008 and the INSERM-CNPq joint program, project 490844/2008-1 (ASCIN/CNPq 61/2008 – Convênios Bilaterais Europa). LHF Sampaio was supported by a scholarship from the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel/CAPES. We are grateful to the patients and staff of the Reference Center for Diagnosis and Treatment, Goiania city for their cooperation and assistance during this study.

These results have been partially presented at the 11th Brazilian Congress of Leprosy, held in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, November 2008.

Corresponding Author:

Mariane Stefani

Rua 235, sala 335, IPTSP, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, GO, 74605050, Brasil. Phone: (62) 3209 6111. Email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

ABSTRACT

Type 1 (T1R) and type 2 (T2R) leprosy reactions are major causes of nerve injury and permanent disabilities. A previous study on plasma levels of 27 cytokines in T1R, T2R patients and unreactive controls pointed to *IL6* as a candidate gene for genetic analysis. Two nested case-control studies were build-up from a cohort of 409 leprosy patients recruited in central Brazil and monitored for T1R/T2R. Positive evidences for association between T2R and *IL6* tag SNPs rs2069832 ($p=0.002$), rs2069840 ($p=0.027$) and rs2069845 ($p=0.044$) were observed, capturing the entire information of the *IL6* locus, as well as with functional *IL6* variant rs1800795 ($p=0.005$). Moreover, IL6 plasma levels of leprosy patients with T2R correlated with *IL6* genotypes ($p=0.04$). No association was found between *IL6* variants and T1R. The description of genetic predictive factors for leprosy reactions may have a major impact on preventive strategies against these incapacitating events.

Keywords: Leprosy; Type 2 reaction; IL6; Association analysis; Genetics; Tag SNP.

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic dermato-neurological, disabling disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) that in 2009 affected approximately 245.000 new individuals worldwide. Prevalence of the disease remains stable since the mid 1990's, despite global implementation of efficient multi-drug therapy (MDT) [1]. Leprosy presents as a broad clinical, bacilloscopic, histopathological and immunological spectrum, ranging from the localized tuberculoid (TT) form, associated with a granulomatous Th1-type immune response, to systemic, Th2-type, lepromatous (LL) disease. Immunologically unstable, borderline forms (borderline tuberculoid, borderline borderline and borderline lepromatous (BT, BB and BL) lie between the poles [2].

Leprosy reactions are immune-inflammatory-related phenotypes that may occur before diagnosis, during treatment or after MDT. Leprosy reactions require immediate treatment to prevent permanent nerve impairment, motor disability and deformity. Field cohort studies estimate that the disability ratio in leprosy ranges from 16-56% [3], mainly due to the occurrence of reactional episodes. Since leprosy reactions may occur months or even years after MDT completion, *related disabilities are expected to continue to occur even under the unlikely scenario of leprosy eradication.*

There are two major types of leprosy reactions. Type 1 reaction (T1R) affects 20-30% of leprosy cases [4] and is characterized by acute inflammation of pre-existing skin lesions or by the appearance of new ones and/or neuritis. Systemic symptoms are rare. T1R occurs predominantly among leprosy patients presenting unstable immune response against the bacilli (BT, BB, BL forms) [5] – however, T1R may also occur in TT patients [6, 7]. *Approximately 95% of T1R cases are diagnosed simultaneously with leprosy or during the first 2 years of MDT* [8]. Even with adequate treatment, 40% of the T1R patients may present permanent nerve damage [9]. *Erythema Nodosum Leprosum* (ENL) is the main

presentation of type 2 reaction (T2R) which affects predominantly leprosy patients showing Th2-type of immune response and high bacterial load, therefore classified towards the lepromatous pole (BB, BL and LL) of the disease. The onset of T2R is generally during MDT treatment [10], and the majority of patients usually develop several acute and chronic episodes over the years. T2R presents as painful erythematous tender nodules on various parts of the body with or without neuritis, usually followed by systemic signs such as fever and malaise. T2R is characterized by increased levels of tumor necrosis factor- α and immune-complex-associated vasculitis, panniculitis, and uveitis. Treatment to T1R is based on corticosteroids and T2R therapy includes corticosteroids and/or thalidomide [5].

Genomic sequence studies of *M. leprae* strains of worldwide distribution have shown very low genetic diversity suggesting that differences in susceptibility to disease and to clinical manifestations, including reactional episodes, are *influenced* by the host defense genes [11]. Only recently genetic epidemiology studies have identified predictive susceptibility factors for leprosy reactions. Most of these studies focused on variants on Toll-like receptor 1 (*TLR1*) and Toll-like receptor 2 (*TLR2*) genes, important mediators of mycobacterium recognition during innate immune response. Alleles of both the single nucleotide polymorphism (SNP) rs3804099 and a microsatellite intragenic to *TLR2* were associated with type 1 reaction in an Ethiopian population [12]. Non-synonymous SNP rs5743618 (I602S) of *TLR1* was found associated with protection against type 1 reaction in a Nepali population [13]. The same variation was subsequently associated with leprosy *per se* in Indian and Turkish populations [14]. Another non-synonymous polymorphism of *TLR1* (N248S) was associated with both leprosy *per se* and type 2 reaction, with the *S* and the *N* allele being more frequent among leprosy and T2R patients, respectively [15]. Finally, the first genome-wide association study (GWA) in leprosy revealed four SNPs intragenic to *NOD2* gene associated with leprosy [16].

A subsequent study showed variants of the same gene associated with leprosy *per se*, T1R and T2R [17]. However, associated variants were not the same across the two studies.

A constitutive gene expression analysis using non-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from reactional and non-reactional leprosy patients revealed that *IL6* was expressed in most of the T1R and T2R patients, whereas among non-reactional individuals, mRNA was only detected in TT/BT patients. When skin biopsies were analyzed, expression of *IL6* was detected in most lesions of both T2R and TR1 patients [18]. Nevertheless, it is known that mRNA expression and the actual level of the secreted protein may be different *in vivo*. The production of IL-6 by PBMCs in response to anti-CD3 T cell polyclonal stimulant was observed in a significantly higher proportion of LL than TT patients [19]. In a comparative study, lepromatous patients had the highest serum levels of IL-6 and T2R patients had higher levels of IL-6 than non-reactional patients [20]. In general, these studies indicate higher IL-6 levels associated with LL leprosy, which is associated with occurrence of T2R.

In this context, a recent analysis of 27 plasma factors including cytokines, chemokines and growth factors revealed IL-6 as the only biomarker of both T1R and T2R when compared to leprosy-affected individuals without reaction [21]. *Here we present the results of a follow-up prospective, nested case-control study of association between leprosy reactions and tag polymorphisms of the IL6 gene in an expanded population sample of affected individuals recruited at the same Brazilian reference center for leprosy diagnosis and treatment.*

MATERIALS and METHODS

Population sample

A cohort of leprosy patients was recruited at the time of leprosy diagnosis (newly detected cases) at a public health reference center (“Centro de Referencia em Diagnóstico e Terapêutica”) located in Goiânia city, central western Brazil, between February 2006 and March 2008. Leprosy diagnosis/classification was defined after detailed dermato-neurological examination by a clinician with expertise in leprosy diagnosis, bacilloscopy and histopathology of skin lesion biopsies, according to Ridley & Jopling criteria [2]. Case definitions of leprosy, T1R and T2R have been described elsewhere [21]. Inclusion criteria were: newly detected patients, without history of previous leprosy treatment, presenting or not leprosy reactions (T1R or T2R). Leprosy patients have been closely followed up for reactional episodes during MDT (6 months for PB patients and 12 months for MB patients). Upon completion of MDT, patients have been strongly advised to return to the reference center in case any sign or symptom of reaction occurred. Overall, patients have been followed up for at least 2 years since diagnosis; leprosy reactions were observed at diagnosis, during MDT and post MDT. For patients who came for diagnosis during a reactional episode, blood was collected before the start of MDT and anti-leprosy reaction therapy. For leprosy patients who developed reactions during MDT, blood was collected during MDT. For patients who developed a reactional episode after the completion of MDT, by the time blood was collected, patients were taking neither MDT nor any other specific drug therapy for leprosy reaction. Patients were excluded from the genetic analysis if they had uncertain classification of leprosy or of the type of leprosy reaction, if the clinical classification was inconsistent with the type of reaction and if the clinical signs and symptoms were compatible with pure neuritis. Two nested case-control studies were build-up from this cohort: the first included leprosy patients at the first episode of T1R and the second, leprosy patients at their first episode of T2R.

Controls were newly detected leprosy patients who did not have reaction at the time of initial diagnosis or during follow-up. Cases of T1R were compared with controls presenting polar TT or intermediary BT, BB and BL leprosy. Cases of T2R were compared with controls with polar LL or BL and BB disease. All patients were treated for leprosy following WHO MDT therapy guidelines and for leprosy reaction following the appropriate therapy, when needed. Demographic and clinical variables were measured and compared using chi-square and the t-test, when appropriate, and an alpha error under 0.05 (p value) was considered significant. This study was approved by the Brazilian National Committee for Ethics in Research (CONEP, protocol # 650/2006/12638). All patients signed an informed consent as required by ethical regulation.

Marker selection:

Tag SNP markers capturing the entire information of the *IL6* locus were selected according to the information available at the International HapMap Project website, release 24/phase 2_Nov08. All selected markers presented a minor allele frequency of 0.2 or higher in the CEU (Caucasian) HapMap population. Two markers were considered in linkage disequilibrium (LD) when presenting a pairwise $r^2 > 0.8$. Following these criteria, tag SNPs rs2069832, rs2069840 and rs2069845 were selected for genotyping.

DNA extraction and genotyping:

Genomic DNA was obtained from peripheral blood by classic salting-out protocol [22], purified and quantified. Tag SNPs rs2069832, rs2069840 and rs2069845 were genotyped by polarized fluorescence, Taqman probe-based methodology [23] using the ABI 7500 platform.

Genotypes were automatically called using the appropriate software with subsequent manual checking of accuracy. Functional SNP rs1800795 was genotyped by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis as described elsewhere [24].

Plasma IL-6 levels:

Plasma levels of IL-6 were measured for all leprosy patients for whom a biological sample was available. IL-6 levels were determined by ELISA (eBioscience Human IL-6 kit, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions using undiluted samples. An exploratory stem-and-leaf test was carried out to identify outliers."

Statistical analysis:

Hardy-Weinberg equilibrium estimates were carried out using Haploview 4.2 [25]. Genotyping frequencies of cases and controls were compared by univariate analysis under both dominant and additive model using the X^2 test or the Student's t-test when appropriated. Adjustment for gender, clinical form and age was performed using stepwise multivariate logistic regression analysis. *The p-value threshold for rejection of the null hypothesis was fixed at 0.05*; for comparisons that reached statistical significance, Odds Ratio (OR) was estimated with the appropriated test. *Mann-Whitney test was used to compare IL-6 plasma levels across controls and cases of leprosy reactions, as well as across genotypes under a dominant model.* Analysis was performed with the statistical software SPSS 13.0.

RESULTS

A total of 429 leprosy-affected individuals were recruited for the study. Following exclusion criteria, 20 individuals were removed from the analysis: 10 with pure neuritis and 10 for inconsistencies or uncertain diagnosis of either leprosy and/or type of reaction. During the two years follow-up since diagnosis, 37.7% (154/409) of leprosy patients developed T1R, 9.5% (39/409) developed T2R and the remaining 216 (52.8%) did not present any sign of reaction. Regarding T1R, 8.5% (13/154) of patients came for diagnosis during the first T1R episode, 56.5% (87/154) presented the first TR1 episode during MDT and the remaining 36% (54/154) developed T1R after completion of MDT, at a median time of 3 months post-MDT, ranging from 1-14 months. Among T2R cases, 10.2% (4/39) of patients came for diagnosis during the first reactional episode, 63.8% (25/39) presented T2R during MDT and 26% (10/39) patients presented T2R after MDT, at a median time of 4 months post-MDT, ranging from 1-13 months. For the genetic analysis, the T1R sub-group was compared with 188 non-reactional controls presenting TT, BT, BB or BL leprosy; the T2R sub-group was compared with 70 non-reactional leprosy controls presenting BB, BL or LL leprosy.

Comparison between T1R cases and controls revealed statistically significant differences in the distribution of the leprosy classification ($p=8.1 \times 10^{-5}$), gender ($p=0.04$) and age ($p=1.3 \times 10^{-5}$). T1R was more frequent among BT individuals (51.3% of the cases) and males (61.7%); mean age for T1R cases was higher (51.0 ± 15.2) when compared to controls (41.7 ± 16.6) ($p=1.3 \times 10^{-5}$). For the T2R sub-group, the only difference observed between cases and controls was regarding the leprosy classification ($p=0.005$): LL patients were more frequent among T2R cases (71.8%) than among controls (40%). Description and analysis of the Ridley & Jopling

classification and epidemiological data from all groups T1R-controls and T2R-controls are summarized in Table 1.

To replicate the association between levels of plasmatic IL6 and occurrence of leprosy reactions observed previously in a smaller sample of the studied population (REF 18), we compared plasma levels of IL6 across 16 reaction-free, leprosy-affected control individuals, 33 cases of T2R and 54 cases of T1R from our expanded dataset (figure 1). Results confirmed increased levels of IL6 among cases of both T1R ($p = 0.009$) and T2R ($p = 2.4 \times 10^{-8}$) when compared with reaction-free, leprosy controls. Interestingly, the magnitude of the effect was much more pronounced for T2R when compared with T1R ($p = 1.0 \times 10^{-6}$).

All markers were in Hardy-Weinberg equilibrium. Genetic analyses failed to detect association between *IL6* variants and the occurrence of T1R. No association was observed even after the removal of the 22 TT controls from this sub-population (data not shown) as these patients present a relatively stable immune response and are less susceptible to develop T1R. Positive evidence for association between all three tag SNPs and occurrence of T2R (Table 2) was observed for both dominant and additive models after correction for leprosy clinical form. Linkage disequilibrium analysis confirmed independence of all three SNPs (Figure 2).

A comprehensive search on the HapMap database (build 24/phase 2_Nov08) revealed that SNP rs2069832 was tagging a bin that contained variant rs1800795, a known, functional polymorphism initially localized at a negative regulatory domain of the promoter region of *IL6* [26]. Therefore, SNP rs1800795 was genotyped exclusively in the T2R sub-population. Analysis confirmed strong LD between rs1800795 and rs2069832 in our population sample ($r^2 = 0.69$, Figure 1). Moreover, association between rs1800795 functional variant of *IL6* and occurrence of T2R was also observed. Odds ratio were estimated at 4.0 (95% CI = 1.64 –

9.76) and 3.7 (95% CI = 1.47 – 9.34) for risk alleles “A” and “C” of markers rs2069832 and rs1800795, respectively. Allele “G” of marker rs2069840 showed very weak LD with both rs2069832 and rs1800795 SNPs and was associated with protection against T2R (OR = 0.27, 95% CI = 0.22 – 0.91).

Multivariate analysis performed including all four SNPs confirmed independent association of two bins: the first captured by tag SNP rs2069832 and including markers rs2069845 and rs1800795 ($p = 0.01$) and the second, an rs2069840 singleton, the latter with borderline significance ($p = 0.06$). Haplotypic analysis also revealed statistically significant association between T2R and haplotypes composed by the risk alleles of rs2069840 and both functional SNP rs1800795 and tag SNP rs2069832 ($p = 0.02$ and 0.04 , respectively; supplementary table 1).

Investigation of association between genotypes and plasma levels of IL6 was performed using the entire sub-sample of 39 T2R cases (Figure 3). Protective allele “G” of marker rs2069840 was associated with lower IL6 plasma concentrations under a dominant model ($p = 0.04$). Higher plasma levels of IL6 were observed among carriers of susceptibility alleles “A” and “C” of markers rs2069832 and rs1800795, although the differences did not reached statistical significance. Five individuals presented plasma IL-6 concentration ≥ 56 pg/mL (considered outliers) and were removed from the analysis after stem-and-leaf filtering.

DISCUSSION

This study presents combined genetic and serological evidence that implicates IL6 gene variants as risk factors for susceptibility to the occurrence of leprosy T2R. The IL6 gene was selected for genetic analysis based on results of a previous multiplex cytokine study from our group showing that, among 27 plasma factors tested, only IL-

6 was identified as a potential biomarker of both T1R and T2R [21]. First, we replicated the original finding for both T1R and T2R in an expanded population sample of patients recruited at the same highly endemic region, following a prospective design. However, the effect was less notable for the T1R group (figure 1). Then, our strategy of comprehensive physical mapping of the IL6 gene using tag SNPs, followed by a genotype/phenotype correlation study, led to an unbiased identification of a functional IL6 variant associated with T2R in the expanded population sample. No association between IL6 polymorphisms and leprosy T1R was observed. This is an intriguing finding that deserves further considerations: occurrence of both types of leprosy reaction is clearly associated with increased production of pleiotropic inflammatory cytokine IL6. However, in T1R, higher levels of IL6 take place in a context of an already existing Th1 type of immune response. This increase of IL6 in T1R could be due to non-genetic and/or genetic determinants located in different genes of the immune pathway. In contrast, a more exuberant increase of plasma IL6 among T2R individuals seem to be dependent of genetic determinants playing a central role, as T2R occurs in a context of Th2 immune response background with only transient Th1 activation. This hypothesis is strongly reinforced by the results of both genetic association and genotype/phenotype correlation shown here. Altogether, our results argue in favor of different physiopathological mechanisms for T1R and T2R in which genetic and non-genetic variants have different impact over the phenotypes.

The small sample size of the leprosy T2R affected individuals is an acknowledged limitation of our study. Indeed, despite the large number of leprosy-affected individuals enrolled for follow-up, the number of individuals who developed T2R was small, as expected, reducing the power of the association analysis. Another limitation is the lack of replication of the

genetic findings in an independent population sample. *Nevertheless, these limitations are partially minimized by the fact that genetic association between at least one SNP bin, represented by tag SNP rs2069840, and occurrence of T2R was also observed in an independent experiment using plasma levels of IL-6 as a phenotype. The second associated bin, containing known functional SNP rs1800795, also correlated with different IL6 plasma levels, however not reaching statistical significance, possibly due to the small sample size.*

In humans *IL6* gene, located at 7p21 chromosome, produces a secreted 26-kDa glycoprotein arranged in four chains. There are several possible mechanisms by which higher IL-6 levels might affect the pathogenesis of T2R. Although IL-6 was first recognized by its property to induce antibody production, it is considered a key player in inflammation and in acute-phase reaction, which is one of the earliest responses to insults. IL-6 can be produced by a broad spectrum of cell types, including T and B cells, macrophages, activated monocytes, mast cells, neutrophils, eosinophils and can exert its effects on virtually any cell. IL-6 is known to be deregulated in many chronic autoimmune and inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, Crohn's disease, juvenile arthritis, and multiple myeloma [26]. IL-6 also participates in the adaptive immune response affecting the T-cell differentiation into regulatory T cells (Tregs) or Th1, Th2 and particularly in Th17 differentiation in humans. Although speculative, it seems reasonable to assume that higher levels of IL-6 could contribute to the development of leprosy T2R, mainly due to its potent pro-inflammatory role and capacity to stimulate antibody production. Together with extensive systemic inflammatory manifestations, immune-complex-associated vasculitis is one of the hallmarks of leprosy T2R.

The results presented in this report are, to our knowledge, the first implicating *IL6* polymorphisms in leprosy T2R. Previous studies implicate *IL6* genetic variants with different diseases. In particular, SNP rs1800795 is a well-known functional *IL6* polymorphism located

at position -174 of the promoter region of the gene, inside a negative regulatory domain. Alleles of rs1800795 have been described as risk factor for Grave's disease [27], systemic-onset juvenile chronic arthritis [26], periodontitis [24, 28, 29], hepatitis C [30], and both type 1 and 2 *diabetes mellitus* [31, 32], the latter with inconclusive results [33]. As for tropical infectious diseases, the same allele "C" of rs1800795 identified here as risk factor for T2R has been associated with mucosal leishmaniasis in a Brazilian population [34]. Other studies failed to detect association between *IL6* markers, including rs1800795, and Chagas disease, as well as HIV infection [35, 36].

Individuals homozygous for allele "C" of rs1800795 were shown to be under a six-fold higher risk of developing Crohn's disease, a chronic inflammatory bowel disease that can also have *erythema nodosum* as systemic complication [37]. Interestingly, this is not the first time that alleles of a gene are associated with both Crohn's disease and leprosy phenotypes. Several genetic epidemiology studies have independently detected variants of *NOD2*, *TNFSF15* and *IL12B* as risk factors for both Crohn's disease and leprosy [16, 38-40], leading authors to suggest an exciting hypothesis of a mycobacterial origin for Crohn's disease [41]. In addition, *NOD2* polymorphisms have been also associated with both types of leprosy reactions [17].

To date, no previous association of rs2069840 has been detected with any chronic inflammatory, autoimmune or infectious disease. Since this SNP is not in linkage disequilibrium with functional rs1800795 and seems to be independently associated with occurrence of T2R, these observations suggest the existence of additional IL6 functional variants other than the rs1800795 LD bin playing a role in T2R susceptibility. In fact, marker rs2069840 seems to be of particular importance, since it is associated with both T2R and plasma levels of IL-6. Interestingly, haplotypes composed by risk alleles of rs2069840 and both functional SNP rs1800795 and

rs2069832 were also associated with T2R, even under low power due to low allele frequencies.

The essential role of IL-6 in T2R immunopathology needs to be further explored. The use of IL-6 as a biomarker in multiple diseases has been widely discussed, based on the multiple impact of this cytokine over the control of innate and adaptative immunity [42]. Here we propose genetic variants of *IL6* as possible biomarkers for T2R in leprosy. The results presented here add up to a solid body of evidence implicating IL-6 in the pathogenesis of leprosy T2R, and point to this cytokine as a possible valuable predictive marker for this aggressive leprosy phenotype.

REFERENCES

1. Global leprosy situation, *Wkly Epidemiol Rec* **2010**; *33*. -- . . -
2. Rid:Sy-DS,-J3p:iCg-WH.-C:assificagi3C-3f:-Spr3sy-acc3rdiCg-g3-immuCi9y.-A-fivS-gr3up-sysgSm **6966--**
3- :2. . -2. 3.-
- 3 **2994--3. 3:. 2. . - . . -**
- . - vaC- BrakS:- WH,3NvM3::L3PB,3DaL3L,3Sg3a:
pPSdwM3C,3ISgM3C3Cd3pagh3gSCSLW3f3CSuP3pagh3Cd3SaM3CL3C3SpP3Ly
aCd3baLS:CS3PLu:gl33f3a3Mh3Pg33f3mu:gw3aM3aPy3SpP3Ly3pag3Cg3C3C3Ph3Cd3a
RSv2 -- . . : -3- . -
- . . 9SM8::aPd9DM,9AdamL9LB,9BwvL9TP,9KPahSCbuh:9JL,9TPumaC9RW,9WwvwmL9DL,9ThS9
C3Cg3Cu3Cg3Cha::SCgSL3f9LSpP3Ly.9:9CM3P3b3:RSv2 -- . . :33. -3. . . -
- . . 9KaPHK,9ShaPma9.9Nsw9SL3CL3af9SPMDT9CPBaCd9MB9SpP3Ly:9P3Sp3Pg3f9. 9M3SL9
ICd3a9LSpP2 -- . . :2- -
- . . 9SgSfaC9MM,9MaPgS::9CM,9BwvL9TP,9KPahSCbuh:9JL,9IC9Lgu9gypS9. 9Mg3k3CS9gSCS9
SxpPSLL3C6aCd6mSMhaCvml6aLL3MagSd6wvgh6SaP:y6:SpP3Ly6pP3gPSLL3C6J6ICfSM6Dw6
2 --xxx:xx2- -3xx
- xxRaCquS-B,-NVuySC-VaCÂ-T,-Vu-Â3CVÂ-T,-SVa:xAVS-IL-aC-Imp3P3aCVRv3k-KaM3P-f3P-
OCLS3aCd3SquS:aS3f3RSvSPLa:RSaM3CLO3C3V3C3CamSLS3Pa3C3V3L3O3v3h3L3SpP3Ly3C:3C3M3a:0
ICfSM33uL3D3v3SaLSL2 @DO:330xx0

xx0aC0PakS:0VÂ,0KhawaL0Bx0NSPvS0uCM03C0mpav0mSCV0C0SpP3Ly:0CC0p0d0Smv03:3V0M:0
aCd0M0C0M:0Mudy0P0P0V2:0RSLu:0L3f0MSP3vd0PSaVnSCV0LSpP0Rsv099600x:xx00xx0

xxx0P3M0VSPa0L,0Jav0C0S,0RSddy0R,0SVA:0C:0v0C0M:0B0uPLS0C0f0SPyVhSma0C0d03Lum0C0SpP3Lum:0C0
xx0y0SaP0Bh3P0Mudy0C0Ây0dSPaqad,0Cdw0x0Am0TP3p0MSd0Ây0V0299600O:xxx0xx0

xxx0M3C3VM,0Â3C3PS0N,0BaPCv0POT,0SVA:0CC3mpaPaVwSOVSC3m0M0aCd0phy:3VS3VPaph0M0
aCa:yL0L3f0M0y0M0qa0MSP0um0C0SpPaS0N0a0B0SCSV0299900x:x2x20x0

x2x0B3Mud0PY,0ÂawC0Th3maLÂ0R,4Sv0ddv0qu04MÂ0R,4SV0A:
P3:y0m3PYh0v0mL4AP54ALL3M0v0sd4w0Wh4RSv0SPLa:4RSaM03C4v0C4LSYP3Ly
ICfSM03uL0D0v0SaLSL0 00xx:2x302xx0

x3x0M0v0M0CEA,0MaM0I3Ca:d0M,0RaCj0WC,0SVA:0ÂumaCQ LRx0D0Sf0M0SCM0y0L0ALL3M0v0sd0w0Wh0
ImYa0Psd0My0M0qa0MSP0v:4SVCa:v0V4aCd4P3VSM03C4P3m4LSYP3Ly4RSv0SPLa:4RSaM03C
NSV:4 P3Y0D0v0 00:S23xx0

x0x0V3CV0SÂ,0B3M0haw0S,0Ma:h3V0Pa0D,0SVA:0LSYP3Ly0Cd0h0S0daY0V03C0f0umaC03::0y0SO
PSM0YV0P0x0PL3S0PaVh3V0 00:Sxxxxxxx0

xxx0SMu0P0CV0RP,0ÂamaCC0L,0Kaq0SP0WR,0SVA:0P3:y0m3PYh0v0m0N20x0S0C0h0S0umaCQ 3::0
:y0SOPSM0YV0P0x0OVSC0S0M0PS:a0Vsd0V0O.SYP3Ly0CaCd0.SYP3Ly0PSaM03CL0J0ICfSM0D0v029990
xxx:xxxx0x0

8
JMSd0299900xxZ0xx00xx0

xxx0BSPP0V0V3C0VR,0MaM0I3CaZ0M,0Khad0VS0S,0SVA:0C3mm3CQ3Zym3PYh0v0mL0C0h0S0N0D20
VSC0SOPSV03C0aPS0aLL3M0v0sd0w0Wh0SYP3Ly0CaCd0M0L0PSaM0w0SOL0V0SL0J0ICfSM0D0v029690
2xxZ:02203xx0

xxx0M3PaSLOMO,0SaPC30EN,0AZm0Sv0a0AS,0SVA:0Z0CyV3) v0C0m0RNA0C0x0YPSLL03C0C0SYP3Ly0a0
Y3LL0q0Z0P3Z03P0C0VSP0P3C0vamma0aCd0C0VSP0Zu) v0C020C0PSaM03CL0RR0aCd0ENL)0SM0Cd0
J0mmu0C30299900xZ:0x0x0

xxx0Mh3a0M(,0VaZ0SPPama0L,0Mh3a0A,0SVA:0Z0LSYP3maV3uL0aCd0M0q0SPM0i0Z0v0SYP3Ly0
M0C0M0Z0YPSLSC0V03C0aCd0y0V3) v0C0PSLY3CLSL0C0V0D0SPmaV30299600xZ0xx00xx0

2xx0BSZ0aum) a0PVA,0B3) haZ0NR,0Mahaja0CPM,0Bha0Padwaj0R,0PaCd0WDP,0DSLh0YaCd0S0S0
Cv0M0i0Z0V0y0V3) v0C0SYP3fv0Z0L0C0SYP3Ly0Ya0V0S0CL0L0SYP0Rsv0 00xZ2303xx0

2xx0SVSfaC0MM,0BuSPPa0B,0S3uLa0AL,0SVA:0P3VSC0w0ZY0ZaLma0naP) SPL0C0f0y0YS0C0aCd0y0YS0
20SYP3Ly0PSaM03CL0Z0YPSZm0CaPy0SY3PV0BMC0CfSM0D0v0299900Zxx0

22x0Q3h0C0W,0VSwz0CSP0B,0R3z0SC0R,0MPw0SP0C0R0A0PaY0d0YP3M0duPS03P0S0x0PaM0C0V0V0SC3m0M0
DNA0P3m0C0Su) 3M0y0SL0Nu0M0S0M0M0d0L0R0SL0699600xZ0xx0

23x0LSS0LB,0C3CCS0Z0CR,0BZ0M0OW0A0Z0Z0M0d0v0M0v0Ca0V03C0q0y0C0M) 0PaCL0Z0V0C0PCRO0w0Wh0
f0i0P3VSC0M0YP3q0SL0Nu0M0S0M0M0d0L0R0SL0 00xZ03xx00x0

20x0(PsvvZaW3OPC,OSMPSZCcamvCaVaORM,OdSOBPW3ORB,OJPxOdSOS3uzaOAP,OLvCSOSRxD
P3Zym3PYhVzmQaVY3LW3C0xOCbfQLGxVSCSOLaLL3MaVsdGvVhLuLMSYVqVZY030MhP3CvM
YSP3d3CWWL0CQCaumLwC0PazvZaC0Y3YuZaW3CxD0ZC0PSP3d3CV3Z299703xZ3x002x0

2xx0BaPPSWQC,OKPy0,OMaZSPQ,0DaZy0Mjx0AaYZvSwZaCaZyLwZaCd0vZuaZzaW3C0fLD0Cd0
haYZVYYS0naYL0Bv0cf3PmaWML299702xZx30xx0

2xx0KWhmaCOD,OKauZiLOB,OJSffSPyOR,OSV0aZ0(hS0SffSM03fOC3vSZ0Y3Zym3PYhVzmL0C0VhSO
vCSPZSu) vC0x(QIL0x)0VSCS0C0L0x0PaCLMPW3C0Cd0YzLma0L0x0CvSZL,0Cd0C0LL3MaW3C0
wVh0yLVSmm0BCLSV0uvSCvS0MhP3CvM0PvPwLz0CZC0CvSLV099702xZx3xx0xx0

2xx0ACvaP0M,OKhaZzadSh0O,0ELSVhamaW0A,0SVOaZ0BPavSL'0dVLSaLS0aCd0VSCSO
Y3Zym3PYhVzm0fQNK0aZ'ha,0L02,0L0x,0L0x2,0Cd0KN0Vamma0Ccd3M0VCS296903xZ3000
xx0

2xx0NvqaZ0L,CBPvfWhLOBS,0D3C3LON,0SV0aZ0ALL3MaW3C0qSWwSSC0C0VSPZSu) vC0x0YP3m3VSP0
haYZVYYSLaCd0AVPSSLwS0YSP3d3CWWL0CZC0PSP3d3CV3Z299703xZx30xx0

2xx0NvqaZ0L,0'Aww30K,0D3C3LON,0SV0aZ0ALL3MaW3C0qSWwSSC0YSP3d3CWWL0Cd0Mmm3C0
vaPwCVL0C0hS0Y3m3VSP3f0hS0C0VSPZSu) vC0x0VSCS0CyV3) vCS299900xZx00x0

3xx0CuLLWh0A,OKaZSW0E,OKaqPw0C,0SV0aZ0C0VSPZSu) vC0x0YP3m3VSPY3Zym3PYhVzmL0C0fZuSCMS0
VhS0uVBM3S0f0MhP3CvM0SYaWwL0C0mmu0C3VSCSVM0296603Z300xx0

3 f6a6fuCMw3Ca:6xx6qSga0
SLWPadv3Z0LSCLwvSOILx0x0B/COYP3m3VSP0Y3/yM3PYhVzm0wVh0SaP/y0BCLSV0YYS0x0
dwaqSVSL0C0Sma/SL0AumaC0M3/SMi/aP0BSCSVM0299702/xxxx0xxxx0

32x0Bw/SLYvSOKM,0J3/Lv/PIISOR,0BSW0C0VM,0SV0a/0ILOPuqSPW0aCOAMMS/SPaV3P03f0(yYS0x0
DwaqSVSL0C0Lx0x0CC0KSma/SL?0dwaqSVSL02997000/x20x020xx0

33x0QwL, vaC Dam RM, MSwL JB, MaCL3C JE, AuCVS? D, Au KBxBSCSVMva?wV3C vC ILx
VSCS aCd VYYS 2 dwaqSVSLQVAVVvC0S]]? ChaYQVYYS0aCaQVwL0C0Q?VSLM0S0MLS0MBCV?30
LWdy0Cd0nSV0aCaQVwL0Aum0M30BSCSVM299602x0xxx002xx0

30x0CaLVS0M0L,0MSCSszSLOE,00QvSw0aQ,0SV0aQ0Lx00x00CBQC0Y?3m3V?0Y30ym3?YhVzm0
vCf0uSCMSL0uLMSYVqVZY030nuMBLa0QuV0C3V03MaQzSd0Mv0CS3uL0CvHmaCwvLw0C0B?azv00
ICfSM0W0299602x00xxx02xx0

3xx0S3qW0RC,0BS?haCSQJ,0MahSdv0SA,0SV0aQ030ym3?YhVzmL0bfQL0x0x00BQC,0L0x00x020
CQA0aCd0Vw) 0Bf0AIVQAIDS0am3CV0J3?Vh0Cdw0COY3Yu0W3C0M30CS00Bv3MhSm029690
33x0Q0x02x0

3xx03??SL0DA,0CaQada0E,0BS?au0CY,0SV0aQ0LaM03f0ALL3MaW3C0qSWwSSC0L0x0x00BQC0VSCSO
Y30ym3?YhVzm0Cd0ChaVaL0VLSaLS0QvL0LuS0ACWWSCL0296902x03x00x0

3xx0BuS??Sw30CS,OKS??Sw0a0?,0(ava?SLOL,0SVOaQ0KaWY0aMdL,0ILx,0aCd0(JIKaQ'ha0
Y30ym3?YhVzmL0aC0SxamY0C0Bf0CuV?WSCSVM0C0C?3hC'L0dVLSaLS0AM0J0BaLV?3SCVS?30
299902x0Q20x0xx0

3xxBa??SWQC,ÁaCL3uCS,QTMBQSDL,SVaQBSC3mSQwvSALL3MaV3CofSfCSLm3?SOhaCO
3xQvWEMDuLMSYVqvQyQM03?C?3hC'LOvSaLSxQJaVBSCSV299700xQxxQx0

3xxLSB3u?hwL,0BSC)3C,0Bwa?dvCSEXQJ3dxQcdQJ3d2000CaVSOmmuCWyQcd0humaCO
vCfQmmaV3?yQvL3?dS?L0B3MhSmS3M0?aCL299700xQOxxQx0

OxxM3?ahaCB,0Kau?CB,0Vh0M,0VaQCALL3MaV3CBf0ra?vaCVL00hSQLx2BOVSCS0wWh0
QY?3LyQcd0uqS?MiQ3Lm0vLuS0ACWWSCL299700xSuYYQ2300x0

OxxOBSh?OMA,OSMu??OE:OMyMqams?vaOvOC?3hC'LOdWsaLSQaOYS?LWVSCV0hyY3VhSLm0
ICfQmm03wS00v299602Qxxx00

O2x0KvLmaCOEQ,0 SCSCqaum0Ax0(hSOuqvWuW3uL0CVS?Qu) vCQ0aOwmsOf3?0?SaYY?avLa0
Ca?dv3vaLMDwqSVB0296900x20

0

Tables

Table 1. Ridely Jopling and epidemiological data of leprosy T1R-controls and leprosy TR2-controls.

	T1R (%)	Controls (%)	<i>p</i>	T2R (%)	Controls (%)	<i>p</i>
N	154	188		39	70	
Ridley Jopling Classification						
TT	————	22 (11.7)		————	————	
BT	79 (51.3)	124 (66.0)		————	————	
BB	29 (18.8)	16 (8.5)	2.46 E-08	3 (7.7)	16 (22.8)	0.005
BL	46 (29.9)	26 (13.8)		8 (20.5)	26 (37.2)	
LL	————	————		28 (71.8)	28 (40.0)	
Gender						
M	95 (61.7)	91 (48.4)	0.014	27 (69.2)	45 (64.3)	0.60
F	59 (38.3)	97 (51.6)		12 (30.8)	25 (35.7)	
Age						
Mean [SD]	51.0 [15.2]	41.7 [16.6]	3.8 E-07	40.0 [16.6]	45.9 (16.9)	0.073
Min - Max	10 - 88	7 - 87		11 - 78	9 - 79	

Abbreviations: T1R, Type 1 Reaction; T2R, Type 2 Reaction; SD, Standard Deviation. TT tuberculoid leprosy, BT borderline tuberculoid, BB borderline borderline, BL borderline leprosy, LL lepromatous leprosy; M-male, F –female. *p* value of X^2 test for Ridley Joplin classification and gender variable; *p* value of student's t-test for age.

Table 2. Association between *IL6* genetic variants and occurrence of type 1 and type 2 leprosy reaction

	T1R	Controls	<i>p</i> U	<i>p</i> M	T2R	Controls	<i>p</i> U	<i>p</i> M	Odds Ratio (CI)
<i>IL6</i> rs1800795									
CC	—	—	—	—	1 (2,6)	3 (4,5)	0.019	0.030	2.41 (1.09 - 5.33)
CG	—	—	—	—	22 (57,9)	20 (29,8)			
GG	—	—	—	—	15 (39,5)	44 (65,7)			
CC + CG	—	—	—	—	23 (60,5)	23 (34,3)	0.009	0.005	3.71 (1.47 - 9.34)
GG	—	—	—	—	15 (39,5)	44 (65,7)			
<i>IL6</i> rs2069832									
AA	7 (4.7)	5 (2.7)	0.33	0.23	4 (10.5)	3 (4.4)	0.005	0.007	2.71 (1.32 - 5.57)
AG	39 (26.2)	66 (36.1)			20 (52.6)	19 (27.9)			
GG	103 (69.1)	112 (61.2)			14 (36.9)	46 (67.7)			
AA + AG	46 (30.9)	71 (38.8)	0.13	0.11	24 (63.1)	22 (32.3)	0.002	0.002	4.00 (1.64 - 9.76)
GG	103 (69.1)	112 (61.2)			14 (36.9)	46 (67.7)			
<i>IL6</i> rs2069840									
GG	16 (10.7)	17 (9.2)	0.50	0.50	1 (2.6)	8 (12.1)	0.034	0.027	0.44 (0.22 - 0.91)
CG	73 (48.7)	86 (46.7)			13 (33.3)	28 (42.4)			
CC	61 (40.6)	81 (44.1)			25 (64.1)	30 (45.5)			
GG + CG	89 (59.4)	103 (55.9)	0.54	0.51	14 (35.9)	36 (54.5)	0.06	0.040	0.39 (0.16 - 0.96)
CC	61 (40.6)	81 (44.1)			25 (64.1)	30 (45.5)			
<i>IL6</i> rs2069845									
GG	13 (8.6)	17 (9.3)	0.45	0.29	8 (20.5)	7 (10.4)	0.023	0.044	1.92 (1.02 - 3.63)
AG	63 (41.7)	83 (45.6)			22 (56.4)	30 (44.8)			
AA	75 (49.7)	82 (45.1)			9 (20.1)	30 (44.8)			
GG + AG	76 (50.3)	100 (54.9)	0.40	0.30	30 (79.9)	37 (55.2)	0.025	0.045	2.59 (1.02 - 6.56)
AA	75 (49.7)	82 (45.1)			9 (20.1)	30 (44.8)			

Abbreviations: T1R, Type 1 Reaction; T2R Type 2 Reaction; *p*U, *p* value for the χ^2 test; *p*M, *p* value for the multivariate logistic regression analysis; Odds Ratio from multivariate logistic regression analysis; CI, Confidence interval.

Supplementary table 1. Haplotypic analysis including the two IL6 tag-SNPs independently associated with T2R

Haplotype (SNP1 - SNP2)	Frequencies			Additive model		Dominant model	
	T2R	Controls	<i>p</i>	OR [IC]	<i>p</i>	OR [IC]	
rs1800795 - rs2069840							
G-C	0.49	0.5	—	—	—	—	
C-C	0.31	0.17	0.05	2.19 [0.99 - 4.86]	0.02	3.17 [1.21 - 8.29]	
G-G	0.19	0.32	0.26	0.62 [0.27 - 1.42]	0.24	0.62 [0.28 - 1.37]	
C-G	>0.01	0.01	0.99	0.99 [<0.001 - >999.9]	0.99	0.99 [<0.001 - >999.9]	
rs2069832 - rs2069840							
G-C	0.45	0.49	—	—	—	—	
A-C	0.36	0.18	0.02	2.44 [1.13 - 5.28]	0.04	2.74[1.04 - 7.25]	
G-G	0.18	0.32	0.28	0.64 [0.27 - 1.45]	0.28	0.63 [0.28 - 1.44]	
A-G	>0.01	0.01	0.99	1.01 [<0.001 - >999.9]	0.99	0.99 [<0.001 - >999.9]	

T2R: Type 2 leprosy reaction; Controls; individuals affected by BB, BL or LL leprosy and no sign of occurrence of T1R and/or T2R; OR: odds ratio; IC: 95% confidence interval

FIGURES

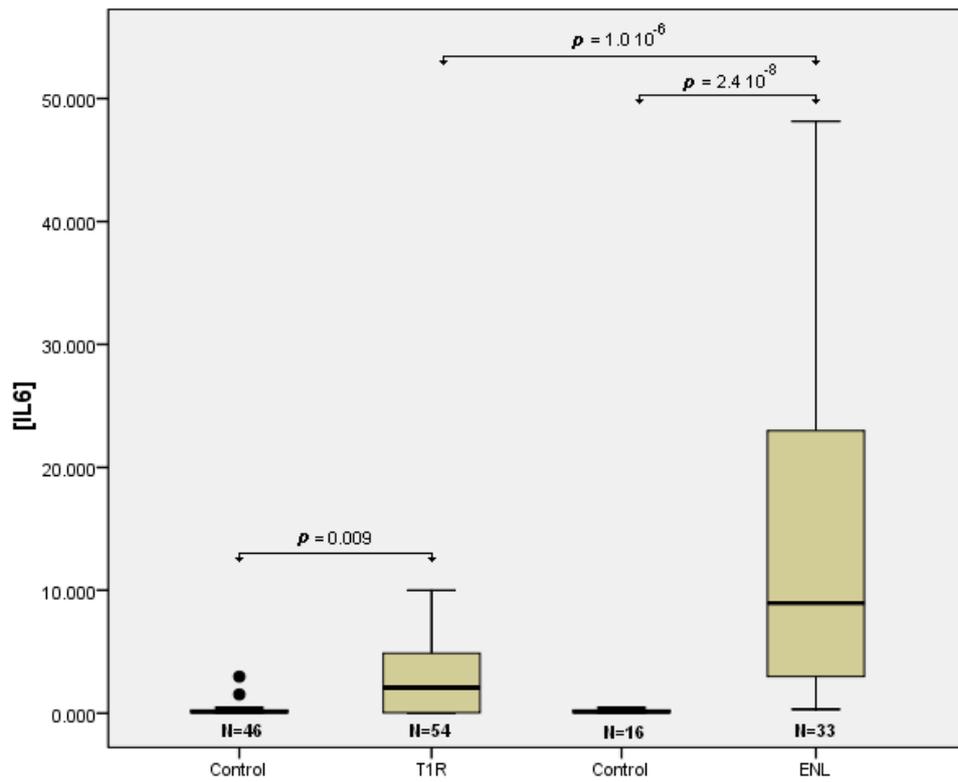


Figure 1. Plasma levels of IL6 among 16 reaction-free controls, 54 T1R and 33 T2R cases from the genetic study dataset. p , non-parametric Mann-Whitney p -values.

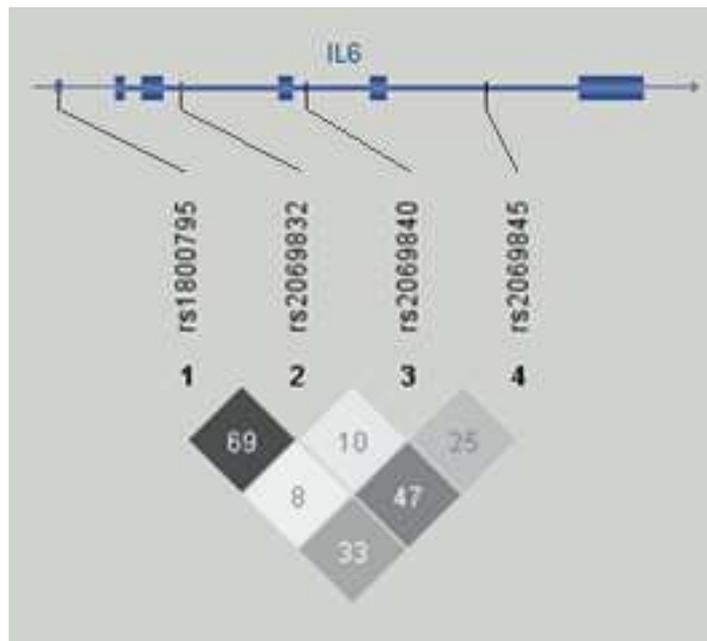


Figure 2. Relative position and linkage disequilibrium (LD) pattern of IL6 markers.

Genomic structure of the IL6 gene is represented in blue. Values inside the boxes represent LD measured using the r^2 parameter.

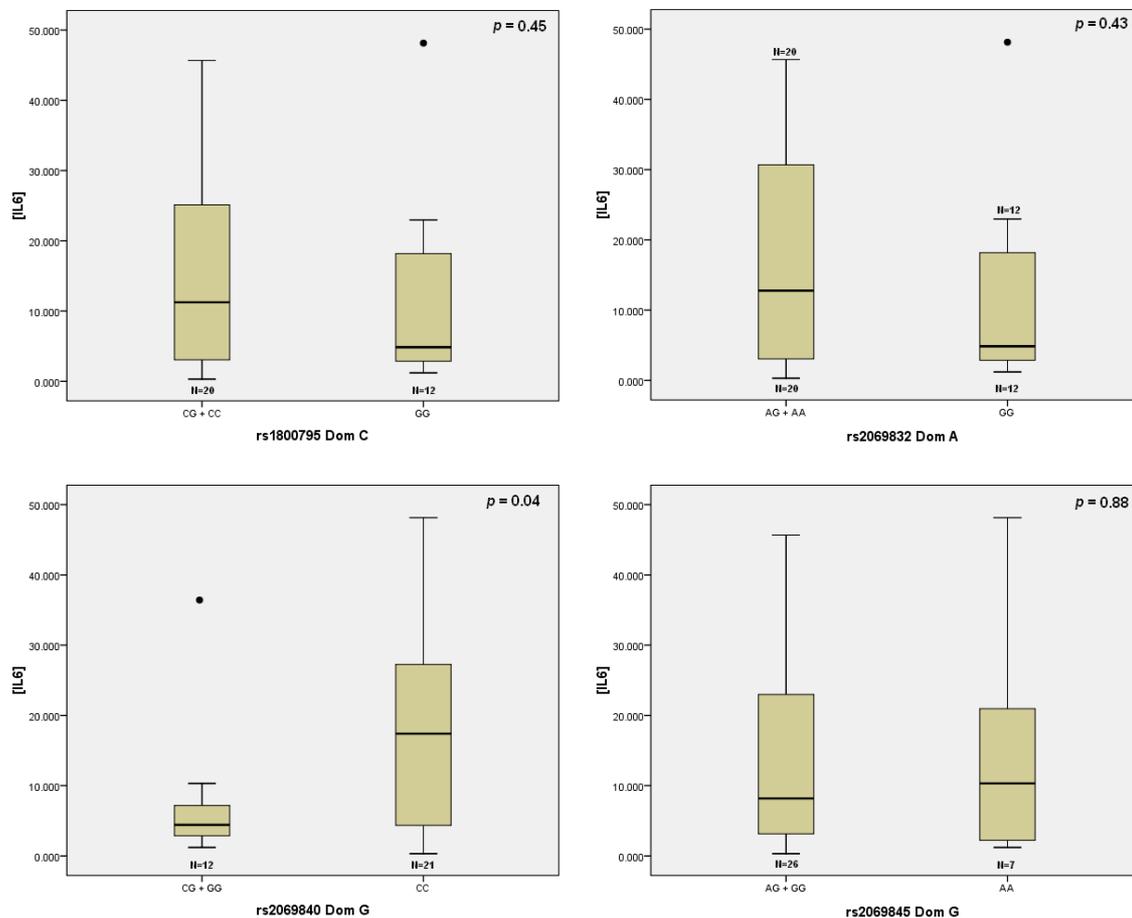


Figure 3. Plasma levels of IL-6 according to IL6 genotypes. The sub-sample was composed of 39 T2R cases that were distributed into the genotype classes. N, number of individuals in each genotype class. P, Mann-Whitney p-value for the IL-6 plasma levels across genotypes under a dominant model. Circles and dots represent individuals with serum levels of IL6 above the 95% confidence interval.

6 RESULTADOS COMPLEMENTARES

A descrição do grupo populacional utilizado nas análises dos sub-itens 6.1 a 6.6 encontra-se descrita no capítulo 5. Para os sub-itens 6.3 a 6.6, que incluem o estudo de replicação dos genes associados a RR na população Vietnamita [113], foram removidos os controles TT do subgrupo RR, aproximando assim o grupo populacional recrutado em Goiânia ao estudo original, no qual somente indivíduos com a forma borderline de hanseníase foram incluídos. Mesmo após a remoção dos indivíduos TT, as variáveis forma clínica, gênero e idade permaneceram associadas a RR ($p=8,1 \text{ E-}05$, $p=0,04$ e $p=1,3 \text{ E-}05$, respectivamente). Todos os marcadores utilizados nas análises encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p<0,05$) (EHW), a menos que especificado ao contrário.

6.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ADICIONAIS PARA O GENE *IL6*

0

0

6.1.1 Análise de regressão logística multivariada incluindo SNP de *IL6*

Na análise de regressão logística multivariada, incluindo SNP de *IL6*, pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre casos de ENH e controles para o SNP rs2069832 (modelo aditivo $p=0,01$ e dominante $p=0,03$). O marcador funcional rs1800795 e o SNP rs2069845 não demonstraram ser significativos nesta análise, apresentando similaridade na captura de informação com o SNP rs2069832. Para o marcador rs2069840 foi possível observar valores de p borderline (modelo aditivo $p=0,06$ e dominante $p=0,07$), indicando a independência deste marcador dos demais (tabela 7).

Tabela 7 – Regressão logística multivariada entre marcadores de *IL6*

<i>tag</i> SNP	<i>p LR</i> Modelo aditivo	<i>p LR</i> Modelo dominante
rs2069832	0,01	0,03
rs2069840	0,06	0,07
rs2069845	0,31	0,57
rs1800795	0,89	0,69

6 *p LR*; valor de *p* da likelyhood ratio provêniante da análise de regressão logística multivariada.

6 Modelo dominante para os alelos de menor frequência.

6.2 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE *CXCL10* E ESTADO REACIONAL.

As análises não demonstraram diferença significativa na distribuição dos genótipos no subgrupo RR para o *tag* SNP rs4859587 do gene *CXCL10*; para o subgrupo ENH a presença do alelo A tanto no modelo dominante quanto aditivo está associado a um forte fator de proteção ao desenvolvimento de ENH ($p=0,022$ OR=0,36 (0,15 – 0,87) e $p=0,002$ OR=0,31 (0,15 – 0,65) respectivamente), quando corrigidos pelas covariáveis idade e forma clínica (tabela 9).

Tabela 8 – Análise de associação entre o *tag* SNP rs4859587 do gene *CXCL10* e estado reacional

	RR (%)	Controles (%)	<i>pU</i>	<i>pM</i>	OR (IC)	ENH (%)	Controles (%)	<i>pU</i>	<i>pM</i>	OR (IC)
<i>CXCL10</i> rs4859587										
AA	14 (9,2)	21 (11,2)				1 (2,6)	15 (21,4)			
AC	67 (47,8)	93 (49,5)	0,17	0,19	NS	17 (43,6)	34 (48,6)	0,003	0,002	0,31 (0,15 - 0,65)
CC	72 (47,0)	74 (39,3)				21 (53,8)	21 (30,0)			
CC + AC	139 (90,8)	167 (88,8)	0,54	0,28	NS	38 (97,4)	55 (78,6)	0,009*	0,016	0,07 (0,01 – 0,65)
AA	14 (9,2)	21 (11,2)				1 (2,6)	15 (21,4)			
AA + AC	81 (53,0)	114 (60,7)	0,15	0,29	NS	18 (46,2)	49 (70,0)	0,014	0,022	0,36 (0,15 - 0,87)
CC	72 (47,0)	74 (39,3)				21 (53,8)	21 (30,0)			

RR; reação reversa.

pU; análise univariada, valores de *p* referentes ao teste de X^2 ; **p* de fisher

pM; análise multivariada, valores de *p* referente ao teste de regressão logística multivariada binomial. Subgrupo RR corrigido para as covariáveis gênero, forma clínica e idade e subgrupo ENH corrigido para a covariável forma clínica

OR; *odds ratio*

IC; Intervalo de confiança

ENH; eritema nodoso hansênico.

6.3 ESTUDO DE REPLICAÇÃO DE MARCADORES DO TIPO SNP PREVIAMENTE ASSOCIADOS A ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE.

O resultado das análises de replicação encontram-se na tabela 10. O SNP rs3784712 do gene *MAP2K5* foi excluído das análises por não demonstrar-se polimórfico no grupo estudado.

Nenhuma associação significativa foi observada entre os polimorfismos rs4351280, rs4801639, rs262672 e rs3779096 presente nos genes *MAP3K5*, *NLRP4*, *PRKCZ* e *RNF216* respectivamente, e ER, no entanto, uma tendência à associação pode ser observada entre o alelo C do polimorfismo rs3804099 e proteção a RR [$p=0,06$ OR=0,57 (0,31 – 1,02)]. Para o sub grupo ENH, a presença do alelo G do marcador rs12459484 demonstrou-se associado a susceptibilidade a ENH na análise multivariada, modelo aditivo [$p=0,02$ e OR =2,40 (1,14 – 5,00)]. Este mesmo alelo encontra-se enriquecido nos casos de RR sob o mesmo modelo, no entanto, a diferença na distribuição entre casos e controles deste grupo não foi significativa $p=0,09$ (tabela 10).

6.4 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE *TRAF1* E ESTADO REACIONAL.

Quatro *tag* SNP foram necessários para capturar a informação do gene *TRAF1* e sua região promotora. O marcador rs7021880 não demonstrou-se em EHW e foi retirado da análise estatística ($p=4,1 \text{ E-}04$). Não foi observada associação significativa entre *tag* SNP do gene *TRAF1* e ER. O marcador rs2416804 apresenta um valor de p de 0,09 para associação a ENH, com alelo G estando enriquecido no grupo de controles (tabela 11). Análise de LD confirmou a independência de todos os *tag* SNP do gene *TRAF1* testados (Figura 14).

Tabela 9 – Análise dos SNP previamente associados a estados reacionais

	RR (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)	ENH (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)
MAP3K5 rs4351280										
GG	9 (5,8)	6 (3,7)				3 (7,7)	1 (1,5)			
AG	52 (33,8)	55 (33,7)	0,51	0,27	NS	14 (35,9)	21 (31,3)	0,14	0,31	NS
AA	93 (60,4)	102 (62,3)				22 (56,4)	45 (67,2)			
AA + AG	145 (94,2)	157 (96,3)	0,36	0,27	NS	36 (92,3)	66 (98,5)	0,15*	0,38	NS
GG	9 (5,8)	6 (3,7)				3 (7,7)	1 (1,5)			
GG + AG	61 (39,6)	67 (37,4)	0,70	0,40	NS	17 (43,6)	22 (32,8)	0,27	0,42	NS
AA	93 (60,4)	102 (62,3)				22 (56,4)	45 (67,2)			
MAP2K2 rs12459484										
GG	20 (13,0)	16 (9,7)				5 (12,8)	1 (1,5)			
AG	73 (47,4)	76 (46,1)	0,29	0,09	1,37 (0,95 - 1,96)	19 (48,7)	31 (44,9)	0,03	0,02	2,40 (1,14 - 5,00)
AA	61 (39,6)	73 (44,2)				15 (38,5)	37 (53,6)			
AA + AG	134 (87,0)	149 (90,3)	0,35	0,18	NS	34 (87,2)	68 (98,5)	0,04*	0,03	12,2 (1,22 - 121,6)
GG	20 (13,0)	16 (9,7)				5 (12,8)	1 (1,5)			
GG + AG	93 (60,4)	92 (55,8)	0,40	0,16	NS	24 (61,5)	32 (46,4)	0,13	0,09	2,11 (0,88 - 5,06)
AA	61 (39,6)	73 (44,2)				15 (38,5)	37 (53,6)			
NLRP4 rs4801639										
CC	37 (24,7)	35 (21,5)				8 (20,5)	16 (24,3)			
CT	72 (48,0)	71 (43,6)	0,19	0,34	NS	18 (46,2)	27 (40,9)	0,88	0,96	NS
TT	41 (27,3)	57 (35,0)				13 (33,3)	23 (34,8)			
TT + CT	113 (75,3)	128 (78,5)	0,50	0,69	NS	31 (79,5)	50 (75,8)	0,66	0,76	NS
CC	37 (24,7)	35 (21,5)				8 (20,5)	16 (24,3)			
CC + CT	109 (72,7)	106 (65,0)	0,15	0,25	NS	26 (66,7)	43 (65,2)	0,87	0,85	NS
TT	41 (27,3)	57 (35,0)				13 (33,3)	23 (34,8)			
PRKCZ rs262672										
TT	13 (8,9)	10 (6,3)				4 (10,5)	7 (10,3)			
TG	53 (36,3)	56 (35,0)	0,36	0,28	NS	12 (31,6)	28 (41,2)	0,50	0,23	NS
GG	80 (54,8)	94 (58,7)				22 (57,9)	33 (48,5)			
GG + TG	133 (91,1)	150 (93,7)	0,38	0,43	NS	34 (89,5)	61 (89,7)	0,97*	0,90	NS
TT	13 (8,9)	10 (6,3)				4 (10,5)	7 (10,3)			
TT + TG	66 (45,2)	66 (41,3)	0,48	0,33	NS	16 (42,1)	35 (51,5)	0,35	0,12	NS
GG	80 (54,8)	94 (58,7)				22 (57,9)	33 (48,5)			
RNF216 rs3779096										
TT	17 (11,3)	21 (12,9)				3 (7,7)	8 (11,9)			
CT	61 (40,4)	73 (44,8)	0,32	0,77	NS	25 (64,1)	33 (49,3)	0,61	0,78	NS
CC	73 (48,3)	69 (42,3)				11 (28,2)	26 (38,8)			
CC + CT	134 (88,7)	142 (87,1)	0,66	0,49	NS	36 (92,3)	59 (88,1)	0,15*	0,28	NS
TT	17 (11,3)	21 (12,9)				3 (7,7)	8 (11,9)			
TT + CT	78 (51,7)	94 (57,7)	0,28	0,12	NS	28 (71,8)	41 (61,2)	0,27	0,27	NS
CC	73 (48,3)	69 (42,3)				11 (28,2)	26 (38,8)			
TLR2 rs3804099										
CC	26 (17,0)	41 (25,2)				10 (26,3)	15 (21,4)			
CT	78 (51,0)	79 (48,5)	0,08	0,06	0,73 (0,52 - 1,02)	20 (52,6)	41 (58,6)	0,77	0,87	NS
TT	49 (32,0)	43 (26,4)				8 (21,1)	14 (20,0)			
TT + CT	127 (83,0)	122 (74,8)	0,08	0,06	0,57 (0,31 - 1,02)	28 (73,7)	55 (78,6)	0,57	0,44	NS
CC	26 (17,0)	41 (25,2)				10 (26,3)	15 (21,4)			
CC + CT	104 (68,0)	120 (73,6)	0,27		NS	30 (78,9)	56 (80,0)	0,90	0,59	NS
TT	49 (32,0)	48 (25,9)				8 (21,1)	14 (20,0)			

RR; reação reversa.

pU; análise univariada, valores de p referentes ao teste de χ^2 , *p de fisher

pM; análise multivariada, valores de p referente ao teste de regressão logística multivariada binomial. Subgrupo RR corrigido para as covariáveis gênero, forma clínica e idade e subgrupo ENH corrigido para a covariável forma clínica

OR; odds ratio

IC; intervalo de confiança

ENH; eritema nodoso hansênico.

NS; nos marcadores com valores de p superiores a 0.1 na análise multivariada a OR não foi calculada e denominada não significativa.

Tabela 10 – Análise de associação de tag SNP do gene TRAF1 e estado reacional

	RR (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)	ENH (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)
TRAF1										
rs2416804										
GG	25 (16,3)	36 (22.1)				6 (15.4)	21 (30.0)			
CG	83 (54,3)	71 (43.6)	0.92	0.57	NS	19 (48.7)	31 (44.3)	0.09	0.09	0.59 (0.32 - 1.08)
CC	45 (29,4)	56 (34.4)				14 (35.9)	18 (25.7)			
CC + CG	128 (83,7)	127 (77.9)	0.20	0.12	NS	33 (84.6)	49 (70.0)	0.09	0.19	NS
GG	25 (16,3)	36 (22.1)				6 (15.4)	21 (30.0)			
GG + CG	108 (70,6)	107 (65.6)	0.35	0.63	NS	25 (64.1)	52 (74.3)	0.26	0.15	NS
CC	45 (29,4)	56 (34.4)				14 (35.9)	18 (25.7)			
TRAF1										
rs13440146										
TT	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
TG	15 (9,7)	11 (6,8)	NA	NA	NS	4 (10,5)	8 (11,6)	NA	NA	NA
GG	139 (90,3)	169 (92,3)				34 (89,5)	61 (88,4)			
GG + GT	154 (100)	161 (100)	NA	NA	NA	38 (100)	68 (100)	NA	NA	NA
TT	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
TG	15 (9,7)	11 (6,8)	0.35	0.64	NS	4 (10,5)	8 (11,6)	0.87 ^a	0.73	NS
GG	139 (90,3)	169 (92,3)				34 (89,5)	61 (88,4)			
TRAF1										
rs3761847										
GG	24 (15,7)	35 (21,5)				8 (20,5)	20 (28,6)			
GA	77 (50,3)	75 (46,0)	0.36	0.26	NS	19 (48,7)	31 (44,3)	0.43	0.20	NS
AA	52 (34,0)	53 (32,5)				12 (30,8)	19 (27,1)			
AA + GA	129 (84,3)	128 (78,5)	0.19	0.20	NS	31 (79,5)	50 (71,4)	0.36	0.18	NS
GG	24 (15,7)	35 (21,5)				8 (20,5)	20 (28,6)			
GG + GA	101 (66,0)	110 (67,5)	0.78	0.53	NS	27 (69,2)	51 (72,9)	0.69	0.45	NS
AA	52 (34,0)	56 (30,3)				12 (30,8)	19 (27,1)			

RR; reação reversa.

pU; análise univariada, valores de p referentes ao teste de X², *p de fisher

pM; análise multivariada, valores de p referente ao teste de regressão logística multivariada binomial. Subgrupo RR corrigido para as covariáveis gênero, forma clínica e idade e subgrupo ENH corrigido para a covariável forma clínica

OR; odds ratio

IC; intervalo de confiança

ENH; eritema nodoso hansênico.

NS; nos marcadores com valores de p superiores a 0.1 na análise multivariada a OR não foi calculada e denominada não significativa.

NA; teste estatístico não aplicado

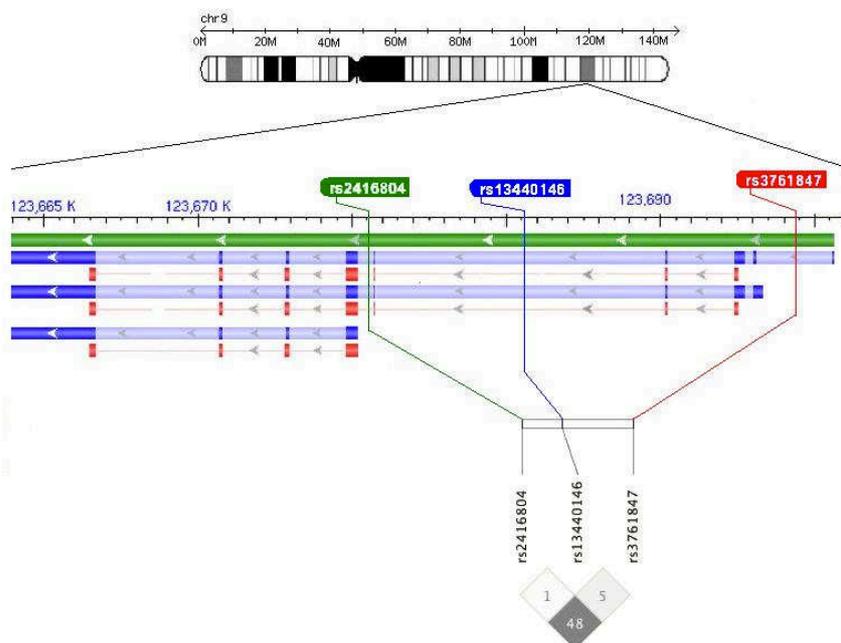


Figura 14 – Desequilíbrio de ligação entre marcadores tag SNP do gene TRAF1
 FONTE: HapMap, NCBI/MapViewer e Haploview 4.1

6.5 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE *NLRP12* E ESTADO REACIONAL.

Nenhum marcador do gene *NLRP12* demonstrou-se associado a ENH. O *tag* SNP rs4419163 apresentou tendência à associação na análise multivariada, com o alelo A como fator de susceptibilidade a RR ($p=0,07$). A presença do alelo A para o marcador rs4539722 está associada à proteção a RR tanto no modelo aditivo quanto dominante [$p=0,01$ OR=0.66 (0,47 – 0,91) e $p=0,04$ OR=0,58 (0,34 – 0,97), respectivamente] (tabela 12). A mapa do DL entre os *tag* SNP de *NLRP12* encontra-se na figura 15. A análise de DL confirmou a independência entre os marcadores.

6.6 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO GENE *JAK1* E ESTADO REACIONAL.

Devido à baixa FAM observada para quatro (rs3818753, rs12135754, rs2151572 e rs4916004) dos dezesseis *tag* SNP do gene *JAK1*, não foi possível realizar as análises sob o modelo aditivo, bem como as análises multivariadas para correção dos valores de p obtidos para estes marcadores (tabela 13).

Nas análises com o sub-grupo RR, o marcador rs2780816 apresentou valor de p com tendência à associação, com o alelo C enriquecido no grupo de casos ($p=0,09$). O SNP rs4916005 apresenta a mesma tendência, com modelo dominante para o alelo T ($p=0,06$), no entanto, a frequência observada para o alelo C foi muito baixa. Para o subgrupo ENH, dois marcadores demonstram tendências a associação com valores de p inferiores a 0,1 nos modelos aditivos: rs2256298 ($p=0,1$) e rs310247 ($p=0,08$) (tabela 13). A descrição do padrão de desequilíbrio de ligação entre os *tag* SNP do gene *JAK1* encontram-se na figura 16.

Tabela 11 – Análise de associação de tag SNP do gene *NLRP12* e estado reacional

	RR (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)	ENH (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)
<i>NLRP12</i>										
<i>rs2866111</i>										
TT	7 (4,6)	3 (1,8)				1 (2,6)	3 (4,3)			
CT	35 (22,7)	42 (25,5)	0,64	0,96	NS	7 (17,9)	22 (31,4)	0,13	0,14	NS
CC	112 (72,7)	120 (72,7)				31 (79,5)	45 (64,3)			
CC + CT	147 (95,5)	162 (98,2)	0,16*	0,25	NS	38 (97,4)	67 (95,7)	0,65*	0,95	NS
TT	7 (4,6)	3 (1,8)				1 (2,6)	3 (4,3)			
TT + CT	42 (27,3)	45 (27,3)	1	0,68	NS	8 (20,5)	25 (35,7)	0,10	0,09	0,44 (0,17 - 1,15)
CC	112 (72,7)	120 (72,7)				31 (79,5)	45 (64,3)			
<i>NLRP12</i>										
<i>rs10410581</i>										
TT	1 (0,6)	1 (0,6)				0 (0,0)	1 (1,4)			
TG	15 (9,8)	16 (9,8)	1	0,98	NS	2 (5,1)	5 (7,2)	0,44	0,36	NS
GG	138 (89,6)	146 (89,6)				37 (94,9)	64 (91,4)			
GG + TG	153 (99,4)	162 (99,4)	1	0,88	NS	39 (100)	69 (98,6)	1*	1	NS
TT	1 (0,6)	1 (0,6)				0 (0,0)	1 (1,4)			
TT + TG	16 (10,4)	17 (10,4)	1	0,94	NS	2 (5,1)	6 (8,6)	0,51*	0,5	NS
GG	138 (89,6)	146 (89,6)				37 (94,9)	64 (91,4)			
<i>NLRP12</i>										
<i>rs8110965</i>										
GG	29 (19,3)	32 (20,5)				6 (15,8)	11 (16,0)			
GC	79 (52,7)	76 (48,7)	0,84	0,60	NS	23 (60,5)	33 (47,8)	0,36	0,28	NS
CC	42 (28,0)	48 (30,8)				9 (23,7)	25 (36,2)			
CC + CG	121 (80,7)	124 (79,5)	0,80	0,96	NS	32 (84,2)	58 (84,1)	0,98	0,79	NS
GG	29 (19,3)	32 (20,5)				6 (15,8)	11 (16,0)			
GG + GC	108 (72,0)	108 (69,2)	0,60	0,45	NS	29 (76,3)	44 (63,8)	0,18	0,17	NS
CC	42 (28,0)	48 (30,8)				9 (23,7)	25 (36,2)			
<i>NLRP12</i>										
<i>rs889163</i>										
GG	3 (2,1)	8 (5,2)				2 (5,4)	1 (1,5)			
GA	37 (25,3)	37 (24,2)	0,41	0,68	NS	10 (27,0)	17 (25,0)	0,36	0,24	NS
AA	106 (72,6)	108 (70,6)				25 (67,6)	50 (73,5)			
AA + AG	143 (97,9)	145 (94,8)	0,15*	0,30	NS	35 (94,6)	67 (98,5)	0,28*	0,41	NS
GG	3 (2,1)	8 (5,2)				2 (5,4)	1 (1,5)			
GG + AG	40 (27,4)	45 (29,4)	0,7	0,97	NS	12 (32,4)	18 (26,5)	0,52	0,3	NS
AA	106 (72,6)	108 (70,6)				25 (67,6)	50 (73,5)			
<i>NLRP12</i>										
<i>rs4419163</i>										
AA	9 (5,9)	6 (3,8)				2 (5,3)	1 (1,4)			
AT	61 (39,9)	56 (35,2)	0,18	0,07	1,46 (0,97 - 2,20)	14 (36,8)	14 (37,8)	0,38	0,55	NS
TT	83 (54,2)	97 (61,0)				22 (57,9)	44 (63,8)			
TT + TA	144 (94,1)	153 (96,2)	0,38	0,16	NS	36 (94,7)	68 (98,6)	0,29*	0,43	NS
AA	9 (5,9)	6 (3,8)				2 (5,3)	1 (1,4)			
AA + AT	70 (45,8)	62 (39,0)	0,23	0,12	NS	16 (42,1)	15 (36,2)	0,55	0,69	NS
TT	83 (54,2)	97 (61,0)				22 (57,9)	44 (63,8)			
<i>NLRP12</i>										
<i>rs4806773</i>										
CC	2 (1,3)	8 (5,1)				1 (2,7)	1 (1,4)			
CT	32 (21,2)	28 (17,7)	0,49	0,59	NS	8 (21,6)	16 (23,2)	0,92	0,9	NS
TT	117 (77,5)	122 (77,2)				28 (75,7)	52 (75,4)			
TT + CT	149 (98,7)	150 (94,9)	0,10*	0,15	NS	36 (97,3)	68 (98,6)	1*	0,66	NS
CC	2 (1,3)	8 (5,1)				1 (2,7)	1 (1,4)			
CC + CT	34 (22,5)	36 (22,8)	0,96	0,99	NS	9 (24,3)	17 (24,6)	0,97	0,99	NS
TT	117 (77,5)	122 (77,2)				28 (75,7)	52 (75,4)			
<i>NLRP12</i>										
<i>rs10416363</i>										
GG	27 (17,5)	29 (17,7)				3 (7,9)	13 (18,6)			
AG	69 (44,8)	71 (43,3)	0,88	0,89	NS	22 (57,9)	33 (47,1)	0,43	0,33	NS
AA	58 (37,7)	64 (39,0)				13 (34,2)	24 (34,3)			
AA + AG	127 (82,5)	135 (82,3)	0,97	0,88	NS	35 (92,1)	57 (81,4)	0,17*	0,12	NS
GG	27 (17,5)	29 (17,7)				3 (7,9)	13 (18,6)			
GG + AG	96 (62,3)	100 (61,0)	0,8	0,74	NS	25 (65,8)	46 (65,7)	0,99	0,85	NS
AA	58 (37,7)	64 (39,0)				113 (34,2)	24 (34,3)			

NLRP12 rs4539722										
AA	29 (19,0)	45 (27,8)				9 (23,7)	17 (25,0)			
AG	70 (46,1)	75 (46,3)	0,03	0,01	0,66 (0,47 - 0,91)	20 (52,6)	35 (51,5)	0,92	0,89	NS
GG	53 (34,9)	42 (25,9)				9 (23,7)	16 (23,5)			
GG + AG	123 (81,0)	117 (72,2)	0,07	0,04	0,55 (0,31 - 0,96)	29 (76,3)	51 (75,0)	0,88	0,97	NS
AA	29 (19,0)	45 (27,8)				9 (23,7)	17 (25,0)			
AA + AG	99 (65,1)	120 (74,1)	0,09	0,04	0,57 (0,34 - 0,97)	29 (76,3)	52 (76,5)	0,99	0,79	NS
GG	53 (34,9)	42 (25,9)				9 (23,7)	16 (23,5)			

RR; reação reversa.

pU; análise univariada, valores de p referentes ao teste de X^2 , * p de fisher

pM; análise multivariada, valores de p referente ao teste de regressão logística multivariada binomial. Subgrupo RR corrigido para as covariáveis gênero, forma clínica e idade e subgrupo ENH corrigido para a covariável forma clínica

OR; odds ratio

IC intervalo de confiança

ENH; eritema nodoso hansênico.

NS; nos marcadores com valores de p superiores a 0.1 na análise multivariada a OR não foi calculada e denominada não significativa.

NA; Teste estatístico não aplicado

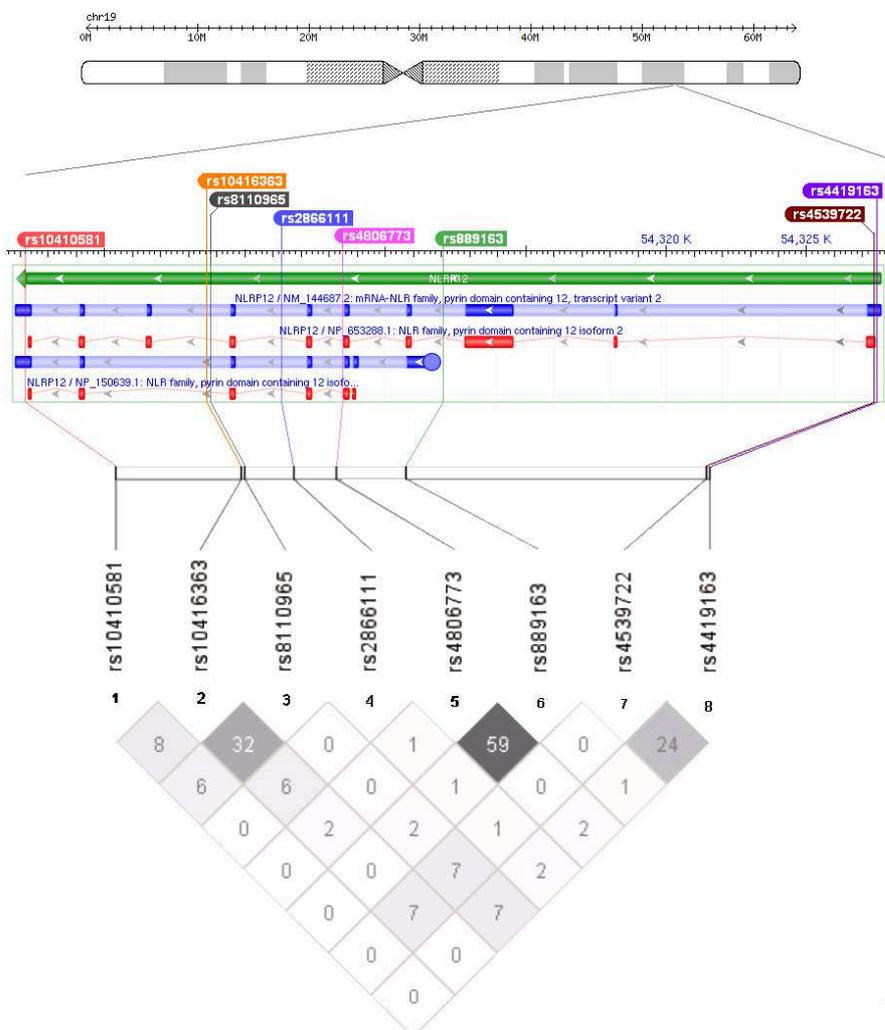


Figura 15 – Desequilíbrio de ligação entre marcadores tag SNP do gene NLRP12
 FONTE: HapMap, NCBI/MapViewer e Haploview 4

Tabela 12 – Análise de associação de tag SNP do gene *JAK1* e estado reacional

	RR (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)	ENH (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)
JAK1 rs3818753										
GG	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
AG	1 (0,7)	3 (1,8)	NA	NA	NA	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	NA	NA
AA	150 (99,3)	160 (98,2)				38 (100)	70 (100)			
AA + AG	151 (100)	163 (100)	NA	NA	NA	38 (100)	70 (100)	NA	NA	NA
GG	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
AG	1 (0,7)	3 (1,8)	0,35*	NA	NA	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	NA	NA
AA	150 (99,3)	160 (98,2)				38 (100)	70 (100)			
JAK1 rs12135754										
CC	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
AC	10 (6,6)	11 (6,8)	NA	NA	NA	1 (2,6)	5 (7,2)	NA	NA	NA
AA	141 (93,4)	150 (93,2)				37 (97,4)	64 (92,8)			
AA + AC	151 (100)	161 (100)	NA	NA	NA	38 (100)	69 (100)	NA	NA	NA
CC	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
AC	10 (6,6)	11 (6,8)	0,94*	NA	NA	1 (2,6)	5 (7,2)	0,34*	NA	NA
AA	141 (93,4)	150 (93,2)				37 (97,4)	64 (92,8)			
JAK1 rs310202										
GG	27 (17,5)	24 (15,0)				3 (7,9)	9 (13,2)			
AG	65 (42,2)	70 (43,8)	0,66	0,48	NS	16 (42,1)	27 (39,7)	0,55	0,82	NS
AA	62 (40,3)	66 (41,2)				19 (50,0)	32 (47,1)			
AA + AG	127 (82,5)	136 (85,0)	0,54	0,59	NS	35 (92,1)	59 (86,8)	0,41*	0,55	NS
GG	27 (17,5)	24 (15,0)				3 (7,9)	9 (13,2)			
GG + AG	92 (59,7)	944 (58,8)	0,86	0,54	NS	19 (50,0)	36 (52,9)	0,77	0,94	NS
AA	62 (40,3)	66 (41,2)				19 (50,0)	32 (47,1)			
JAK1 rs310199										
GG	31 (20,3)	25 (15,5)				3 (7,6)	8(11,4)			
AG	74 (48,3)	89 (55,3)	0,74	0,58	NS	18 (46,2)	38 (54,3)	0,22	0,33	NS
AA	48 (31,4)	47 (29,2)				18 (46,2)	24 (34,3)			
AA + AG	122 (79,7)	136 (84,5)	0,27	0,21	NS	36 (92,4)	62 (88,6)	0,54*	0,65	NS
GG	31 (20,3)	25 (15,5)				3 (7,6)	8(11,4)			
GG + AG	105 (68,6)	114 (70,8)	0,67	0,84	NS	21 (58,8)	46 (65,7)	0,22	0,33	NS
AA	48 (31,4)	47 (29,2)				18 (46,2)	24 (34,3)			
JAK1 rs4916005										
CC	4 (2,7)	10 (6,3)				1 (2,7)	6 (8,7)			
CT	52 (35,1)	55 (34,4)	0,34	0,24	NS	11 (28,9)	20 (29,0)	0,32	0,6	NS
TT	92 (62,2)	95 (59,4)				26 (68,4)	43 (62,3)			
TT + CT	144 (97,3)	150 (93,8)	0,17*	0,06	0,31 (0,09 - 1,07)	37 (97,3)	63 (91,3)	0,25*	0,41	NS
CC	4 (2,7)	10 (6,3)				1 (2,7)	6 (8,7)			
CC + CT	56 (37,8)	65 (40,6)	0,62	0,56	NS	12 (31,6)	26 (37,7)	0,53	0,82	NS
TT	92 (62,2)	95 (59,4)				26 (68,4)	43 (62,3)			
JAK1 rs12093269										
TT	5 (3,3)	10 (6,1)				1 (2,6)	7 (10,1)			
CT	54 (35,8)	54 (33,1)	0,65	0,54	NS	11 (28,2)	18 (26,1)	0,30	0,50	NS
CC	92 (60,9)	99 (60,7)				27 (69,2)	44 (63,8)			
CC + CT	146 (96,7)	153 (93,9)	0,29*	0,14	NS	38 (97,4)	62 (89,9)	0,18*	0,21	NS
TT	5 (3,3)	10 (6,1)				1 (2,6)	7 (10,1)			
TT + CT	59 (39,1)	64 (39,3)	0,97	0,95	NS	12 (30,8)	25 (36,2)	0,57	0,89	NS
CC	92 (60,9)	99 (60,7)				27 (69,2)	44 (63,8)			
JAK1 rs310198										
TT	4 (2,7)	10 (6,1)				1 (2,6)	4 (5,7)			
CT	49 (32,6)	55 (33,7)	0,22	0,19	NS	12 (31,6)	24 (34,3)	0,45	0,91	NS
CC	97 (64,7)	98 (60,2)				25 (65,8)	42 (60,0)			
CC + CT	146 (97,3)	153 (93,9)	0,17*	0,17	NS	37 (97,4)	66 (94,3)	0,48*	0,94	NS
TT	4 (2,7)	10 (6,1)				1 (2,6)	4 (5,7)			
TT + CT	53 (35,3)	65 (39,8)	0,41	0,34	NS	13 (34,2)	28 (40,0)	0,55	0,9	NS
CC	97 (64,7)	98 (60,2)				25 (65,8)	42 (60,0)			

JAK1 rs2256298										
AA	24 (16,1)	25 (15,6)				1 (2,6)	8 (11,4)			
AG	64 (43,0)	76 (47,5)	0,65	0,56	NS	18 (47,4)	38 (54,3)	0,05	0,10	0,55 (0,27 - 1,14)
GG	61 (40,9)	59 (36,9)				19 (50,0)	24 (34,3)			
GG + AG	125 (83,9)	135 (84,4)				37 (97,4)	62 (88,6)			
AA	24 (16,1)	25 (15,6)	0,91	0,71	NS	1 (2,6)	8 (11,4)	0,15*	0,21	NS
AA +AG	88 (59,1)	101 (63,1)				19 (50,0)	46 (65,7)			
GG	61 (40,9)	59 (36,9)	0,46	0,27	NS	19 (50,0)	24 (34,3)	0,11	0,2	NS

RR; reação reversa.

pU; análise univariada, valores de p referentes ao teste de X^2 , p de fisher

pM; análise multivariada, valores de p referente ao teste de regressão logística multivariada binomial. Subgrupo RR corrigido para as covariáveis gênero, forma clínica e idade e subgrupo ENH corrigido para a covariável forma clínica

OR; odds ratio

IC; intervalo de confiança

ENH; eritema nodoso hansênico.

NS; nos marcadores com valores de p superiores a 0.1 na análise multivariada, a OR não foi calculada e denominada não significativa.

NA; Teste estatístico não aplicado

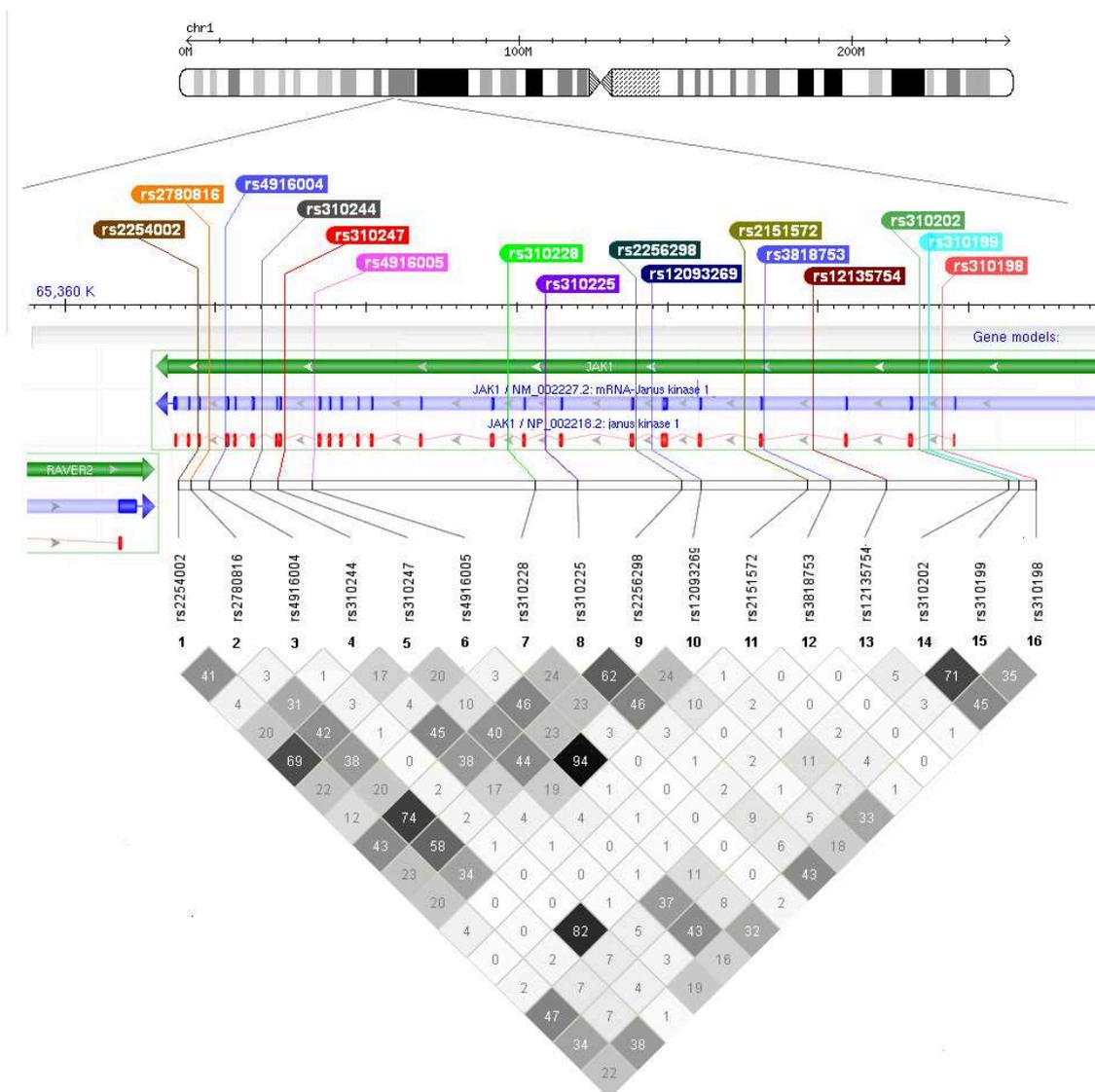


Figura 16 – Desequilíbrio de ligação entre marcadores tag SNP do gene JAK1
 FONTE: HapMap, NCBI/MapView e Haploview 4.1

Tabela 12 – (cont.) Análise de associação de tag SNP do gene JAK1 e estado reacional

	RR (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)	ENH (%)	Controles (%)	pU	pM	OR (IC)
JAK1 rs2151572										
CC	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
AC	16 (10,5)	20 (12,1)	NA	NA	NA	0 (0,0)	7 (10,1)	NA	NA	NA
AA	137 (89,5)	145 (87,9)				38 (100)	62 (89,9)			
AC + AA	153 (100)	165 (100)				0 (0,0)	0 (0,0)			
CC	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	NA	NA	38 (100)	69 (100)	NA	NA	NA
AC	16 (10,5)	20 (12,1)	0,64	NA	NA	0 (0,0)	7 (10,1)	0,05*	NA	NA
AA	137 (89,5)	145 (87,9)				38 (100)	62 (89,9)			
JAK1 rs310228										
AA	3 (2,0)	2 (1,2)				0 (0,0)	2 (2,8)			
AC	30 (19,6)	37 (22,6)	0,78	0,69	NS	7 (18,4)	16 (22,9)	0,78	0,69	NS
CC	120 (78,4)	125 (76,2)				31 (81,6)	52 (74,3)			
CC + AC	150 (98,0)	162 (98,8)				38 (100)	68 (97,2)			
AA	3 (2,0)	2 (1,2)	0,67*	0,58	NS	0 (0,0)	2 (2,8)	0,29*	0,58	NS
AA + AC	33 (21,6)	39 (23,8)				7 (18,4)	18 (25,7)			
CC	120 (78,4)	125 (76,2)	0,64	0,54	NS	31 (81,6)	52 (74,3)	0,39	0,54	NS
JAK1 rs310225										
AA	19 (12,5)	27 (16,4)				2 (5,4)	11 (15,7)			
AG	70 (46,1)	72 (43,6)	0,5	0,38	NS	19 (51,4)	33 (47,2)	0,5	0,38	NS
GG	63 (41,4)	66 (40,0)				16 (43,2)	26 (37,1)			
GG + AG	133 (87,5)	138 (83,6)				35 (94,6)	59 (84,3)			
AA	19 (12,5)	27 (16,4)	0,33	0,24	NS	2 (5,4)	11 (15,7)	0,21*	0,24	NS
AA + AG	89 (58,6)	99 (60,0)				21 (56,8)	44 (62,9)			
GG	63 (41,4)	66 (40,0)	0,7	0,68	NS	16 (43,2)	26 (37,1)	0,54	0,68	NS
JAK1 rs4916004										
AA	0 (0,0)	0 (0,0)				0 (0,0)	0 (0,0)			
AG	9 (6,0)	15 (9,3)	NA	NA	NA	1 (2,6)	6 (8,6)	NA	NA	NA
GG	140 (94,0)	146 (90,7)				37 (97,4)	64 (91,4)			
GG + AG	149 (100)	156 (100)				38 (100)	70 (100)			
AA	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	NA	NA	0 (0,0)	0 (0,0)	NA	NA	NA
AG	9 (6,0)	15 (9,3)				1 (2,6)	6 (8,6)			
GG	140 (94,0)	146 (90,7)	0,28	NA	NA	37 (97,4)	64 (91,4)	0,42 ^d	NA	NA
JAK1 rs310247										
GG	28 (18,9)	25 (15,6)				13 (34,2)	11 (16,0)			
AG	69 (46,6)	80 (50,0)	0,69	0,72	NS	18 (47,4)	37 (53,6)	0,03	0,08	1,73 (0,93 - 3,21)
AA	51 (34,5)	55 (34,4)				7 (18,4)	21 (30,4)			
AA + AG	120 (81,1)	135 (84,4)				25 (65,8)	58 (84,1)			
GG	28 (18,9)	25 (15,6)	0,44	0,39	NS	13 (34,2)	11 (16,0)	0,03	0,11	NS
GG + AG	97 (65,5)	105 (65,6)				31 (81,6)	48 (69,6)			
AA	51 (34,5)	55 (34,4)	0,99	0,87	NS	7 (18,4)	21 (30,4)	0,18	0,20	NS
JAK1 rs310244										
AA	4 (2,6)	6 (3,6)				1 (2,6)	2 (2,9)			
AG	48 (31,4)	50 (30,3)	0,87	0,57	NS	12 (31,6)	28 (40,0)	0,87	0,57	NS
GG	101 (66,0)	109 (66,1)				25 (65,8)	40 (57,1)			
GG + AG	149 (97,4)	159 (96,4)				37 (97,4)	68 (97,1)			
AA	4 (2,6)	6 (3,6)	0,60*	0,64	NS	1 (2,6)	2 (2,9)	1*	0,64	NS
AA + AG	52 (34,0)	56 (33,9)				13 (34,2)	30 (42,9)			
GG	101 (66,0)	109 (66,1)	0,99	0,64	NS	25 (65,8)	40 (57,1)	0,38	0,63	NS
JAK1 rs2780816										
AA	24 (16,3)	34 (20,6)				2 (5,3)	12 (17,1)			
AC	59 (40,2)	74 (44,9)	0,16	0,09	0,76 (0,55 - 1,05)	19 (50,0)	34 (48,6)	0,11	0,09	0,75 (0,54 - 1,04)
CC	64 (43,5)	57 (34,5)				17 (44,7)	24 (34,3)			
CC + AC	123 (83,7)	131 (79,4)				36 (94,7)	58 (82,9)			
AA	24 (16,3)	34 (20,6)	0,33	0,35	NS	2 (5,3)	12 (17,1)	0,13*	0,33	NS
AA + AC	83 (56,5)	108 (65,5)				21 (55,3)	46 (65,7)			
CC	64 (43,5)	57 (34,5)	0,1	0,07	0,64 (0,40 - 1,04)	17 (44,7)	24 (34,3)	0,28	0,08	0,64 (0,40 - 1,05)

JAK1 rs2254002										
CC	34 (22,4)	34 (20,7)				14 (36,8)	16 (22,9)			
AC	74 (48,7)	78 (47,6)	0,58	0,69	NS	15 (39,5)	35 (50,0)	0,6	0,69	NS
AA	44 (28,9)	52 (31,7)				9 (23,7)	19 (27,1)			
AA + AC	118 (77,6)	130 (79,3)				24 (63,2)	54 (77,1)			
CC	34 (22,4)	34 (20,7)	0,72	0,74	NS	14 (36,8)	16 (22,9)	0,12	0,74	NS
CC + AC	108 (71,1)	112 (68,3)				29 (76,3)	51 (72,9)			
AA	44 (28,9)	52 (31,7)	0,59	0,75	NS	9 (23,7)	19 (27,1)	0,69	0,75	NS

RR; reação reversa.

pU; análise univariada, valores de p referentes ao teste de X^2 , p de fisher

pM; análise multivariada, valores de p referente ao teste de regressão logística multivariada binomial. Subgrupo RR corrigido para as covariáveis gênero, forma clínica e idade e subgrupo ENH corrigido para a covariável forma clínica

OR; odds ratio

IC; intervalo de confiança

ENH; eritema nodoso hansênico.

NS; nos marcadores com valores de p superiores a 0.1 na análise multivariada, a OR não foi calculada e denominada não significativa.

NA; Teste estatístico não aplicado

7 DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

Muito pouco tem se avançado no entendimento das bases genéticas dos estados reacionais, os artigos publicados até o momento carecem de replicação ou apresentam limitações relevantes no desenho do estudo ou estratégia de análise. Neste contexto, algumas abordagens diferenciais vêm se mostrando promissoras na seleção de genes, como estudos do perfil de citocinas e de vias imunológicas, trazendo um novo *insight* para a investigação dos mecanismos de ação dos ER, sendo uma alternativa ao desenho de genes candidatos funcionais.

Para avaliarmos o impacto de fatores genéticos em ER, desenvolvemos duas estratégias: (i) avaliação de SNP associados a ER, provenientes da literatura ou de estudos colaborativos, para replicação, (ii) avaliação por cobertura física de genes candidatos novos ou previamente associados a ER.

7.1 EXPERIMENTOS DE REPLICAÇÃO

7.1.1 SNP selecionado da literatura

Observamos em nossas análises a tendência para associação do SNP rs3804099 do gene *TLR2* e ER ($p=0,06$). Este polimorfismo, descrito por Bochud e cols. em 2008, foi a primeira variante genética demonstrada em associação a ER. No estudo original a presença do alelo T foi descrita como fator de proteção a RR ($p=0,002$) [106]. Nossos achados apontam para direção oposta, com o alelo C como fator de proteção.

Alguns fatores são cogitados para discutirmos as inconsistências observadas: (i) a diferença entre os grupos populacionais: o grupo do estudo primário, de origem etíope, é formado por 441 indivíduos, nestes, a distribuição dos tipos de reação é peculiarmente distinta da relatada em outros grupos-populacionais. Cerca de 30% dos casos de ER apresentados são neurites, apenas 66 (15%) dos indivíduos desenvolveram RR e 17 (3,8%) ENH. Esta baixa incidência de RR e ENH é inesperada, considerando que 75% das formas clínicas foram BT + BL

(considerada de risco para RR) e 63% BL+LL (risco para ENH). A proporção dos ER do estudo original diferem das descritas em outras populações [46, 115], incluindo nosso estudo, no qual somente 11 indivíduos apresentaram neurites e foram excluídos do grupo; (ii) quanto a inversão do sentido da associação, uma possível explicação adicional é a ocorrência do fenômeno de *flip-flop* [116], ou seja, a inversão do alelo de risco associado a um fenótipo em grupos distintos. Este efeito seria plausível nos casos em que o alelo associado não é o causal, mas sim, um representante do *bin* desta variante. No entanto, neste caso, deve haver também uma inversão na FAM do alelo de risco: se em uma população o alelo de risco é o mais frequente, na outra o alelo de risco deve ser o alelo raro; não corresponde as nossas observações, uma vez que o alelo associado é o de maior frequência em ambos os grupos, sendo assim incompatível com a definição clássica do fenômeno *flip-flop* [117]; (iii) a definição do grupo controle “no RR” utilizado no estudo inicial: não há uma definição específica se este grupo é formado por indivíduos sem nenhum tipo de reação, ou se inclui os casos de ENH e neurite. Uma análise cuidadosa dos números permite a especulação de que o grupo controle é formado por indivíduos sem RR mas com os outros dois tipos de ER, o que torna a comparação caso/controle difícil.

7.1.2 SNP selecionados de estudos colaborativos

No estudo realizado por nossos colaboradores, investigando as vias envolvendo TNF- α , múltiplos sinais de associação à RR foram observados, cuja descrição encontra-se resumida na tabela 14.

Não observamos a replicação dos achados genéticos entre os SNP rs3779096, rs4351280, rs262672 e rs4801639 presentes nos genes *RNF216*, *MAP3K5*, *PRKCZ* e *NLRP4* respectivamente, e RR. Não foi observada diferença significativa também para o fenótipo ENH. O SNP rs3784712 do gene *MAP2K5* não foi utilizado nas análises genéticas, segundo o banco de dados HapMap, este é polimórfico somente em indivíduos de origem asiática, explicando a ausência de variância na população brasileira. Demonstramos sinal de associação estatisticamente significativo entre o marcador rs12459484 do gene *MAP2K2* e ENH,

com o alelo A enriquecido no grupo controle em ambos os modelos, aditivo ($p=0,02$) e dominante ($p=0,03$). Apesar da diferença na distribuição dos genótipos deste marcador não ser significativa para o grupo RR ($p=0,09$), o alelo A encontra-se também em maior proporção no grupo controle. De fato, este alelo é o mesmo associado a proteção a RR na população Vietnamita [$p_{M.Carlo}=0,004$ OR=0,55 (0,37 – 0,82)], esta observação é compatível com a hipótese de um possível impacto de proteção para este alelo em ambos os ER. O papel da *MAP2K2*, cuja proteína é denominada MEK2, parece ser muito importante no mecanismo de defesa do hospedeiro. MEK2 é um dos principais alvos da protease secretada pelo *Bacillus anthracis*, inibindo a via de mitose e diferenciação celular ativada por MEK2 e MEK1, muitas vezes sendo letal [118]. Outro fator virulento (*YopJ*) secretado por bactérias do gênero *Yersinia* também tem impacto direto sobre MEK2, através da acetilação de duas serinas residuais no *loop* de ativação, causando a inibição da resposta inflamatória e o direcionamento para apoptose celular [119]. Contudo, novos estudo esclarecendo o possível impacto de polimorfismos nesse gene como fator de proteção a ER são necessários.

Tabela 13 – Genes associados a RR na população vietnamita e suas funções já descritas

N	Gene	Nome	Função
1	<i>TRAF1</i>	tumor necrose factor receptor-associated factor 1	Proteína associada a receptores de TNF e uma das responsáveis pela transdução do sinal. Interage com proteínas inibidoras de apoptose e medeia os sinais anti-apoptóticos dos receptores de TNF
2	<i>RNF216</i>	ring finger protein 216	Inibidor das vias ativadas por TNF e IL1. Age também funcionalmente como uma E3 ubiquitina proteína ligase, transferindo a ubectina de E2 para o substrato
3	<i>MAP2K2</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 2	Tem um papel crucial na transdução do sinal de fatores de crescimento, mitógenos e de diferenciação celular
4	<i>MAP2K5</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 5	A cascata de sinalização mediada por esta citocina envolve produção de fatores de crescimento, proliferação celular e diferenciação para linhagem muscular
5	<i>MAP3K5</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	Gene muito conservado de drosófilas à mamíferos, sua real função não é bem estabelecida. Nos humanos é expresso abundantemente no pâncreas e no coração
6	<i>NLRP12</i>	NACHT leucine-rich repeat family, pyrin domain containing 12	Envolvida na ativação da via das caspases pela interação com complexos proteicos denominados inflamossomos
7	<i>NLRP4</i>	NACHT leucine-rich repeat family, pyrin domain containing 4	Envolvida na ativação da via das caspases pela interação com complexos proteicos denominados inflamossomos
8	<i>PRKCZ</i>	protein kinase C, zeta	Envolvida em vários processos celulares como proliferação, diferenciação e secreção de fatores inflamatórios
9	<i>JAK1</i>	Janus kinase 1	Enzima transdutora de sinais, acoplado a proteína de membrana STAT formando o complexo JAK/STAT envolvido na transdução de sinal da via do IFN- α e IFN- β

Fonte. [113], Gene Sequence/NCBI

7.2 EXPERIMENTO DE COBERTURA FÍSICA COMPLETA

7.2.1 Análise de Cobertura física completa de genes previamente descritos

Não averiguamos nenhum sinal de associação entre os *tag* SNP do gene *TRAF1* e ER no grupo populacional brasileiro, incluindo o SNP rs3761847 associado a RR na população vietnamita ($p=0,002$). De fato, esta é variante do gene *TRAF1* mais relatada em associação a doenças complexas, principalmente a artrite reumatóide (AR), tanto no GWAS para AR quanto em meta-análise [120, 121]. Para o SNP rs2416804, podemos observar claramente uma inversão na distribuição genotípica entre casos de ENH e controles. Contudo, essa diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,09$). Este polimorfismo não foi relatado em associação a susceptibilidade a nenhuma doença até o presente momento. O SNP rs7021206 também associado a AR, quando avaliado em nosso grupo-populacional, demonstrou frequências genotípicas fora do EHW, sendo retirado do estudo antes das análises estatísticas.

Através da cobertura do gene *NLRP12*, utilizando a estratégia de *tag* SNP no grupo-populacional brasileiro, foi possível observar a associação significativa entre apenas um marcador, o rs4539722 e RR [alelo A $p=0,01$ OR=0,66 (0,47 – 0,91)]. O SNP inicialmente associado a RR na população vietnamita, rs7259148 [$p=0,0001$ OR=3.26 (1,77 – 6,01)], encontra-se em alto DL com o rs4539722 ($r^2=0.66$) segundo o banco de dados HapMap população CHB, utilizada no estudo original. Para confirmarmos a dependência ou independência dos achados devemos observar a distribuição dos genótipos destes dois SNP em ambos os grupos, no entanto, pelo alto DL apresentado por estes na população CHB, é possível cogitar a hipótese de estarmos capturando o sinal da mesma variação causal na população vietnamita. Uma vez que além do valor considerável de DL, os dois SNP estão fisicamente próximos, localizados na região UTR 5' do gene *NLRP12*. Outro *tag* SNP, rs4419163 apresenta uma tendência a associação ($p=0,07$), apesar do DL entre os SNP rs4539722 e o rs4419163 ser baixo ($r^2=0.24$) em nosso grupo de estudo, estes marcadores estão possivelmente capturando a mesma informação. Nenhuma associação significativa foi observada entre os *tag* SNP e ENH.

Membros da família NLR tem sido descritos como importantes mediadores de processos inflamatórios na imunidade inata, estando envolvidos no reconhecimento de patógenos intracelulares e no recrutamento de uma variedade de moléculas efetoras, incluindo caspases e quinases [122]. A cascata de sinalização envolvendo as moléculas *NLRP* ainda não é bem elucidada, no entanto, estudos recentes demonstram a interação direta e específica entre NOD2 (descrita em associação a ER) e NLRP12 no inflamossomo [123], sugerindo um papel tão importante para NLR4 e NLRP12 quanto os atribuídos a NOD1 e NOD2 no reconhecimento de patógenos intracelulares. Em um dos primeiros estudos genéticos envolvendo *NLRP12*, um polimorfismo denominado pelos autores como *NALP12_In9*, foi descrito como fator de susceptibilidade a doença crônica de pele (dermatite atópica) [124].

Duas variações do gene *JAK1* foram associadas a RR na população vietnamita. Este foi o único gene a apresentar sinais independentes de associação, com os SNP rs310202 ($p=0,0002$) e rs3818753 ($p=0,02$). Na análise de *JAK1* por tag SNP na população brasileira, estes achados não foram replicados. O SNP rs3818753 demonstrou ser pouco polimórfico no grupo estudado (FAM=0,6%) e o SNP rs310202 não apresentou diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos e entre casos de ER e controles. Um único marcador demonstra tendência de associação à RR e ENH ($p=0,09$ para ambos), e este é independente dos dois marcadores previamente associados na população vietnamita ($r^2 < 0.1$). Jak1 é uma tirosina quinase que desempenha um papel crucial na ativação da resposta imunológica mediada por importantes citocinas como IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, IL2/IL4, IL6 e IL10 [125]. A deleção desse gene é fatal em camundongos neonatos [126], sugerindo a importância de um bom funcionamento dessa via. Entretanto, variantes deste gene não demonstram associação a susceptibilidade a ER no grupo-populacional brasileiro.

7.2.2 Análise de Cobertura física completa de genes inéditos

7.2.2.1 Discussão complementar para o gene *IL6*

6

6

Uma ampla discussão dos achados para o gene *IL6* encontra-se no Capítulo 5. Este sub-item limita-se a discussão da independência dos achados e das análises haplotípicas.

Como padrão define-se que dois ou mais marcadores pertencem ao mesmo *bin* quando os mesmos apresentam DL superior a $r^2=0.8$; no entanto, não podemos descartar a hipótese de que marcadores com DL inferior ao valor de referência compartilhem informações. Esse fato pode ser observado no mapa de desequilíbrio de ligação, por exemplo: para o gene *IL6* o marcador rs2069832 ($p=0,007$) apresenta DL de $r^2=0.69$ com o rs1800795 ($p=0,03$) e $r^2=0.47$ com o rs2069845 ($p=0,044$). Neste caso, podemos observar uma redução na significância da associação com o fenótipo, conforme expressa pelo valor de p , quando há diminuição no DL. Este fato indica apenas um sinal de associação sendo capturado por três polimorfismos, mesmo estes apresentando r^2 baixo para serem considerados em um mesmo *bin*. O mesmo não é válido para o SNP rs2069840 que apresenta baixo DL com o rs2069832 ($r^2=0.1$) e valores de $p=0,027$.

O modo de formalizar a dependência ou independência dos dados observados é através de uma análise de regressão logística multivariada incluindo somente os marcadores como co-variáveis, na qual sinais independentes apresentam valores de *likelihood ratio* significativos enquanto marcadores dependentes perdem a significância. Voltando ao exemplo anterior, a significância estatística do modelo genético diminui a medida que aumenta o DL entre os SNP; o modelo aditivo para os SNP rs1800795, rs2069845, rs2069832 e rs2069840 apresentam $p=0,89$, $p=0,31$, $p=0,06$, $p=0,01$ respectivamente, confirmando a independência do rs2069840 dos demais, observada no mapa de DL com valores de r^2 inferiores a 0.25.

7.2.2.2 CXCL10 e ENH

6

6

Um dos resultados mais significativos do presente estudo, porém surpreendente a princípio, foi a associação do *tag* SNP rs4859587 do gene *CXCL10* e ENH ($p=0,002$). O gene *CXCL10* codifica a proteína IP10, previamente descrita em níveis elevados em pacientes que desenvolveram RR, porém, não em casos de ENH, no estudo que deu origem a seleção deste gene [62]. Um trabalho subsequente reforça o achado de IP10 elevado no soro de pacientes com RR, bem como o aumento da expressão de *CXCL10* em biopsia de lesão [127]. No entanto, nos dois estudos, esta alteração significativa somente é demonstrada em pacientes durante RR. Não houve diferença nos níveis circulantes de IP10 como fator preditivo em pacientes acompanhados até o eventual desenvolvimento de RR [127], o que reforça a necessidade de utilizarmos marcadores genéticos, possivelmente associados a super-expressão de mediadores imunológicos, como indicadores para o monitoramento de pacientes com hanseníase, e não medidas séricas. Alterações nos níveis de IP10 também são descritas em outras patologias com fator etiológico semelhante. Em doença de Crohn, é possível observar um aumento de anticorpo IgG específico para *Mycobacterium avium subs. paratuberculosis* e ligantes de CXCR3 como a CXCL10, CXCL9, CXCL11 (figura 17).

Sabemos que o aumento na circulação de anticorpo anti-PGL1 e IP10 estão associados à susceptibilidade a ER. O mecanismo de ação pelo qual ligantes de CXCR3 estariam envolvidos nesse processo, poderia assemelhar-se ao apresentado em pacientes com doença de Crohn, com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e IL12, de forma desordenada, levando a dano tecidual característico de super-expressão de TNF- α [128]. Neste caso, podemos cogitar um papel inverso para a variante descrita como fator de proteção a ENH, esta tendo alguma influência, limitando a secreção de mediadores da resposta Th1; uma vez que IP10 tem papel importante na quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos para o sítio de inflamação, bem como na angiogênese e a manutenção do sítio inflamatório, facilitando a formação de granulomas [129].

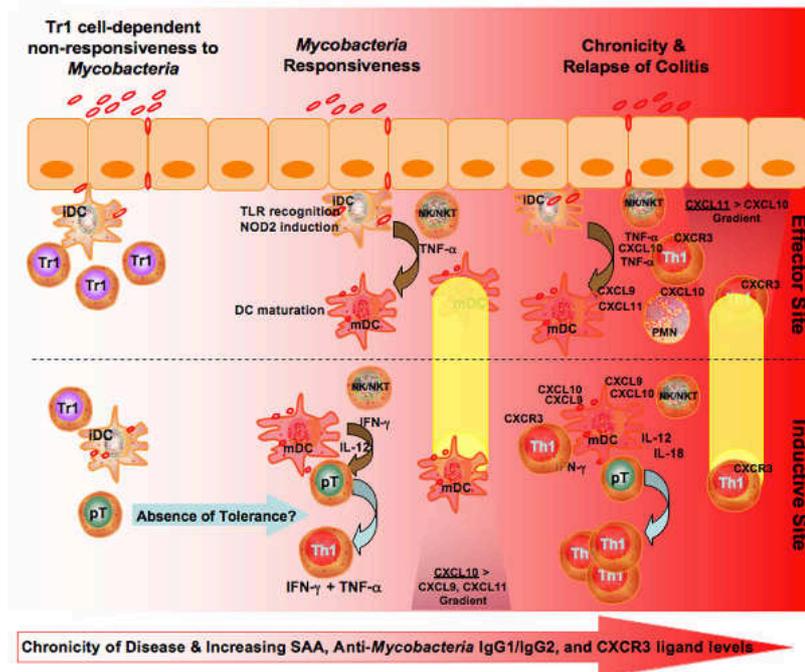


Figura 17 – Hipótese do mecanismo celular e molecular de doença em Crohn induzida por micobactéria. Assim como proposta para doença de Crohn o mecanismo de ação pelo qual ligantes de CXCR3 estariam envolvidos no desenvolvimento de ENH seria através da quimiotaxia de células Th1 para o sítio efetor, causando aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IFN- γ , de forma desordenada, acarretando danos teciduais característicos de super-expressão de TNF- α . Outro fato que aproxima as duas doenças é a presença de anticorpo específico para micobactérias, o que no casos de pacientes com hanseníase poderia causar a deposição de imunocomplexos, característico de pacientes em ENH.

Fonte: [130]

Em paralelo, IP10 também vem sendo estudada como possível marcador prognóstico para tuberculose [131]. O sequenciamento da região promotora do gene *CXCL10* demonstrou uma nova variação na posição -135 G/A em associação a doença ($p=0,02$) em uma grupo-populacional Chinês [132]. Dois possíveis mecanismos de expressão de IP10 são descritos em tuberculose. No primeiro, a expressão de IP10 seria regulada pelo nível de TNF- α (figura 18) [63]. O segundo seria através de IL17 [133]. No entanto, estudos funcionais envolvendo os polimorfismos do *cluster* de *CXCL10* são necessários para averiguar o real papel destas em ER.

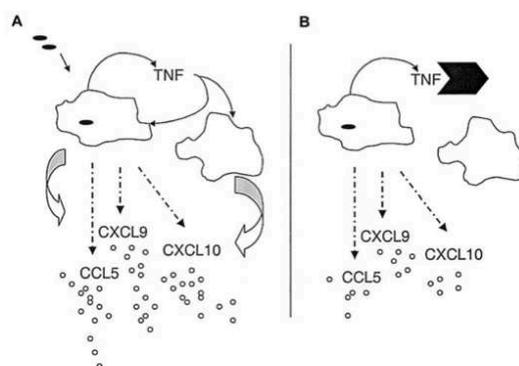


Figure 1. Influence of TNF on production of chemokines by macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. A, Initial interaction and infection with *M. tuberculosis* elicits production of TNF by macrophages within 4 h. TNF can then act on the infected macrophages or on other macrophages to induce chemokine production (open arrows). Chemokines (e.g., CXCL9, CXCL10, and CCL5) are also produced by macrophages following infection (dotted arrows). B, Blocking production of TNF (antibody or receptor fusion; solid arrowhead) reduces the quantity of chemokines produced by the macrophages, but a residual level of chemokine production that is not TNF dependent remains (dotted arrows).

Figura 18 – Influencia da secreção de TNF na Produção de citocinas
Fonte: [63].

7.3 LIMITAÇÕES

7.3.1 Limitações do estudo

Devido à limitação da estratégia do estudo de replicação, a saber (i) a investigação apenas dos SNP previamente associados; (ii) o desenho do estudo de vias candidatas e (iii) o poder da amostragem em detectar a associação (erro do tipo 2) em nosso grupo-populacional, não podemos descartar o impacto dos genes não associados à patologia do ER.

Algumas limitações primárias devem ser consideradas: por exemplo, uma diferença nas estruturas de *bins* entre a população vietnamita e brasileira pode ter impacto direto sobre a falta de associação no estudo de replicação, uma vez que a suposta variação causal não encontre-se no mesmo bin que o marcador genotipado. Além disso, o desenho do estudo de vias candidatas para o TNF- α , é fundamentado em análise de associação baseado em famílias. Neste desenho, aplica-se um teste denominado “Teste de Desequilíbrio de Transmissão” (TDT), que busca identificar a transmissão de alelos de forma não aleatória de pais heterozigotos para um filho afetado. Nesse caso, por ER acometerem apenas pacientes com hanseníase, podemos considerar ER um “endofenótipo” (figura 19). Ao observarmos a transmissão de pais para filhos afetados, não podemos assegurar se um eventual

desequilíbrio de transmissão é devido ao ER, à hanseníase ou mesmo às suas formas clínicas.

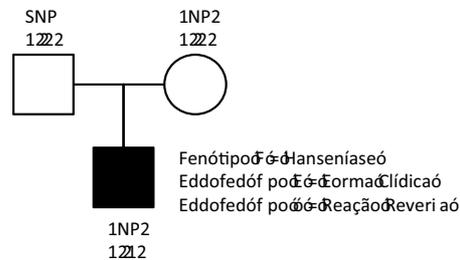


Figura 19 – Desenho de estudo de associação baseado em famílias incluindo endofenótipos.

7.3.2 Limitações gerais da estratégia de análise

Para entendermos melhor o mecanismo de ação dos ER, primeiramente precisamos avançar no conhecimento de múltiplas áreas, como vias metabólicas, bioquímicas, interações no sistema imune entre outros. Somente assim, poderemos definir se as alterações observadas nos níveis de citocinas são realmente a origem dos ER, ou secundárias, devido a variações muito sutis presentes em genes antecessores, apresentando um possível efeito geométrico e em cascata. Um bom exemplo nesta questão é a via dos NLR; sabemos muito pouco sobre sua real função, mas dois estudos independentes relatam a associação entre *NLRP12* e RR.

Outro fator limitante são os métodos estatísticos aplicados em estudos de replicação ou GWAS, apresentando valores matemáticos que não consideram estudos prévios. Por exemplo, em GWAS a linha de corte ($p=1 \text{ E-}07$) é utilizada como estratégia para evitar a observação de falsos positivos devido a testes múltiplos (erro do tipo 1), esse valor deve ser atingido pelos marcadores para serem considerados significativos, incluído os já associados ao fenótipo. Uma nova abordagem mais cuidadosa faz-se necessária, na qual o efeito biológico seja o relevante. Na atual interpretação dos GWAS, é considerado mais significativo estatisticamente uma variação que apresente $p=1 \text{ E-}10$ e $OR=1,1$ (1,0 – 1,2), do que uma variação previamente associada com $p=1 \text{ E-}03$ e $OR=7,1$ (5,1 – 12,3), quando na verdade esta última é muito mais significativa biologicamente. O mesmo processo

é válido para testes de replicação de SNP ou genes candidatos, no qual a estatística clássica sempre testa a rejeição da hipótese nula, não levando em conta que a seleção de determinada variante como candidata não foi aleatória, mas sim baseada em evidências prévias. Novas abordagens estatísticas para estes tipos de estudo já vem sendo consideradas no meio científico, como a possível aplicação da teoria de Bayes. Por fim, a junção das limitações citadas pode determinar a não observação de associação entre fatores previamente descritos e ER, sendo eles verdadeiros.

7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Múltiplos estudos vem demonstrando os mesmos genes associados a diferentes doenças infecciosas. Como por exemplo *PARK2* associado a hanseníase [81, 83, 134] e a febre tifoide e paratifoide [84] e *NRAMP1* com hanseníase [93], tuberculose [135], crohn [136], leishmaniose [137] entre outras doenças causadas por parasitas intracelulares [138]. Outro gene interessante é *NOD2*, amplamente descrito em associação a doença de Crohn [139], o qual polimorfismos foram recentemente descritos em associação tanto a hanseníase *per se* quanto a seus ER [102, 104]. De fato, múltiplos genes associados a doença de Crohn são compartilhados por fenótipos de hanseníase, como *IL6*, *NOD2*, *TNFSF15*, *IL12B*, *CCDC122* e *C13orf31* [102, 140, 141]. Essa correlação genética entre hanseníase e Crohn é interessante e vem sendo questão de debates, aquecidos pelo fato de novas propostas sugerirem um papel muito importante para do *Mycobacterium avium sub-paratuberculosis* na etiologia da doença Crohn [142, 143] e por uma de suas possíveis complicações cutâneas ser eritema nodoso, assim como hanseníase [144].

Alguns genes parecem ter impacto em diversos níveis em hanseníase, assim como *NOD2*. O *NRAMP1* também está associado a hanseníase [93] e ambos os ER [112], bem como *TLR1*, no qual a variante I602S (rs2287195) está associada a proteção a RR [108] e à hanseníase *per se* [90], sugerindo a importância deste SNP em mais de um fenótipo em hanseníase.

Sumarizando, os genes *TLR1*, *TLR2*, *NOD2* e *NRAMP1* foram os primeiros associados à ER, porém, nenhum destes é específico para ER, variantes presentes

nestes genes já foram descritas anteriormente associadas a hanseníase ou suas formas clínicas. Exceto pelo gene *TLR2*, cuja variante funcional (p.Arg677Trp) primariamente associada a forma clínica lepromatosa [145], foi desconsiderada por na realidade encontrar-se em uma região homóloga ao éxon 3 do *TLR2*, 23kb acima do gene [146]. Novas abordagens, como as realizadas no presente estudo, utilizando vias candidatas e perfil de citocinas, visam contribuir para um melhor esclarecimento especificamente dos ER. As vias envolvendo TNF- α são particularmente interessantes neste contexto, em especial pelo fato de que a talidomida, frequentemente utilizada no tratamento de ENH [70], é um potente inibidor da transcrição de TNF- α [147], assim como o “Infliximab[®]”, anticorpo monoclonal anti-TNF utilizado recentemente como alternativa em pacientes com ENH severo [148].

Como contribuição original de nosso trabalho, demonstramos associação entre ER e variantes genéticas presentes em genes responsáveis pela regulação da resposta imune. Estes achados podem levar à concepção de novos sítios de interferência farmacológica, bem como de marcadores prognósticos para o tratamento e prevenção de ER. No entanto, estes são os primeiros passos; novas investigações funcionais envolvendo os genes associados (*IL6*, *CXCL10*, *NLRP12*, *MAP2K2* e *TLR2*) fazem-se necessárias para a evolução de nosso conhecimento sobre o mecanismo de ação dos ER, possivelmente a maior herança deixada pela hanseníase como problema de saúde pública, no caso improvável de sua eliminação.

8 CONCLUSÕES

- a. Foi encontrada associação significativa entre ENH e três *tag* SNP do gene *IL6*: rs2069832 ($p=0,002$), rs2069840 ($p=0,027$) e rs2069845 ($p=0,044$); A análise de DL demonstrou independência entre os marcadores. A análise da variante funcional rs1800795 também revelou evidência positiva de associação com ENH ($p=0,005$), nenhuma associação foi observada entre polimorfismos do gene *IL6* e RR;
- b. A presença do alelo A no marcador rs4859587 do gene *CXCL10* demonstrou-se associado a proteção contra ENH ($p=0,002$), nenhuma associação foi observada entre RR e este *tag* SNP;
- c. Nenhuma diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências alélicas entre controles e casos de RR foi observada para os SNPs rs4351280, rs4801639, rs262672 e rs3779096 dos genes *MAP3K5*, *NLP4*, *PRKCZ* e *RNF216*, respectivamente;
- d. O polimorfismo rs12459484 do gene *MAP2K2*, foi observado em associação a ENH ($p=0,02$), e apresentou uma tendência a associação a RR ($p=0,09$);
- e. Foi observada uma tendência de associação ($p=0,06$) entre RR e o polimorfismo rs3804099 do gene *TLR2*, sendo o alelo de proteção o de maior frequência;
- f. Uma diferença na distribuição dos genótipos entre casos/controles pode ser observada para o SNP rs2416804 do gene *TRAF1* no grupo ENH, sem atingir, no entanto, significância estatística. Não foi detectada associação entre nenhum dos ER e os outros dois *tag* SNPs rs13440146 e rs3761847;
- g. Dos oito *tag* SNP analisados para o gene *NLRP12* foi observada diferença na distribuição de frequência alélica estatisticamente significativa apenas para o rs4539722, ($p=0,01$) com o alelo A enriquecido no grupo controle para RR;

- h. Dos dezesseis *tag* SNP investigados para o gene *JAK1*, o SNP rs2780816 apresentou tendência a associação para RR e ENH ($p=0,07$ e $p=0,08$ respectivamente);
- i. Foi observada diferença significativa nos níveis séricos de IL6 entre pacientes com RR e ENH quando comparados com controles sem ER, pareados por forma clínica, $p=0,009$ e $p=2.4 \cdot 10^{-8}$ respectivamente. Níveis de IL6 encontram-se aumentada em pacientes com ENH quando comparados com pacientes com RR $p=1.0 \cdot 10^{-6}$;
- j. A presença do alelo de proteção à ENH para o *tag* SNP rs2069840 correlacionou com uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis séricos de IL6, no modelo de dominância ($p=0,04$) – não houve diferença significativa entre níveis séricos de IL6 e alelos dos *tag* rs2069832 e rs2069845 bem como para o SNP funcional rs1800795.

REFERÊNCIAS

- .6 Tan, S. A. and C. A. Graham, T. Armauer Hansen (1841-1912): *diocov: 9: 9bdfh: d2) o: dbf l: p9oy. Þingi pore Med J g i i i i 9 (i):(pi(i i i -i -*
- i i- WHO:W <http://www.who.int/p/wi2c/ct/9/f2ctoh//to:W HHHH:W WoIdW HeHthW Ot: HOH:HOH:OWV>
- HWV Key:KH(B) 9i/wBB?/?Wh/Wo9Bwov0Bv/otL/p/9Fo) cwic/wc wi2NMHHHW[CH[dVHHHW HH/HH/HHHH];K AvH:HB;[K ftzm:K [http://h\[thH \[K\[/Hzm/b;z: s/s\[H/k wH;Hms/butH\[dwH\[V wzt;dsz;d\[stw\[s\[tvzu/dwH dHHV](http://h[thH [K[/Hzm/b;z: s/s[H/k wH;Hms/butH[dwH[V wzt;dsz;d[stw[s[tvzu/dwH dHHV)
- HWV u z/zt:w H[vtW;Hog wch[/c[:WHHHH308vHHH:/wWHHHHwHw
- HWV u z/zt:wu Hw[twH;HwCop p292ti?/wg/gop igw2gwwphyGg/og92phigw2g2Gaiowofw Mygob2gt/9ibp wmp92/wNHG[/ [t:HHHHH31NH:/N HHHHHHNN
- NHN L[L H:GHML/ooogy9op w/?itigboL/p9ooyw H/:HHHHH22LH/:ls HHHHLHHH
- HHL u H/ch[st[t:IL HTbb/9bMoio2gwwmp9ooyigv2gtiqbity/2gigt/9p9/t2tiogw [dHHst:L HHHH28LH/:ls HHLHLHHH
- HHL vzv[/:LHHLP/opP/vwithwP/p9ooyvi 2go/g'ownio/2o' wv 9iggvth/wP iwwP/wPg/owLh[L szch;lsch[/c[lzut /H:HHHHH2 :ls HHHHLHHH
- HHL u Hz;HL:lu HNH[tH;HShort historical on the routes of the control of the Leprosy in Brazil and the State of São Paulo. *Hansenologia Internationalis*, 2008. 13(2): (p.29-44.4
- 10.1 Araujo, A. C. S., *A lepra e as organizações anti-leprosas do Brasil em 1936.* *Mj mórGóM wótOótoOówaldoOrózO36. 12MmM. 115.M*
- MMM G5anj ll5FG. GFDei Daniel de SamaDateGéé76Bj léM.G
- G2.G ChemotheDapyofhlepDoyy. IRepoDhofuWHOStudyGroup. *WBrdWj althW réamWj chW Rj pRj rORéÉR. 1477p. RR2.R*
- R3.R R R5 *GlobalhbpDoyyhituation, h2010* RR klyEE5dj m5BRj c620R0. R32R35mFE. R3yR R8.R
- RR.R R R5. *LbpDowhpDvalbnchDatbv, hdataDpoDtvtoWHOhavhofthbhiSSininShofl2009.* R 20R0R R R0/02/20RR];R Rvk5klf b f] Bmyb <http://www.lwhB5nt/lfE/y3ykt5Bm/LEPPbbTEjbN200éIEdfb>
- b5lb *L DáfEovhãEuaçãoEpEdbmEóãEahalHanvbnávbh1994H2ó9H200éHb8/05/20bb];b bvk5klf b f] Bmyb* [http://nfwEkhBÉ/b\]k/5ndf xEhE?BEt5m=cBm dBcmkn&tkyk=dBc df tk5y&é5l =bbyy&wf m5l=b23b](http://nfwEkhBÉ/b]k/5ndf xEhE?BEt5m=cBm dBcmkn&tkyk=dBc df tk5y&é5l =bbyy&wf m5l=b23b)
- b6b b] Byy5b b 2F7b *HanvbnávbnohBDavil: hDadvhbhindicadoDvhvblcionadov200é6 B] kyil5kyb 5nyFé] 5Bklkwkúdí 7b*
- by7b EdmBnd6b 7LbpDowhandHE: pEd:HLHMbdEcaandHLuáuDáHEtoD6í d7b 57F5m657b JBNí y6kndK7b] 5KfyBm20066Ní wYB] ky5kmb] 5léi Wnfví] yFyP] í yy2bé7b
- b87b Tkn6wY7kndb57b] kKkn6L D aubDHa8vb8H(MB4MM9M2)hdEcovbDbDhofthbcauvbhofh d) Doww2v5mékEB] í lb í d5klhBy] nkl62008799byntEY520b52b7b
- bé7b b1F] 6b 7b Fkl7Lb) *Dowlavlu{ b8tEhdEvavb2b kmmlbí nBmí 620bb799bb2nyE7b éb úb7b*
- 207b KlkFy] 6P7b 7b Fkl7Lb) *DbtctE8hofMvcoactbDEu: h6) Dab8avaácaDEbDHEh) o) uátE8vh foDw h5l5ntb 5:] Bb5l6b ééú7B1bbbnEY2ébyb5b7b*
- 2b7b B] BycK6b 7b Fkl7Lb) *aDatEvbh(b8o: Evhofthbcb) Dowha8dhtubbDcáhbacá7b b] y7b b 5:] Bb5l6b 6200071117E7b ú5bb27b*

- 22Y T]ymknbb Y Yí FklYbPDbababhzoo8otEchbwDvvhEhthbhvouthbD8hU8Ebdh(tatbv2Nb Eméllh í d620bbYB66bbynEYb626búYb
- 2úY 5Blí 6wTYí FklYbMawEbh(b8bhdbcavhEhthbhbwDvvhbacEáuv2NkFy]í 6200bY 000b682únyEYb00yLb0bbYb
- 2bY wKí Ek]d65YbThbhExwbxE b8taáx EbvabhThathToáowvthbhI8jbctE8hofhHu: a8h I bwkowIBacEjEtoH ootII advlofMEcb2]ExEbb í d66é60Y000búnyEYb55b5bYb
- 25Y K5jckKí 5ní]6b FYkndbEYEWFB]y6l ttb: wtvtohbvtabjEhthbhax: adEjoh(x avvwuvh 8ovb: cEctuvhI E82hahah: odbjfoxtHbhvtudvhoFjBwxow2h2RbwoxthofjBwxo: atoEdh jBwxowhEha8hbxwbxE b8tajjvhEfbctbdhax: adEjjo2vntF]bYí E] b5 Fkí]bb ycBbkcFD5y6 béybYB bDnyEY6éDby02Yb
- 26Y B]FFBnbb YkndbDNYBYBckwBBd6l bwkow2Ykncí F6200bYB03bébb6nyEYb20ébbéYb
- 2yY JkcBbyBnbb YkndhYK]kKí mbyKl6l bwkow2Ykncí F66éééYB03béb5DnyEYb55b60Yb
- 28Y wcBlk]d6DY Yí FklYb hbh o8tEuE(hI hajjb8(bvhoFhI bwkow2515mYb 5:]Bb5BlYb í vYb 2006Y00b2nyEYDD8bD8bYb
- 2éY b5dlí y6DYwknbb Y Y]BEI5né6l jawEcatE8hofjBwxowhaccoxDE(htoHE : u8Ev2hI h fEbl(xouwhvvtb: 2vntF]nkF3nklB]By]nklBíblí E] ByybknbbBFkí]ybb ycBbkcF5ymb d5yí kyí 66é66YB0bDnyEY255b2yDYb
- D0Y Ykkmky]k6b YKbYuyí my]k6knbb YbDí kny6x bfEIE(hwotbctEvhxbvwo8vbvtoHh wathokb8v:kvtoKEbhxofEbvEhIbwkowvIbvE8v2vc5 mci 66éé6Y00yEY2yyb2yéYb
- DbY I hb: othbxawhoFjBwxowhfoxtco8txojhwokxa: : bv2b B]ldbb í klFKb5]éknblí cKbb í Eb wí]66é82Y070yEYbDDBYb
- D2Y KkKkwFk6wPYbWYb kklí]6knbbDNYBYBckwBBd6l bwkowhtvwhMxbactE8vha8dh bxvthb: a8Bodovu: hBwxovu: 2b nk5ybB]ky5í 5 Bbdí bDí]mkFBIBé5k62008Y68bbnyEYb y5b2Yb
- DDY bknmqí 6BYí FklYbI kbhlvha8hI: woxta8thREvkhI actoxfoxhO8vbtha8dhkbqubjabhofh Rbvbxvajh RbactE8vh Ehb VEt8a: bvbh I atE8tvh wEhh I bwkow2W515nEckl1 wní cFBqql D5j aq q6200qY00bbndEYDDb0Yb
- DbY bí k6TYb YknbbPYb W5í 15né6x bjavbdltvwhhvwxbv8vEVEvhxbactE8vhfojjowbdhbvh bxvthb: a8Bodovu: hBwxovu: 2vntF]Yí E] b5 Fkí]bb qcBbkcFD5q66éé8Y00bDnyEYDb6b 2qYb
- D5Y b B]kí q6b Y Yí FklYbkbqub8tEajhbxvthb: a8Bodovu: hBwxovu: h8dhkbvbxvajhxbactE8h wEhhvE EjaxhvbE8ajcvtokEbh RNI hwattbx8vhEhalhoxdbxjEbhjBwxowhwatE8t2B]b]b Dí]mkFBIB6200bY000bbndEYbq5b8bYb
- D6Y b Bdl5nbb Y Yí FklYbI8vEuEdb8tEcatE8hofrcbjjvEhhu: a8hBwxowhKxa8ujo: avhwEhh : o8ocjo8ajh8tEodEvttoEbtbxjbukEIB2ha8dHEvxcbwtox2]vnmqnl66é8bY080b6ndEYD085b60Yb
- DqY w]í í n5vkqknPYí FklYbI bwxo: atouvjBwxowhwatE8tvhhowhI hbjwxbW]jEbhcvtokEbh wxofEbhvEhhdfbx8tEajhbxwbvE8hofEbtbxjbukEIBV6hdvxEkltvwhIha8dl2hxbactE8v2v nmqnlBIBéq66éé8Y00bbndEYb52é6D6Yb
- D8Y b5dlí q6DYwknbbKYb Ybkd56l hhhhEtojekEajhcouxvhofhxbactE8vhEhbboxdbxjEbh jBwxowh8dlthbEhoutco: b2vntF]Yí E] b5 Fkí]bb qcBbkcFD5q66é8bY00bbndEYD8D6é2Yb
- DéY vknbl]kklí l6b Y Yí FklYbI hbnI IRH ohoxtktudv:HEvvtEkatEbhkxwdEctE8,ldbtctE8h a8dhwathokb8bvEhofh8buxowathvha8dhxbactE8vhEhBjBwxow2hV bthodvha8dhbavbjEbh xbvujtvofhIcohoxtHofh ujtEacEjjaxvBwxowhwatE8tvhEhI8oxthI8dEa2Yí E] b5 v62005Yb 70bbndEYb bDbYb
- b0Y wBqk6b Y Yí FklYbV vcobactbxEu: hBwxablx NI hawocEatbdhwEhhtvwhVxbactE8vhEh vEkbjbjbvE8hwaucEacEjjaxvBwxowhxbatbdhwEhhvEkbjbdovbxifa: wE,lofjoxacE,ha8dh : EocvcjEbb2b m]E] BEbb í dlb qé6200qY77b5ndEYb2é6DDYb

- bbY PBckF]] k6YY6i FklY6l jBEajhcouxvbhofhbxvthb: a8odovu: hjbwovu: :ha8hVVIvbaxh
cohoxtvtudvHvHvdxabad,h8dEa2b m]H]] BElb í dlb qé62006Y70b5ndEY868bqé Y
- b2Y vknbB] kki l6b Y YkndbwYBKKkwkq6Nbxvbhfú8ctE8hE waE: b8thEhjbxov:ha8h
bwEdb: EojokEajh8dhc]jBEajhtudvIII axth2:hRbvujtvhofhvtbxoEltxat: b8t2Yí E]] b1 v6
béé6Y07b2ndEYb0b8b8Y
- bDY b kF] q6 b FY6 x EtEkuEhEkh bbtwbb8h xbjawwbh a8dh jatbh xvbvxvajh xactE8h Eh
: ujtEdxukhV x l wtxbatbdHl hjbxov2Yí E]] b1 v6200bY70bDndEY250bDY
- bbY wBqk6 b Y Y6 V axcadoxbvh V ojbcujaxbvH: u8ojókEovh bh l b8étEovh davh RbaçVbvH
Ha8vê8Eav6200é6Unfví] y5kdi fí dí] kl6l lb B5ayyb B5anfK3E] b2 b
- b5b b knkndKk] 6b YjY Yí b kyF] 6kndlá b] BcKí 6REkfactoxvfoxhbxvthb: a8odovu: h
jbêxovu: 2mH]Yí E]] 5 Fkí] lb qcBbkFD5q6bééé Y07bDndEY2q0b8Y
- b6Y B1 cxBlí qm5nk6b YkndbDYB1] Kí 6Occuxxb8cbhofhxbactE8v,hthbEhdEak8ovEha8dh
: a8akb: b8thE]jbêxovwêatE8tvHtxbatbdHê Ehh ujtEdxukHthbxaéV;hxébxE8cbH]thbh
jbêxowhco8txojhêxokxa: hofHthbhl jhl fxEahl bêxowha8dhRbhahE]atE8hl xaE]Ekh
l b8tbxHl l ERI êH]EthEêEa2mH]Yí E]] 5 Fkí] lb qcBbkFD5q6bééé2Y00b2ndEYbqD8bY
- bqY b Fk5mqBndwE Yí FklY6x btctE8hofHl IV, ,Hl IV6,hu8dHl IRH]thbljbêxowhvkE]jbvE8v]ofh
êatE8tvHduxEkléxbd8Evojo8b]txat: b8tfoxHtvêbH]Hl VRêHxbactE8v2mH]Yí E]] 5 Fkí] b
b qcBbkFD5q6200bY70bndEY2qD8bY
- b8Y b B] k1 q6b Y Y6i FklY6l vtokEbh: RNI hbxéxbwE8hE]jbêxov:ha8hE]jbhxo]bhfoxb
E]tbxfbxo8lka: : ahu8dH]tbx]bukE]V2H]xbactE8vHkRRhu8dHENI é2vcknd]bmmqnBl6
bééé Y00b5ndEY5bbéé Y
- béY b í mkmBq6wN Yí FklY6Exvthb: a8odovu: hjêxovu: :hu]jBEajh a8E]v]tatE8hofHthbh
axthuvêhb8o: b8o82Ykrcí F6bééé Y0bq62qndEYé DD8bY
- 50Y KkKkw5K6wá b kndb I oê axdvhu8dbxvta8dE]kHthbhêathojokv]hofh
bxvthb: a8odovu: hjêxovu: 2]] km]b lwBc]] BElb í dlb qé62008Y000bndEYD2é bDqY
- 5bY b kbklkq6b Y Y6i FklY6l hbH]Etoêathojokvhu8dH]Etochb: E]txv]ofH]Exvthb: a]Nodovu: h
l bêxovu: 2mH]Yí E]] 6é65Y88qEY28bbéé Y
- 52Y 515ví 5 k6b Y Y6i FklY6NbutxoêH]v]E]v]ojatbd]fxo: hjêxovwêatE8tv]k]b]avbHl NI Iajêhah
a8dlbxH]E]laccb]xatbd]uêoêtovE]H]v]Exo2Yí qk]Bc]B]l6bééé Y00bDndEYD6bbq]bY
- 5DY DBmí] 6b Y Y6kndb]Y Y6wK5ví lq6l hbh"l ucEh"hb8o: b8o8"H]hd]ffuvbh]b" xov2b mmb
wH] mb í d6é6q Y07bndEY8Dbb6Y
- 5bY wí Kékl6VNY6l uc/6'vh" hb8o: b8o8/b' vthb: ah8bc' ot/ca8v2mH]b]bDí] mkFBl62005Y
00bqndEY602b5Y
- 55Y YkFkE5F Ykndlb Y5Kkví c]ZkmB] k6l h"""" ott"d"j"" o"" ofl uc/6:hu8h8t' oduct/68]to]t'h
cj/6/ca]hu8dlh/'to]ok/ca]j]Htud" 2mF]Yí E]] 6ZéZ8Y00qEY2ZZDqY
- 56Y Yqc5BZ YkndZY]Zlvk] kdB60"u"cu]ojH'o" "H]jh ajld"lka8H aza' o]o]H]j"fa8c/a"/ld"ho" h
l'/'ko"ZL ZL q] éq5kZ]5k6Z í x5B6Z852qDZ
- 5qY Z km6XY6i FklY6l H8"" W"co"act"/u: k""c"/"lcu"/8k]d]ffu""H""o: atou"H""o""Z
ZmZ]515mZ kFKBl62008Y080Z6ndEY856Z6Z
- 58Y wH í km6Z Z Y6i FklY6l """"": "8thofha8t/II IIIha"haH"ok8o"t/ch: a'k""hofH]""o""h
""act/682mF]Yí X]] 5 Fkí] Z qcBZkcFD5q6Zéé8Y00ZndEYD56Z6Z
- 5éY wkmXk5BZY6i FklY6l: : u8ojok/ca]j]H"act"/"W 2j"" a"hu8t/k"8"H /thH "j""a8c"hoH
d/ak8o"/hu8dH]acc/6"hd""jo": "8t2BZ 5Zmí cFD5q620ZZY00qXZ26Z
- 60Y wH í km6Z Z Y6l hajj"8k""h]8]th" h"o"thk"8o: /ch"alfo' lth"hd""jo": "8thofH]""t"lfo' h
j""o""ld/ak8o"/Z]í vZBc]] kqZ í dZ]] BX62008Y00 Suppl 0qXZ6éZéZ
- 6ZY wH Z Y Z Y6i FklY6lH8k]tuHl "" "hVh] tok/6"hl "8"h/' "" "" ""/68ha8dh
V"cha8/": "H ""oc/at"dh" /th]a'j]H "" ""o""H'ok"" ""/68Z]Kí] BqÂnk]lB1]mí c]F]Bq]l
D5qí kqí q6200DY088ZqndEY02ZZ0DZ

- 62V wĤ íknfZZ V ZĤ í FZklVĤI ot"8t/ajh"ja": ah: a'k""hofhl ""hVha8dhl ""h2hj""o""h
 ""act/8":lāh' "j/ βa""h""o'tBZ 5Zmí cFD5q6200é V0qXVq5V
- 6DV ZléBbdGZ V ZĤ á YVY5nZkmdZJYVFlqmnZĤI u: o'h8"co"/hfacto'ha8dhch": ok/8"h
 /8t""act/8"y8lth"lfo': at/8lha8dh a/8t"8a8c"lhf'k'a8ujo: a"y8lth""cujo"/Z515nZ
 wí cFD5q62005V00 Suppl 8qXVZ8éZéDV
- 6ZV wcBllaÂdGD. I8c' "aX"dhl XI I Vóhl "X"jha8dhl "8"h/' ""XX/8h/8hl X""hVh
 I ""oXhR"act/8XZ515nWkcc5n ZmmqmBl620ZZV
- 65V ZBckí GZ VĤ FklVĤ h"Ĥff"ctXofud""8oco't/cot'o"/cho': o8"kl I I H"y8lj""o: atouXh
 j""ah"act/8ZmFjZí XÂZé5ZV00ZnqXVZDqZ5V
- 66V Z klkí ÂZwYVZkmdZDNYBckwBBdGĤI ""oXhX""hVhk"X""Xaj"h"act/8Xha8dth"/h
 : a8ak": "8tZí XÂZí v62008V 0ZZnqXVZDqZ286V
- 6qV YBckwBBdGDNYVZkmdZ V Z5mKkGĤI ""k8a8cXha8dh""oX:luko: ""h"8Xh"lj,t""atu""h
 "X/" ZmFjZí XÂZ Fkí ÂZ qcBZkcFD5q6Zééé V0 ZNqXV6Z2V
- 68V Tkđí qqí GZ VĤ FklVĤ/ff"cthoflthaj/do: /d"l8lth"Ĥ""XX/8hofl NI Iaj" hah IRNI lū8dh
 X8th"Xh Hofl NI Iaj" hah/8hc"jjXhf'o: hj""oXh"at/'8tXh" /thh"X"Xajh"act/8Z
 wmmqmBXKkÂnkBlZmmqmBFbx5Bl62006V08ZnqXVZDZ2ZV
- 6éV Z klkí ÂZwYVZ VZ Z kĤ ÂZkmdZDNYBckwBBdGĤI h"h"oj"hoflthaj/do: /d"y8lth" h
 : a8ak": "8thofl"Xth": al8odoXū: lj""oXū: Zí XÂZí v6200qV 8ZnqXVZéqZ2Z5V
- q0V áí nmkGZ VĤ FklVĤ aj/do: /dal8oht'ata: "8tohdok' /t": al8odoXoħa8X√"8/co:h"X/X
 √EohXt": √° t/cahdok'8Xa/8Xcj√ ≠8/coXh"Ĥ""X"ct/XaXd"l8oXaXy8X"Xt/ka√β
 √μ"XZ nk5qBÂqđí 5ÂBqđí Dí ÂnkFBlBé5k62005V30qXV5ZZZ22V
- qZV Z BÂkí qZ VĤ FklVĤ 8t/8fja: : ato'Xld'ukX'jockhXtok/8"h RNμluccu: ujat/8h8h
 th"ħk/8ha8dh: ""oX"lth"cj/β/cajko8d/t/8hofl"act/8ajh""oXh"at/'8tXZjZmvi qFZ
 Dí ÂnkFBl62000V000Z6nqXV6D5ZZV
- q2V wkmXk5B6XVĤ FklVĤμ"8to' /fXj/β"hd"co" aX"Xy8hX/Xoħa8dh8hXt' ohtu: ou'ħ"co"oXh
 fact'o'μaj" hah kμNμaj"ha"ħ ""oduct/8h /8h j""o: atouXh j""oXh "at/'8tXh " /thh
 ""Xth": al8odoXū: lj""oXū: Ĥ/Nμ"Z515nXxXZmmqmBl6Zéé8V000ZnqXV000ZV
- qDV ZĤĤ ÂZ VĤ FklVĤμ""oXhaXh"8"t/ch od"jfo'ħXc""t/ /tXhtoko: : o8y8f"ct/ouXh
 d/X" aX"XZ qmknZí mí Fcq62008V008ZnqXV2qZ2D5V
- qZV Z 5l5kmqGZ DVZ í FZ klVμ "j/cat/8Xh ofh h/khh j"X"jh" X"udok"8"ht'a8Xc' /t/8h /8h
 V Xco"act""/u: Ĥ""a"ZBZ 5Zí mBm5q6200é V00ZnqXVDeqV
- q5V wK5 ldqZXDVDVZ Zqqí ll6kmdZ V Záí Â5ckkZkrcí Gμ"8"t/ch"/d": /ojokXhoflth"ħ
 Xūc""t/ /tXhtoh""oXZjZ515nZmvi qFZé8qV 0ZZnqXVZDZéZZV
- q6V 5KkkÂkvkÂF5Z V kmdZVVBéí lGμht" /8hXudXh8h""oXZwFqFékÂFZí BÂZĤK5 mí G
 ZéqDV
- qqV ZZí l6YV kmdZVDí mí nk5qG "t"ct/8hofh ajo'ħ"8"Xfo'ħXc""t/ /tXhtoh""oXlū8dh
 /Xh"tX"Xh8laha' / ""a8hXa8d:h "X/ ad"ħXa8dZLmZJZ qmZí mí FZé88V00Znq
 XV56Z266V
- q8V YkckÂB6FVĤ FklVĤμh ajo'ħ"8"ħco8t'ojXj""oXhXūc""t/ /tXh8lāhX""8d": /ch
 Xojat"dl'o"ujat/8lf'o: l8o'thoflB'azjZmí cFD5q620Z0V000Z0nqXV5é8Z605V
- qéV wĤld5q5Z ZĤ VĤ FklVĤμh: ajo'ħXūc""t/ /tXhjoXhfo'hj""oXh8h8d/ah: a"Xtoh
 ch'o: oXo: "Wó"V, ZNkFqÂ Zí mí Fcq6200ZV0 ZNqXVZDZéZZZV
- 80V ZĤĤ ÂZ VĤ FZ klVμ"8"t/ch a8dh fu8ct/8ajh a8ajXh ofh co: : o8h V RμVh ""o8h 7h
 "ojX: o""hX: Xh8h""oXhXūc""t/ /tXZL qmZí mí F620Z0V00 ZNqXVDDqZ8V
- 8ZV Z 5ÂGZ VĤ FklVĤkuXc""t/ /tXhtoh""oXhXaXoc/at"dh" /thhμRK2ħa8dhμμRμZ
 NkFqÂ 6200ZV00 Z6éq5nqXV6D6Z6Z0V
- 82V Z 5ÂGZ VĤ FklVĤμh'o: oXo: "hRq25hXh/8k"dhtohXūc""t/ /tXhtoh""oXh8hah
 VĤt8a: bvbhwujatE8ZNkFZí mí F6200DV08ZnqXVZ2Z5V

- 8DZ Z kKBÂkGZDYZKZDkÂv5qKZkmdZwZwBBdZμXoc/at/08hXtudXho5h: ajo'h' /XhX/8kj" h 8ucj"ot/d" h" ojX: o' " h/X Xh/8lth" hco: : o8h "kujato' Xh "k/08h05μμRK2ha8dhμμRμh k"8"Xh" /thj" "" oXXh/8la8h8d/a8h' o" ujat/082XqÂV BqÂnklBíZL qmknZL í néF5cQZ006Z 00ZnqXZD8ZLZ2Z
- 8ZV Z15ZwZí FZklYZμμRK2/μμRμh" ojX: o' " h/X Xha8dhXuXc"" t/ /tXhtohtX" ho/dha8dh "a' atX" ho/dh5" X" Z515nXxXZmmqmBl62006V000ZnqXZL25ZDZV
- 85V Zlck5qGZYZí FZklYZkt"" /X'h' "" j/cat/08h/d" 8t/5' Xhahjo" μ' oduc/8khjX: "hoto' /βμ [] j" h]]hjj"j" h X] h]jo' h /Xkh] cto' h' h'] jX[08X" thj"" oXXZnKfZL í m F6200qV80Znq XZ5ZqZ522Z
- 86V Z 5ÂkGZ YVZ ["8"t/ch hoXh " X/Xt] 8c" h] 8dh XuXc"" t/ /tXh toh j"" oXXZ L 5cÂBZ5 qZ wní cFBn62006V8ZnqXZLZ2ZZZDZV
- 8qV ZBq6wZ FZklYZ u: o' l8" c' oX/Xh] cto' h' o: ot"" h" ojX: o' " h/X h] 8dhXuXc"" t/ /tXhto h j"" o:] touXh"" oXXZwní cFD5qGZééqV 0ZnqXZ5D0ZV
- 88V wknfBqGZYZ FZá VZwqíqqGZkmdZá VZVkmí ÁZBÂéKfZRo] "ho5tu: o' h8" c' oX/Xh] cto' [] j" h] h] 8dh/8t"" j" uk/8[Vóh" o: ot"" hk"8" h" ojX: o' " h/X Xh/8h] "" oXXZ] BqÂnklBíZ wní cFBqZd5qí kqí 62002V80ZnqXZL68qZL6éZV
- 8éV Zkíkl5nékmGZYZDá VZw5néklGZkmdZNVZ í KÂkG ['] 8X" o' t"" h] Xoc/ t" dh" /thj] 8t/k" 8 ["" oc" X/8khk [["hk"8" Xh] 8dhXuXc"" t/ /tXhtohtu"" cujo/dh] "" oXXh] 8dh" uj: o8] ' Xh tu"" cujoX/XZT5qqí Z mFéí mZLééqV 00ZnqXZL68Zq2Z
- é0V Z Bné6wZ Yí FZklYZ ["" oXXh] 8dlth" h] d] " t] t/08h05hu:] 8hto] j] k" h" c"" to' hZá YBwZ ákFKBé620Z0V0qXZL Z000éqéZ
- éZV Vkmí ÁZBÂéKfZ á VZ í FZklYZ H [[' RBV*ó4h] 8dh' RBV*Vóh] ' "h] Xoc/ t" dh" * /thh " X/Xt] 8c" h] 8dhXuXc" * t/ /tXh, h" " X" ct/X" jXh/8hB'] z/] 8h] 8dhV/ t8]: "X" h] " * oXXh *] t/ 8tXZL í m qZmmqm6200qV8ZnqXZV020ZV
- é2V Z1F ÁZLZYZ í FZklYZ Hu:] 8h ["ukocXt" h [8t/k" 8h [j] Xh [hR" k/08h k/8kj" [Nucj" ot/d" h [ojX: o' * h/X Xh] ' " h] Xoc/ t" dh" /thj] "" oXXhkuXc" * t/ /tXh/8hV/ t8]: h] 8dh [8d] Z] Z wní cFD5q620ZZV08Zé nqXZL2qZBZV
- éDV ZZí 16YVkmíZ YDí qqí 5n6kuXc" * t/ /tXhtoh] "" oXXhXj/8k" dhtoh" hu:] 8hNR [V [Vh k"8" ZBqÂnklBíZwní cFBqZd5qí kqí 6Zéé8V 0 ZnqXZLDDZZ5Z
- éZV Zlck5qGZYZ í FZklYZ ['] 8ujo:] touXhR"] ct/08htoh [8t'] d' :] jh [8j" ct/08h05h ["" o: /8h kV /tXud] hR"] ct/08" h] Xh] /8k" dhtoh" hHu:] 8hNR [V [Vh] "8" h/8hV/ t8]: "X" h] " * oXXh k/ Xh/ XZT Kí ZBqÂnklBíZwní cFBqZD5qí kqí q62000V80ZnqXZV02ZD08Z
- é5V ZBq6wZ FZklYZ Xoc/ t/08h05Xt]: /8h h" c" * to' h" 8otX" * h' /thj] "" oXXhX" " ZBqÂnklZ BíZwní cFBqZd5qí kqí 6ZéééV 0ZnqXZL8qZLéZV
- é6V Z kKBfÂkGZ DYZ í FZklYZ [[[Vóh" * o: ot"" h X/8kj" h 8ucj" ot/d" h" * ojX: o' * h/X Xh] ' " h X/8/5c] 8tjXh] Xoc/ t" dh" /thh" X/Xt] 8c" hto] h] "" oXXZL qmZL í m F62005V008ZnqXZL 2é5ZD00Z
- éqV wknfBqGZYZ Yí FZklYZRo] "ho5tu: o' l8" c' oX/Xh] cto' [] j" h] h] 8dh/8t"" j" uk/8[Vóh" o: ot"" h k"8" h" ojX: o' * h/X Xh/8h] "" oXXZwní cFD5q62002V80ZnqXZL68qZéZV
- é8V áí Á 5ÂkGZ YVZ FZklYZ ["8"t/c, h" /d": /ojok/c] jh] 8dh' /ojok/c] jh] 8] jXXh/05h/8t"" j" uk/8 [Vóh" o: ot"" h/8kj" [8ucj" ot/d" h" ojX: o' * h/X Xhukk" X/X] h" 58/tX" h" oj" h' h] 8V9 [/ [h /8h] "" oXXhXuXc" * t/ /tXZL í m qZmmqm6200éV00ZnqXZLqZB0V
- ééV Z BÂkí qGZ YVZ FZklYZ [8t"" j" uk/8[Vóh" o: ot"" h/8kj" [8ucj" ot/d" h" ojX: o' * h/X Xh] Xh :] ' k"" Xh5' h/X] X" hXuXc" * t/ /tXh] 8dh/dX"] X" hX" X" /tXh/8h] "" oXXZL í m qZmmqm6200ZV0ZnqXZL5é2Z5Z
- Z00V 5kÂdBqB65 YVZ FZklYZ [[N [h+874h] > [h/8kj" hBucj" ot/d" h" oj>: o+* h/> h/>] >>oc/ t" dh * /thj] "" o>>h]: o8k hB+] z/] 8>ZL qmZL í m F620Z0V08Z5nqXZL8ZLé0Z
- Z0ZV FÂkncí qcK5D YVZ FZklYZ >>oc/ t/08h" t" "" 8lk/jj" +c" j] h: : u8okjo" uj/8j/k" h" c" * to+h k"8ot>* >h] 8dh] "" o>>h/8hB+] z/] ZT5qqí Z mFéí m62008Z 0Z5nqXZLq8ZB2Z

- Z02Z ZKkméZFYZ FZklY ["8o: " * /d" h] >>oc/ t/obhtud>h5j" * +o>>ZNXméI ZZ í d6Z00éZ 800ZZqmqXZ60éZ8Z
- Z0DZ Z BnéZ WYZ WYZ 5l6kmdZF5 W/kmZí ÂéZ ["8o: " * /d" h] >>oc/ t/obhtud>h5j" * +o>>Z NXméI ZZ í d6Z0Z0B00ZZ5mqXZZZ6Zq;ZkqFKBÂZÍ XlqZZZqZ8Z
- Z0Z Z BÍ ÂÁméFBmZ Z YZí FZklY [o: : o8h*oj>: o+*h/> >h/8hth" hNO+2hk"8" h+"k/obh] +" h] >>oc/ t" dl* /thj" * +o>>h 8dht>h"] ct/>"ht] t">Zmí cFD5q6Z0Z0V000ZémqXZZZ2Z D5Z
- Z05Z 5kÁdBqBZ5Y Zí FZklY [N/βju+βhVh] >*VVó] j] h>βkj" h8ucj" ot/d" h*oj>: o+*h/> h/>h] >>oc/ t" dh* /thh* +ot" ct/obh/βh] " * +o>>h8" +>"hd] :] k" ZJZNí qÁB5mmqnl6Z200qZ 000ZZZmqXZDZ8Z
- Z06Z BBcKqdZ YZí FZklY [ojjh/ k" hR" c" * to+>h [R2* h] oj>: o+*h/> >h] +>" h] >>oc/ t" dl* /thh R" >" +>] jhR"] ct/obh/βh] " * +o>>ZTKí ZBqÂnklZíZmí cFBqQZ5qí kqí q6Z008V00 ZmqXZ 25DZ26Z
- Z0qZ Vkcqí lBmZ Z kmdZá Z V Dí Fmí ÂqZ [ojjhR" c" * to+>h] h] "8t+] jh/j": "8thβh[88] t" h]: : u8" h R" >" o8>" >Zmí cFBmqZ mZmmqnlFq6Z002Z 0ZDmqXZ0DDZ0ZZZ
- Z08Z Z 5qKZ XZ YZ í FZ klY Hu:] 8h [[RVh + "5c"/8c>h [>h [>>oc/ t" dh * /thh [: *] />" dh V >co"] ct" +>] jhk/8] j/βkh] 8dh] +ot" ct/obh5o: h] " * +o>>hR" >" +>] jhR"] ct/obZá YBwZí élZ TÁBXZ5q6Z008V0Z5mqXZ 2DZ
- Z0éZ 5mqí F5K5 YZí FZklY [h" h*oj>: o+*h/> h], V5 [h5hu:] 8htojj/ k" h" c" * to+>h] h] : *] />h /β8] t" h/ : u8" h >" >βkho5h: /c+o" /] jhc" jhh"] jhhco: *o8"8t>Z] Zmmqnl6Z200qZ 0 8ZZ0mqXZ6D8qZéZ
- ZZ0Z wcKqÁméZ YZí FZklY [oj>: o+*h/> hN248kh8lth" hu:] 8h] ojjh/ k" h" c" * to+>h] h] "8" h>h +>] t" dthj" * +o>>h 8dh] " * +o>>h"] ct/ob>Zmí cFD5q6Z00éV000ZZ2mqXZ8Z6ZéZ
- ZZZ Z BÍ ÂÁméFBmZ Z YZí FZklY [o: : o8h] oj>: o+*h/> >h/8hth" hNO+2h ["8" hR" k/obh] +" h [>>oc/ t" dl* /thj" * +o>>h 8dht>R"] ct/>"ht] t">Zmí cFD5qZ
- ZZ2Z Tí 5í 5ÁkZ Z YZí FZklY [NR [V [Vhk"8" h*oj>: o+*h/> >h/βh/βd/>du] j>h* /thh] " * +o>>h +>] ct/ob>h] tt"8d" dh] th* oh"5" +>"8c"lc"8t" +>hβR" c/5", lβo+th"] >" +>hβ+] z/] ZZí vZBcZ BÁkZ í dTÁBX6Z0Z0V08ZDmqXZ8Z6Z
- ZZDZ Zkmqí 6BYRecherche de facteurs génétiques influençant deux phénotypes liés à la lèpre : la réaction granulomateuse de Mitsuda et les réactions de réversion65nZ FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS SUD2007, UNIVERSITÉ PARIS XI: Paris. p. 217.Z
- ZZZ Z TÁ éBqí F6DZ YZí FZklY [h8" * h] jko+th: h5o+th] *jot>" ["] >" dh] >>oc/ t/obh] 8] j>>β: hth" h ktoch] >tc/ V h] jko+th: ZZmqZ qmZí mí F6Z00ZV08Zá FZmqXZ65ZqZ
- ZZ5Z KqmkÁZ BYZ WZ DBéÁkZ kmdZ WZ KkqÁZ /> /d": /ojok/c] jhch] +>] ct" +>tc>h5h] " * +o>>h +>] ct/ob>hV5h>"] +>h" +>" +>"8c" h5o: h8o+thh[8d/] ZmfZ] Zí XÁZ5 FKI ÁZ qcBZkcFD5q6Z 200Z 0ZZmqXZ25ZDDZ
- ZZ6Z Y5nZá WZí FZklY [Nohk"8" h>h] 8h/s] 8d: hth" h5] / [5o* h" h"8o: "8o8ZZ mZ] Z qmZí mí F6Z 200qV0ZDmqXZ5DZ8Z
- ZZqZ 5lkÁkí Z Z Z kmdZY Z 5kÁdBmZ [>" ct>ho5o" >" +>βkh] 8dhcj] /: /βkh] jj" j" h5] /> h/βh] >>oc/ t/obhtud/" >ZZí mí FXX5í m5l6Z0Z0B0ZDmqXZ66ZqZ
- ZZ8Z Dqí qZí ÁqZ NYWZí FZklY [+ot"oj>t/ch/β] ct/>] t/obho5hV [[[k/β] >" [k/β] >" h" >h] 8th+] +h j" th] jh] cto+Zw5 mci Zéé8V080Z5D6ZmqXZqDZqZ
- ZZéZ Z FFKlZ Z WYZá í kkZ5Kí w6kmdZ Y YZ cZ kKBmZ [c" t>] t/obho5h /K2h] 8dh[hk] **] hBh kBavbhlYY Zá ÁBcZnkFZ ckdZw5Z UzZ 6Z006V008ZZémqXZ85qZéZ
- Z20Z álí néí Z Z Z YZ í FZ klY [R [[V [[5h] >h] h +>kh jocu>h 5o+th +>" u:] to/dh] +th+t/> [[] h k"8o: " * /d" h" tud>ZNXméI ZZ í d6Z00qV00 ZZ2mqXZZééZ20éZ

- Z2ZV ZKqGZYÍ FZklYZ k/8kj“h8ucj”ot/d“h*oj>: o+*h/ >h] thth“h[R[[V/[5hjocu>h] +“h] >oc/] t“dh/ /thh“u:] to/dh] +th+/>h8h] H] 8h] h/8“>“h*o*uj] t/82BZ 5Z í dZ í mí FZ 20ZZV00qXV5DZ
- Z22V Yí ZBqÁK5q6YVWbí nkB6kmdZWXVZ 5ÁAd5m6NodVh] 8dhNod2h8h88] t“h/ : u8/ >h] 8dh hu:] 8h85] : :] to+>hd/ >od“ +>ZB3cKí mZBcZ Ákmq6200qV80ZáF6nqXVZ ZqéZBZV
- Z2DV Z kémí ÁZ ZWVZ í FZklYZ />] ju] t/8ho5hNod[j/k“h+“c“*to+hkN[R*“h“5“cto+hdo:] /8h /8t“+] ct/8>Zá YBw5 mí 6200é V0ZZnqXV ZéDZV
- Z2ZV Z kcklqqB6FVÍ FZklVÍ oj>: o+*h/ >h8hN[[H[[[RRkN[R*“k“8“>h8h] to“/cl“+ :] t/ >Z XxXZ í ÁmkFBl6200qV00Z8nqXV 6é2BZV
- Z25V wcK5mllí ÁZ5VZDXYZ í vq6kmdZTVZDí cki ÁZjI Y[k[[[h/ >8] j/8k:h5o: h/8t“+5“+o8>htoh c>tok/8“>ZB5BlZ Kí m6200qV080Z28nqXV 2005éZ6DV
- Z26V ZBd5é6WVYZ í FZklYZ />+u* t/8ho5hth“h]] kVhk“8“hd“: o8>t+] t“>ho“j/k] to+>h] 8dh 8o8+“du8d] 8thoj“>h5th“h]] k>h8hc>tok/8“ [/8duc“dh“ /ojok/ch“>*o8>“>Z5í ll6Zéé8V 08ZDnqXV DqDZBZV
- Z2qV wcBlkÁd6DV VÍ FZklVÍ [8c+“] >“dh] > [h/ >8] 8dhVóh] >“j>h] 8dhk“8“h“+“>“> /8h8t>*“hVh j“*+o>h“] ct/8>Z515mV kcc5m ZmmqmBl620ZZV08Z6nqXV ZqZ5DV
- Z28V ZZZkq6Z KYZ ZV Y5cKmkndZkmdZwZá 5llkl6 [/toc/8] >6.5mZ [: u8ojok/] h [j“juj] +“h“h Voj“cuj] +20086klqí v5 ÁZ5BZ í Zkmí 5ÁBV
- Z2éV YkcBFH 6WVÍ FZklVÍ > [R, /h85] : :] t/8,h] 8dh] uto/ : u8“hd/“] >“>ZLmVNZVZ ckdZ wc5200éV00 8qXVDZ0ZqV
- ZD0V w5néK6ZUYÁ VÍ FZklVÍ > [[Vó+h] hc“jj>h] 8dhNYhc“jj>h] >> />h8hth“h+“c+u/ : “8th] 8dh] ct/ >] t/8ho5h] > [R, +h] 8dh] > [[VV+hj“ukoc>t“>hdu+8khV >co“] ct“+] [“8h] 8c“dh coj/ >ZBZ 5ZmmqmBl62008V0qXV 25V
- ZDV Y5éKH ÁZjVZ í FZklVÍ [h“: ok/8“h [[[Vó:h] 8h] dju8cth:] +k“+h5+hj] t“8thtu““+cujo> /h /85“ct/8h8hch/ >+“8ZmFZT qZí ÁZVqméZ5q6200éV08Z6nqXV DZ6V
- ZD2V Tkme6NXYVÍ FZklVÍ [“8“t/ch] >oc/] t/8h““t* ““8h] hch“: ok/8“h“h“ > [[[Vóhk [[Vó,h /8t“+5“+o8hk] : :] h/8duc/“j“h*+ot“/8hVó“h] 8dh>u>“*t/ / >htohtu““+cujo> />Z515mV 5K5mZ cK6200éV000ZZZnqXV 8Z02V
- ZDDV Z kÁF5m c6ZYVÍ FZklVÍ “kuj] t/8h] 8dh5u8ct/8h85f +o/85] : :] to+>h] HV7h“jj>ZLmVNZ YZ ckdZwc52008V0008qXV 88ZZZV
- ZDV Z 5Á6Z YVZ í FZklVÍ [h+o: o>o: “hRq25h/ >hj/8k“dhtoh>u>“*t/ / >htohj“*+o>>h/8h] h V/“t8] : “>“h*o*uj] t/8ZnkFqÁ Z í mí F5c6200DV88ZDnqXV Z2ZZZ5V
- ZD5V Y5Z YVÍ FZklVÍ [[VV [Vh5o+ : “+>hNR [V [V*“k“8“h*oj>: o+*h/ >h] 8dltu““+cujo> /h >u>“*t/ / >h>: h “t] [] 8] j>> />ZmFZT qZí ÁZVqméZ5q62006V00ZZnqXV DZ2V
- ZD6V ZkcBq15ZZ VÍ FZklVÍ Rój“ho5h5u8ct/8h] jh*oj>: o+*h/ >ho5hNR [V [Vh“8“h5+hth“h d“>“jo* : “8th5] +oh8>hd/“] >“ZmllkmmZBwí lZ5q62008V00ZZ0nqXV D2DZ0V
- ZDqV 5kqFí llqcc5ZYVÍ FZklVÍ > [RVh] 8dhk [[VV [Vh*oj>: o+*h/ >h] 55“cth>u>“*t/ / >htoh cut] 8“ou>h/ >h:] 8] > / >h8h+] z/ : h] h] >“ [co8t+oj] 8dh] : / > [“] >“dh>ud>ZBZ 5Z í dZ Zí mí FZ0Z0V00qXV 0V
- ZD8V V5lkl6wZ í FZklVÍ [h“h [t/ > [>h/ Bckhjocu>h8] tu+] jh+“> / >] 8c“htoh/85“ct/8h* /thh /8t+] c“jjuj] +h*] +] > / >h>h] “+ok] t“dh“>hd/ >+u* t/8ho5th“hN+] : *Vh“8“ZJXxXZ í d6 Zéé5V080ZDnqXV 55Z66V
- ZDéV Zdlí ÁZjVÍ FZklVÍ h“h“+ok8o>t/ch“o* “>h5th“hNO+2k“8ot>*“h5+co: *j/c] t“dh] +oh8>h d/“] >“: h] h “t] [] 8] j>> />ZLmVZ kqFÁBí nH ÁBl620ZZV000ZZnqXV 6ééZqZ2V
- ZZ0V Zqí ÁÁ 5Á65WVÍ FZklVÍ] tt>h] c/d>h [[R, h] 8dh] N [] j* h] h*oj>: o+*h/ >h] 8h+] : *j“ho5h 8ut+ /k“8“t/c>h8h] +oh8>hd/“] >“ZLmVZ kqFÁBí nH ÁBl6200éV000Zé nqXV ZZZZéV
- ZZZV wcKqÁÁ6ZX kmdZá VZ ÁBq6 [hco: : o8hk“8“t/ch58k“+“+8th/8h] “*+o>>h] 8dh] +oh8>h d/“] >“?NZn6lZ Z í d6200éV800ZZnqXV 666ZV

- ZZ2Z BÍ KÁZ Z V kmdZXVwKqÁZV >co"] ct" +/ h8h[+oh8>hd/>"] >":h] h" +>/t"8th>* oth">/>Z
wílkmmZBwí lD5q6Z006V00ZZ0mXVZ000ZZV
- ZZDZ Fí lí ÁZ Z FZklYV >co"] ct" +/u: h] >/u: h>u">* "c/>h*] +] tu" "+cujo>/>h] 8dh[+oh8>h
d/>"] >":h] h>>t":] t/ch">/"* h] 8dh "t] [] 8] j>>/>ZYkncí FZwí cFD5q6Z00qV Zé mXVZ
60qZZDZ
- ZZZV FkÁK5DYÁ FklYV/k8/5c] 8c" h>f" +>th":] l8odo>u: h] 8dl">od"+:] h] 8k+"8o>u: h8h
/85]: :] to>+h "o* "jh d/>"] >":h] h coh>+th >tud>h o5h 2462h *] t/'8t>Z Z í d55mí Z
ZBklF5mBÁ n6Z008VB Z5mXVZ8ZZéDZ
- ZZ5Z KkméZTYV kmdZZYV5Kkí G+ "t" ct/8h8h5f ojj]j/k" h" c" *to+h2h[[R2*h ut] t/8h8hth" h
j"* +o:] tou>h"* +o>>h"] t/'8t>ZFXZ wZmmqnBlZ í dZ 5cÁZ3Bl6Z00ZV30ZZmXVZ5DZBZ
- ZZ6Z Z klKBFAZDZ FZklYV [[R2h[+kR77[+* h*oj>: o+* h/>: h/8hj"* +o>>:h+">/>t" dZZ qmZ
Zí mí RZ005V000Z5mXVZZDZ5Z
- ZZqZ áí mnkZV YÁ FklYV Talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico: revisão
sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações.ZZmk5qZ
BÁkq5í 5ÁBqZí DÍ ÁnkFBlBé5k6Z005V30Z5mXVZZZ2Z
- ZZ8Z FkZí ÁZ Z VZ YV í mjí mKkmdZ FVZ BldqçKm5dRZ +"] t: "8th8h" cu++"8th" +>th":] h
8odo>u: hj"* +o>u: h" /th85/+/:] "ZNXné1ZZ í d6Z006V300ZqmXVZqDéZ

Z

ANEXOS A: AUTORIZAÇÃO DO USO DE IMAGEM

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE

TERMS AND CONDITIONS

Jun 08, 2011

This is a License Agreement between Vinicius M Fava ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2684310151651
License date	Jun 08, 2011
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Clinical Infectious Diseases
Licensed content title	Tumor Necrosis Factor and Chemokine Interactions in the Formation and Maintenance of Granulomas in Tuberculosis:
Licensed content author	Holly M. Scott Algood, Philana Ling Lin, JoAnne L. Flynn
Licensed content date	08/01/2005
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	ESTUDOS DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDADE A ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE GENES CANDIDATOS
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Jul 2011
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD
Total	0.00 USD
Total	0.00 USD

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Jun 08, 2011

This is a License Agreement between Vinicius M Fava ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2671921238946
License date	May 18, 2011
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Genetics
Licensed content title	Comparative genomic and phylogeographic analysis of <i>Mycobacterium leprae</i>
Licensed content author	Marc Monot, Nadine Honoré, Thierry Garnier, Nora Zidane, Diana Sherafi, Alberto Paniz-Mondolfi, Masanori Matsuoka, G Michael Taylor, Helen D Donoghue, Abi Bouwman, Simon Mays, Claire Watson, Diana Lockwood, Ali Khamesipour, Yahya Dowlati, Shen Jianping, Thomas H Rea, Lucio Vera-Cabrera, Mariane M Stefani, Sayera Banu, Murdo Macdonald, Bishwa Raj Sapkota, John S Spencer, Jérôme Thomas, Keith Harshman, Pushpendra Singh, Philippe Busso, Alexandre Gattiker, Jacques Rougemont, Patrick J Brennan, Stewart T Cole
Licensed content date	Nov 1, 2009
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 5 Dissemination of leprosy throughout the world.
Author of this NPG article no	
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	ESTUDOS DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDADE A ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE GENES CANDIDATOS
Expected completion date	Jul 2011
Estimated size (number of pages)	90
Total	0.00 USD

Open-Access License

No Permission Required

The Public Library of Science (PLOS) applies the [Creative Commons Attribution License](#) (CCAL) to all works we publish (read the [human-readable summary](#) or the [full license legal code](#)). Under the CCAL, authors retain ownership of the copyright for their article, but authors allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles in PLOS journals, so long as the original authors and source are cited. **No permission is required from the authors or the publishers.**



In most cases, appropriate attribution can be provided by simply citing the original article (e.g., Kaltenbach LS et al. (2007) Huntingtin Interacting Proteins Are Genetic Modifiers of Neurodegeneration. *PLoS Genet* 3(5): e82. doi:10.1371/journal.pgen.0030082). If the item you plan to reuse is not part of a published article (e.g., a featured issue image), then please indicate the originator of the work, and the volume, issue, and date of the journal in which the item appeared. For any reuse or redistribution of a work, you must also make clear the license terms under which the work was published.

This broad license was developed to facilitate open access to, and free use of, original works of all types. Applying this standard license to your own work will ensure your right to make your work freely and openly available. Learn more about [open access](#). For queries about the license, please [contact us](#).

■ BioMed Central Open Access license agreement

Brief summary of the agreement

Anyone is free:

- to copy, distribute, and display the work;
- to make derivative works;
- to make commercial use of the work;

Under the following conditions: Attribution

- the original author must be given credit;
- for any reuse or distribution, it must be made clear to others what the license terms of this work are;
- any of these conditions can be waived if the authors gives permission.

Statutory fair use and other rights are in no way affected by the above.

ANEXO B: CAPÍTULO GENÉTICA DO LIVRO NOTE DI LEPROLOGIA

Cesare Massone

Enrico Nunzi

NOTE di LEPROLOGIA

**Associazione Italiana Amici di Raoul Follereau
Bologna**

In copertina: Cristo guarisce i malati di lebbra. Mosaico del Duomo di Monreale

Manuale di Leprologia

C. Massone, E. Nunzi

Pubblicato dall'Associazione Italiana Amici di Raoul Follereau

Elaborazione elettronica Effebiemme srl - Genova

Finito di stampare nel mese di settembre 2009

TUTTI I DIRITTI SONO RISERVATI

Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo senza il permesso scritto degli Autori e dell'Associazione Italiana Amici di Raoul Follereau

Copie del volume possono essere richieste a:

Associazione Italiana Amici di R. Follereau

Via Borselli, 4

40135 Bologna

Tel. 051 4393211

Sito AIFO: www.aifo.it

AUTORI

Canata Silvia

Borsista Laboratorio sovraregionale per il Morbo di Hansen
U.O.C. Dermatologia Sociale - Centro di Riferimento Nazionale per il Morbo di Hansen
Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova

Cerroni Lorenzo

Professore Associato
Direttore del servizio di Istopatologia e dell'Ambulatorio Linfomi Cutanei
Clinica Dermatologica
Università di Medicina, Graz (Austria)

Clapasson Andrea

Borsista Laboratorio sovraregionale per il Morbo di Hansen
U.O.C. Dermatologia Sociale - Centro di Riferimento Nazionale per il Morbo di Hansen
Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova

Fava Vinicius Medeiros

Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná,
Curitiba, Paraná, (Brasile)

Gennaro Sergio

Dirigente medico I livello
U.O.C. di Neurochirurgia e Neurotraumatologia
Responsabile attività di Day Surgery
Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova

Marchetti Alessandra

Scuola di specializzazione in Radiologia
Università degli Studi di Genova

Martinoli Carlo

Professore Associato in Radiologia
Cattedra di Radiologia, DICMI
Università degli Studi di Genova

Massone Cesare

Professore Associato

Clinica Dermatologica, Università di Medicina, Graz (Austria)

CIRLEP (Centro Interdipartimentale per lo studio del Morbo di Hansen e la Dermatologia Tropicale) - Università di Genova

Mira Marcelo Távora

Professore Associato

Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, (Brasile)

Noto Salvatore

Vice-Presidente International Leprosy Association per le Comunicazioni

Fondatore e Direttore "Leprosy Mailing List", Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova

CIRLEP (Centro Interdipartimentale per lo studio del Morbo di Hansen e la Dermatologia Tropicale) - Università di Genova

Nunzi Enrico

Professore Ordinario di Dermatologia Università degli Studi di Genova

Direttore U.O.C. di Dermatologia Sociale - Centro di Riferimento Nazionale per il Morbo di Hansen Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova

Ravenna Angela

Scuola di specializzazione in Radiologia

Università degli Studi di Genova

Reni Lizia

Dirigente Medico I livello

U.O.C. Clinica Neurologica 1

Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova

Professore a contratto di Elettromiografia e Tecniche correlate

Università degli Studi di Genova

Ribeiro Rodrigues Rodrigo

Professore Associato

Laboratorio di Immunologia cellulare e molecolare – Centro di Malattie Infettive

Università Federale de Espírito Santo, Vitória (Brasile)

Schettini Antônio Pedro Mendes

Responsabile Servizio di Istopatologia Cutanea
Fondazione Alfredo Da Matta, Manaus (Brasile)

Soyer H. Peter

Professore Ordinario di Dermatologia
Università di Queensland, Brisbane (Australia)

Talhari Carolina, PhD

Divisione di Dermatologia
Istituto di Medicina Tropicale dello Stato dell'Amazzonia, Manaus (Brasile)

Talhari Sinésio, PhD

Direttore Divisione di Dermatologia
Direttore dell'Istituto di Medicina Tropicale dello Stato dell'Amazzonia, Manaus (Brasile)

Indice

Capitolo 1. Microbiologia. <i>A Clapasson, S Canata</i>	Pag 19
Capitolo 2. Genetica. <i>VM Fava, M Mira</i>	Pag 27
Capitolo 3. Immunologia. <i>R Ribeiro Rodrigues</i>	Pag 31
Capitolo 4. Patogenesi. <i>C Massone, E Nunzi</i>	Pag 39
Capitolo 5. Classificazione. <i>C Massone, E Nunzi</i>	Pag 45
Capitolo 6. Approccio dinamico alla diagnosi. <i>C Massone, E Nunzi</i>	Pag 49
Capitolo 7. Aspetti clinici cutanei. <i>E Nunzi, C Massone</i>	Pag 61
Capitolo 8. Le lepreazioni. <i>E Nunzi, S Noto</i>	Pag 75
Capitolo 9. Interessamento dei nervi periferici. <i>L Reni</i>	Pag 79
Capitolo 9.1. Diagnostica per immagini dei nervi periferici del morbo di Hansen <i>A Ravenna, A Marchetti, C Martinoli</i>	Pag 97
Capitolo 10. Localizzazioni ORL, oculari, viscerali ed ossee. <i>E Nunzi, C Massone</i>	Pag 103
Capitolo 11. Lebbra e gravidanza. <i>C Massone, E Nunzi</i>	Pag 111
Capitolo 12. Lebbra ed HIV. <i>C Talhari, S Talhari</i>	Pag 115
Capitolo 13. Esami di laboratorio. <i>A Clapasson, S Canata</i>	Pag 119
Capitolo 14. Istopatologia. <i>C Massone</i>	Pag 127
Capitolo 15. Diagnosi. <i>C Massone, E Nunzi</i>	Pag 137
Capitolo 16. Diagnosi differenziale cutanea. <i>C Massone, E Nunzi</i>	Pag 143
Capitolo 17. Terapia e follow-up terapeutico. <i>E Nunzi, DL Leiker</i>	Pag 151

Capitolo 18. La neurolisi. <i>S Gennaro</i>	Pag 161
Capitolo 19. Prognosi. <i>E Nunzi</i>	Pag 167
Capitolo 20. Epidemiologia. <i>S Noto</i>	Pag 169
Capitolo 21. Problematiche del controllo e della prevenzione della lebbra nei paesi occidentali. <i>C Massone, E Nunzi</i>	Pag 175
Capitolo 22. La lebbra in Italia. <i>E Nunzi</i>	Pag 183
Capitolo 23. Dermatologia globale e lebbra: teledermatologia. <i>C Massone, A Schettini, HP Soyer, S Noto, E Nunzi, L Cerroni</i>	Pag 191
Capitolo 24. Per saperne di più. <i>C Massone</i>	Pag 195
Atto istitutivo dell'Ospedale di San Lazzaro	Pag 209
Note di Leprologia: immagini	Pag 211

Capitolo 2

Genetica

V. Medeiros Fava, M. Távora Mira

La teoria che la lebbra ed altre malattie infettive sono ereditarie fu formulata già nell'era pre-microbiologica. La scoperta rivoluzionaria di un microorganismo inizialmente chiamato *Bacillus leprae* all'interno di lesioni di pazienti affetti da lebbra, ha portato Gerhard H.A. Hansen a rifiutare fermamente l'origine ereditaria ed a essere in netto contrasto con i colleghi e perfino con il suo maestro. Oggigiorno disponiamo di chiare prove che l'esposizione al *Mycobacterium leprae* è necessaria ma non sufficiente per sviluppare la malattia. Diversi geni e regioni genomiche sono recentemente state identificate come fattori fondamentali di un complesso meccanismo genico che regola la suscettibilità alla malattia.

Genetica del *M leprae*

La sequenza genica completa del *M leprae* è stata pubblicata all'inizio del 21° secolo. La comparazione genomica con il *M tuberculosis* ha dimostrato una marcata evoluzione riduttiva del *M leprae*, che risulta in un'alta specializzazione intracellulare. Lo studio approfondito dell'espressione genica del *M leprae* ha dimostrato che il 27% del genoma, inizialmente riconosciuto come pseudogenoma inattivo, ha in realtà una trascrizione genica del 43%. Di conseguenza il transcriptoma del *M leprae* è composto da una grande proporzione di prodotti genici inattivi, generati in apparente assenza di beneficio per il microorganismo. La motivazione di un profilo trascrizionale così inusuale rimane ancora oggi incompresa.

Il genoma del *M leprae* è altamente conservato ed i ceppi trovati a livello mondiale vengono considerati geneticamente clonali: questa è una delle maggiori scoperte raggiunte con il sequenziamento genico del microorganismo. La dimostrazione della scarsa variabilità del patogeno suggerisce che il fenotipo caratterizzante lo spettro clinico della malattia sia direttamente collegato a fattori dell'ospite. Pertanto, durante gli ultimi cento anni tutti gli sforzi si sono concentrati nell'identificazione di fattori genetici dell'ospite che siano marcatori di suscettibilità per la lebbra ed i suoi fenotipi clinici, e più recentemente marcatori predittivi per le leproreazioni e per la risposta al test di Mitsuda.

Genetica dell'ospite - studi preliminari

Gli studi di aggregazione familiare sono stati i primi a suggerire l'esistenza di un collegamento genetico tra suscettibilità e malattia. Uno studio classico a questo riguardo condotto da Chakravartii e Vogel nel 1973 ha rivelato un'alta concordanza di frequenza di lebbra tra i gemelli monozigoti (82,6%) *versus* i gemelli dizigotici (16,7%). Diverse analisi di segregazione complessa (Complex Segregation Analysis [CSA]) sono state applicate

ai diversi fenotipi di lebbra, aiutando ad identificare fattori di differenziazione e variabili che possano giustificare il fenotipo familiare e, se possibile, identificare la presenza dell'effetto genico e dei parametri che determinano il modello di ereditarietà. Il più importante esperimento riguardante i CSA è stato condotto nell'isola caraibica di Desirade dove una popolazione endemica è stata isolata e studiata. I risultati hanno dimostrato l'esistenza di un fattore genetico co-dominante oppure recessivo responsabile della suscettibilità naturale.

Geni della lebbra e loci genomici

L'armamentario di analisi genetica molecolare è stato applicato con successo per l'identificazione di varianti genetiche che condizionano le vie immunopatogeniche e di suscettibilità di una malattia così complessa come la lebbra. L'origine molecolare della componente genica che controlla la suscettibilità alla malattia è stato intensamente ricercato tramite studi di geni candidati, regioni geniche e perfino studi di tutto il genoma. Questi studi hanno dimostrato che la lebbra è una patologia con un processo a due fasi: nella prima un gruppo di geni controllano la suscettibilità all'infezione per sé, mentre un secondo diverso gruppo genico controlla le manifestazioni cliniche. Studi più recenti hanno identificato un terzo gruppo genico che influenza, in una proporzione di soggetti, la comparsa di reazione reversal (RR). Nei paragrafi successivi presentiamo un breve riassunto dei fattori genici più rilevanti.

Geni HLA (Human Leukocyte Antigen)

I primi fattori di rischio genetico per sviluppare la lebbra sono stati collegati a varianti del complesso HLA (un gruppo di geni che regola la risposta immunitaria), localizzati nella regione cromosomica 6p21. Le manifestazioni cliniche della lebbra dipendono direttamente da fattori immunitari dell'ospite come il bilancio Th1/Th2, il quale viene controllato in parte dalla presentazione antigenica e dell'interazione cellula-cellula mediate dai geni HLA. Ad oggi, disponiamo di evidenze che supportano l'associazione tra alleli specifici dell'HLA, in particolare l'allele HLA-DRB1, e le manifestazioni cliniche della lebbra. Uno studio completo del genoma in 71 famiglie brasiliane ha rivelato l'associazione tra l'allele HLA-DQA e la malattia. Alcune varianti di geni associati all'HLA sono state descritte come *TAP*, *MICA* e *MICB* in diversi fenotipi di popolazioni diverse.

Uno studio condotto in 22 famiglie vietnamite colpite dalla lebbra ha dimostrato una relazione diretta tra il tipo clinico di lebbra e due marcatori microsatelliti del gene del $TNF-\alpha$ (*TNFA*) localizzato nella regione di geni HLA. Questo studio ha dimostrato che forme polari diverse all'interno della stessa famiglia erano associati ad aplotipi di *TNFA* diversi. Questa scoperta concorda con l'evidenza che supporta l'associazione tra polimorfismi del promoter del *TNFA* e diverse manifestazioni cliniche della lebbra.

Uno studio recente condotto su quattro campioni di popolazioni diverse con origini etniche variegata ha dimostrato che un singolo polimorfismo di un nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism [SNP]) localizzato a livello del paio di basi +80 del gene *LTA*, lo-

calizzato vicino a *TNFA*, è associato ad un esordio precoce della malattia, indicando l'età al momento della diagnosi come una variante fondamentale negli studi di associazione genica.

La regione HLA presenta un'esteso, variabile e molto complesso pattern di "Linkage Disequilibrium" (LD), un fenomeno nel quale un allele localizzato in un gene può di per sé essere associato ad altri alleli di geni posti nelle vicinanze. In presenza di tale LD, è possibile che un allele direttamente collegato alla malattia si trovi associato al gene vicino. Per tale motivo (LD) l'associazione tra lebbra e geni HLA deve essere interpretata con molta attenzione.

Geni non-HLA

Ad oggi, numerose varianti non-HLA localizzate in numerosi geni sono state descritte come fattori di rischio per la malattia, come il recettore per la Vitamina D (Vitamin D Receptor [*VDR*]), il "Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1" (*NRAMP1*), l'interleuchina 10 (*IL10*) e i geni *PARK2/PACRG*. Il gene *Nramp1* è stato descritto originalmente come un gene di suscettibilità murina a diversi patogeni intracellulari. L'omologo umano *NRAMP1* è stato associato più tardivamente alla suscettibilità della lebbra ed all'intensità della risposta granulomatosa alla lepromina (Reazione di Mitsuda).

L'*IL-10* è una citochina coinvolta nella risposta immune di tipo Th2 contro il *M. leprae*. Uno studio che ha valutato cinque SNP localizzati a livello della regione promoter del gene dell'*IL-10* ed ha rivelato un aplotipo a tre marcatori che conferisce un'azione protettiva contro l'infezione leprosa in generale, ed in particolare contro le forme multibacillari. Simultaneamente è stato dimostrato che un aplotipo differente di questi tre marcatori era significativamente associato alla suscettibilità per la lebbra in generale e non a forme cliniche particolari. Un studio caso-controllo confermato da un recente studio di metanalisi, ha rivelato che SNP *IL10-819* costituisce un'importante fattore genetico di rischio per la malattia di Hansen.

Un'analisi genomica completa per la ricerca dei geni di suscettibilità per la lebbra ha prodotto il primo posizionamento clonale delle varianti genetiche che controllano la suscettibilità a diverse malattie infettive. Due SNP localizzati a livello della zona regolatrice condivisa dai geni *PARK2* e *PACRG* nella regione cromosomica 6q25-q27 si sono dimostrati associati alla malattia di Hansen sia in popolazioni vietnamite che brasiliane che indiane, in studi condotti separatamente. È interessante notare che questi SNP associati alla lebbra condizionano anche la suscettibilità al tifo ed alla febbre para-tifoidea in una popolazione indonesiana, suggerendo un ruolo fondamentale di questi polimorfismi nella patogenesi di diverse infezioni causate da patogeni intracellulari. La proteina parkin, codificata dal gene *PARK2* è una proteina E3 ubiquitin ligasi. Come la via dell'ubiquitina sia coinvolta nella patogenesi della lebbra (ed in altre malattie infettive) è una domanda interessante che ancora attende una risposta.

Leproreazioni

Soltanto negli ultimi anni la ricerca si è concentrata sulle basi genetiche associate alla suscettibilità alle leproreazioni e sino ad oggi soltanto tre studi sono stati pubblicati a tale riguardo. Uno di questi ha dimostrato l'associazione tra RR e alleli dei gene dei Toll-Like Receptors (TLRs). Alcuni alleli di un SNP e un marcatore microsatellite del gene *TLR2* sono state le prime varianti genetiche associate alla protezione e suscettibilità alle RR rispettivamente. Altri due lavori hanno dimostrato l'impatto delle varianti del gene *TLR1* nel rischio di sviluppare una RR. Una di queste varianti codifica per una sostituzione isoleucina a serina, causando un segnalazione inappropriata e la protezione verso le RR. I fattori di rischio genetico associato all'insorgenza dell'eritema nodoso leproso non sono ancora stati descritti.

Prospettive

Lo studio genetico di tratti complessi nelle diverse patologie e in particolare nelle malattie infettive è un campo di particolare interesse e di continua crescita. La descrizione delle basi genetiche della suscettibilità alla lebbra potrà portare al miglioramento dei protocolli per diagnosi, terapia e prevenzione della malattia. Inoltre la lebbra può essere vista come un modello di studio per le diverse varianti fenotipiche, applicabili ad altre patologie infettive ed a meccanismi immunopatogenetici. Un'approfondita conoscenza del meccanismo molecolare dell'infezione potrebbe migliorare la nostra abilità per combattere vecchie e nuove malattie infettive.

**ANEXO C: ARTIGO DE REVISÃO “ASPECTOS GENÉTICOS DA
SUSCETIBILIDADE DO HOSPEDEIRO à HANSENIASE”**

ASPECTOS GENETICOS DA SUSCETIBILIDADE DO HOSPEDEIRO à HANSENIASE

(especial para SIIC © Derechos reservados)

Esta revisão oferece uma síntese dos últimos avanços obtidos na área a partir de estudos genéticos epidemiológicos e funcionais.



Autor:

[Marcelo Távora Mira](#)

Columnista Experto de SIIC

Institución:

Pontificia Universidade Católica do Paraná

[Artículos publicados por Marcelo Távora Mira](#)

Coautores

Schneider Francio Angela* Monteiro Sindeaux Renata Helena* Medeiros Fava Vinicius***** Brotto Ramos Geovana**** Santos Sotomaioir Vanessa****

Candidata a mestrado, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil*

Doutora, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil**

Especialista, candidata a doutorado, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil***

Graduada, candidata a mestrado, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil****

Graduado, candidato a doutorado, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil*****

Recepción del artículo
10 de agosto, 2010

Aprobación
20 de octubre, 2010

Primera edición
24 de noviembre, 2010

Resumen

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica que ainda afeta aproximadamente 215 000 pessoas em todo o mundo. Observações clínicas e epidemiológicas sugerem que apenas uma pequena parcela de indivíduos expostos ao *Mycobacterium leprae* desenvolvem a doença. Hoje, sabe-se que mecanismos de controle da suscetibilidade a fenótipos da doença dependem, em grande parte, das características genéticas do hospedeiro. Esta revisão oferece uma síntese dos últimos avanços obtidos na área a partir de estudos genéticos epidemiológicos e funcionais.

Palabras clave

hanseníase, formas clínicas, estados reacionais, estudos funcionais, genética do hospedeiro, polimorfismos

Clasificación en siicsalud

[Artículos originales](#) > [Expertos de Iberoamérica](#) >

Especialidades

► *Principal:* [Dermatología](#), [Infectología](#)

► *Relacionadas:* [Anatomía Patológica](#), [Atención Primaria](#), [Diagnóstico por Laboratorio](#), [Epidemiología](#), [Genética Humana](#), [Medicina Interna](#), [Salud Pública](#)

► **Enviar correspondencia a:**

Marcelo Távora Mira, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, PPGCS- CCBS, 80.215-901, Curitiba, Brasil, E-mail: m.mira@pucpr.br

Host Genetics and Susceptibility to Leprosy

▪ **Abstract**

Leprosy is a chronic infectious disease that still affects approximately 215 000 individuals worldwide. Clinical and epidemiological observations suggest that only a small proportion of the population exposed to *Mycobacterium leprae* develop the disease. Today, it is known that mechanisms controlling susceptibility to leprosy phenotypes strongly depend on the genetic background of the host. This review summarizes the latest advances in the field, obtained from genetic epidemiology and functional studies.

▪ **Key words**

leprosy, leprosy clinical forms, leprosy reactions, functional studies, host genetics, polymorphisms

Artículo completo

ASPECTOS GENÉTICOS DA SUSCETIBILIDADE DO HOSPEDEIRO à HANSENIASE

(especial para SIIC © Derechos reservados)

Fatores de risco genéticos de suscetibilidade à hanseníase e suas formas clínicas

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que acomete principalmente pele e nervos periféricos. A doença, também conhecida como lepra, tem sido um problema de saúde ancestral para populações humanas, e apesar disso, muito pouco ainda se conhece sobre suas bases fisiopatológicas e epidemiológicas. Atualmente, a hanseníase ainda afeta cerca de 215 000 indivíduos em todo mundo, com a maioria dos novos casos concentrados no Brasil e na Índia.¹ A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que varia de acordo com a resposta imune do hospedeiro. Em um pólo desse espectro está a forma lepromatosa, sistêmica, associada com uma resposta imunológica do tipo Th2 (humoral) e no outro, a forma tuberculóide, localizada e associada com forte resposta imune do tipo Th1 (celular).²

Com a identificação do bacilo causador da hanseníase no século XVII por Armauer Hansen,³ confirmou-se sua natureza infecciosa e muito da investigação científica passou a se concentrar em aspectos relativos ao agente patogênico e suas propriedades, tais como virulência, capacidade de indução de resposta imune e resposta ao tratamento. Contudo, observações clínicas sempre indicaram que o controle da suscetibilidade a diferentes fenótipos da doença depende de características inatas ao hospedeiro, associadas a fatores ambientais e sócio-econômicos.⁴ Por exemplo, a influência de fatores genéticos no controle da hanseníase *per se* (a doença independentemente de sua forma clínica) e suas formas de manifestação clínica têm sido demonstrada em estudos de agregação familiar, estudos em gêmeos, análises de segregação complexa e análises de associação e ligação.⁵

Em 1988, foi realizada análise de segregação complexa em uma população da ilha caribenha Desirade. A prevalência de hanseníase na ilha era de aproximadamente 30/1 000 habitantes, uma das mais elevadas do mundo na ocasião. Os resultados do estudo rejeitaram um modelo esporádico (não familiar) e indicaram uma herança mendeliana, com um gene principal co-dominante ou recessivo controlando a suscetibilidade à doença.⁶ Mais recentemente, esse

achado foi em parte confirmado em estudo realizado por nosso grupo, envolvendo 76 *pedigrees* correspondentes à totalidade de uma população isolada e hiperendêmica (128.2/1 000 hab.) para hanseníase localizada no Pará, norte do Brasil, que também resultou na rejeição de modelo predominantemente ambiental de controle da suscetibilidade à doença.⁷ Importante, este estudo revelou que o efeito de gene principal encontrado foi capaz de explicar integralmente a agregação familiar de casos, independentemente do compartilhamento, em uma mesma família, de variáveis não-genéticas.

Embora eficientes em indicar a existência de um controle genético da suscetibilidade à hanseníase, estes estudos observacionais são limitados em seu poder de definir a exata natureza deste efeito, como por exemplo, o número e a identidade dos genes envolvidos. Para tal, estudos genético-moleculares são necessários, e vários têm sido realizados ao longo das últimas décadas⁽⁵⁾. Como resultado, diversos genes, tais como o *VDR*,⁸ *NRAMP1*,⁹ *TAP*,¹⁰ *IL10*¹¹ e variantes da região MHC/HLA¹² foram identificados em associação ou ligação com fenótipos da hanseníase.

Em 2001, uma primeira varredura genômica para genes de suscetibilidade à hanseníase encontrou evidência de ligação entre a região cromossômica 10p13 e hanseníase paucibacilar em uma população da Índia.¹³ O achado foi confirmado, dois anos mais tarde, em uma coleção de famílias recrutadas no Vietnã do Sul.¹⁵ Recentemente, uma análise realizada em uma amostra da mesma população vietnamita mostrou associação significativa entre marcadores do gene *MRC1*, localizado na região 10p13, e hanseníase *per se*.¹⁴ Esse resultado argumenta a favor do *MRC1* como um gene de suscetibilidade a hanseníase *per se*; porém, não explica o pico de ligação observado nos estudos de ligação anteriores, exclusivo para famílias contendo indivíduos portadores da forma paucibacilar da doença. Até o momento, nenhum gene candidato emergiu de estudos envolvendo a região 10p13 e hanseníase paucibacilar.

O resultado mais importante da varredura genômica realizada na população vietnamita,¹⁵ com a participação de nosso grupo, foi a localização de *loci* de suscetibilidade à hanseníase *per se* nas regiões cromossômicas 6q25-q27 e 6p21.^{15,16} Estudos subsequentes, de mapeamento de alta densidade, levaram à identificação de variantes dos genes *PARK2/PARCRG*¹⁶ e *LTA*,¹⁷ respectivamente, como importantes fatores de risco para a doença. Atualmente, um dos focos de nosso trabalho está na completa dissecação do forte efeito de ligação observado entre a região cromossômica 6q25-q27 e hanseníase *per se*. Nossa expectativa é de que genes candidatos adicionais, localizados neste segmento cromossômico, serão descritos.

Recentemente, uma varredura genômica de associação (*Genome-Wide Association*, ou GWA), realizada em uma população chinesa identificou variações em sete genes – *CCDC122*, *CD13orf31*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR*, *RIPK2* e *LRRK2* – associados com a suscetibilidade à hanseníase, com resultados mais evidentes para os genes *CD13orf31*, *NOD2*, *RIPK2* e *LRRK2* e hanseníase multibacilar. Na tentativa de replicar esses achados, Wong e *col.* genotiparam, em uma população africana, os mesmos marcadores associados no estudo chinês. Foi novamente observada associação significativa entre hanseníase e os genes *C13orf31* e *CCDC122*, cujas variantes têm sido descritas como fatores de risco para doença de Crohn. Curiosamente, os achados para os genes *NOD2*, *RIPK2*, *TNFSF15* e *LRRK2* não foram replicados.¹⁸ Segundo o pesquisador Dr. Erwin Schurr, da Universidade McGill (Montreal, Canadá), o componente genético de controle da suscetibilidade a infecções em geral é complexo, heterogêneo e modulado por fatores ambientais, como determinantes da virulência microbiana. Porém, estudos do tipo GWA, que combinam o conhecimento da sequência completa do genoma humano com o da arquitetura complexa de suas variantes mais comuns, têm se mostrado uma

ferramenta poderosa para se avançar na elucidação destes fatores inatos de resistência.¹⁹

Genética dos estados reacionais em hanseníase

Os estados reacionais (ER) acometem cerca de 30%-50% dos pacientes que desenvolvem hanseníase⁴ e são considerados os maiores causadores de sequelas neurológicas permanentes desde que a poliquimioterapia (PQT) foi implementada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1982. Estudos demonstram que de 16% a 56% dos pacientes apresentam perda ou diminuição de função neural periférica já no diagnóstico de hanseníase,²⁰ em sua grande maioria devido à ocorrência dos ER, já que uma parcela considerável dos diagnósticos de ER são efetuados simultaneamente ao da doença *per se*. Estudo prospectivo realizado em uma população da Índia demonstrou que 39.4% de novos casos multibacilares desenvolveram ER e destes, 73% desenvolveram danos neurais previamente inexistentes.²¹ Os ER ocorrem com maior frequência durante o tratamento PQT, principalmente no primeiro ano após o diagnóstico,²² mas podem aparecer anos após o término do tratamento, no entanto, com menor frequência.²³

Os mecanismos fisiopatológicos por trás dos ER ainda permanecem obscuros. As hipóteses mais aceitas baseiam-se na ativação de um processo inflamatório de forma repentina e exacerbada nas lesões pré-existentes e/ou em novas lesões, frequentemente envolvendo nervos periféricos, o que requer tratamento imediato, normalmente com corticóides, a fim de se evitar danos neurais permanentes. Os ER podem ser divididos em dois principais grupos: a reação reversa (RR), ou reação do tipo 1, e o eritema nodoso hansênico (ENH), também conhecido como reação do tipo 2. RR e ENH diferem na forma clínica, porém, podem ocorrer em um mesmo paciente em tempos distintos.²⁴

Diversos estudos evidenciam níveis circulantes aumentados de citocinas Th1, tais como o TNF- α , INF- γ e IL-12, em pacientes no momento do diagnóstico de RR; (rev. em²⁵). Esta observação está de acordo com a hipótese de que a RR é uma reação de hipersensibilidade tardia a antígenos do *M. leprae*, causada pela reativação da resposta imune celular do tipo Th1. Pacientes que apresentam as formas *borderline* da doença²⁶ tem maior propensão ao desenvolvimento de RR, provavelmente devido à instabilidade no balanço Th1-Th2. Outros fatores como idade, índice baciloscópico e número de lesões também estão associados à patologia.²² Quanto ao ENH, acredita-se que, por motivo ainda não esclarecido, ocorra a ativação Th1 em pacientes com resposta predominantemente Th2, levando à formação de imunocomplexos que causariam inflamação nas lesões, muitas vezes de repercussão sistêmica. O ENH acomete predominantemente pacientes do pólo lepromatoso da doença,²³ em 62.5% destes, de forma crônica.²⁷

Apesar dos sinais e sintomas dos ER serem bem descritos, pouco tem sido explorada e hipótese da existência de fatores genéticos que levam ao desencadeamento do processo. Variações nos genes *TLR1* e *TLR2* vêm sendo demonstradas associadas à ER. A família de receptores TLR1, 2 e 6, envolvidos na resposta imune inata, é formada por dímeros responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, principalmente de micobactérias.²⁸ Estudo realizado em uma amostra populacional etíope formada por 66 casos de RR e 150 controles demonstrou associação do *single nucleotide polymorphism* (SNP) *TLR2* rs3804099 com proteção [OR = 0.34 (0.17-0.68) p = 0.002] e um microsatélite próximo ao gene com susceptibilidade à RR [OR = 5.83 (1.98-17.15) p = 0.001].²⁹

Dois SNPs não-sinônimos presentes no gene *TLR1* foram descritos associados a ER: o SNP rs5743618 (I602S) foi encontrado associado com proteção à RR [OR = 0.51 (0.29-0.87) p =

0.01] em uma população do Nepal de 206 casos de RR e 603 controles;³⁰ o SNP rs4833095 (N248S) está associado com ENH em uma população de Bangladesh de 656 controles e apenas 11 casos de ENL [OR = 0.40 (0.16-0.99)].³¹

Recentemente, sete dos polimorfismos do gene *NOD2* investigados na mesma população nepalense utilizada no estudo do gene *TLR1* foram demonstrados associados a RR e ENL, o de maior significância para RR foi o rs8044354 [OR = 0.74 (0.59-0.92) p = 0.005] e para ENL, o rs2287195 [OR = não demonstrado; p = 0.006].³²

Apesar dos primeiros estudos sugerindo um controle genético em ER, há muito ainda a ser explorado. São de suma importância novas pesquisas com o intuito de elucidar o mecanismo de ação dos ER, pois mesmo em um cenário de eliminação da hanseníase, previsto pela OMS mas vista com ceticismo por muitos especialistas,³³ os ER continuarão a ser um grave problema de saúde pública. Portanto, a descrição de marcadores preditivos dos ER é um dos maiores desafios em hanseníase na atualidade. Estudos funcionais, por exemplo, podem ser uma boa ferramenta para contribuir na escolha de genes e vias candidatas à susceptibilidade a ER. Em publicação recente, o grupo liderado pela Dra. Mariane Stefani, da Universidade Federal de Goiás, Brasil, comprovou alterações, previamente descritas,³⁴ nos níveis de expressão de diversas citocinas e quimiocinas, tanto na RR1 quanto no ENH.³⁵ Genes de citocinas são bons candidatos funcionais, e vários deles estão em fase avançada de investigação, em nosso laboratório, como possíveis marcadores gênicos de risco de desenvolvimento de ER.

Genética funcional da suscetibilidade à hanseníase

Entre as diversas estratégias possíveis para investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da hanseníase, estudos genéticos em larga escala têm produzido resultados promissores. Contudo, para maioria desses genes, pouco se sabe sobre suas funções no contexto da infecção por *M. leprae*. Genes candidatos, como *IL10*, *TNFA*, *LTA*, *MRC1* e *PARK2*, vêm sendo alvo de análises funcionais cujo objetivo é entender melhor seus papéis biológicos na fisiopatologia da doença.

O gene *IL10* codifica uma citocina imunorregulatória primariamente excretada por macrófagos ativadas e células T reguladoras, envolvidas no controle da imunidade inata e imunidade mediada por células, respectivamente. Análises haplotípicas utilizando SNPs localizados na região promotora desse gene,^{11,36} bem como estudo posterior caso-controle e de meta-análise, revelaram que o alelo -819T está associado com suscetibilidade à hanseníase.

Consistentemente, dosagem de IL-10 em sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos carreadores do alelo -819T, estimuladas com antígenos de *M. leprae*, revelou menor produção da citocina quando comparado com células com o genótipo -819C.³⁷

O TNF- α , codificado pelo gene *TNFA*, é uma citocina principalmente produzida por monócitos/macrófagos que, diferente da IL-10, tem atividade pró-inflamatória, efetora da resposta imune inata. Na hanseníase, o TNF- α parece estar envolvido no controle da resistência do hospedeiro ao *M. leprae*. Estudo baseado em famílias³⁸ e estudos subsequentes caso-controle^{39,40} sugerem que o alelo -308A da região promotora do gene *TNFA* promove proteção contra hanseníase *per se*. Contudo, outros achados divergem desse resultado, e mostram o alelo -308A associado com forte resposta inflamatória contra *M. leprae*⁴¹ e com suscetibilidade à forma multibacilar da infecção.⁴² Estudo funcional indicou que portadores do alelo -308A apresentavam uma forte reação inflamatória contra antígenos do *M. leprae* em pele. Ainda, dosagens de TNF- α em sobrenadante de células isoladas de biópsias de pele revelaram que pacientes classificados na forma tuberculóide expressam mais essa citocina.⁴³ Outro estudo

funcional recente demonstrou que camundongos *knockout* TNF^{-/-} possuem menor capacidade de controlar a infecção por *M. leprae*, já que foi observado significativo aumento no número de bacilos durante nove meses de acompanhamento a partir da inoculação do microrganismo em suas patas.⁴⁴ Tais achados revelam um envolvimento importante do TNF- α na patogênese da hanseníase; porém, o papel exato da variação -308 ainda permanece obscuro.

Outra citocina envolvida na hanseníase, a linfotóxina alfa (LT-a) é um membro da superfamília do TNF. A função da LT-a, codificada pelo gene *LTA*, é menos conhecida em comparação com o TNF- α . Sabe-se que é uma citocina participante na ativação de inflamação crônica, através da regulação da expressão de moléculas de adesão, bem como de outras citocinas e quimíocinas importantes no recrutamento de linfócitos⁴⁵ e na resposta contra patógenos intracelulares.⁴⁶ Alcaïs *et al.* relacionaram o SNP *LTA*+80 com maior risco à hanseníase, principalmente em populações de casos jovens.¹⁷ O papel biológico deste SNP já havia sido testado *in vitro* em linhagens de células B, transfectadas para expressar os alelos *LTA* +80A ou *LTA* +80C, revelando que o primeiro é capaz de suprimir a expressão de LT-a. Outro estudo com camundongos *knockout* LT-a^{-/-} infectados com *M. leprae* mostrou uma diminuição na ativação de células T, consequentemente uma menor resposta inflamatória na fase crônica da infecção.⁴⁴

Mais recentemente, estudos buscaram entender o papel biológico do gene *MRC1* na hanseníase. Esse gene codifica um receptor de manose (RM), membro da família dos receptores de superfície celular de lectina tipo-1 em humanos. Apesar dos RMs não serem receptores intermediários da fagocitose, são expressos em células especializadas, como macrófagos e células dendríticas. Esses receptores são capazes de reconhecer e se ligar a padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs), como resíduos de manose, fucose e *N*-acetil-glucosamina,^{47,48} evento chave no desencadeamento da resposta imune inata. Alter *et al.*¹⁴ analisaram polimorfismos do éxon 7 do gene *MRC1* em amostras de famílias de indivíduos afetados por hanseníase do Vietnã e em amostras caso-controle do Brasil. Os achados revelaram o haplótipo G396-A399-F407 associado a hanseníase *per se* e à doença multibacilar. Já o haplótipo S396-A399-F407 apareceu com maior frequência no grupo controle. Os mesmos pesquisadores partiram em seguida para uma abordagem funcional, realizando ensaios de associação com células recombinantes construídas para super-expressar os haplótipos citados anteriormente. Após ensaios celulares com ligantes clássicos de MR (ovoalbumina e zimosan) e ainda com *M. leprae* e *B. bovis* BCG, não verificou-se diferenças significativas entre as variantes em relação a capacidade celular de ligação e internalização. Esses achados funcionais sugerem que o efeito desses haplótipos possa ser indireto, e que o processo de internalização do *M. leprae* ou de outros patógenos dependa de outras moléculas, além dos MRs.

Um dos genes de grande interesse do nosso grupo é o *PARK2*, associado ao controle da suscetibilidade à hanseníase *per se*.¹⁶ O gene *PARK2* codifica uma enzima altamente conservada denominada parquina, uma ubiquitina ligase (E3) de 465 aminoácidos e 52-kDa.^{49,50} A parquina é expressa em vários tecidos e tipos celulares, incluindo os neurônios dopaminérgicos presentes na *substantia nigra* do mesencéfalo e células de Schwann do sistema nervoso periférico.^{16,52} Por ser uma E3, a parquina classicamente é responsável pela ubiquitinação de proteínas-alvo, dirigindo-as para degradação no proteossomo.^{49,50} A ubiquitinação de proteínas, além de sinalizar para a degradação, regula diversos processos celulares, como reparo de DNA recém-replicado, endocitose, tráfego de proteínas, degradação lisossomal, apoptose, apresentação de antígeno e transcrição.^{53,54} Estudos recentes utilizando diferentes modelos celulares e animais mostram que a parquina é uma proteína multifuncional, e destacam seu papel na regulação da integridade mitocondrial frente ao estresse oxidativo e

fosforilação oxidativa. Variantes do gene *PARK2* são capazes que elevar o estresse oxidativo, conseqüentemente causando danos celulares indiretos e até morte celular.^{55,56}

Não se sabe quais as conseqüências biológicas da presença de variações genéticas no gene *PARK2* sobre o funcionamento das células em geral, e das células-alvo do *M. leprae* em particular. Indiretamente, a inibição do proteassomo de macrófagos infectados com *M. leprae* reduz o índice de apoptose celular, além de alterar o perfil de produção de certas citocinas.⁵⁷ É possível que variações no gene *PARK2* alteram a função normal dos macrófagos, modificando sua resposta frente ao desafio com antígenos do *M. leprae*. Este efeito poderia ser específico ao *M. leprae*, ou pode ser comum a outros microorganismos patogênicos. Estudo genético independente demonstrou associação entre aqueles polimorfismos de *PARK2/PACRG* encontrados primeiramente nos estudos com hanseníase e a febre tifóide e paratifóide, infecções causadas pelos patógenos intracelulares *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*, respectivamente.⁵⁸ Em nosso grupo, macrófagos primários contendo mutações no gene *PARK2*, e linhagens monocíticas transfectadas com RNAs de interferência para este gene vêm sendo desafiados com *M. leprae*; em seguida, ensaios funcionais são aplicados, com o objetivo de se avançar no entendimento da função da proteína parquina na resposta imunológica do hospedeiro frente ao patógeno.

Considerações finais

Ao longo dos últimos anos, um sólido corpo de evidências acumulou-se em favor de um papel crucial da genética do hospedeiro no controle da suscetibilidade à hanseníase. Porém, esses estudos não explicam na totalidade porque certos indivíduos adoecem com mais facilidade, progridem para diferentes formas clínicas da doença ou desenvolvem episódios reacionais. A combinação de estudos genéticos e funcionais pode ser uma poderosa ferramenta na dissecção de vias metabólicas envolvidas na fisiopatologia da doença. Além disso os conhecimentos produzidos podem ter impacto direto sobre a saúde do paciente na forma de melhores estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento.

Los autores no manifiestan conflictos de intereses.

Bibliografía del artículo

1. Leprosy fact sheet (revised in February 2010). Wkly Epidemiol Rec 85(6):46-8, 2009.
2. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis 34(3):255-73, 1966.
3. Hansen GA. Spedalskhedens Arsager. Norsk Magazin for Laegevidenskaben 1874 1955:76-9.
4. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev 19(2):338-81, 2006.
5. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. Microbes Infect 8(4):1124-31, 2006.
6. Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. Am J Hum Genet 42(2):256-66, 1988.
7. Lazaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. J Infect Dis 201(10):1598-605.
8. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. J Infect Dis 179(1):187-91, 1999.

9. 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* 65(6):733-5, 2001.
10. Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens* 49(2):168-72, 1997.
11. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 5(7):592-5, 2004.
12. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 8(4):320-4, 2007.
13. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet* 27(4):439-41, 2001.
14. Alter A, De Leseleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet* 127(3):337-48.
15. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 33(3):412-5, 2003.
16. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427(6975):636-40, 2004.
17. Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* Apr;39(4):517-22, 2007.
18. Wong SH, Hill AV, Vannberg FO. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 362(15):1446-7; author reply 7-8.
19. Schurr E, Gros P. A common genetic fingerprint in leprosy and Crohn's disease? *N Engl J Med* 361(27):2666-8, 2009.
20. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 10;363(9416):1209-19, 2004.
21. Smith WC, Nicholls PG, Das L, Barkataki P, Suneetha S, Suneetha L, et al. Predicting neuropathy and reactions in leprosy at diagnosis and before incident events-results from the INFIR cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 3(8):e500, 2009.
22. Ranque B, Nguyen VT, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, et al. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. *Clinical Infectious Diseases* 44(1):33-40, 2007.
23. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 83(1):75-82, 2008.
24. Moraes MO, Sampaio EP, Nery JA, Saraiva BC, Alvarenga FB, Sarno EN. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *Br J Dermatol* 144(1):175-81, 2001.
25. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19(2):338-81, 2006.
26. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International Journal of Leprosy and others Mycobacterium Diseases* 34(3):255-73, 1966.
27. Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg* 74(5):868-79, 2006.
28. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun* 70(3):1033-41, 2002.

29. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *The Journal of Infectious Diseases* 197(2):253-61, 2008.
30. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2(5):e231, 2008.
31. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* 199(12):1816-9, 2009.
32. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* 201(9):1422-35, 2010.
33. Fine PE. Leprosy: what is being "eliminated"? *Bull World Health Organ* 85(1):2, 2007.
34. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 50(5):541-9, 1999.
35. Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, et al. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis* 9:75, 2009.
36. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 118(2):295-300, 2005.
37. Pereira AC, Brito de Souza VN, Cardoso CC, Dias Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun* 10(2):174-80, 2009.
38. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* 2(4):196-204, 2001.
39. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 186(11):1687-91, 2002.
40. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis* 13(4):493-8, 2009.
41. Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JA, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 53(1):45-7, 2001.
42. Vejbaesya S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thai* 90(6):1188-92, 2007.
43. Moura DF, Teles RM, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IM, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study Mycobacterium leprae-human cell interaction. *Br J Dermatol* 157(2):273-83, 2007.
44. Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton WJ, et al. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol* 174(4):1379-89, 2009.
45. Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 183(4):1461-72, 1996.
46. Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, Britton WJ. Secreted

- lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 193(2):239-46, 2001.
47. Le Cabec V, Emorine LJ, Toesca I, Cougoule C, Maridonneau-Parini I. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *J Leukoc Biol* 77(6):934-43, 2005.
48. Largent BL, Walton KM, Hoppe CA, Lee YC, Schnaar RL. Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces. *J Biol Chem* 259(3):1764-9, 1984.
49. Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(24):13354-9, 2000.
50. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25(3):302-5, 2000.
51. Marin I, Ferrus A. Comparative genomics of the RBR family, including the Parkinson's disease-related gene parkin and the genes of the ariadne subfamily. *Mol Biol Evol* 19(12):2039-50, 2002.
52. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392(6676):605-8, 1998.
53. Moore DJ. Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 5):749-53, 2006.
54. Robinson PA, Ardley HC. Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci* 117(Pt 22):5191-4, 2004.
55. Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279(18):18614-22, 2004.
56. Yang H, Zhou HY, Li B, Niu GZ, Chen SD. Downregulation of parkin damages antioxidant defenses and enhances proteasome inhibition-induced toxicity in PC12 cells. *J Neuroimmune Pharmacol* 2(3):276-83, 2007.
57. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for Mycobacterium leprae-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol Lett* 110(1):82-5, 2007.
58. Ali S, Vollaard AM, Widjaja S, Surjadi C, Van de Vosse E, Van Dissel JT. PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. *Clin Exp Immunol* 144(3):425-31, 2006.

Está expresamente prohibida la redistribución y la redifusión de todo o parte de los contenidos de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) S.A. sin previo y expreso consentimiento de SIIC.

**ANEXO D: ARTIGO DE REVISÃO “GENETIC RISK FACTORS FOR HUMAN
SUSCEPTIBILITY TO INFECTIONS OF RELEVANCE IN DERMATOLOGY”**

Genetic risk factors for human susceptibility to infections of relevance in dermatology*

Fatores de risco genético para a suscetibilidade humana à infecções de relevância em dermatologia

José Felipe Jardim Sardinha¹
 Vinícius Medeiros Fava³
 Geovana Brotto Ramos⁴
 Nicolaus Albert Borges Schriefer⁶
 Sinésio Talhari⁸

Roberto Gomes Tarlé²
 Angela Schneider Francio⁴
 Luiz Carlos de Lima Ferreira⁵
 Marcelo Távora Mira⁷

Abstract: BACKGROUND: In the pre-microbiological era, it was widely accepted that diseases, today known to be infectious, were hereditary. With the discovery of microorganisms and their role in the pathogenesis of several diseases, it was suggested that exposure to the pathogen was enough to explain infection. Nowadays, it is clear that infection is the result of a complex interplay between pathogen and host, therefore dependant on the genetic make-up of the two organisms. Dermatology offers several examples of infectious diseases in different stages of understanding of their molecular basis. In this review, we summarize the main advances towards dissecting the genetic component controlling human susceptibility to infectious diseases of interest in dermatology. Widely investigated diseases such as leprosy and leishmaniasis are discussed from the genetic perspective of both host and pathogen. Others, such as rare mycobacterioses, fungal infections and syphilis, are presented as good opportunities for research in the field of genetics of infection.

Keywords: Dermatology; Infection; Polymorphism, genetic

Resumo: INTRODUÇÃO: Durante a era pré-microbiológica, era comum a visão de que doenças, hoje sabidamente infecciosas, eram hereditárias. Com a descoberta dos microorganismos e seu papel na patogênese de diversas patologias, chegou-se a propor que a exposição ao patógeno era condição suficiente para explicar infecção. Hoje, está claro que infecção é o resultado de uma complexa interação entre patógeno e hospedeiro, dependendo portanto, em última análise, do make-up genético de ambos os organismos. A dermatologia oferece diversos exemplos de doenças infecciosas em diferentes graus de entendimento de suas bases moleculares. Nesta revisão, resumimos os principais avanços na direção da dissecação do componente genético controlando suscetibilidade do ser humano a doenças infecciosas de importância na dermatologia. Doenças amplamente estudadas, como a hanseníase e a leishmaniose, são discutidas sob o ponto de vista da genética tanto do hospedeiro quanto do patógeno. Outras, como micobacterioses raras, micoses e sífilis, são apresentadas como boas oportunidades para pesquisa na área de genética de infecção.

Palavras-chave: Dermatologia; Infecção; Polimorfismo genético

INTRODUCTION

Research conducted over the last decades has resulted in a solid body of evidence for the existence of a genetic component controlling susceptibility to a wide variety of infectious diseases, several of which are important in dermatology. Familial and ethnic

aggregation of cases, as well as an often exuberant variety of clinical manifestations of diseases caused by intracellular pathogens, are strong indicators that the genetic make-up of both host and pathogen exerts great impact on disease susceptibility and clinical phe-

Recebido em 11.11.2010.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 18.11.2010.

* Work conducted at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMTAM) - Manaus (AM), Brazil.

Conflict of interest: None / *Conflito de interesse: Nenhum*

Financial funding: None / *Suporte financeiro: Nenhum*

¹ MSc - PhD student of Tropical and Infectious Diseases - Diagnosis Manager, Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMTAM) - Manaus (AM), Brazil.

² MD - MSc student of Health Sciences, Pontificia Universidade Catolica do Parana (PUC-PR) - Visiting Professor of Dermatology, Santa Casa de Misericórdia de Curitiba - Curitiba (PR), Brazil.

³ PhD student in the graduate program of Health Sciences, Pontificia Universidade Catolica do Parana (PUC-PR) - PhD student of the Center for Advanced Molecular Research, Pontificia Universidade Catolica do Parana (PUC-PR) - Curitiba (PR), Brazil.

⁴ MSc student of Health Sciences, Pontificia Universidade Catolica do Parana (PUC-PR) - MSc student of the Center for Advanced Molecular Research, Pontificia Universidade Catolica do Parana (PUC-PR) - Curitiba (PR), Brazil.

⁵ MD - PhD in Clinical Pathology - Head of the Research Department, Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMTAM) - Manaus (AM), Brazil.

⁶ MD - PhD in Immunology - Professor of Parasitology, Federal University of Bahia (UFBA) - Salvador (BA), Brazil.

⁷ PhD - Professor and principal investigator of the Center for Advanced Molecular Research, Pontificia Universidade Catolica do Parana (PUC-PR) - Curitiba (PR), Brazil.

⁸ MD. PhD in Dermatology - President of the Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMTAM) - Manaus (AM), Brazil.

©2011 by Anais Brasileiros de Dermatologia

notypes.¹ Leprosy and leishmaniasis are extreme examples of the complexity of this scenario. In leprosy, very low variability of the pathogen suggests a major role for host genetic risk factors controlling disease susceptibility and clinical manifestation. In leishmaniasis, susceptibility to disease is likely to depend on highly variable genomes of both pathogen and host. In either case, as well as in the case of a few additional infectious diseases of importance in dermatology, several genes and genomic regions have been described either linked to or associated with clinical phenotypes. In contrast, opportunities for molecular research are wide open for little explored diseases with dermatological manifestations, such as a number of fungal infections and syphilis. In this review, we present a summary of the advances in the field of genetics of infectious diseases with relevance in dermatology. We will focus on genetic risk factors for host susceptibility; however, we will give attention to genetics of the pathogen, when necessary.

GENETICS OF LEPROSY AND OTHER MYCOBACTERIAL DISEASES

Leprosy

Genetics of *Mycobacterium leprae*

The causative agent of leprosy, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), has some remarkable characteristics that distinguish it from other human bacterial pathogens, such as its inability to be cultured in artificial media, low optimal growth temperature and exceptionally slow doubling time (14 days).² These peculiarities might be explained by the loss of genes involved in crucial metabolic pathways that occurred along evolution.³ Of particular relevance in the context of genetics of susceptibility to leprosy - and one of the main contributions of the unraveling of the *M. leprae* genome - is the observation that different strains of the pathogen distributed worldwide are virtually clonal.⁴ Therefore, the wide variability of clinical manifestations of leprosy as well as the different degrees of susceptibility to infection *per se* are likely to rely heavily on the variability of the host. In this scenario, studies on host genetic risk factors controlling leprosy phenotypes are critical to allow for a deeper understanding of the molecular pathogenesis of the disease.

Host genetics and susceptibility to leprosy

Thanks largely to the application of powerful modern human genetic analysis over the past decades, today the influence of genetic factors controlling host susceptibility and clinical phenotypes of leprosy is generally known. It is also accepted that a favorable genetic make-up of the host, combined with environmental and pathogen-related variables, has a high impact on the definition of susceptibility to infection and clinical manifestation of leprosy.⁵

The first report on the hypothesis of a genetic component for human susceptibility to leprosy dates from the turn of the nineteenth century.⁶ The classic study of twins in an Indian population showed significantly higher concordance rates in the occurrence of leprosy among monozygotic twins compared with dizygotic twins, not only for leprosy *per se* but also for clinical type of disease.⁷ Several Complex Segregation Analyses (CSA) for leprosy phenotypes have been performed in order to answer questions concerning the model of inheritance involved. The application of this tool of analysis to different populations has shown that susceptibility to leprosy has a significant genetic component, probably with a major co-dominant or recessive gene controlling susceptibility to the disease.^{8,9}

Association and linkage analysis identified several genes and chromosomal regions involved in classical and non-classical immune response against *M. leprae*.¹⁰ Of note, leprosy was the first infectious disease found to be associated with specific Human Leukocyte Antigen (HLA) variants. Linkage and association studies have demonstrated involvement of class II HLA-DR2 and HLA-DR3 as important genetic risk factors for susceptibility to subtypes of leprosy (reviewed by Mira)^{10,11} In addition, there is cumulative evidence that other HLA-linked genes are involved in innate immune response against leprosy, such as the Tumor Necrosis Factor Alpha (*TNFA*) and the Lymphotoxin Alpha (*LTA*).^{12,13} *LTA* highlights as a critical effector molecule involved in host defense against intracellular pathogens; a low-expression allele located at position (+ 80) of the *LTA* gene has been found associated with a higher risk of early-onset leprosy *per se* in patients from two independent family-based samples from Vietnam and a case-control sample from India.¹³

Among additional candidate genes involved in classical immune response, cytokines evidently play a critical role in the pathogenesis of infectious diseases. Previous studies have established IL-10 as a good candidate gene for susceptibility to both early stages of leprosy infection and disease progression.¹⁴ A higher TNF- α /IL-10 ratio was also correlated with a better prognosis in terms of clinical outcome of leprosy household contacts.

An interesting, unexpected outcome of the intense investigation on genetic risk factors for complex traits is the description of a number of candidate genes associated with different diseases, suggesting the existence of key genes and metabolic pathways shared across the pathogenesis of these diseases. In leprosy, remarkable examples are provided by genes such as *SLC11A1* (former *NRAMP1*), *PARK2*, *NOD2* and *LRRK2*, all linked to or associated with leprosy phenotypes as well as with susceptibility to Parkinson's (*PARK2* and *LRRK2*), Chron's disease (*NOD2* and

LRRK2) and several other autoimmune and inflammatory conditions (*SLC11A1*). *PARK2* is an E3 ubiquitin-protein ligase thought to regulate innate immunity.¹⁵⁻¹⁸ *NOD2* is an intracellular sensing molecule expressed by macrophages and epithelial cells that recognizes the bacterial cell-wall peptidoglycan and the muramyl dipeptides motif. It is, therefore, valid to hypothesize that *PARK2* participates in ubiquitination-mediated *NOD2* signaling, whereas *LRRK2*, a leucine-rich repeat kinase 2, was shown to be a regulator of *PARK2* activity.¹⁷ *SLC11A1* encodes an integral membrane protein expressed exclusively in cells of the immune system recruited to the membrane of a phagosome upon phagocytosis, a pathway likely to be involved in immune response to infectious diseases in general.¹⁹

Only very recently attention has been paid to the genetic control of occurrence of type 1 and type 2 leprosy reactions that affect about 30-50% of leprosy patients and are considered the major causes of permanent neurological disability associated with the disease. Variations in Toll-like Receptors 1 (*TLR1*) and 2 (*TLR2*) genes have been found associated with leprosy reaction.^{20,21} Receptors *TLR1*, 2 and 6 are dimmers responsible for antigen recognition, especially mycobacteria, in the innate immune response. Recently, *NOD2* gene polymorphisms were also shown to be associated with both types 1 and 2 leprosy reactions as well as with leprosy *per se* - replicating the Chinese finding - in a population from Nepal.^{17,18}

Cutaneous tuberculosis and other mycobacteriosis

In addition to leprosy, other mycobacteria may cause human disease of interest in dermatology. In fact, in terms of public health, the most important human pathogen of the genus is *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), the causative agent of tuberculosis (TB). Other species of mycobacteria may be associated with disease and are collectively referred to as non-tuberculous (or atypical) mycobacteria (NTM).

M. tuberculosis infection usually affects the lungs, but can also attack any part of the body such as the skin, kidney, spine and brain. If not treated properly, TB can be fatal. The disease is transmitted through airborne particles from respiratory secretions of patients or by direct inoculation.²² Upon exposure, only 10% of the population will develop the disease and it is estimated that one third of the global population is infected with *M. tuberculosis*.²³ The ability of *M. tuberculosis* to determine successful infection and disease in such a small group of subjects depends on its virulence factors and the genetic background of the host, which, combined, will ultimately determine the ability of the microorganism to evade immune response.²⁴ Immune defense against *M. tuberculosis* is complex and involves an interaction between CD4+ and

CD8+ T lymphocytes and macrophages, along with the production of cytokines such as interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α).²⁵

Much has been studied on the genetics of host susceptibility/resistance to pulmonary infection by *M. tuberculosis*. Several candidate genes have been investigated in different populations, some of them presenting variants showing strong association with the disease, such as HLA genes, Interferon Gamma (*IFNG*), Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (*NRAMP1* or *SCL11A1*), *TLR2* and the Vitamin D Receptor (*VDR*).^{23,26-33,34-38}

Cutaneous tuberculosis is a rare form of extra pulmonary disease that affects 1 to 4% of the total cases of TB.^{39,40} Cutaneous TB occurs more often in children, intravenous drug users and individuals under immunosuppressive therapy, as well as individuals affected by HIV/AIDS, *diabetes mellitus*, cancer and end-stage renal disease.⁴¹ In contrast with intense scientific investigation focusing on host genetics and control of pulmonary TB, successfully demonstrating an important role for individual susceptibility to disease, there is no published data reporting association between genetic gene variants and occurrence of cutaneous TB, to our knowledge.

A wide variety of NTM is associated with human diseases (including cutaneous infections) such as *Mycobacterium bovis*-BCG, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium avium-intracellulare* and *Mycobacterium chelonae*.^{41,42} Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM - 209, 950) is a rare syndrome characterized by innate predisposition to infection caused by weakly virulent mycobacteria, such as BCG vaccines and NTM.⁴³ Mutations in patients affected by the syndrome have been identified in five autosomal genes (IFN- γ receptor 1 [*IFNGR1*], IFN- γ receptor 2 [*IFNGR2*], signal transducer and activator of transcription 1 [*STAT1*], IL-12 B p40 subunit [*IL12B*] and IL-12 receptor b-subunit [*IL12RB1*]) and 1 X-linked (nuclear factor- κ B-essential modulator [*NEMO*]) gene, clearly implicating the IFN- α /IL12 pathway of activation of immune response as a critical step in the specific control against mycobacterial infection in humans.⁴⁴

LEISHMANIASIS

Leishmaniasis is a vector-borne disease with worldwide distribution. It affects populations from 88 developing and under-developed countries, most of them located in the tropics. Productive infections result in visceral or tegumentary disorders of potentially life threatening or disfiguring clinical outcomes.⁴⁵ Approximately 2 million new cases of leishmaniasis are detected annually.

According to clinical manifestations, the disease can

be distributed into Visceral Leishmaniasis (VL) and American Tegumentary Leishmaniasis (ATL); ATL can be further sub-divided into localized Cutaneous Leishmaniasis (CL), Mucosal Leishmaniasis (ML) and Disseminated Leishmaniasis (DL). ATL is the most common disease form, with an estimated 1.5 million cases per year, 90% of them concentrated in only 7 countries, including Brazil. VL accounts for approximately 500,000 cases per year and is considered the most severe form of the disease.

ATL is caused by parasites of the *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) complexes in the New World. The two classical forms of ATL that can result from human infection with *L. braziliensis* are CL and ML; DL, a third emerging form of ATL caused by *L. braziliensis*, occurs mostly in northeastern Brazil. CL, ML and DL are distinct entities, presenting different clinical features. CL is usually limited to single or few skin ulcers more commonly found in upper and lower limbs.⁴⁵ In DL, multiple ulcerated and non-ulcerated skin lesions are concurrently found in more than one area of the patient's body, which may be preceded by a brief period of transient, low-grade fever.⁴⁶⁻⁴⁸ ML is the most severe complication of ATL, affecting mostly mouth, nose and pharyngeal mucosae. It can lead to severely disfiguring facial lesions and life threatening oral, pharyngeal and laryngeal destruction.^{49,50} Up to four percent of CL and forty percent of DL patients develop ML disease.^{48,50}

Genetics of *Leishmania sp*

There is substantial variability among the etiological agents of leishmaniasis at the subgenus level with at least 15 species described.^{51,52} The strong association between *Leishmania sp* and different disease forms suggests a prominent role for the specific genetic background of these microorganisms in clinical manifestation and possibly illness prognosis. The wide range of leishmaniasis outcomes can be simultaneously found in endemic regions, reinforcing the hypothesis that subtle intra-species genetic variability between *L. braziliensis* strains/isolates may be involved in the observed spectrum of diseases. In this respect, experimental studies have shown that *L. braziliensis* isolated from patients with different forms of the disease presents distinct biological behaviors in animal models.⁵³

Most efforts to epidemiologically link polymorphism of *Leishmania* strains to clinical outcomes of human disease have not been very revealing.⁵⁴⁻⁵⁷ Wide geographic distribution and multiple sources of tested isolates may be among the reasons for this lack of association. However, two Colombian reports by Saravia et al. were very insightful in this respect.^{58,59} In both studies, the authors described an increased frequency of mucosal involvement among human cases caused by particular *L. braziliensis* zymodemes or strains. Furthermore, the disease evolution in those

infected with parasites of the "mucosal-prone" *L. braziliensis* zymodeme was statistically longer ($p=0.002$) than that caused by other strains.⁵⁹

Two recent reports further reinforce that the parasite strain has an important role in determining complex phenotypes of human infections. In the earlier of these studies, a multiclonal population structure among *L. braziliensis* isolates from an area with high endemicity for ATL in the northeastern Brazilian state of Bahia was described.⁶⁰ More importantly, that study revealed a statistically significant association between clinical outcome of leishmaniasis and parasite genotypes. Coupled with the observations from Saravia et al. mentioned above, these findings indicate a major role for the intra-species variability among these microorganisms with regard to form of the disease, paralleling the strong relationship between species of *Leishmania* and form of leishmaniasis.^{45,58,59} In the most recent report, a geographic clustering of ATL forms was found in the same Brazilian region.⁶¹ It was remarkable that the distributions of ML and DL overlapped those of the clones of the parasite that were associated with these diseases in that previous study, indicating that the *L. braziliensis* genetic content may also influence other complex phenotypes like geographic distribution of form of leishmaniasis within an affected region.⁶⁰

Host genetics and susceptibility to leishmaniasis

The complex range of outcomes observed in leishmaniasis is likely the result of a complex interplay between host and parasite; therefore, it is reasonable to assume that both pathogen and host genetic backgrounds play a role in defining the disease. Most of the genetic studies of host susceptibility factors in leishmaniasis have been conducted in populations affected by the VL form of the disease, and little is known about the impact of host genetic variants on ATL susceptibility.⁶²⁻⁶⁴

ACSA performed in a population sample containing nuclear families recruited in an endemic area for the subspecies *Leishmania peruviana* revealed the participation of both environmental and genetic factors - with the presence of a major gene effect - controlling susceptibility to leishmaniasis per se and disease severity.⁶⁵

High circulating level of TNF- α can be observed in plasma of patients with MCL.⁶⁶ A subsequent study successfully demonstrated two polymorphisms of the *TNFA* gene in association with ATL in a case-control Venezuelan population sample, including the (-308) variation of the promoter region of the gene largely described as a functional regulator of TNF- α plasma levels. Interestingly, the study shows that homozygous females for the susceptibility allele were in higher risk of developing infection when compared to males with the same genotype.⁶⁷ Of note, *TNFA* (-308) polymor-

phism is also associated with other infectious diseases, including leprosy and TB.^{68,69} Also, *TNFA* is physically close to the *LTA* gene, which has also been described in association with leprosy; both genes are located at chromosomal region 6p21 harboring the MHC/HLA complex, reinforcing the importance of this genome segment in multiple infectious diseases.¹³

INF- γ , the immune modulator coded by the *INFG* gene, is a cytokine critical to innate and adaptive immunity against intracellular bacterial infections. An association study performed in a collection of 80 family trios (father, mother and one affected child) from Sudan detected a haplotype composed of alleles of four polymorphisms of the *Interferon Gamma Receptor 1 (INFGRI)* gene associated with post kala-azar dermal leishmaniasis, but none of the *INFG* gene variations were found in association with disease susceptibility in the studied sample.⁷⁰ In a subsequent Brazilian study, comparison of allele frequencies between ATL cases (CL and ML) and healthy controls failed to detect association between disease susceptibility/severity and the functional polymorphism *INFG* (+ 874). However, *INFG* (+ 874) alleles were associated with IFN- γ plasma levels in the same population.⁷¹

In the 1980's, animal studies resulted in the description of the *Slc11a1* gene (previously described as *Nramp1*) playing an important role in controlling innate susceptibility to intracellular pathogens, such as murine leishmaniasis and TB.^{19,72,73} Since then, intense research has been focusing on reproducing the effect in human infectious diseases such as leprosy, TB and VL.^{15,64,74} Recently, an insertion/deletion polymorphism located at the 3' region of human *SLC11A1* was associated with CL. Interestingly, in the mouse model, in which the animals were experimentally infected with leishmania, the *Slc11a1* gene polymorphism did not seem to influence the development of cutaneous lesion as it does in humans infected through bites of the sand fly vector. In a possible explanation, the authors suggest a role for polymorphonuclear, macrophages and/or dendritic cells in the wound healing response and CL susceptibility in humans, not seen in animal models.⁷⁵ Finally, in the same study, variants of the *CXCR1* gene, encoding an IL-8 receptor with a role in chemoattraction and neutrophils activation in infection sites, were found associated with both CL and ML phenotypes.⁷⁵

Cytokine genes are obvious candidates for the control of human susceptibility to infection in general. In leishmaniasis, a previously known functional polymorphism (-819) of the *IL10* gene, associated with regulation of IL-10 serum levels, was also associated with the development of leishmaniasis skin lesions in a Brazilian population sample from the northeastern state of Bahia.⁷⁶ Again, the same polymorphism is widely descri-

bed in association with leprosy.¹⁴ Allele frequencies of a polymorphism in the promoter region of *IL6* gene were differentially distributed among ML patients compared to CL cases. The susceptibility genotype to ML was also correlated with lower IL-6 serum levels, leading to higher risk of development of this form of the disease.⁷⁷ In a recent publication, another promoter polymorphism located in the *CCL2* (or *MCPI1*) gene that plays a role in the recruitment of monocytes to site of infection was associated with ML but not with CL in a Brazilian sample.⁷⁸ Finally, classical HLA haplotypes are associated with CL and/or MCL and VL, as further discussed in a review by Sakthianandeswaren et al.⁷⁹

OTHER INFECTIOUS DISEASES OF INTEREST IN DERMATOLOGY

Paracoccidioidomycosis

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous mycosis endemic in Latin America, especially in Brazil and Argentina, caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides braziliensis* (*P. braziliensis*). The disease presents a broad spectrum of clinical and pathological manifestations, ranging from localized lesions to severely disseminated infection.⁸⁰

Effective defense against *P. braziliensis* depends mainly upon the ability of the host to mount an efficient, Th1-type of acquired resistance modulated by the interaction of T cells and macrophage-activating cytokines. Resistance or mild manifestation of the disease has been related to IFN- γ and TNF- α production, while increased susceptibility to disease phenotypes are observed associated with a predominant production of Th2 interleukins IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13.⁸⁰

Molecular genetic studies have shown evidence of association of PCM with specific variants of immune response-related genes. Specific alleles of the *TNFA* (-308) polymorphism were associated with PCM in a small case-control population sample from Brazil.⁸¹ Variants of Th2 cytokine genes, such as *IL10* and *IL4*, were also found in association with PCM. For *IL4*, the susceptibility C/T genotype was associated with higher production of this cytokine.^{80,81}

Chromoblastomycosis

Chromoblastomycosis is a chronic mycosis involving the skin and subcutaneous tissue. A large number of melanized (dematiaceous) fungi have been associated with the disease, the most common being *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrioni*. The infection is acquired by inoculation of the agent following local trauma, frequently in the lower extremities. The lesion may assume different aspects: tumoral, verrucous, cicatricial lesions, plaques or a mixture of clinical manifestations.⁸² Satellite lesion may develop by autoinoculation.

A Brazilian study has shown that susceptibility to chromoblastomycosis may be influenced by variants of an HLA class I gene located on chromosomal region 6p21: the relative risk for an HLA-A29 carrier to develop chromoblastomycosis was estimated at 10.⁸³ A recent family-based study performed in a highly consanguineous population from Falcon State, an endemic rural area of northern Venezuela, detected an 11% higher proportion of cases within families, as well as an estimated 65% of heritability for the trait, with the vast majority of cases being caused by *Cladophialophora carrioni*.⁸⁴ Interestingly, a previous study had failed to detect association between chromoblastomycosis and polymorphism of the HLA region in a family-based population sample from the same Falcon State.⁸⁵

Histoplasmosis

Histoplasma capsulatum (*H. capsulatum*) is the most common cause of invasive fungal pulmonary disease worldwide. It is classically considered an endemic mycosis, even though the fungus has an opportunistic behavior in immunocompromised patients. The pathogen is transmitted upon inhalation of the conidial forms, present in environments such as caves dwelling bats and soils inhabited by chicken. The clinical features may vary from asymptomatic infection to disseminated severe forms; the outcome of the infection with *H. capsulatum* is dependent on dynamic interactions between innate immunity, adaptive immunity and fungal virulence factors.⁸⁶ Skin and mucosal manifestations of histoplasmosis may occur, especially in the disseminated form (more frequent in the setting of immune suppression), as a result of hematogenic dissemination, together with lymph node involvement.

Protective immunity occurs through the induction of cytokine production by T cells, particularly IFN- γ and TNF- α , which subsequently activate phagocytic cells. Mice deficient in IFN- γ have accelerated mortality; similarly, patients with defective IFN- γ signaling are at risk for severe histoplasmosis.⁸⁷

The presence of HLA antigens such as B7 and DRw2 has been associated with the Syndrome of Presumed Ocular Histoplasmosis. In a Mexican study, HLA-B22 was found in association with pulmonary histoplasmosis in the State of Guerrero: allele frequency was highly increased in the Juxtlahuaca and the Olinala populations as compared to controls from the Coyuca population. Importantly, Juxtlahuaca and Olinala inhabitants are known to live in areas where the disease was considered occupational for peasants, miners, cave tourist guides, anthropologists, archeologists and others who refer contact with bat guano and/or avian excreta that contain nutrients for fungal growth. In contrast, people from the Coyuca population have no contact with the excreta mentioned above.⁸⁸

Syphilis

Syphilis is an ancient, biblical disease that, despite the availability of relatively advanced methods for diagnosis and affordable treatment, remains a global health problem. The causative agent is the spirochete *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) subspecies pallidum.⁸⁹ The infection triggers a strong humoral and cell-mediated immune response, the latter being evidenced by the presence of granuloma.

In both primary and secondary syphilis, an increased expression of Th1 cytokines has been shown, with IL-2 and IFN- γ being overexpressed in both humans and rabbits.⁸⁹ Increased apoptosis of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells by a Fas-mediated death pathway in patients with secondary early syphilis could account for the incomplete clearance of *T. pallidum* from the lesions, leading to the establishment of chronic infection.⁸⁹ Expression of the inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-12 and TNF- α in dendritic cells (DCs) is stimulated by exposure to whole *T. pallidum* organisms or to synthetic TpN47, a recombinant lipopeptide that carries the immunodominant epitopes from *T. pallidum*.⁹⁰

Despite these advances towards the understanding of the intimate immunological basis of syphilis, with the description of potentially good candidate genes for investigation using genetic epidemiology tools, no published data describing association between genetic variants and syphilis phenotypes have become available to date.

FINAL REMARKS

At the dawn of molecular medicine, some deeper knowledge of the genetic basis controlling infection in humans is becoming increasingly important, not only for the basic scientist but also for the physician directly involved with clinical practice. In this context, several infectious diseases of interest in dermatology offer either exciting new findings or great opportunities for innovative research. For example, for genes known to impact on disease phenotypes, exploring the possibility of functional relationship between genetic polymorphisms and cell phenotypes can provide new insights into the basic mechanisms of host defense against infections. Combined analysis of different diseases may lead to the discovery of shared pathways of host response, ultimately leading to new, extremely powerful therapeutic targets. It is only with a clearer perspective of the complex disease panorama that better resources can be applied directly to patients, with a much-expected improvement in the health and quality of life of the exposed populations.

REFERÊNCIAS

1. Fine PE. Immunogenetics of susceptibility to leprosy, tuberculosis, and leishmaniasis. An epidemiological perspective. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1981;49:437-54.
2. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:338-81.
3. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001;409:1007-11.
4. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science.* 2005;308:1040-2.
5. 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.
6. Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? *An Bras Dermatol.* 2007;82:483-7.
7. Chakravarti M, Vogel F. A twin study on leprosy. In: Becker PE, Lenz W, Vogel F, Wendt GG, editors. *Topics in human genetics.* Stuttgart: Thieme; 1973. p.1-29.
8. Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis.* 2010;201:1598-605.
9. Abel L, Demeais 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.
10. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect.* 2006;8:1124-31.
11. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000979.
12. Vanderborcht PR, Matos HJ, Salles AM, Vasconcelos SE, Silva-Filho VF, Huizinga TW, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNFalpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72:143-8.
13. Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet.* 2007;39:517-22.
14. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009;10:174-80.
15. Abel L, Sánchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998;177:133-45.
16. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Fiumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004;427:636-40.
17. Zhang FR, Huang W, Chen S, Sun L, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med.* 2009;361:2609-18.
18. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis.* 2010;201:1422-35.
19. Govoni G, Vidal S, Cellier M, Lepage P, Malo D, Gros P. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp1 gene in macrophages. *Genomics.* 1995;27:9-19.
20. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e231.
21. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis.* 2008;197:253-61.
22. Lai-Cheong JE, Perez A, Tang V, Martínez A, Hill V, Menagé Hdu P. Cutaneous manifestations of tuberculosis. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32:461-6.
23. Leandro AC, Rocha MA, Cardoso CS, Bonecini-Almeida MG. Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D-binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon-gamma genes and its association with susceptibility to tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42:312-22.
24. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004;120:213-32.
25. Stenger S, Modlin R L. T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:89-93.
26. Brahmajothi V, Pitchappan RM, Kakkanaiah VN, Sashidhar M, Rajaram K, Ramu S, et al. Association of pulmonary tuberculosis and HLA in south India. *Tubercle.* 1991;72:123-32.
27. Singh SP, Mehra NK, Dingley HB, Pande JN, Vaidya MC. Human leukocyte antigen (HLA)-linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLA-DR types. *J Infect Dis.* 1983;148:676-81.
28. Awomoyi AA, Charurat M, Marchant A, Miller EN, Blackwell JM, McAdam KP, et al. Polymorphism in IL1B: IL1B-511 association with tuberculosis and decreased lipopolysaccharide-induced IL-1beta in IFN-gamma primed ex-vivo whole blood assay. *J Endotoxin Res.* 2005;11:281-6.
29. Blackwell JM, Barton CH, White JK, Searle S, Baker AM, Williams H, et al. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol Med.* 1995;1:194-205.
30. Cervino AC, Lakiss S, Sow O, Hill A V. Allelic association between the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in Guinea-Conakry. *Ann Hum Genet.* 2000;64:507-12.
31. Greenwood CM, Fujiwara TM, Boothroyd LJ, Miller MA, Frappier D, Fanning EA, et al. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet.* 2000;67:405-16.
32. Liaw YS, Tsai-Wu JJ, Wu CH, Hung CC, Lee CN, Yang PC, et al. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility of tuberculosis in Taiwanese. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:454-60.
33. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis J Immunol. 1999;163:3920-7.
34. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis.* 1999;179:721-4.
35. Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet.* 2000;355:618-21.
36. Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, Bah B, Sillah J, Gustafson P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. *J Infect Dis.* 2004;190:1631-41.
37. Lewis SJ, Baker I, Davey Smith G. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9:1174-7.
38. Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts. *Indian J Med Res.* 2000;111:172-9.
39. Saral Y, Coskun B K, Ozturk P, Bulut Y, Cobanoglu B. Multiple metastatic tuberculosis abscesses in a patient with Pott disease and lung tuberculosis: a case report. *J Cutan Pathol.* 2005;32:629-33.
40. Yates VM, Ormerod LP. Cutaneous tuberculosis in Blackburn district (U.K.): a 15-year prospective series, 1981-95. *Br J Dermatol.* 1997;136:483-9.
41. Frankel A, Penrose C, Emer J. Cutaneous tuberculosis: a practical case report and review for the dermatologist. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2009;2:19-27.
42. Ho MH, Ho CK, Chong LY. Atypical mycobacterial cutaneous infections in Hong Kong: 10-year retrospective study. *Hong Kong Med J.* 2006;12:21-6.
43. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D514-7.
44. Al-Muhsen S, Casanova JL. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:1043-51.
45. Azulay RD, Azulay Júnior DR. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 1995;34:303-7.
46. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994;56:315-25.
47. Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986;89:319-23.
48. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002;186:1829-34.
49. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002;70:6734-40.
50. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espondia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80:859-76.
51. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratloug F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1993;68:104-6.
52. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratloug F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus Leishmania Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum*

- Comp. 1993;68:107-8.
53. Kahl LP, Byram JE, David JR, Comerford SA, Von Lichtenberg F. Leishmania (Viannia) braziliensis: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:218-32.
 54. El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, et al. Leishmania donovani: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol.* 2001;97:35-44.
 55. Reiner NE, Lo R, Llanos-Cuentas A, Guerra H, Button LL, McMaster WR. Genetic heterogeneity in Peruvian Leishmania isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41:416-21.
 56. Schöniak G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, et al. Genetic heterogeneity in the species Leishmania tropica revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:217-24.
 57. Toledo A, Martín-Sánchez J, Pesson B, Sanchiz-Marín C, Morillas-Márquez F. Genetic variability within the species Leishmania infantum by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;119:257-64.
 58. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of Leishmania (Viannia) in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:86-94.
 59. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of Leishmania viannia in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:738-44.
 60. Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun.* 2004;72:508-14.
 61. Schriefer A, Guimarães LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:871-6.
 62. Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A, et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun.* 2007;8:84-90.
 63. Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with Leishmania chagasi infection. *Genes Immun.* 2007;8:539-51.
 64. Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, White JK, Cordell HJ, Howson JM, et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:66-74.
 65. Shaw MA, Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Collins A. Human genetic susceptibility and infection with Leishmania peruviana. *Am J Hum Genet.* 1995;57:1159-68.
 66. Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res.* 1993;26:233-8.
 67. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1995;182:1259-64.
 68. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG + 874T/A, IL10 -1082G/A and TNF-308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet.* 2008;123:477-84.
 69. Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H, et al. Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns.* 1997;23:218-24.
 70. Salih MA, Ibrahim ME, Blackwell JM, Miller EN, Khalil EA, ElHassan AM, et al. IFNG and IFNGR1 gene polymorphisms and susceptibility to post-kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan. *Genes Immun.* 2007;8:75-8.
 71. Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, et al. IFNG + 874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis.* 2007;7:33.
 72. Blackwell JM, Black GF, Peacock CS, Miller EN, Sibthorpe D, Gnananandha D, et al. Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997;352:1331-45.
 73. Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, et al. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med.* 1995;182:655-66.
 74. van Crevel R, Parwati I, Sahiratmadja E, Marzuki S, Ottenhoff TH, Netea MG, et al. Infection with Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2009;200:1671-4.
 75. Castellucci L, Jamieson SE, Miller EN, Menezes E, Oliveira J, Magalhães A, et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. *BMC Med Genet.* 2010;11:10.
 76. Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with Leishmania braziliensis. *J Immunol.* 2008;180:6139-48.
 77. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhães A, Guimaraes LH, Lessa M, et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis.* 2006;194:519-27.
 78. Ramasawmy R, Menezes E, Magalhães A, Oliveira J, Castellucci L, Almeida R, et al. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010;10:607-13.
 79. Sakhthianandeswaren A, Foote S J, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2009;25:383-91.
 80. Bozzi A, Reis BS, Pereira PP, Pedrosa EP, Goes AM. Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2009;48:212-7.
 81. Bozzi A, Pereira PP, Reis BS, Goulart MI, Pereira MC, Pedrosa EP, et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. *Hum Immunol.* 2006;67:931-9.
 82. Garnica M, Nucci M, Queiroz-Telles F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22:559-63.
 83. Tsuneto LT, Arce-Gomez B, Petzl-Erler ML, Queiroz-Telles F. HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1989;27:181-5.
 84. Richard-Yegres N, Yegres F. Cromomicosis: una endemia rural en la region noroccidental en Venezuela. *Rev Cubana Med Trop.* 2009;61:209-12.
 85. Naranjo F, Márquez I, Gendzekhadze K, Zhang S, Fernández-Mestre M, Yegres F, et al. Human leukocyte antigen class I and MICA haplotypes in a multicase family with Cladophialophora carrionii chromoblastomycosis. *Tissue Antigens.* 2006;68:287-92.
 86. Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42:192-8.
 87. Nosanchuk JD, Gacser A. Histoplasma capsulatum at the host-pathogen interface. *Microbes Infect.* 2008;10:973-7.
 88. Taylor ML, Perez-Mejia A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia.* 1997;138:137-42.
 89. Peeling RW, Hook EW 3rd. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. *J Pathol.* 2006;208:224-32.
 90. Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:29-49.

MAILING ADDRESS / ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

José Felipe Jardim Sardinha
 Avenida Pedro Teixeira 25, D. Pedro.
 Cep: 69040-000 Manaus, Amazonas - AM
 E-mail address: felipesardinha@bol.com.br

How to cite this article /Como citar este artigo: Sardinha JFJ, Tarlé RG, Fava VM, Francio AS, Ramos GB, Schriefer NAB, Ferreira LCL, Mira MI, Talhari S. Genetic risk factors for human susceptibility to infections of relevance in dermatology. *An Bras Dermatol.* 2011;86(4):708-15.

**ANEXO E: APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM
PESQUISA (CONEP)**



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 650/2006

Registro CONEP: 12638 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 119/2005

Processo nº 25000.003820/2006-88

Projeto de Pesquisa: "Estudo de marcadores genéticos e imunológicos de progressão clínica e susceptibilidade aos estados reacionais da hanseníase".

Pesquisador Responsável: Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Instituição: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)/Universidade Federal de Goiás.

Área Temática Especial: Genética humana

Patrocinador: DECIT-MS/CNPq

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 287/2006, cabem as seguintes considerações:

- a) O pesquisador definiu claramente os critérios de inclusão do grupo controle e suas especificidades frente ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e o tempo de armazenamento do material biológico à luz da Res. CNS 347/2005.
- b) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 19 de junho de 2006.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS