

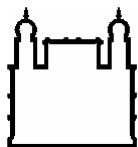
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

**ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM
GENES CANDIDATOS NA HANSENÍASE**

CYNTHIA CHESTER CARDOSO

Rio de Janeiro
2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CYNTHIA CHESTER CARDOSO

Estudos de associação de polimorfismos de base única em genes candidatos na Hanseníase

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO

2006

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

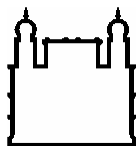
C268 Cardoso, Cynthia Chester

Estudos de associação de polimorfismos de base em genes candidatos na hanseníase / Cynthia Chester Cardoso. - Rio de Janeiro, 2006.
xvi, 87 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2006.
Bibliografia: f. 69-87.

1. Hanseníase. 2. Polimorfismo de um único nucleotídeo . I. Título.

CDD:616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: CYNTHIA CHESTER CARDOSO

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES
CANDIDATOS NA HANSENÍASE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Aprovada em: 24/03/2006

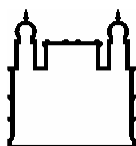
EXAMINADORES:

Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello - **Presidente da Banca Examinadora**

Prof. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

Rio de Janeiro, 24 de Março de 2006.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

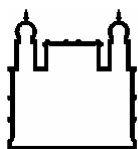
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES

CANDIDATOS NA HANSENÍASE

RESUMO

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada por um patógeno intracelular obrigatório, o *Mycobacterium leprae*, com tropismo por células de Schwann nos nervos periféricos e macrófagos na pele. O espectro com cinco formas clínicas diferentes é determinado pela interação patógeno-hospedeiro através da influência do *M. leprae* sobre a resposta imune do hospedeiro associada à dicotomia Th1 x Th2, a qual é representada pelas formas tuberculoides e lepromatosas da doença. A análise de seqüências do *M. leprae* demonstrou uma baixa variabilidade, de forma que tanto o desenvolvimento de Hanseníase quanto de seu espectro de manifestações depende majoritariamente das características do hospedeiro. Esta observação tem estimulado estudos visando à identificação de marcadores de suscetibilidade à Hanseníase *per se* ou a uma das formas clínicas. O objetivo deste estudo foi reproduzir em uma nova população os resultados de associação entre polimorfismos de base única (SNPs) e a suscetibilidade à Hanseníase já publicados. Um estudo tipo caso-controle utilizando uma população composta por 233 contatos domiciliares sadios e 212 pacientes de todas as formas clínicas da hanseníase foi desenhado. As amostras foram genotipadas através dos métodos de PCR-RFLP ou discriminação alélica por tempo real para SNPs dos genes *TNFA* (-308), *LTA* (+252) e *PARK2* (-2599 e rs1040079). Desvios em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados em SNPs do locus de TNF (-308 nos pacientes e +252 nos contatos) e no SNP -2599 do gene *PARK2* em ambas as populações. As análises baseadas em populações confirmam a proteção anteriormente detectada para o alelo TNF-308A (OR=0,59; P=0,03) e para o haplótipo -308A/+252A, embora este segundo resultado não seja significativo (OR=0,47; P=0,06). Os estudos de SNPs e haplótipos do gene *PARK2* não detectaram associação. Um novo SNP (asp110ala) no gene de ninjurina (*NINJI*) também foi investigado de modo a verificar uma possível associação com a Hanseníase. Nenhuma evidência de associação deste SNP com a suscetibilidade e severidade foi detectada, embora uma primeira análise tenha sugerido associação com dano neural avaliado pelo grau de incapacidade. Assim utilizando uma população estendida de pacientes (n=765) foi confirmada a associação do alelo 110ala e o grau de incapacidade (OR=1,54; P=0,007). A quantificação alelo-específica dos transcritos por tempo real demonstrou que o alelo 110asp tem expressão aumentada quando comparada à do alelo 110ala. Neste trabalho foi confirmada a associação do alelo -308A com a resistência a hanseníase *per se* em Brasileiros. As análises de ninjurina demonstraram que o SNP asp110ala pode ser um marcador prognóstico valioso já que o portadores do alelo 110ala têm suscetibilidade aumentada ao dano neural, possivelmente causada por uma expressão reduzida desta molécula de adesão mediada por esse alelo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES

CANDIDATOS NA HANSENÍASE

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*, which has tropism for Schwann cells in peripheral nerves and macrophages in the skin. The spectrum with five different clinical forms is determined by host: pathogen interactions that influences a polarized immune response represented as the tuberculoid and lepromatous forms of the disease, which are associated to Th1 x Th2 immunological patterns, respectively. The sequence analysis of *M. leprae* showed low genetic variability in a way that both leprosy *per se* and the spectrum of manifestations are explained mostly due to host responses. This observation has encouraged many studies aiming the identification of markers of susceptibility to leprosy *per se* or to one of the clinical forms. The aim of this study was to replicate in a new population previous published results that reported association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and leprosy susceptibility. It was designed a case-control study using 233 healthy unrelated household contacts and 212 patients from all clinical forms of leprosy. Samples were genotyped using PCR-RFLP or allelic discrimination method for SNPs in *TNFA* (-308), *LTA* (+252) and *PARK2* (-2599 and rs1040079) genes. Deviations from the Hardy-Weinberg Equilibrium were detected in SNPs located at TNF locus (-308 in patients and +252 in control group) and for the SNP -2599 at *PARK2* gene in both populations. The population-based analysis replicated the protection previously reported for allele TNF-308A (OR=0,59; P=0,03) and also for -308A/+252A haplotype, although it was not significant (OR=0,47 P=0,06). Analysis with *PARK2* SNPs and haplotypes did not show any association. A novel SNP (asp110ala) at *NINJI* gene was also investigated so as to determine a possible association with leprosy. There was no evidence of association of this SNP and leprosy susceptibility and severity, but the first analysis suggested an association with neurological damage as assessed by the disability grade. So, using an extended patients population (n=765) we confirmed the association between allele 110ala and incapacity grade (OR=1,54; P=0,007). Functional analysis detected a higher ninjurin mRNA and protein expression in response to *M. leprae* stimulus. Allele-specific transcript quantitation demonstrated that allele 110asp was augmented as compared to 110ala. Here, we confirm the association of -308A allele with resistance of leprosy *per se* among Brazilians. Ninjurin analysis showed that asp110ala could be a valuable prognostic marker, since carriers of ala110 allele have increased susceptibility to nerve damage possibly because this allele shows a decreased expression of this adhesion molecule.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras”.

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus, fonte de equilíbrio e inspiração.

Aos meus pais e grandes amigos, Ricardo e Cátia, meus eternos exemplos de caráter e personalidade, pelo apoio incondicional e pelo amor acima de tudo.

Ao meu noivo, Carlos Henrique Vieira Fontes, por sempre me incentivar a crescer cada vez mais, pelo apoio, compreensão e amor.

Ao meu orientador, Milton Ozório Moraes, pela chance de trabalhar nesta área pela qual hoje sou completamente apaixonada. Por reforçar em mim a certeza de que sou cientista, pelo enorme amadurecimento profissional que tem me proporcionado.

À minha grande amiga Sabrina, que amo como se fosse uma irmã, pelas valiosas conversas de corredor. Pelo apoio constante que me dedica tanto na vida pessoal quanto na profissional, ao qual não tenho palavras para agradecer.

Às minhas outras irmãs emprestadas Carla de Lamare e Carla Honse, por estarem sempre prontas a me apoiar apesar do fato de hoje em dia eu as procurar tão pouco.

A Antônio Pacheco, pela inestimável ajuda com as análises estatísticas.

Aos amigos do laboratório, Alejandra, Guilherme, Viviane, Patrícia, Flávia, Ana Beatriz, Karina, Alexandre Freire, Diogo, Valcemir, Alexandre Pio e Felipe, pelo apoio e pelo ambiente agradável que mantêm no laboratório.

Às queridas amigas Caroline, Luciana e a todas as que ficaram na Bioquímica da Uerj: Fernanda, Patrícia, Amanda, Cíntia, Natália e Mônica, pela alegria e incentivo constantes, renovando minhas baterias a cada conversa.

À equipe da Dra. Elisabeth Sampaio, em especial Ariane, Rosaninha e Tatiana, pelo apoio nos experimentos de expressão.

A todos do Ambulatório Souza-Araújo, em especial à Nádia, que tanto me ajudou na organização do banco de dados dos contatos.

A todos os funcionários do Departamento, cujas atividades são essenciais para o desenvolvimento das atividades de pesquisa. Em especial ao Sr. Sales, pelo carinho, e à Benedita, sempre empenhada em manter nosso laboratório limpo e organizado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Lista de Quadros, Tabelas e Figuras

	Página
Quadro 1: Principais estudos de associação em Hanseníase utilizando SNPs como marcadores e genes candidatos como estratégia de escolha dos alvos de análise.	18
Quadro 2: Estudos genéticos de ligação realizados em Hanseníase com base na estratégia de rastreamento genômico.	21
Quadro 3: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação nos sistemas que utilizam a técnica de PCR-RFLP, condições de ciclagem e tamanho dos fragmentos amplificados em pares de base (pb).	34
Quadro 4: Condições da reação de digestão e padrão de fragmentos utilizado para determinação dos genótipos nos sistemas que utilizam a técnica de PCR-RFLP.	35
Tabela 1: Distribuição dos indivíduos componentes das três populações de estudo de acordo com o sexo e a etnia.	31
Tabela 2: Frequências genotípicas observadas nos grupos de contatos domiciliares sadios e pacientes para os polimorfismos de base única TNF-308 e LTA+252.	43
Tabela 3: Frequências dos haplótipos formados pelos polimorfismos LTA+252 e TNF-308 nos grupos de contatos sadios e pacientes.	44
Tabela 4: Frequências genotípicas observadas nos grupos de contatos domiciliares sadios e pacientes para os SNPs –2599 e rs1040079 do gene <i>PARK2</i> .	45
Tabela 5: Frequências dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs1040079 e PK-2599 nos grupos de contatos sadios e pacientes.	45
Tabela 6: Frequências genotípicas do polimorfismo asp110ala em pacientes e contatos sadios.	46
Tabela 7: Frequências genotípicas do polimorfismo asp110ala em pacientes de acordo com o grau de incapacidade inicial.	47
Tabela 8: Frequências genotípicas do polimorfismo asp110ala em contatos sadios e pacientes da população estendida.	48
Tabela 9: Frequências genotípicas do polimorfismo asp110ala na população estendida de pacientes de acordo com o GII.	48
Tabela 10: Resultados das análises de ASTQ do gene <i>NINJI</i> em amostras de PBMC de um indivíduo afetado (1) e dois sadios (2 e 3) e biópsias de nervo.	54
Tabela 11: Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas do SNP	

TNF-308 obtidas a partir de estudos de caso-controle em Hanseníase.	56
Tabela 12: Comparação entre as frequências (%) genótípicas e alélicas dos polimorfismos rs1040079 e -2599 do gene <i>PARK2</i> obtidas em estudos de caso-controle em Hanseníase.	59
Figura 1: Aspectos imunológicos das diferentes manifestações clínicas da hanseníase.	9
Figura 2: Estratégias de estudos genéticos em hanseníase.	23
Figura 3: Representação esquemática da região que abriga os genes do MHC com indicação dos principais polimorfismos.	24
Figura 4: Representação esquemática dos genes <i>PARK2</i> e <i>PACRG</i> demonstrando sua localização em orientação oposta.	27
Figura 5: Representação gráfica utilizada para discriminação alélica por PCR em tempo real para o polimorfismo rs1040079 do gene <i>PARK2</i> .	37
Figura 6: Marcação imunohistoquímica para ninjurina em biópsias de nervo de pacientes de Hanseníase ou outras neuropatias.	50
Figura 7: Cinética da expressão de ninjurina em culturas de PBMC.	51
Figura 8: Expressão média de ninjurina em biópsias de nervo periférico.	52
Figura 9: Indução da expressão dos transcritos portadores do alelo A em relação aos portadores do alelo C em culturas de PBMC.	53

Lista de Símbolos e Abreviaturas

χ^2	Qui-quadrado
°C	Graus Celsius
3' UTR	Região 3' não traduzida de um gene
ASTQ	Quantificação alelo-específica de transcritos
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	Borderline-bordeline
BL	Borderline-lepromatoso
BT	Borderline-tuberculóide
CD	Cluster differentiation
Ct	Ciclo em que a amplificação começa a ser detectada durante uma reação de PCR em tempo real (do inglês “threshold cycle”)
DC-SIGN	Molécula de adesão presente em células dendríticas (do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin”).
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos (N = A, C, G, T ou U)
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ENH	Eritema nodoso hansênico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GII	Grau de incapacidade inicial
GLM	Modelo logístico (do inglês “generalized linear model”)
H	Horas
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês “human leukocyte antigen”)
HLP	Proteína semelhante a histona (do inglês “histona-like protein”)
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LAM	Lipoarabinomanana

LL	Lepromatoso
LOD score	Logaritmo de probabilidades (do inglês “log of the Odds”)
LRM	Modelo logístico (do inglês “logistic regression model”)
LPS	Lipopolissacarídeo
LT- α	Linfotoxina alfa
MB	Multibacilar
Min	Minutos
NF κ B	Fator nuclear de células B
NRAMP	(do inglês “natural resistance-associated macrophage protein”)
OR	Razão de probabilidades (do inglês “Odds Ratio”)
PB	Paucibacilar
Pb	Pares de base
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PBS	Solução tampão fosfato (do inglês “phosphate buffer solution”)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGL-1	Glicolípido fenólico 1
PNL	Forma neural pura da Hanseníase (do inglês “pure neural leprosy”)
PQT	Poliquimioterapia
RING	Domínio presente em algumas proteínas E3 ligases (do inglês “really interesting gene”)
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RNAse	Enzima responsável pela degradação das moléculas de RNA
Rpm	Rotações por minuto
RR	Reação reversa
S	Segundos
SLC11A1	(do inglês “solute carrier family 11, member 1”)
SNP	Polimorfismos de base única
TAP	molécula transportadora de peptídeos
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TDT	testes de desequilíbrio de transmissão

TGF- β	Fator de crescimento celular (do inglês “transforming growth factor beta”)
Th	Linfócito T auxiliar (do inglês “T helper”)
TLR	Receptores semelhantes ao Toll (do inglês “Toll-like receptors”)
TN	Tamil Nadu (cepa indiana de <i>M. leprae</i>)
TNF- β	fator de necrose tumoral beta
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TT	Tuberculóide
U	Unidade
Ub	Ubiquitina
Ubl	Domínio protéico semelhante à ubiquitina
V	Volts
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês “World Health Organization”)

I. INTRODUÇÃO

1. Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica típica de países tropicais. É causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular obrigatório identificado inicialmente em lesões de pacientes por Gerhard Henrik Armauer Hansen, em 1873 (Ridley & Jopling, 1966).

No que concerne às características morfológicas do bacilo, o *M. leprae* apresenta-se como um bastonete reto ou ligeiramente encurvado. É dito álcool-ácido resistente (BAAR) devido ao fato de corar-se de vermelho pela fucsina e não se descorar pela lavagem com solução álcool-ácida (Ress, 1985). Apresenta um envoltório celular composto pela membrana plasmática, parede celular e uma camada mais externa rica em lipídios complexos, distintos daqueles normalmente observados em outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Muitas das propriedades relativas à virulência e a sobrevivência do *M. leprae* dentro da célula hospedeira parecem estar associadas à estrutura característica do seu envelope, conforme descrito adiante.

Em virtude da predileção do *M. leprae* por macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos, as principais manifestações clínicas da Hanseníase incluem lesões de pele, mucosas e nervos, sendo a infecção do tecido nervoso responsável pela perda de sensibilidade local típica da doença (revisado por Britton & Lockwood, 2004). Todavia, além dos macrófagos e células de Schwann, o bacilo também é capaz de infectar outros tipos celulares tais como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos. Além da pele e nervos, o *M. leprae* é capaz de afetar também as mucosas das vias aéreas superiores, olhos, vísceras abdominais, linfonodos, medula óssea, testículos e ovários (revisado por Gallo *et al.*, 2005).

Por ser uma doença principalmente neurológica, a hanseníase representa em todo o mundo uma das principais causas de neuropatia tratável dentre as que apresentam etiologia diferente de trauma. Ao causar incapacidade e deformidade em diferentes graus, a neuropatia periférica constitui a principal causa da morbidade observada dentre os pacientes com hanseníase bem como do estigma historicamente relacionado a esta doença (Scollard *et al.*,

1999).

1.1 Epidemiologia e Transmissão

A hanseníase representa um problema de saúde pública em diversos países de baixos níveis de desenvolvimento social e econômico, com destaque para a Índia e o Brasil, que apresentam os maiores números absolutos de casos. No início de 2004, o Brasil encontrava-se no topo da lista dos países de maior prevalência da hanseníase, com uma taxa de 4,6 pacientes por

10.000 habitantes. No início deste ano, entretanto, após a atualização dos registros dos pacientes esta taxa foi reduzida significativamente, alcançando um valor de 1,7/10.000. Ainda assim, o Brasil permanece na lista dos 9 países nos quais a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS) juntamente com Angola, República Africana Central, Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia. Este conjunto de países concentra 84% do número total de novos casos registrados em 2004 e 74% dos casos registrados no início de 2005 (WHO, 2005a).

Desde 1982, quando foi adotada a poliquimioterapia, houve uma redução de 85% na prevalência global da hanseníase. Entretanto, a taxa de prevalência inferior a 1 paciente para cada

10.000 habitantes buscada pelo programa de eliminação proposto pela OMS ainda não foi alcançada em diversos países (WHO, 2004 e 2005a). Um dos problemas encontrados no sentido de alcançar a eliminação da hanseníase é a prevalência oculta, com uma estimativa de que aproximadamente 10.000 casos permaneçam sem diagnóstico. Deficiências da rede pública de saúde, que incluem a presença de profissionais incapacitados para o reconhecimento e diagnóstico, a falta de informações da população a respeito da doença, acrescida do estigma a ela relacionado, são alguns dos fatores que dificultam o diagnóstico de novos casos no Brasil (MS, 2003).

Apesar dos esforços da OMS no sentido de eliminar a doença, o número de casos novos permanece praticamente inalterado na maioria dos países endêmicos, o que sugere fortemente que a infecção ativa ainda é muito presente dentro das comunidades (Beyene *et al.*, 2003). Estima-se que a cada ano seja registrada uma média de 400.000 novos casos em todo o mundo, dos quais, aproximadamente 50.000 são provenientes do Brasil. Os novos casos

registrados durante o ano de 2004 confirmam a precisão desta estimativa já que, dos 407.791 novos casos registrados em todo o mundo, 49.384 provêm do Brasil. Com base nestas taxas, atualmente o grande objetivo da OMS

consiste na redução das taxas de incidência (WHO, 2005a), o que requer a implantação de medidas preventivas.

O contágio entre seres humanos através das secreções nasais foi sugerido como a forma mais provável de transmissão da hanseníase. A patogenicidade é baixa (aproximadamente 10 % dos indivíduos expostos ao *M. leprae* manifestam a doença) e o processo de multiplicação do *M. leprae* ocorre de forma lenta, com um período de incubação médio entre 3 e 5 anos na maior parte dos casos (revisado por Gallo *et al.*, 2005). A temperatura ideal para a multiplicação do bacilo varia entre 27 e 30°C, o que explica o fato de o mesmo se concentrar em áreas superficiais do corpo bem como sua capacidade de sobreviver em tatus e porções distais do corpo de roedores (revisado por Britton & Lockwood, 2004).

1.2. Diagnóstico, classificação e tratamento

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico. Entretanto, existem diversos testes tanto clínicos quanto laboratoriais que fornecem evidências bacteriológicas, histopatológicas e imunológicas capazes de dar suporte a este diagnóstico inicial. Dentre os testes mais utilizados encontram-se a baciloscopia, que testa a presença do bacilo na linfa, e a sorologia, que busca anticorpos contra o glicolípido fenólico 1 (PGL-1). Estudos mais recentes propõem o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) tanto na forma convencional (Santos *et al.*, 1997), quanto a versão em tempo real (Martinez *et al.* No prelo.), a fim de detectar e quantificar DNA de *M. leprae* em lesões ou outras amostras de pacientes.

A principal e mais atual classificação para as formas clínicas da Hanseníase tem como base aspectos clínicos, imunológicos, baciloscópicos e histológicos e propõe a existência de dois pólos principais. O primeiro deles, conhecido como tuberculóide (TT), representa a forma mais branda da doença em que as lesões de pele geralmente têm baciloscopia negativa e os indivíduos têm reação positiva à lepromina. O segundo pólo é composto pelos indivíduos lepromatosos (LL), os quais apresentam lesões com índice baciloscópico alto e reação negativa à lepromina. Completando o espectro de manifestações clínicas característico da hanseníase, existem ainda três formas intermediárias denominadas “borderlines”. Estas são representadas

pelas formas borderline-tuberculóide (BT), borderline-bordeline (BB) e borderline-lepromatosa (BL), em ordem crescente de severidade (Ridley & Jopling, 1966).

Outro método classificatório, proposto pela OMS com fins terapêuticos, subdivide os pacientes em dois grandes grupos com base no exame baciloscópico dos esfregaços de linfa cutânea. De acordo com este método, são classificados como paucibacilares (PB) os casos com baciloscopia negativa (BT e TT) e multibacilares (MB) aqueles com baciloscopia positiva (BB, BL e LL). A OMS sugere ainda, para os locais endêmicos onde métodos diagnósticos laboratoriais não são disponíveis ou confiáveis, a utilização de uma classificação essencialmente clínica com base no número de lesões cutâneas. Nesta classificação simplificada os pacientes são divididos em paucibacilares, quando apresentam de uma a cinco lesões de pele, ou multibacilares, caso apresentem mais de cinco lesões de pele (WHO, 2004).

Independente das classificações com embasamento imunológico ou de acordo com a baciloscopia, existe ainda uma denominação específica para os casos em que os danos neurais apresentam-se em isolado, na forma de uma neuropatia periférica caracterizada por disfunção motora, sensorial ou por ambas. Este tipo de manifestação clínica é denominado forma neural pura, ou hanseníase neurítica e, seu diagnóstico exige a realização de biópsias de nervo periférico devido à ausência de lesões cutâneas (Jardim *et al.*, 2003).

A hanseníase apresenta um tratamento padronizado desde a implantação da poliquimioterapia (PQT), em 1982. A detecção da doença nos estágios iniciais e administração imediata do tratamento possibilitam a eliminação do bacilo e previne os danos neurais, evitando o surgimento de deformidades e incapacidade. A PQT prevê a administração de dapsona, rifampicina e clofazimina em doses e esquemas específicos de acordo com a classificação do paciente em paucibacilar ou multibacilar (revisado por Gallo *et al.*, 2005).

Durante o curso da infecção freqüentemente ocorrem episódios de reação inflamatória aguda os quais podem ser desencadeados pelo próprio tratamento ou por fatores tais como co-infecção, imunização, gravidez, parto, estresse, dentre outros. Tais alterações na resposta imune são conhecidas como episódios reacionais e geram exacerbações no quadro clínico do paciente podendo acarretar o surgimento de novas lesões, reativação de lesões antigas e agravamento do quadro neurológico do paciente (Rea *et al.*, 1998).

As reações do tipo 1, ou Reação reversa (RR), ocorrem predominantemente em

pacientes BT e BB durante o tratamento, enquanto que as reações do tipo 2, ou Eritema nodoso

hansênico (ENH) são comuns principalmente em pacientes BL e LL. Pacientes no curso de reações podem apresentar comprometimento neurológico além das lesões cutâneas. A reação do tipo 2 é mais grave uma vez que os pacientes desenvolvem sintomatologia sistêmica com febre alta, mialgia, dores articulares e novas lesões de pele. A reação do tipo 1 apresenta-se clinicamente como uma reinfilhação de lesões antigas geralmente acompanhada por hiperalgesia. O tratamento dos pacientes em reação depende da severidade e do tipo de reação, presença de neurite, alergia a drogas, gravidez, dentre outros. A inflamação aguda resultante requer terapia anti-inflamatória, normalmente a prednisona para RR e talidomida para o ENH, associada à PQT. Nos casos em que há comprometimento neural, independente do tipo de reação, há necessidade da introdução dos esteróides tais como a prednisona (revisado por Sampaio *et al.*, 2003).

2. Resposta imune ao *M. leprae*

Em virtude da correlação entre o espectro clínico da hanseníase e o estado imunológico do paciente, que vai desde uma resposta exacerbada até uma ausência total de resposta contra o bacilo, a Hanseníase tem servido como modelo humano para o estudo dos mecanismos de proteção, patologia e supressão na resposta imune. O estudo da dinâmica da resposta imune ao *M. leprae* tem permitido avanços no campo da imunologia e pode ser utilizado para indicar novos rumos para o diagnóstico e tratamento da doença (Gallo *et al.*, 2005), bem como para o entendimento da mesma.

2.1. Eventos iniciais da resposta

Após a penetração do *M. leprae* no organismo, ele deve obrigatoriamente ser internalizado a uma célula já que este patógeno não sobrevive no meio extracelular. Estudos direcionados à demonstração dos mecanismos de fagocitose do *M. leprae* pelos macrófagos indicaram inicialmente a participação do sistema complemento (Schlesinger & Horwitz, 1991a) e, em seguida a interação do PGL-1 com o componente C3 deste sistema, bem como sua importância como mediador do processo de fagocitose do bacilo (Schlesinger & Horwitz, 1991b). Contudo, sabe-se que a imunidade utiliza diversos outros receptores além dos receptores do complemento no processo de reconhecimento dos patógenos, dentre os quais

podem ser citados os receptores semelhantes ao Toll (TLRs, do inglês “Toll-like receptors”), receptores de manose

e, provavelmente DC-SIGN (do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin”).

No caso específico do *M. leprae*, estudos desenvolvidos no ano de 2003 demonstraram que o homodímero TLR2 e o heterodímero TLR2/TLR1 são os únicos capazes de promover a ativação celular na presença do *M. leprae*, mais especificamente por lipoproteínas presentes neste patógeno (Krutzik *et al.*, 2003). Estes resultados evidenciam a importância do TLR2 no reconhecimento do *M. leprae* e ativação da resposta protetora.

Mais recentemente, em 2005, foi demonstrada a capacidade do TLR de promover a diferenciação de monócitos tanto em macrófagos quanto em células dendríticas. Neste estudo, os monócitos foram ativados em uma via dependente de TLR e submetidos à marcação específica para DC-SIGN e CD1b, envolvidos nos processos de captação e apresentação de antígenos, respectivamente. À medida que a análise foi aprofundada, as células DC-SIGN⁺ foram caracterizadas fenotipicamente como macrófagos, enquanto as CD1b⁺ apresentaram fenótipo de células dendríticas. A capacidade de diferenciação dos monócitos em macrófagos ou células dendríticas após ativação de TLR evidencia a importância deste receptor tanto na ativação dos mecanismos de fagocitose característicos da imunidade inata quanto na apresentação de antígenos aos linfócitos, para indução de resposta imune adaptativa (Krutzik *et al.*, 2005). Estas evidências sugerem que o TLR seria responsável por fazer uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa.

A ativação dos macrófagos induzida por TNF- α e IFN- γ estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais são responsáveis pela eliminação do bacilo após a fagocitose (Bekker *et al.*, 2001). Entretanto, componentes micobacterianos tais como o lipoarabinomanana (LAM, comum a *M. tuberculosis* e *M. leprae*) e o PGL-1 (exclusivo do *M. leprae*) têm sido descritos como moduladores da resposta imunológica *in vitro*. Segundo dados da literatura, o LAM apresenta ações antagônicas já que, por um lado estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α e a interleucina 1 beta (IL-1 β) e, por outro modula a atividade microbicida dos macrófagos ao inibir a produção de IFN- γ (Adams *et al.*, 1993). Já o PGL-1, presente tanto na superfície da bactéria quanto livre no tecido infectado, foi descrito como supressor da atividade imune celular e da produção de IFN- γ , além de ser

capaz de modular a produção de TNF- α *in vitro*, o que pode impedir uma ativação eficaz dos macrófagos

(revisado por Sampaio *et al.*, 2003). Por fim, foi ainda descrita para o PGL-1 uma atividade inibidora sobre o metabolismo oxidativo do macrófago, o que impede a destruição das bactérias (Neill & Klebanoff, 1988).

2.2. Desenvolvimento das diferentes formas clínicas

Nos indivíduos em que a resposta imune não é capaz de controlar a infecção, ocorre o desenvolvimento de Hanseníase clínica, a qual pode se apresentar de várias maneiras diferentes de acordo com o tipo e intensidade da resposta imune desenvolvida. Pode-se dizer que o espectro da Hanseníase encontra-se diretamente relacionado ao estado fisiológico do paciente com relação à imunidade celular (Ridley & Jopling, 1966), já que esta é necessária para o controle de infecções por patógenos intracelulares.

Dentre as diversas moléculas que atuam na resposta protetora, as moléculas de HLA (do inglês “human leukocyte antigen”) merecem destaque devido ao seu papel fundamental de apresentação dos antígenos de *M. leprae* aos linfócitos do hospedeiro, desencadeando o processo de ativação destas células e o conseqüente desenvolvimento da resposta adaptativa. Dentro deste contexto, é importante comentar os trabalhos desenvolvidos por Thole e cols. (1999), que visavam a identificação de antígenos que desencadeassem respostas protetoras de diferentes intensidades, as quais poderiam determinar quais indivíduos expostos se manteriam saudáveis e quais desenvolveriam as formas clínicas mais ou menos severas. Como resultado foram observados perfis antigênicos diferentes dentre os indivíduos, entretanto, sem qualquer tipo de antígeno exclusivo de cada grupo (afetados ou sadios). Dentre o repertório analisado, foi demonstrada a importância de peptídeos provenientes de proteínas de choque térmico e de antígenos do complexo 85B como desencadeadores de resposta imune ao *M. leprae*.

De uma maneira simplificada, pode-se afirmar que a diferença entre as formas extremas da doença é explicada pelo paradigma imunológico clássico que subdivide as respostas dos linfócitos T auxiliares (Th, do inglês “T helper”) em dois pólos conhecidos como Th1 e Th2. Estudos de expressão gênica corroboram esta afirmação ao medir os níveis de RNA mensageiro de diferentes citocinas em pacientes dos pólos LL e TT. Os resultados obtidos demonstram expressão aumentada de genes de citocinas típicas de respostas Th2 (IL-4

e IL-10, por exemplo), em pacientes LL, favorecendo a produção de anticorpos, e de IL-2 e IFN- γ (resposta Th1) em

pacientes TT (Yamamura *et al.*, 1991; Misra *et al.*, 1995; Dockrell *et al.*, 1996), favorecendo a expansão dos linfócitos e ativação dos macrófagos. Dados recentes demonstram ainda uma incapacidade de diferenciação de monócitos em células dendríticas em indivíduos LL (Krutzik *et al.*, 2005), o que contribui ainda mais para a validação desta teoria já que, as células dendríticas são as únicas capazes de ativar linfócitos T virgens, induzindo a resposta imune celular.

Como resultado, indivíduos do pólo tuberculóide são relativamente resistentes ao patógeno, apresentando infecção localizada e baciloscopia negativa, enquanto indivíduos LL são relativamente suscetíveis, apresentando infecção disseminada e alta carga bacilar (revisado por Young, 2001). Tais resultados, entretanto, demonstram apenas uma indução preferencial de um dos eixos da resposta Th, o que não significa que o outro eixo esteja totalmente reprimido, já que, indivíduos TT também apresentam anticorpos anti-PGL-1 (Roche *et al.*, 1993). Além disso, estudos em pacientes LL detectaram a produção de IFN- γ após estímulo de PBMC por antígenos fracionados de *M. leprae*, indicando a presença de linfócitos T específicos para antígenos de *M. leprae* nestes indivíduos (Ottenhoff *et al.*, 1989).

2.3. Desenvolvimento de episódios reacionais

Por fim, além da suscetibilidade à hanseníase *per se* e a uma determinada forma clínica, a resposta imune também influencia diretamente os níveis de morbidade dos pacientes à medida que acarreta danos ao tecido em decorrência da reação inflamatória. Sob o ponto de vista da eliminação do patógeno, a resposta inflamatória pode ser considerada benéfica. Em contrapartida, o episódio inflamatório tem como consequência mais importante a inflamação neural em virtude da presença do *M. leprae*, causando danos e podendo resultar em seqüelas irreversíveis caso o tratamento não seja adequado.

A Reação reversa ocorre devido a um aumento na imunidade celular ao *M. leprae*, causando uma resposta inflamatória de hipersensibilidade tardia eficiente na eliminação do bacilo, mas extremamente danosa ao tecido afetado. Imunologicamente ocorre uma expansão dos linfócitos T *M. leprae*-específicos e produção de IFN- γ , levando à formação de granulomas e ao aumento da atividade microbicida dos macrófagos. Como resultado,

indivíduos que desenvolvem RR apresentam lesões inflamatórias na pele e neurite aguda. O Eritema nodoso hansênico ocorre

devido à ativação de citocinas como o TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-8 (Nery *et al.*, 1998). Existem ainda evidências de que este tipo de reação possa ter contribuição da imunidade celular, já que estudos de expressão gênica demonstraram a expressão de RNAm das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF α tanto em pacientes com RR quanto naqueles que desenvolveram ENL. A produção de TNF- α foi detectada em todos os pacientes testados (Moraes *et al.*, 1999), reforçando a teoria de que o TNF α seja a principal citocina responsável pelos sintomas observados nos pacientes em reação (Sarno *et al.*, 1991; Khanolkar-Young *et al.*, 1995).

A resposta imune ao *M. leprae* encontra-se representada esquematicamente na Figura 1, a qual sumariza as principais citocinas envolvidas nas diferentes formas clínicas e episódios reacionais.

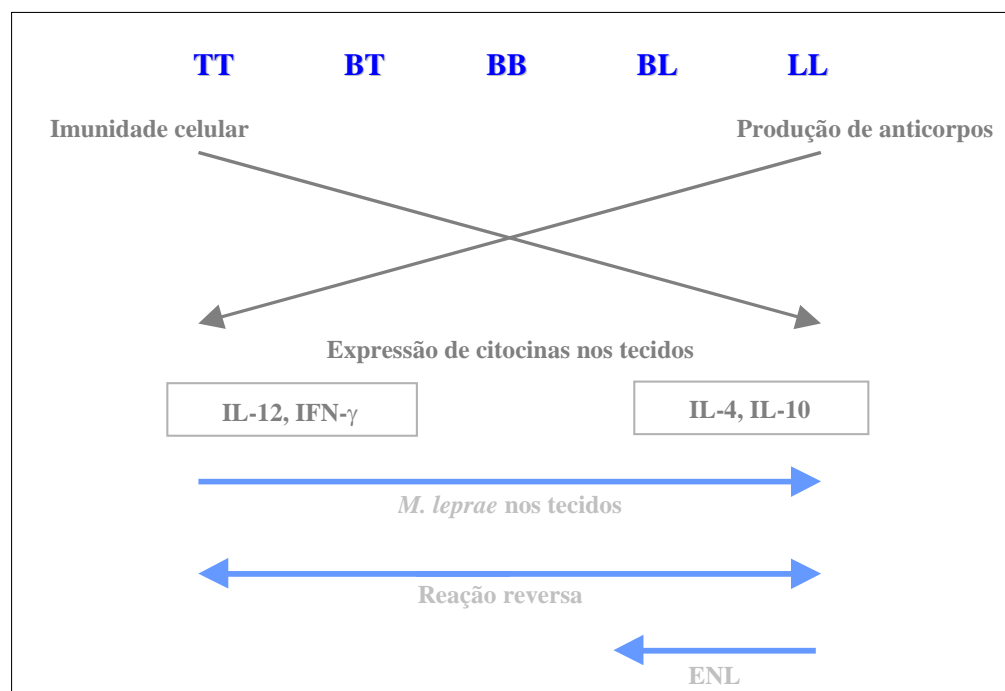


Figura 1: Aspectos imunológicos das diferentes manifestações clínicas da Hanseníase. A imunidade celular, ao contrário da humoral, decresce à medida que o pólo lepromatoso se aproxima em virtude da expressão diferencial de citocinas. O oposto ocorre na baciloscopia, com níveis acentuados em pacientes lepromatosos. A RR pode ocorrer em indivíduos de diferentes formas clínicas, enquanto o ENH é comum em indivíduos do pólo lepromatoso. Adaptado de Britton & Lockwood, 2004.

3. Mecanismos de neuropatogênese

Antes de ser uma doença de pele, a hanseníase é uma doença do sistema nervoso devido ao tropismo específico do *M. leprae* pelas células de Schwann e pela precocidade no aparecimento destas lesões em comparação às de pele. A infecção do nervo pelo *M. leprae* implica em perda de mielina e inflamação, o que pode gerar seqüelas irreversíveis. Um dos primeiros eventos do processo de infecção das células nervosas é a fixação do *M. leprae* à lâmina basal das células de Schwann que envolvem os axônios, através de uma interação com a cadeia α das moléculas de laminina-2 presentes na matriz extracelular, mais especificamente na lâmina basal da célula de Schwann (Rambukkana *et al.*, 2002). Tanto a proteína HLP (do inglês “histona-like protein”) quanto o PGL-1 foram descritos como mediadores desta interação (Shimoji *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2000). Durante a invasão propriamente dita, o complexo *M. leprae*-laminina- α 2 utiliza como receptor o α -dístroglicana presente na superfície da célula de Schwann (Rambukkana, 2001). Estudos recentes indicam a capacidade de ligação da HLP a diferentes isotipos de colágeno, ampliando o papel desta proteína na patogênese da doença ao mediar a interação com outros tipos de células e membranas basais (Pessolani *et al.*, 2003).

Após a infecção, o *M. leprae* tende a proliferar nas células de Schwann ao redor dos nervos periféricos, podendo acarretar problemas de interação entre as células, bem como entre as células e os axônios através de alterações na expressão de moléculas de adesão importantes neste processo (Hagge *et al.*, 2002). Além disso, a presença do *M. leprae* atua como estímulo para a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α e o IFN- γ pelos macrófagos e linfócitos T, respectivamente (Dockrell *et al.*, 1996).

Recentemente, estudos de vias de sinalização celular demonstraram a capacidade do *M. leprae* de ativar a enzima Erk através de um mecanismo dependente da enzima Mek, e a conseqüente liberação de ciclina D1, que estimula a célula a proliferar (Tapinos & Rambukkana, 2005). Tal mecanismo pode explicar de que forma o *M. leprae* induz a proliferação das células de Schwann. Outro trabalho demonstra ainda a capacidade do bacilo de interferir na via endocítica de modo a impedir a acidificação excessiva do fagossomo (Alves *et al.*, 2004). Em conjunto, estes fatores fornecem um nicho propício para a lenta e

insidiosa proliferação do bacilo, culminando com o desenvolvimento da doença.

A questão da perda de mielina gera explicações controversas. Uma das hipóteses propostas sugere que este processo independe do fato do bacilo estar ou não viável, já que a simples presença de componentes de parede tais como PGL-1 seria suficiente para desencadeá-lo (Rambukkana *et al.*, 2002). Em contrapartida, resultados observados a partir de co-cultura de células de Schwann e neurônios de ratos não demonstraram perda maciça de mielina ou destruição axonal em virtude da exposição ao bacilo (Hagge *et al.*, 2002). Entretanto, embora o

M. leprae seja observado com maior frequência em fibras não mielínicas, a degeneração axonal é considerada o fator crítico que leva ao comprometimento neural.

O comprometimento neurológico da hanseníase é capaz de afetar as fibras motoras, sensoriais e autônomas e pode ser desencadeado por mecanismos bioquímicos, através da influência do *M. leprae* sobre o metabolismo celular, por dano mecânico, decorrente do influxo de células e fluido, ou dano imunológico. A resposta de hipersensibilidade característica das reações do tipo 1 (Reação reversa) constitui um dos principais responsáveis pelos danos neurais, especialmente em pacientes do pólo tuberculóide (revisado por Sampaio *et al.*, 2004). As lesões neurais são caracterizadas por infiltrado inflamatório crônico ou subagudo composto por células epitelióides ou macrófagos infectados pelo *M. leprae* (Scollard *et al.*, 1999).

Outro aspecto importante a ser considerado reside na morte celular, a qual pode ocorrer em virtude de diferentes processos. Um destes é a apresentação de antígenos do *M. leprae* aos linfócitos T citotóxicos, resultando na indução da citotoxicidade mediada por células e conseqüente morte das células infectadas (Spierings *et al.*, 2000). Além disso, freqüentemente ocorre a indução de apoptose nas células de Schwann infectadas. Recentemente, Oliveira e cols. (2005) demonstraram a expressão de receptores de TNF- α e TGF- β (do inglês “transforming growth factor beta”) nas células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*, bem como a indução da expressão destas citocinas e de seus respectivos receptores após a infecção. Estes resultados em conjunto com dados anteriores à respeito da apoptose induzida após ativação de TLR2 (Oliveira *et al.*, 2003), sugerem que a apoptose das células de Schwann infectadas é induzida pela interação do *M. leprae* com as células hospedeiras. Além disso, o aumento de expressão observado nesse trabalho corrobora resultados anteriores,

que apontaram o TNF- α como citocina-chave nos mecanismos de dano neural, especialmente durante os episódios reacionais (Sarno *et al.*, 2000).

4. Contatos domiciliares

Sabe-se que muitos indivíduos com infecção subclínica, a qual pode ser detectada através da presença de células T ou anticorpos específicos para o *M. leprae*, não chegam a desenvolver a doença e que a proximidade com pacientes é um importante determinante da transmissão (Shumin *et al.*, 2001). A combinação destes dois fatores sugere que a transmissão da Hanseníase seja mais freqüente entre indivíduos residentes na mesma casa, que vivam no peri- domicílio, ou ainda que tenham contato íntimo com o paciente (Van Beer *et al.*, 1999; Fine *et al.*, 1997; Godal *et al.*, 1971), o que poderia vir a justificar a implantação de algum tipo de terapia profilática em familiares ou outras pessoas muito próximas dos pacientes (Smith & Smith, 2000).

Em contrapartida, sabe-se que, apesar da exposição constante, a prevalência da doença dentre os contatos é baixa, o que provavelmente se deve ao desenvolvimento de uma resposta imune eficaz na grande maioria destes indivíduos (Godal *et al.*, 1971). Além disso, fatores tais como o tempo de exposição, forma clínica do caso-índice (Douglas *et al.*, 2004), idade do contato, distância física e genética entre ele e o paciente, (Moet *et al.*, 2006), imunização com BCG e condições sócio-econômicas das famílias expostas (Duppre N. Comunicação pessoal) são importantes para a determinação de quais indivíduos poderão desenvolver a doença.

O programa de eliminação proposto pela OMS determina a vacinação dos contatos com BCG como forma de prevenção de novos casos. Além disso, estes indivíduos são acompanhados através de exames anuais a fim de facilitar o diagnóstico de possíveis novos casos nas famílias (WHO, 2005b). Entretanto, conforme descrito anteriormente, apesar deste acompanhamento e da existência de um tratamento eficaz, ainda hoje os programas de eliminação não foram capazes de reduzir significativamente as taxas de incidência da doença, o que evidencia a importância do estabelecimento de métodos mais eficientes para prevenção da hanseníase.

5. Estudos genéticos

O genoma completo do *M. leprae* foi publicado em 2001. A partir desta sequência o tamanho do genoma foi caracterizado como tendo 3,27 Mb, conteúdo G+C médio de 57,8 % e 1604 genes. Comparações detalhadas entre os genomas do *M. leprae* e do *M. tuberculosis* mostraram uma perda maciça de genes pelo *M. leprae*, o que poderia explicar tanto a lenta taxa de crescimento do bacilo, quanto sua incapacidade de crescimento *in vitro* (Cole *et al.*, 2001).

O genoma do *M. leprae* contém 1.116 pseudogenes que equivalem a cerca de 27% do seu genoma total. Estes genes recebem esta denominação devido à perda de regiões necessárias para a sua transcrição e/ou tradução. A análise funcional dos genes preservados em *M. leprae* revela uma integridade na maioria das vias anabólicas e a presença de deleções e mutações em algumas vias catabólicas essenciais (revisado por Vissa e Brennan, 2001). A maioria dos genes perdidos pelo *M. leprae* codificam enzimas essenciais (isoenzimas) que se apresentam duplicadas no genoma de *M. tuberculosis*, o que demonstra uma grande redundância no genoma deste patógeno. A presença de um número tão elevado de pseudogenes reflete a enorme adaptação do *M. leprae* à existência intracelular.

Recentemente, em 2005, um trabalho multinacional demonstrou claramente a reduzida variabilidade do *M. leprae*. Esse trabalho utilizou 7 cepas de *M. leprae* obtidas da Etiópia, Brasil, México, Tailândia, Estados Unidos e duas obtidas da Índia. A cepa indiana de Tamil Nadu (TN) foi utilizada como base para as comparações, as quais foram capazes de revelar um padrão de agrupamento filogenético apenas quando foram utilizados polimorfismos de base única (SNPs, do inglês “single nucleotide polymorphisms”) como marcadores. Mais especificamente, as análises com SNPs foram capazes não apenas de detectar diferenças entre as cepas, mas também de fornecer evidências para a formulação de hipóteses a respeito da rota de disseminação da doença por todo o mundo (Monot *et al.*, 2005). A partir destes resultados é possível concluir que, uma vez, de acordo com os dados publicados até então, o patógeno apresenta variabilidade genética reduzida, o estado fisiológico do hospedeiro representa o fator determinante no desenvolvimento e severidade da doença.

Nos tempos atuais, um dos principais usos da epidemiologia molecular talvez seja o estudo de doenças infecciosas, particularmente visando, por um lado, à caracterização de patógenos, e, por outro, a identificação de indivíduos geneticamente suscetíveis. Dependendo da frequência de determinado genótipo de suscetibilidade em uma população exposta ao agente etiológico, essa informação pode ser considerada útil para justificar a implantação de medidas de prevenção da doença no local (Preston, 2003).

No caso específico da hanseníase, as características clínicas da doença sugerem a participação de vários genes na regulação da resposta imune no que diz respeito à proteção/suscetibilidade. Os estudos de associação e ligação desenvolvidos até então fornecem evidências para esta sugestão, já que detectaram associação em diferentes genes e regiões, conforme exposto na revisão de Fitness e cols. (2002) e descrito mais adiante. Além disso, sabe-se que a Hanseníase não se manifesta na grande maioria dos indivíduos infectados, que frequências aumentadas de doentes são observadas em famílias com casamentos consangüíneos, que as taxas de prevalência observadas são diferentes dentre os grupos étnicos ainda que situados em uma mesma área endêmica e que, tanto o desenvolvimento de hanseníase *per se* quanto das diferentes formas clínicas não são eventos aleatórios em parentes afetados (revisado por Beiguelman, 1968).

Tais observações têm estimulado estudos genéticos em Hanseníase abordando suas três vertentes principais, representadas pela suscetibilidade, severidade e morbidade. Esta última, mais especificamente, encontra-se diretamente relacionada às diferentes complicações que acometem os pacientes durante os estados reacionais com destaque para o grau de incapacidade que reflete o nível de lesão neural observado em alguns indivíduos. Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado que os diferentes fenótipos resultam da variação de numerosos loci, cada um deles contribuindo em parte para a suscetibilidade (Marquet & Schurr, 2001).

5.1. Metodologias de estudo

As análises de suscetibilidade genética em doenças complexas como a hanseníase podem ser realizadas tanto através de estudos de ligação quanto em estudos de associação. Em

linhas gerais, estas duas metodologias diferem principalmente devido ao fato dos estudos de

ligação responderem perguntas relacionadas a um locus, enquanto os estudos de associação respondem perguntas a respeito de alelos (Strachan & Read, 2002).

Os conceitos de ligação e desequilíbrio de ligação são de fundamental importância em epidemiologia genética. Dois loci gênicos são ditos ligados quando são transmitidos em conjunto em uma frequência maior que a esperada em uma herança dita independente. Ou seja, dois alelos encontram-se em desequilíbrio de ligação quando são encontrados juntos, formando um bloco haplotípico, mais frequentemente do que o esperado em uma população (Burton *et al.*, 2005).

Os estudos de ligação podem ser utilizados como uma primeira etapa de estudo de um determinado caráter, uma vez que podem ser utilizados para o mapeamento de diversas regiões no genoma que contenham um gene relacionado à doença, ainda que o pesquisador não disponha de hipóteses preliminares. Este tipo de análise é conduzido obrigatoriamente em amostragens familiares e geralmente tem seus resultados apresentados como um “logaritmo de probabilidades” calculado em função da fração de recombinação ou da posição cromossomal medida em centimorgans (cM, equivalente a 1×10^6 bases). Este valor, conhecido como “LOD score” indica evidência de ligação significativa quando maior ou igual a 3 (Teare & Barret, 2005). Os estudos de associação encontram-se descritos de forma mais detalhada nos itens que se seguem.

5.2. Tipo de amostragem e desenho de estudo para associação de genes a doenças complexas

Em linhas gerais, os estudos de ligação e associação são utilizados para identificação e mapeamento fino de loci envolvidos no desenvolvimento de doenças. O processo de identificação do polimorfismo responsável pela doença em questão pode ser afetado por vários fatores, dentre eles a baixa penetrância da variação, desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos fisicamente próximos do marcador em questão e a possibilidade da existência de mais de um marcador para a doença (Koeleman *et al.*, 2000), como sugerido na hanseníase.

Os estudos de associação podem ser desenvolvidos de várias maneiras diferentes, seja

utilizando amostragens familiares ou populacionais (de indivíduos não relacionados). Os estudos baseados em populações podem pertencer a dois tipos principais: os estudos de caso-controle e os estudos de coortes. Ambos consistem na comparação entre grupos, diferenciando-se apenas na forma como os grupos são formados.

Os estudos de caso-controle subdividem os indivíduos em afetados (casos) e não afetados (controles) e analisam a distribuição alélica nos dois grupos. Este desenho de estudo é ideal para estudos genéticos de associação em que se deseja verificar a homogeneidade de frequências de determinado marcador em indivíduos sadios e afetados. Como resultado, pode ser observada uma frequência aumentada de um determinado alelo em pacientes, caracterizando a suscetibilidade, ou em controles, caracterizando resistência. Um terceiro resultado pode consistir na associação de um determinado locus cujo genótipo não influencia diretamente o fenótipo em questão, desde que o mesmo esteja em desequilíbrio de ligação com o locus associado ao fenótipo estudado (Abel & Dessein, 1998). A evidência de associação é apresentada com frequência através dos valores de Odds Ratio (OR), que representam uma razão entre as probabilidades de o indivíduo carreador do alelo de risco estar ou não doente.

Este tipo de estudo, entretanto, pode ser afetado por diversos fatores, dentre os quais se destaca a estratificação da população. Para evitar este tipo de problema, frequentemente os estudos de associação utilizam amostragens familiares, como as chamadas “famílias nucleares” compostas pelos pais biológicos e um filho afetado. Este tipo de estudo é ideal para os chamados testes de desequilíbrio de transmissão (TDT), cujo princípio estatístico foi descrito em 1993 (Spielman *et al.*, 1993). Este tipo de abordagem tem como finalidade determinar o padrão de transmissão dos alelos de um determinado marcador a partir de pais heterozigotos para os filhos afetados, utilizando os alelos não transmitidos pelos pais como controle daqueles que foram transmitidos (Strachan & Read, 2002). Esta metodologia de estudo, entretanto, não é útil para doenças desenvolvidas em idades mais avançadas, como o Mal de Alzheimer, já que isso impossibilita a obtenção dos genótipos parentais (Kaplan *et al.*, 1998). Este tipo de análise já sofreu diversas adaptações de modo a permitir a utilização de amostragens variadas de famílias (Lunetta *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2003), incluindo aquelas em que os dados parentais são incompletos ou inexistentes (Purcell *et al.*, 2005). Entretanto, tais adaptações acarretam perdas no poder do teste e geralmente provocam erros na análise final ao empregar cálculos matemáticos para estimar os genótipos parentais a partir dos genótipos dos filhos (Martin *et al.*, 2003). Soma-se a isso o fato de algumas dessas alterações jamais terem sido validadas na prática, consistindo apenas em simulações realizadas em programas de computador.

5.3. Seleção dos marcadores genéticos

O objetivo de identificar marcadores genéticos de suscetibilidade no hospedeiro pode ser alcançado através de, pelo menos, duas estratégias: a primeira consiste na escolha de genes candidatos com função conhecida e possivelmente relacionada ao controle da infecção. Uma segunda metodologia utiliza o rastreamento genômico, que busca em todo o genoma regiões cromossômicas associadas à doença, com a vantagem de possibilitar a descoberta de associação em genes cuja função não esteja aparentemente relacionada à doença (Fitness *et al.*, 2002).

5.3.1. Estudos de associação com genes candidatos

Dentro da primeira abordagem, os genes de citocinas têm sido bastante estudados devido à sua atuação no controle da natureza (celular ou humoral), gravidade e duração da resposta contra o agente infeccioso, características que tornam tais moléculas alvos ideais para estudos de genes candidatos. Estudos recentes têm sugerido que SNPs em promotores e regiões codificantes de genes de citocinas tais como o TNF- α e a IL-10 poderiam explicar os diferentes padrões de resposta observados entre pacientes tuberculóides, que produzem mais TNF α , e lepromatosos, com níveis mais altos de IL-10 (Moraes *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2002). Além disso, citocinas do eixo IL-12/IL-23/IFN- γ também desempenham papel essencial no desenvolvimento de uma resposta imune eficaz ao *M. leprae*, o que as torna alvo de estudo assim como o TNF- α e a IL-10.

Um dos primeiros estudos de associação entre SNPs e a Hanseníase foi publicado por Rajalingam e cols. em 1997. Este trabalho utilizou o gene de uma molécula transportadora de peptídeos (TAP) como candidato e identificou um alelo associado à suscetibilidade à Hanseníase tuberculóide. Os principais estudos de associação em Hanseníase utilizando a abordagem de genes candidatos e SNPs como marcadores encontram-se reunidos no Quadro 1.

Quadro 1: Principais estudos de associação em Hanseníase utilizando SNPs como marcadores e genes candidatos como estratégia de escolha dos alvos de análise.

Gene	População	Genótipo/alelo	Fenótipo*	Referência
VDR	Índia	Códon 352 (TT)	Suscetibilidade à forma lepromatosa (OR=1,67; P=0,03).	Roy <i>et al.</i> , 1999
		Códon 352 (CC)	Suscetibilidade à forma tuberculóide (OR= 3,22; P=0,001).	
		Códon 352 (TC)	Proteção contra Hanseníase <i>per se</i> (OR=0,58; P<0,01).	
	Malásia	Códon 352 (CC)	Suscetibilidade (OR= 4,3; P=0,004).	Fitness <i>et al.</i> , 2004
CRI	Malásia	K1590E (GG)	Proteção (OR= 0,3; P=0,02).	Fitness <i>et al.</i> , 2004
TNFA	Indiana	-308A	Suscetibilidade à Hanseníase lepromatosa (OR=3,0; P=0,02).	Roy <i>et al.</i> , 1997
	Brasileira	-308A	Proteção contra Hanseníase <i>per se</i> ($\chi^2=7,55$; P=0,005) e formas multibacilares ($\chi^2=9,63$; P<0,005).	Santos <i>et al.</i> , 2000
	Brasileira	-308A	Suscetibilidade à forma PB em relação a MB (OR=1,6; P<0,05).	Santos <i>et al.</i> , 2002
IL10	Brasileira	-819T	Suscetibilidade (OR=2,28; P<0,01)	Santos <i>et al.</i> , 2002
	Brasileira	-3575A/-2849G/-2763C	Proteção à hanseníase <i>per se</i> (OR=0,35; p=0,0005) e a forma MB (OR=0,32; P=0,006)	Moraes <i>et al.</i> , 2004
		-3575T/-2849A/-2763C	Suscetibilidade à Hanseníase <i>per se</i> (OR=2,37; P=0,027)	
	Indiana	-3575T /-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C	Proteção (OR=0,58; p=0,01)	Malhotra <i>et al.</i> , 2005
IL12RB2	Japonesa	-1035G	Suscetibilidade (OR=3,97; P<0,001)	Ohyama <i>et al.</i> , 2005
		-1023G	Suscetibilidade (OR=2,95; P<0,01)	
		-464G	Suscetibilidade (OR=3,64; P<0,01)	

*O fenótipo de suscetibilidade ou proteção acompanha os valores de Odds Ratio (OR) ou Qui-quadrado (χ^2) e significância estatística (Valor de P).

Os estudos genéticos de associação frequentemente geram resultados pouco confiáveis devido a diferentes fatores tais como estratificação populacional, tamanho amostral reduzido e seleção inadequada dos controles. Sendo assim, as características ideais de um estudo de associação incluem amostragens numerosas, valores de *p* reduzidos e evidências de associação no que diz respeito ao efeito biológico. Além disso, é necessária a confirmação deste resultado em um estudo independente, e se possível, tanto em estudos populacionais quanto em amostragens de famílias (Dahlman *et al.*, 2002; Cardon & Palmer, 2003).

Utilizando estes parâmetros como base, a partir da observação do Quadro 1, podemos destacar a importância dos genes VDR, IL-10 e TNF- α , cujas evidências de associação foram observadas em mais de um trabalho. No caso do TNF- α , apesar de o resultado inicial ter associado o alelo -308A a suscetibilidade à Hanseníase lepromatosa (Roy *et al.*, 1997), diferentes estudos subsequentes foram capazes de demonstrar o efeito protetor deste alelo utilizando tanto amostragens reduzidas (Santos *et al.*, 2000) quanto numerosas (Santos *et al.*, 2002) em estudos de caso-controle. A capacidade protetora do alelo A foi também descrita em experimentos utilizando amostragens familiares (Shaw *et al.*, 2001), demonstrando a reprodutibilidade destes resultados em desenhos de estudo diferentes. Os estudos de associação do gene *TNFA* em hanseníase serão comentados mais detalhadamente em um item específico para este gene.

No caso do gene do receptor de vitamina D, a evidência de associação detectada em 1999 por Roy e cols. foi replicada em parte por Fitness e cols. (2004), já que o genótipo CC anteriormente associado à hanseníase tuberculóide foi associado à hanseníase *per se*. No caso da IL10, a evidência de associação foi confirmada em duas populações diferentes, brasileira e indiana, embora os haplótipos observados sejam diferentes (Santos *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2004; Malhotra *et al.*, 2005).

Ainda no estudo de SNPs em genes candidatos, Wibawa e cols. (2002) demonstraram associação entre genótipos TT e TC na posição +7809 do gene da laminina e o desenvolvimento de Hanseníase nas formas lepromatosa e tuberculóide, respectivamente. Neste estudo foi utilizada uma população oriunda da Indonésia composta por 53 pacientes e 58 controles, constituindo um bom exemplo de associação utilizando tamanho amostral reduzido.

Em contrapartida, comumente os estudos de associação geram resultados negativos. Um bom exemplo ocorre com o polimorfismo da posição -238 do gene TNF- α . Apesar de este polimorfismo estar próximo do polimorfismo -308, o estudo realizado por Santos e cols. (2002) não detectou evidência de associação. Um trabalho publicado no ano seguinte optou pela abordagem do eixo IL-12/IFN γ . Neste trabalho, foram analisadas as frequências de diferentes SNPs nos genes *IFNGR1* e *IL12RB1* em uma população Coreana e não foi detectada qualquer evidência de associação (Lee *et al.*, 2003). Em seguida, o estudo publicado por Fitness e cols. (2004) utilizou diversos SNPs localizados em diferentes genes candidatos e foi capaz de detectar associação apenas em polimorfismos nos genes *VDR* e *CRI1*, conforme descrito anteriormente. Dentre os genes cujos polimorfismos não apresentaram evidência de associação encontram-se o *CCL3*, *ICAM1*, *IFNG*, *IL10*, *LTA*, *MBL*, *SLC11A1*, *TLR2* e *TLR4*.

Além dos genes de citocinas, os receptores envolvidos no reconhecimento do bacilo e apresentação de antígenos para ativação da resposta imune específica também constituem alvos importantes para o estudo de polimorfismos. Neste contexto, as proteínas do complexo MHC constituem indubitavelmente um importante objeto de estudo. O primeiro estudo capaz de determinar associação entre HLA e suscetibilidade à hanseníase foi publicado em 1976, através de um desenho experimental utilizando famílias compostas por casais e um filho afetado. Estudos posteriores confirmaram a importância do alelo HLA-DR2, atualmente subdividido em DR15 e DR16, na suscetibilidade à hanseníase (revisado por Hill, 1998). Em seguida, diversos trabalhos foram desenvolvidos, demonstrando a importância de diferentes alelos de HLA, especialmente DR15, na resistência/suscetibilidade à hanseníase (Ottenhoff *et al.*, 1986; Mitra *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2001).

Ainda sobre os receptores, um estudo desenvolvido com a população Coreana detectou associação entre um polimorfismo no gene do TLR2 e a suscetibilidade à hanseníase lepromatosa ao resultar em níveis reduzidos de IL-12 e aumentados de IL-10 (Kang *et al.*, 2004). Em seguida, ao realizar experimentos com camundongos, Bochud e cols. demonstraram uma incapacidade de ativação do fator de transcrição NF κ B na presença deste polimorfismo (Bochud *et al.*, 2003). Posteriormente, Malhotra e cols. demonstraram que este polimorfismo é, na verdade, resultante da duplicação do exon 3 deste gene (Malhotra *et al.*, 2005).

Outro alvo importante é o gene da proteína transportadora de íons SLC11A1 (do inglês “solute carrier family 11, member 1), conhecida como NRAMP (do inglês “natural resistance- associated macrophage protein”). Estudos em famílias vietnamitas observaram ligação deste gene à suscetibilidade, mas não detectaram associação significativa ($p=0,06$) ao estudar um haplótipo composto por 6 polimorfismos (Abel *et al.*, 1998). Estudos de um microssatélite localizado na região promotora também obtiveram resultados negativos (Roy *et al.*, 1999). Em seguida, análises de uma população africana demonstraram associação entre uma deleção de 4 nucleotídeos na região 3' não traduzida (3'UTR) e a Hanseníase multibacilar (Meisner *et al.*, 2001). Outras análises detectaram ainda a ligação do NRAMP1 à resposta a lepromina (Alcaïs *et al.*, 2000) bem como um fenótipo de suscetibilidade conferido pela combinação de genótipos do microssatélite da região promotora e a reação negativa à lepromina (Ferreira *et al.*, 2004).

5.3.2. Estudos de rastreamento genômico

A hanseníase é uma doença que apresenta características ideais para estudos de rastreamento genômico uma vez que apresenta progressão lenta e taxas de mortalidade baixas, possibilitando o estudo de gerações mais antigas. O advento das técnicas de genotipagem de microssatélites associado ao seqüenciamento do genoma humano, que localizou tais marcadores, tem permitido o uso deste desenho de estudo com relativa freqüência. Esta técnica tem-se mostrado vantajosa devido à sua característica única de possibilitar a identificação de regiões em que, *a priori*, não se julgava existir associação (Siddiqui *et al.*, 2001), conferindo uma vantagem evidente no caso de doenças complexas. Os estudos genéticos de ligação em hanseníase desenvolvidos através de rastreamento genômico encontram-se reunidos no Quadro 2.

Quadro 2: Estudos genéticos de ligação realizados em hanseníase com base na estratégia de rastreamento genômico. *todos os fenótipos de suscetibilidade referem-se à hanseníase *per se*.

Principal região associada	População analisada	Fenótipo observado*	Referência
10p13	Indiana	Suscetibilidade	Sidiqui <i>et al.</i> , 2001
20p12	Indiana	Suscetibilidade	Tosh <i>et al.</i> , 2002

6q25	Vietnamita	Suscetibilidade	Mira <i>et al.</i> , 2003
10p13	Vietnamita	Severidade (PB)	
17q11	Brasileira	Suscetibilidade	Miller <i>et al.</i> , 2004; Jamieson <i>et al.</i> , 2004

O primeiro estudo de rastreamento genômico realizado em hanseníase detectou ligação na região 10p13. Esta região abriga, dentre outros, o gene que codifica o receptor de manose de macrófagos, envolvido no reconhecimento do LAM e a internalização do *M. leprae* (Siddiqui *et al.*, 2001). Em seguida, estudos desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisadores identificaram a importância da região 20p12 (Tosh *et al.*, 2002). Estes trabalhos, entretanto, apenas sugerem os genes envolvidos de acordo com a sua função e por estar localizado na região em questão.

Mais recentemente, Mira e cols. (2003) identificaram a importância da região 6q25 na suscetibilidade à Hanseníase *per se* em um estudo da população Vietnamita. A estratificação da análise de acordo com a forma clínica permitiu ainda que fosse confirmada a associação da região 10p13 nas famílias com casos unicamente paucibacilares. É importante destacar que a análise das famílias utilizada no trabalho de Siddiqui e cols. (2001) demonstra que, de fato, o grupo recrutou um grande número de pacientes paucibacilares. No ano seguinte, a associação da região 6q25 foi melhor caracterizada com a utilização de clonagem posicional (Mira *et al.*, 2004). Neste segundo trabalho a busca por associação foi aprofundada através de desenhos experimentais baseados em estudos de associação (TDT e caso-controle), permitindo a identificação de dois genes, *PARK2* e *PACRG* como os responsáveis pela associação observada. Por último, ainda em 2004, um grupo inglês em colaboração com brasileiros demonstrou a importância da região 17q11, a qual contém diversos genes importantes na resposta imunológica tais como *NOS2A* e *CCL2*, na suscetibilidade à Hanseníase (Miller *et al.*, 2004; Jamieson *et al.*, 2004). A Figura 2 fornece um esquema das diferentes abordagens que levam à escolha de genes candidatos para os estudos genéticos de associação em Hanseníase.

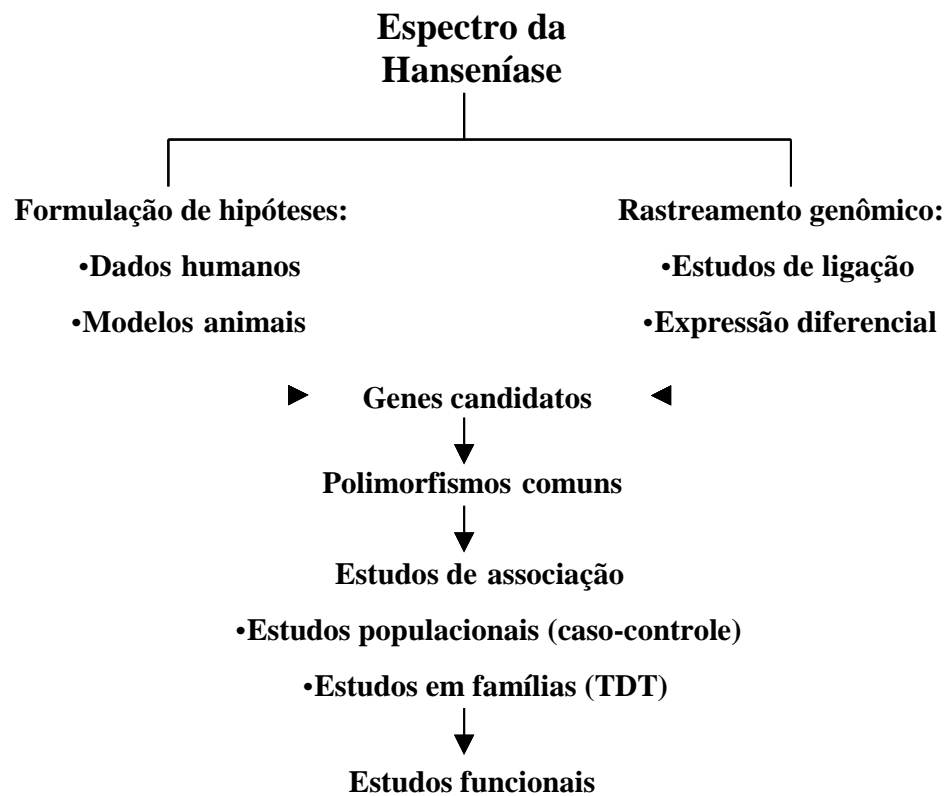


Figura 2: Estratégias de estudos genéticos em hanseníase. A formulação de hipóteses e os estudos de rastreamento genômico fornecem genes candidatos para estudos de associação com polimorfismos e posteriormente seu significado funcional. Adaptado de Alcaïs *et al.*, 2005.

6. TNF- α e linfotoxina (LT)- α

O TNF- α e a linfotoxina- α (LT- α , ou TNF- β) são duas proteínas relacionadas tanto estrutural quanto funcionalmente, ambas isoladas em 1984 a partir de macrófagos (Gray *et al.*, 1984) e linfócitos T (Pennica *et al.*, 1984), respectivamente. O grupo de genes TNF localiza-se no braço curto do cromossomo 6, na região do MHC de classe III (Spriggs *et al.*, 1992). São chamados de TNF os genes do TNF- α (*TNFA*), LT- α (*LTA*) e LT- β (*LTB*), sendo que o gene *TNFA* é fisicamente precedido pelo gene *LTA* dentro desta região (Randolph *et al.*, 2005). A região do cromossomo 6 que abriga o complexo MHC encontra-se representada na Figura 3.

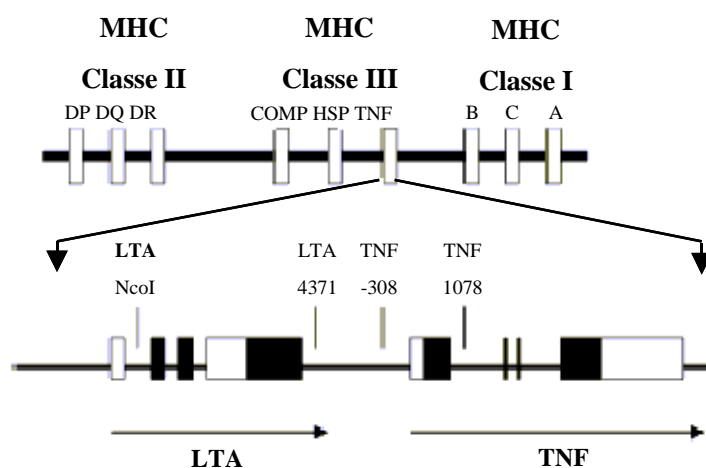


Figura 3: Representação esquemática da região que abriga os genes do MHC com indicação dos principais polimorfismos. Adaptado de Randolph *et al.*, 2005.

Tanto o TNF- α quanto a LT- α são citocinas pró-inflamatórias com algumas ações redundantes visto que compartilham um mesmo receptor. O TNF- α é uma citocina pleiotrópica cujas ações biológicas são vastas e muitas vezes contrastantes. O TNF- α participa na resistência a agentes infecciosos, ativando a função microbicida de macrófagos. Sua secreção é induzida durante a inflamação aguda, ativando uma cascata de sinalização que culmina com a ativação de fatores de transcrição tais como o NF κ B, desencadeando eventos que podem levar à apoptose e necrose. O TNF- α é também um mediador pró-inflamatório importante que acarreta localmente a produção de NO e a vaso-dilatação, e sistemicamente, induzindo febre e outros sintomas da inflamação, sendo caracterizado como mediador central na sepse (revisado por Idriss & Naismith, 2000).

A maior parte dos estudos de polimorfismos de TNF- α consistem em estudos de associação entre SNPs localizados na região promotora e doenças infecciosas e auto-imunes. O principal SNP estudado para este fim localiza-se na região -308 e consiste em uma troca de G para A. Tal polimorfismo já teve sua associação descrita para diversas doenças infecciosas tais como malária (McGuire *et al.*, 1994), Doença de Chagas (Rodriguez-Perez *et al.*, 2005), leishmaniose (Cabrera *et al.*, 1995) e infecções por *Helicobacter pylori* (Zambon *et al.*, 2005), bem como para doenças auto-imunes (Sallakci *et al.*, 2005), coronarianas (Vendrell *et al.*,

2003) e

carcinomas (Azmy *et al.*, 2004). Estudos de expressão têm demonstrado que a presença do alelo A na posição -308 acarreta um aumento na expressão deste gene em resposta ao estímulo de LPS (Sallacki *et al.*, 2005). Entretanto, a implicação funcional deste SNP na infecção pelo *M. leprae*, no que diz respeito à regulação positiva ou negativa da expressão, gera resultados controversos, indicando que o efeito depende do tipo de estímulo e do tempo de exposição (revisado Sampaio *et al.*, 2003).

No caso do gene da LT- α , o principal polimorfismo analisado encontra-se na posição +252, localizada no primeiro intron deste gene, e consiste em uma troca de A para G. Este polimorfismo isoladamente já foi associado a doenças infecciosas com a leishmaniose (Cabrera *et al.*, 1995) e auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (Lu *et al.*, 2005). Em 2002, um estudo de associação envolvendo diversos SNPs do gene *LTA* demonstrou associação entre o polimorfismo LTA+252 e episódios de infarto do miocárdio (Ozaki *et al.*, 2002). Este mesmo trabalho demonstrou ainda a implicação funcional deste polimorfismo através de ensaios de gene repórter, demonstrando um aumento na expressão do gene LTA na presença do alelo G.

Conforme comentado em itens anteriores, o primeiro estudo em hanseníase publicado com SNPs de TNF- α observou uma associação entre o alelo -308A e a hanseníase lepromatosa em uma amostra da Índia (Roy *et al.*, 1997). Estes resultados, entretanto, não foram confirmados em um estudo piloto publicado em 2000, em que este mesmo alelo foi associado à proteção contra forma clínicas severas em uma amostra de pacientes brasileiros (Santos *et al.*, 2000).

Fora do contexto de suscetibilidade, outros trabalhos têm demonstrado que alterações nos padrões de expressão de genes de citocinas em resposta à terapia antiinflamatória estão intimamente ligadas à evolução do quadro clínico do paciente após o tratamento (Moraes *et al.*, 2000). Foi identificada ainda uma correlação entre os dados genotípicos e o teste de Mitsuda uma vez que indivíduos carreadores do alelo A apresentam aumento na resposta de hipersensibilidade, fornecendo ainda mais evidências do papel crucial do TNF- α na resposta imune ao *M. leprae* (Moraes *et al.*, 2001). Resultados de estudos de ligação utilizando famílias brasileiras demonstraram inicialmente a importância do locus TNF. Em seguida, estudos de

desequilíbrio de transmissão reproduziram resultados anteriores ao detectarem a proteção conferida pelo alelo – 308A (Shaw *et al.*, 2001).

Dados provenientes de um estudo mais recente com SNPs de TNF- α não observaram associação para o polimorfismo da posição -238, mas foram capazes de confirmar o efeito protetor conferido pelo alelo -308A (Santos *et al.*, 2002). Por último, foram publicados os resultados de uma avaliação clínica e bacteriológica em pacientes com diferentes genótipos para estes SNPs. Neste trabalho, foi verificada uma correlação entre o alelo -308A e valores reduzidos de índice baciloscópio. O alelo -238A, ao contrário, foi encontrado com maior frequência em indivíduos multibacilares com baciloscopia elevada (Vanderborgh *et al.*, 2004).

Além dos estudos de associação com cada polimorfismo em isolado, igualmente importante é o estudo deste polimorfismo em conjunto com outros presentes em um mesmo cromossomo, formando haplótipos. O haplótipo formado pelos polimorfismos TNF-308 e LTA+252 têm sido associado a doenças cardíacas (Padovani *et al.*, 2000), asma (Randolph *et al.*, 2005), artrite reumatóide (Newton *et al.*, 2003) e diabetes do tipo I (Bouqbis *et al.*, 2003).

Em hanseníase, o trabalho de Shaw e cols. (2001) demonstrou tanto o desequilíbrio de ligação entre estes SNPs quanto a associação entre os haplótipos -308G/+252A e -308A/+252A, e os fenótipos de suscetibilidade e proteção, respectivamente. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório analisaram a frequência de um haplótipo estendido (composto pelos SNPs LTA+252 e TNF-863, -308 e -238) e identificaram associação à doença. Análises de varredura indicaram uma importância maior para os SNPs LTA+252 e TNF -308, os quais concentrariam juntos a informação necessária para identificação de suscetibilidade/proteção, caracterizando este haplótipo como uma “etiqueta” (Vanderborgh PR. Comunicação pessoal).

7. PARK2

O gene *PARK2* foi identificado inicialmente em estudos que visavam a busca de genes e regiões associadas ao desenvolvimento de Parkinsonismo juvenil (Matsumine *et al.*, 1997). A caracterização estrutural da proteína parkina, codificada por este gene, demonstrou a presença de um domínio semelhante à ubiquitina (Ubl) em sua porção N-terminal e dois motivos do tipo RING em sua porção C-terminal, além do motivo IBR (do inglês “in between

RING”), localizado entre os domínios RING1 e 2 (Kitada *et al.*, 1998).

Como resultado a parkina foi classificada como uma E3 ligase do tipo RING portadora de dois domínios funcionais: o domínio Ubl, responsável pelo reconhecimento da proteína-alvo e o domínio RING, responsável pela interação com a enzima E2 (Shimura *et al.*, 2000). Funcionalmente, a parkina, assim como as outras E3 ligases regulam a formação de uma cauda poli-Ub na proteína, o que a torna alvo para o proteossomo 26S (Jackson *et al.*, 2000).

Conforme descrito anteriormente, a importância do gene *PARK2* na hanseníase foi demonstrada em estudos de rastreamento genômico (Mira *et al.*, 2004). O primeiro trabalho, em 2003 demonstrou associação na região 6q25 (Mira *et al.*, 2003). Estudos posteriores, em 2004 confirmaram a associação e detectaram os genes responsáveis pelo fenótipo de suscetibilidade. Neste trabalho, foram realizadas genotipagens para um painel composto por diversos polimorfismos distribuídos ao longo da região de estudo até que fossem identificados os genes *PARK2* e *PACRG* como os responsáveis pelo padrão de associação observado. De tal análise resultou ainda a identificação de um haplótipo de suscetibilidade composto por dois alelos, sendo eles o C no SNP rs1040079 e o T na região -2599. Estes dois SNPs consistem em trocas de T para C e encontram-se localizados na região promotora do gene *PARK2*. Contudo, conforme representado na Figura 4, tais genes encontram-se em orientação oposta no genoma (West *et al.*, 2003), permitindo a localização dos SNPs tanto na região promotora do gene *PARK2* quanto no primeiro intron do *PACRG*. Por fim, é importante comentar dados de estudos mais recentes, os quais não foram capazes de replicar os resultados de Mira e cols. (2004) em um estudo utilizando uma amostragem composta por indivíduos da população indiana (Malhotra *et al.*, 2005).



Figura 4: Representação esquemática dos genes *PARK2* e *PACRG* demonstrando sua localização em orientação oposta.

8. *NINJI*

O gene da ninjurina 1 foi descoberto durante estudos que visavam a identificação de genes com expressão alterada em células de Schwann após dano neural. Neste estudo foram analisados a partir de uma biblioteca subtrativa, clones de cDNA regulados positivamente após dano axonal induzido. O rastreamento desta biblioteca levou à identificação de um clone que codifica uma proteína de 152 aminoácidos e 16,3 kDa expressa em nervos periféricos, especialmente em células de Schwann e neurônios ganglionares (Araki & Mildbrant, 1996). Neste mesmo estudo foram demonstradas a localização desta proteína na superfície celular e sua função de promover a adesão entre as células de Schwann. No ano seguinte, este mesmo grupo estudou em detalhes os padrões de expressão deste gene demonstrando que o mesmo é expresso em diversos tecidos, tanto adultos quanto embrionários e que sua expressão é predominante em células epiteliais. Em conjunto, estes resultados sugerem que o papel da ninjurina seja o de promover a regeneração axonal após danos ao sistema nervoso periférico (Araki *et al.*, 1997).

Análises subseqüentes demonstraram a localização deste gene no cromossomo 9, em uma região previamente associada à uma neuropatia sensorial hereditária (Chadwick *et al.*, 1998). No ano seguinte, entretanto, estudos de associação não detectaram influência da ninjurina sobre o desenvolvimento desta patologia após comparação entre casos e controles (Mandich *et al.*, 1999).

No ano seguinte foi identificada a ninjurina 2, localizada no cromossomo 12 e envolvida em processos de regeneração axonal assim como a ninjurina 1 (Araki & Mildbrant, 2000). Posteriormente, em 2002, estudos utilizando a técnica de microarranjo confirmaram a indução da expressão de a ninjurina 1, após dano ao sistema nervoso periférico (Kubo *et al.*, 2002), o que torna este gene um forte candidato a estudos de associação à neuropatias, como no caso da hanseníase.

8. Racional

Conforme descrito nesta introdução, um dos principais problemas epidemiológicos da Hanseníase no Brasil ainda se reflete nas elevadas taxas de incidência. Adiante, uma vez que o indivíduo desenvolve a doença, mais importante ainda é o curso da infecção, que pode resultar no desenvolvimento de formas severas, bem como comprometimento neural, gerando diferentes graus de incapacidade muitas vezes com lesões irreversíveis. A solução de ambos os problemas requer a descoberta de novos métodos de prevenção. Sendo assim, na tentativa de interromper a cadeia de transmissão e, conseqüentemente diminuir a incidência da doença, é necessário diagnosticar precocemente os pacientes ou ainda identificar fatores que possam sugerir dentre os inúmeros indivíduos expostos, qual grupo apresenta maior probabilidade de desenvolver a doença, independente da forma clínica. Da mesma forma, a fim de evitar o desenvolvimento de formas severas e quadros de incapacidade, faz-se necessária a identificação de marcadores com valor prognóstico, os quais poderiam justificar um tratamento mais adequado.

Com este fim, diversos estudos genéticos têm identificado marcadores de suscetibilidade e/ou proteção tanto à hanseníase *per se* quanto às diferentes formas clínicas. Este tipo de estudo, entretanto, requer não somente a evidência de associação, mas também a confirmação destes resultados em desenhos de estudo independentes, evitando as associações espúrias. Sendo assim, o principal objetivo deste estudo consiste na seleção de uma nova população para estudos de associação cujos controles são compostos por indivíduos sadios residentes no mesmo domicílio de um paciente, o que garante exposição constante. Esta nova população, por apresentar amostras e desenho de estudo distintos dos utilizados anteriormente no laboratório, torna-se útil para a confirmação dos resultados. Por fim, uma vez que a associação é observada, igualmente importante é a busca do significado funcional da variação estudada. Para tanto, tornam-se necessárias análises de expressão, especialmente no caso dos marcadores com possível valor prognóstico, o que torna sua utilização efetivamente relevante.

II. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo consiste na busca de associação em marcadores genéticos anteriormente associados à suscetibilidade, severidade e morbidade na Hanseníase utilizando uma nova população de estudo e analisar o efeito de um novo marcador.

1. Objetivos específicos

- a) Selecionar uma nova população para estudos de caso-controle a partir da coleta de amostras de novos pacientes e contatos domiciliares sadios não relacionados geneticamente entre si ou com o paciente, que desempenham a função de controles expostos ao bacilo;
- b) Confirmar nesta população os resultados de associação à Hanseníase *per se* descritos para os SNP: -2599 e rs1040079 no gene de *PARK2* e -308 no gene de *TNF- α* .
- c) Estender as análises no locus do *TNF α* para o SNP +252 do gene *LT- α* .
- d) Comparar as frequências genótípicas e alélicas nos grupos de casos e controles.
- e) Construir haplótipos nos loci de *PARK2* e *TNFA/LTA* e comparar suas frequências entre as amostras.
- f) Comparar as frequências de um novo SNP, asp110ala, em um outro gene candidato *NINJI* possivelmente associado à morbidade em Hanseníase utilizando também a amostragem total de pacientes.
- g) Avaliar a associação funcional entre o polimorfismo asp110ala e os padrões de expressão da ninjurina 1 em presença de *M. leprae* em culturas de PBMC, em biópsias de nervo periférico de portadores tanto da forma neural pura da Hanseníase comparando-as com outras neuropatias;
- h) Verificar diferença de expressão alelo específica nos alelos asp e ala110 no gene *NINJI*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras clínicas

As amostras de sangue e biópsias utilizadas neste trabalho foram obtidas no Ambulatório Souza Araújo, localizado na Fundação Oswaldo Cruz e credenciado como centro de referência no controle da hanseníase. Os pacientes foram diagnosticados de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966). Após a obtenção do consentimento por escrito, a coleta das amostras foi realizada de acordo com as normas do Comitê de Ética desta mesma Instituição (protocolo CEP /FIOCRUZ 151/01).

2. População analisada

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas do sangue total de 212 pacientes e 255 contatos sadios de pacientes paucibacilares e multibacilares. Os critérios de inclusão dos contatos foram: residir no mesmo domicílio do paciente e não apresentar qualquer grau de parentesco co- sangüíneo com o paciente ou com os outros contatos que compõem a amostra. A população de pacientes foi constituída a partir de uma amostra composta por 114 paucibacilares e 98 multibacilares de acordo com a classificação da OMS. Os estudos do gene *NINJI* incluíram também uma amostra mais numerosa de pacientes composta por 765 indivíduos, sendo 321 paucibacilares e 444 multibacilares. A distribuição dos indivíduos de acordo com o sexo e as características étnicas encontram-se discriminadas na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição de frequências (%) dos indivíduos componentes das três populações de estudo de acordo com o sexo e a etnia.

	Etnia			Sexo	
	Brancos	Mestiços	Negros	Feminino	Masculino
Contatos (N=255)	61	32	7	64	36
Pacientes* (N=212)	54	40	6	40	60
Pacientes** (N=765)	52	38	10	37	63

*pacientes utilizados para os estudos caso-controle de confirmação. **pacientes utilizados para os estudos de associação do gene *NINJI*.

A classificação dos pacientes no que diz respeito aos diferentes graus de incapacidade foi realizada segundo as normas da OMS, a qual segue uma escala que vai de 0 a 2. A análise considera as características dos olhos, mãos e pés e atribui um grau a cada uma delas. O grau zero é atribuído aos indivíduos que apresentarem função normal nestas três regiões. O grau 1 é atribuído ao indivíduo que apresentar perda de sensibilidade na palma das mãos e/ou sola dos pés. Por fim, recebem grau 2 os indivíduos que apresentarem visão reduzida (incapacidade de contar dedos a 6 metros), e/ou danos visíveis, seja nas mãos ou nos pés. O maior grau observado, seja nos olhos, mãos ou pés, é considerado como o grau de incapacidade daquele indivíduo (ILEP, 2001).

3. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue total foi realizada com o auxílio do reagente DNAzol® segundo instruções do fabricante (Invitrogen). Brevemente, o sangue coletado utilizando tampão citrato como anticoagulante foi lavado em solução salina através da homogeneização em NaCl 0,9% e centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C). Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em solução hipotônica de Tris (20mM pH8,0) EDTA (10mM) para lise de hemácias. O material foi centrifugado novamente (4000 rpm durante 10 minutos) e, após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspense em DNAzol® (Invitrogen) para a lise das membranas e degradação das proteínas. Em seguida adicionou-se etanol absoluto de modo a dobrar o volume da mistura, a qual foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos para precipitação do DNA. Após a última centrifugação (14000 rpm, 5 minutos), o *pellet* foi secado à temperatura ambiente, ressuspense em solução alcalina (NaOH 8mM) e armazenado a - 20°C após incubação a 65°C por 1 hora em banho seco (Boeckel).

4. Genotipagem dos indivíduos

A genotipagem dos polimorfismos dos genes do TNF α , LT α , um dos polimorfismos do gene *PARK2*, e o polimorfismo asp110ala (rs17854540) do gene *NINJI* (representados como TNF-308, LTA+252, PK-2599 e NINJ110, respectivamente) foi realizada através do sistema PCR-RFLP (do inglês “polymerase chain reaction – restriction fragment length

polymorphism”).

No caso dos polimorfismos TNF-308 e PK-2599 foi utilizada uma estratégia descrita anteriormente (Wilson *et al.*, 1992), em que os oligonucleotídeos são desenhados de modo a induzir a substituição de um nucleotídeo (“mismatch”) em uma posição próxima à do alelo polimórfico, resultando na criação de um sítio para uma enzima de restrição. O SNP rs1040079 do gene *PARK2* foi genotipado através de sistema de discriminação alélica por PCR em tempo real.

4.1. Genotipagem por PCR-RFLP: as reações de amplificação foram realizadas em termociclador MJ Research modelo PTC-100. Os oligonucleotídeos utilizados, bem como as condições de ciclagem e tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se discriminados no Quadro 3. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L contendo tampão para *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) na concentração 1X, dNTP a 0,2 mM (Invitrogen, contendo dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 0,3 μ M de cada oligonucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA. No caso específico dos sistemas PK-2599 e NINJ110, a concentração de cada um dos oligonucleotídeos foi de 0,4 μ M.

Após a reação de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,7% em tampão TBE 0,5 X (Tris-borato 0,045 M, EDTA 1 mM). Foram aplicados 10 μ L do produto amplificado, homogeneizados em 2 μ L de tampão de corrida (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25%). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel a 100 V durante aproximadamente 40 minutos utilizando marcador de peso molecular (Invitrogen) de 123 pb, exceto para o SNP TNF-308, em que foi utilizado marcador de 50 pb. Em seguida o material genético foi submetido à incorporação de brometo de etídeo através da imersão do gel em solução de brometo de etídeo a 0,1 μ g/mL. As bandas foram visualizadas em transiluminador e fotografadas em sistema de fotodocumentação (Kodak EDAS).

Quadro 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação nos sistemas que utilizam a técnica de PCR-RFLP, condições de ciclagem e tamanho dos fragmentos amplificados em pares de base (pb).

SNP	Oligonucleotídeos (orientação 5'-3')	Ciclagem	Tamanho do fragmento
<i>TNFA</i> -308	Sense 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'	95°C – 5 min 95°C – 1 min 57°C – 1 min 72°C – 1 min 72°C – 5 min	37 x 107 pb
	Antisense 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT- 3'		
<i>LTA</i> +252	Sense 5'-CCGTGCTTCGTGTTTGGACTA-3'	95°C – 3 min 95°C – 45 seg 62°C – 45 seg 72°C – 1:30 min 72°C – 5 min	35 x 782 pb
	Antisense 5'-AGAGGGGTGGATGCTTGGGTTC-3'		
<i>PARK2</i> -2599	Sense 5'-AGGAGTCTCTGTATAACTCCT-3'	95°C – 3 min 95°C – 30 seg 57°C – 40 seg 72°C – 50 seg 72°C – 5 min	40 x 180 pb
	Antisense 5'-AGGTGTATTTTGATTCAGTA-3'		
<i>NINJI</i> asp110ala rs17854540	Sense 5'-CTCTGGGCGACAAAATCATCC-3'	95°C – 5 min 95°C – 40 sec 61°C – 40 sec 72°C – 40 sec 72°C – 5 min	36 x 215 pb
	Antisense 5'-CCAGGTTGTTGAGGAAGTCCAG-3'		

Na etapa seguinte procedeu-se a digestão dos fragmentos amplificados com enzima de restrição específica. A genotipagem foi realizada de acordo com o padrão de bandas observado após a reação, conforme descrito no Quadro 4. O volume total da digestão (25 µL) foi homogeneizado a 4 µL de tampão de corrida e aplicado em gel de agarose 3,5% ou 3% (no caso específico do sistema LTA+252). As amostras foram submetidas a eletroforese a 90 V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. O padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos foi visualizado em transiluminador após coloração com brometo de etídeo segundo descrito anteriormente.

Quadro 4: Condições da reação de digestão e padrão de fragmentos utilizado para determinação dos genótipos nos sistemas que utilizam a técnica de PCR-RFLP.

SNP	Reação de digestão (37°C, 15 horas)*	Fragmentos observados após a reação de digestão e genótipos correspondentes**
TNFA-308	<i>Nco</i> I 2U (5'-C'CATGG-3' - NEB) Tampão 4 (NEB) - 1 X Produto amplificado - 15 µL H ₂ O – suficiente para 25 µL	AA: 1 fragmento (107 pb) GA: 3 fragmentos (107, 87 e 20 pb) GG: 2 fragmentos (87 e 20 pb)
LTA+252	<i>Nco</i> I 2U (5'-C'CATGG-3' - NEB) Tampão 4 (NEB) - 1 X Produto amplificado - 15 µL H ₂ O – suficiente para 25 µL	AA: 1 fragmento (782 pb) AG: 3 fragmentos (782, 586 e 196 pb) GG: 2 fragmentos (586 e 196 pb)
PARK2-2599	<i>Rsa</i> I 4U (5'-GT'AC-3' - Invitrogen) Tampão 1 (Invitrogen) - 1 X Produto amplificado - 15 µL H ₂ O – suficiente para 25 µL	TT: 1 fragmento (180 pb) TC: 3 fragmentos (180, 160 e 20 pb) CC: 2 fragmentos (160 e 20 pb)
NINJI asp110ala	<i>Hae</i> III 3U (5'-GG'CC-3' - NEB) Tampão 2 (NEB) - 1 X Produto amplificado - 15 µL H ₂ O – suficiente para 25 µL	AA: 1 fragmento (215 pb) AC: 3 fragmentos (215, 179 e 36 pb) CC: 2 fragmentos (179 e 36 pb)

*o sítio de restrição de cada enzima bem como o laboratório fabricante encontram-se discriminados entre parênteses. O sítio de clivagem encontra-se representado por aspas simples.

4.2. Genotipagem por discriminação alélica: a genotipagem do SNP rs1040079 foi realizada através de um sistema TaqMan de discriminação alélica do tipo Assay by Design (Applied Biosystems). Este tipo de sistema utiliza um único par de primers para a amplificação de um fragmento de 60 pb flanqueando a posição em que se encontra o alelo polimórfico (sense 5'-CCT CTA TTG CAG GAC TCA AGG T-3' e antisense 5'-GTA TTG GTT GGC CAT GAG TAT AGG A-3'). A discriminação alélica foi realizada por meio da utilização de sondas específicas marcadas com fluoróforos diferentes. As sondas desenvolvidas para anelamento específico aos alelos C (5'-CCCAGCCCACTGTT-3') e T (5'-CCCCAGCCTACTGTT-3') foram marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, respectivamente.

As reações foram realizadas em termociclador modelo ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL contendo 10 ng de DNA genômico, Assay 40 X em concentração final de 1 X contendo primers e sondas em concentrações ideais e TaqMan PCR Master Mix 1 X. Todos os reagentes foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems).

Inicialmente as reações foram submetidas a uma pré-leitura (60°C por 1 minuto) a fim de detectar o background da fluorescência. Em seguida as amostras foram submetidas à reação de amplificação que consistia em uma incubação inicial a 50°C por 2 min para inativação da enzima AmpErase e 95°C durante 10 minutos para a desnaturação inicial. Em seguida as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, durante o qual ocorre o anelamento do primer e a extensão dos fragmentos. Após a amplificação dos fragmentos, as amostras foram submetidas a uma pós-leitura (60°C por 1 minuto). A discriminação alélica foi realizada através da interpretação do gráfico resultante da subtração do background coletado na pré-leitura do valor final obtido na pós-leitura. A representação gráfica PK1079-C *versus* PK1079-T pode ser observada na Figura 5. Amostras com fluorescência muito intensa no comprimento de onda do FAM foram consideradas homozigotas para o alelo T, as que apresentaram fluorescências equivalentes foram classificadas como heterozigotas e, por fim, as que apresentaram fluorescência mais intensa no comprimento de onda do VIC, foram identificadas como homozigotos CC.

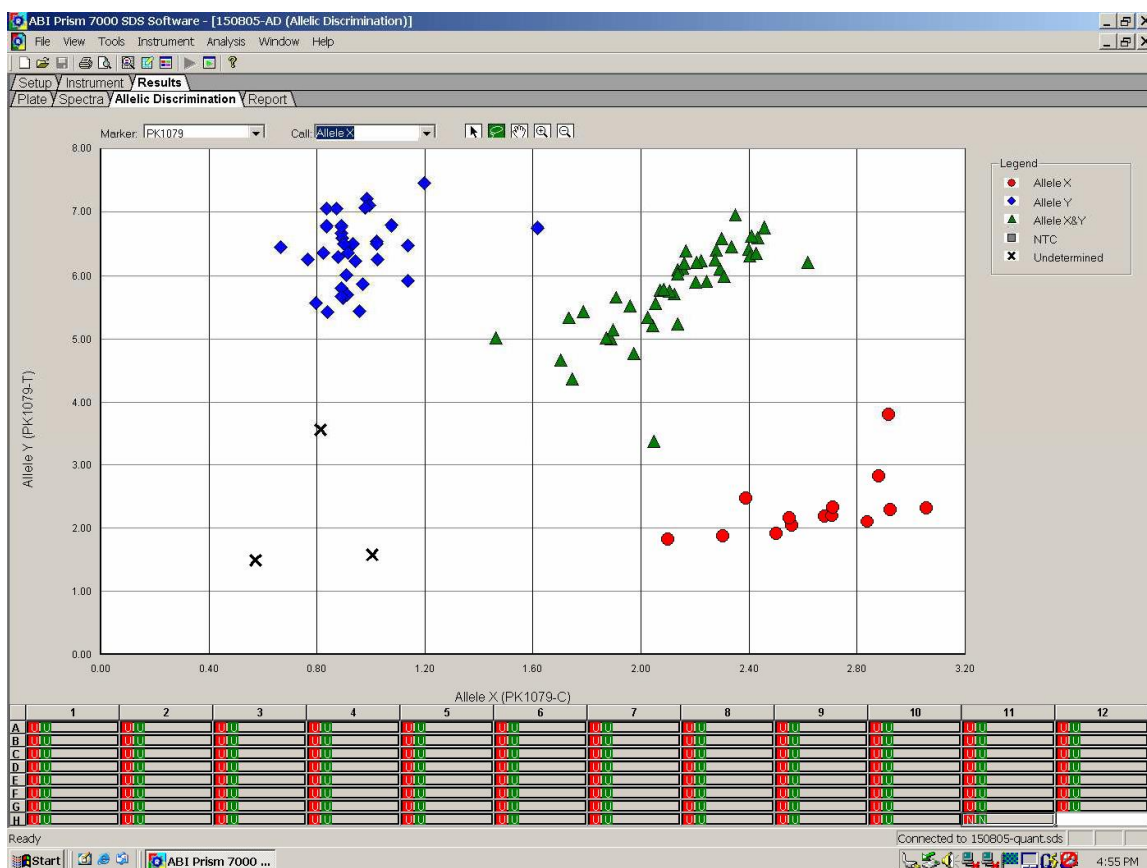


Figura 5: Representação gráfica utilizada para discriminação alélica por PCR em tempo real para o polimorfismo rs1040079 do gene *PARK2*. Os homocigotos CC e TT estão representados respectivamente em círculos vermelhos e losangos azuis e os heterocigotos em triângulos verdes.

5. Cultivo de células

Para este trabalho foram estabelecidas culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano, obtidas de contatos operacionais. As PBMC foram obtidas a partir do sangue total através de um gradiente de densidade de Fycoll-Hypaque (LGC). Para este fim, em temperatura ambiente, o Fycoll-Hypaque foi adicionado em proporção 1:1 ao sangue previamente diluído em tampão PBS (Gibco), também em proporção 1:1. A mistura foi centrifugada a 1.500 rpm (30 min, temperatura ambiente) e, em seguida a camada intermediária entre o soro e o Fycoll, a qual contém as PBMCs, foi transferida para outro tubo e lavada duas vezes através de ressuspensão em tampão PBS e centrifugação a 1.500 rpm (10 min, 4°C).

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro humano AB a 10%, penicilina (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e glutamina a 2mM (meio completo, Gibco), segundo descrito (Sampaio *et al.*, 1998). As culturas foram mantidas a uma temperatura de 37°C, em presença ou não do estímulo com *M. leprae* (1µg/mL, correspondente a 2 bactérias/célula) por intervalos de tempo entre 1 e 12 horas segundo descrito.

6. Extração de RNA

A extração de RNA das amostras de nervo periférico e PBMC foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Antes da extração propriamente dita, as biópsias de nervo (*punch* 2 mm³) foram maceradas em 1 mL de Trizol® com o auxílio de um homogeneizador automático (Polytron PT 3000). Para as culturas de células, após a centrifugação a 1.500 rpm (10 min, 4°C) e descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em Trizol® (1 mL para cada 5 x 10⁶ células).

As etapas seguintes foram comuns tanto às extrações de células quanto de biópsias e consistiram inicialmente na adição de 0,2 mL de solução clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 ao volume de 1 mL de Trizol® contendo cada tipo de amostra. A mistura foi então homogeneizada por inversão e incubada em gelo por 15 minutos. Após centrifugação a

12.000 rpm por 15 min a 4°C em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C), a fase aquosa foi transferida para outro tubo e, a esta solução adicionou-se isopropanol (Invitrogen) na proporção de 1:1. Esta mistura foi então incubada a -20°C durante a noite e, após centrifugação a 14.000 rpm (20 min a 4°C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA submetido a uma etapa de lavagem com etanol 70% (Invitrogen). Após uma última etapa de centrifugação nas mesmas condições da anterior, o *pellet* de RNA foi secado em temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspensão em 100 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (Invitrogen).

7. Transcrição reversa

A transcrição do RNA em cDNA foi realizada em um volume final de reação de 20 μ L mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen). Inicialmente, uma concentração 1 μ g de RNA em solução aquosa foi incubada a 65°C (5 min) juntamente com 0,5 μ g de oligo-dT (Invitrogen) para a linearização da molécula de RNA. Em seguida, adicionou-se a essa mistura o tampão da enzima (Invitrogen) em concentração final 1 X, dNTP (Invitrogen) a 0,125 mM, DTT a 10mM, 40 U de inibidor de RNase (RNaseOut, Invitrogen) e 200 U da enzima Superscript II. Esta mistura foi incubada a 42°C por 30 minutos para realização da transcrição e, em seguida, a 95°C durante 5 minutos para a inativação da enzima. Todas as etapas de incubação foram realizadas em banho seco modelo DB- Heat & Cool (Loccus Biotecnology). Por fim, as amostras foram resfriadas e armazenadas em solução aquosa a -20 °C.

8. Análises de expressão do gene *NINJI*

As análises funcionais do gene *NINJI* foram realizadas com dois objetivos principais: o primeiro consistiu na análise da expressão global de ninjurina e, o segundo na quantificação alelo-específica dos transcritos. Ambos foram realizados por PCR em tempo real através de um sistema Assay-by-Design desenvolvido especialmente para a amplificação e discriminação alélica em cDNA de *NINJI*. O gene da GAPDH, amplificado através de sistema Assay-on-Demand (Applied Biosystems, catálogo número 4333764-F), foi utilizado como constitutivo para os cálculos de expressão relativa do RNA mensageiro de ninjurina.

As reações foram realizadas em volume final de 25 μ L contendo Assay 40 X (ninjurina) ou 20 X (GAPDH) em concentração final 1 X, TaqMan PCR Master Mix em concentração final 1 X e 1 μ L de cDNA por tubo. As reações foram submetidas à pré e pós-leituras para análise de discriminação alélica e à reação de amplificação conforme descrito no item 4.2. Os primers utilizados para a amplificação de um fragmento de XX pb no cDNA da ninjurina foram 5'- GCT GCT CAT CTT CCT TGT CAA GTA C-3' (primer sense) e 5'-

GGT TGT TGA GGA AGT

CCA GCT T-3'(primer antisense). As sondas específicas para anelamento em presença de cada alelo foram 5'-AAC CCG GAC AAG CA-3' (alelo A, VIC) e 5'-AAC CCG GCC AAG CA-3'

(alelo C, FAM).

Cada amostra foi analisada em três tubos de reação, sendo um para amplificação e quantificação do GAPDH e outros dois para a quantificação de ninjurina, cada um para detecção da amplificação de um dos alelos do polimorfismo NINJ110. A fim de minimizar as variações típicas das replicatas, foi preparada uma solução-mãe contendo reagentes e amostra em volume dobrado. Esta solução, em seguida, foi subdividida em duas alíquotas de volumes iguais.

8.1 Quantificação alelo-específica dos transcritos (ASTQ): Nas reações de amplificação de ninjurina, um dos tubos foi utilizado para a detecção da fluorescência do FAM e, o outro para a fluorescência do VIC. A amplificação foi detectada e comparada através dos valores de Ct (do inglês “threshold cycle”) de cada alelo, o qual representa o ciclo exato em que se iniciou a detecção de fluorescência naquela reação. Desta forma, o valor de Ct e a quantidade de RNAm constituem valores inversamente proporcionais já que, quanto maior a quantidade de amostra, mais cedo começa a amplificação da mesma.

As variações nos níveis de expressão dos dois alelos foram calculadas a partir da variação nos valores de Ct (ΔCt) entre um alelo e outro. Os valores de ΔCt foram calculados sempre tendo como base o alelo C, de modo a gerar resultados que refletem a expressão de A em relação a C, conforme indicado na fórmula abaixo:

$$\Delta Ct: (Ct \text{ alelo A} - Ct \text{ alelo C})$$

De posse dos valores de ΔCt , foram calculados os valores de $2^{-\Delta Ct}$, a fim de se ter a noção exata de quantas vezes mais um transcrito está presente em relação ao outro. Os valores foram utilizados como expoente para a base 2 devido ao fato de o crescimento ocorrer de forma exponencial nas reações de PCR (Livak & Schmittgen, 2001). Por último, o expoente tem sinal negativo por questões matemáticas, permitindo a correção do fato de menores valores de Ct corresponderem a uma maior quantidade de RNAm.

8.2. Expressão de ninjurina: a expressão global de ninjurina foi estimada através dos valores de ΔCt , os quais foram calculados utilizando o GAPDH como base, conforme observado na fórmula abaixo:

$$\Delta Ct: (Ct \text{ ninjurina} - Ct \text{ GAPDH})$$

Para este cálculo foi utilizado o menor valor de Ct dentre as alíquotas de ninjurina de cada amostra, a fim de detectar o primeiro ciclo em que houve amplificação de ninjurina, independente do alelo. Por fim, a expressão relativa de ninjurina foi quantificada através dos valores de $2^{-\Delta Ct}$, assim como no ASTQ, com resultados de indução ou repressão sempre em relação ao GAPDH.

9. Análise estatística

Os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada SNP foram realizados a partir da comparação das frequências genóticas observadas com as esperadas pela Lei de Hardy e Weinberg, utilizando o teste de Qui-quadrado de Pearson. As comparações entre as distribuições genóticas e alélicas de pacientes e contatos foram realizadas, respectivamente, através dos modelos de regressão logística GLM e LRM (do inglês “generalized linear model” e “logistic regression model”).

As frequências haplotípicas dos SNPs em fase desconhecida foram estimadas através do método de máxima verosimilhança (Terwiliger & Ott, 1994) com o auxílio do programa EH. Os estudos comparativos entre pacientes e contatos foram realizados através de modelos de regressão logística, com cálculo de Odds Ratio (OR) com ajustes para as co-variáveis não genéticas sexo e etnia, conforme descrito por Moraes e cols (2004). Todas as análises referentes a polimorfismos, tanto em isolado quanto formando haplótipos, foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico R, na versão 2.1.1 (Ihaka *et al.*, 1996).

A comparação entre os níveis de RNA mensageiro em presença e ausência de estímulo foi realizada através do teste *t* de Student, com o auxílio do programa GraphPad Prism, versão 2.01, de 24 de junho de 1996.

IV. RESULTADOS

1. Polimorfismos dos genes *TNFA* e *LTA*

Um total de 459 indivíduos, sendo 253 contatos domiciliares e 206 pacientes, teve seu genótipo determinado para o polimorfismo de TNF- α na posição -308 (TNF-308). As freqüências dos alelos A e G foram respectivamente 0,13 e 0,87 no grupo de contatos e 0,09 e 0,91 dentre os pacientes. No caso do polimorfismo da posição +252 do gene da linfotóxina- α (LTA+252), foram genotipados 249 contatos e 208 pacientes. As freqüências dos alelos A e G foram idênticas em pacientes e contatos, apresentando valores de 0,69 e 0,31, respectivamente. As freqüências genótípicas e valores absolutos obtidos para cada genótipo encontram-se discriminados na Tabela 2. Os testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizados através do teste de Qui-quadrado com 1 grau de liberdade ($\chi^2_{GL=1}$), tendo sido consideradas fora do equilíbrio a população de contatos para o SNP+252 e de pacientes para o SNP-308, visto que ambas apresentaram valores de χ^2 superiores a 3,841 (Tabela 2).

As comparações entre as freqüências genótípicas e alélicas de cada grupo foram realizadas respectivamente através dos modelos de regressão logística GLM (do inglês “generalized logistic model”) e LRM (do inglês “Logistic regression model”), com cálculo de Odds Ratio (OR) e P-valor. A observação da Tabela 1 permite concluir que no caso do SNP-308 existe uma diferença importante entre as freqüências de pacientes e contatos, especialmente no grupo de heterozigotos, embora esta diferença não se mostre significativa com a realização de um teste global (P=0,08). Entretanto, quando os heterozigotos foram comparados ao genótipo-base GG os resultados indicaram diferença significativa, com valor de OR sugerindo proteção (0,5751; P=0,0302). Ao utilizarmos o teste com correção, o valor de OR foi sutilmente alterado (5,65%) e a diferença perdeu sua significância estatística (OR=0,61; P=0,06). As comparações entre as freqüências alélicas apresentam OR sugerindo proteção (0,6383), embora o resultado não seja significativo (P=0,1468). Os carreadores do alelo A, por sua vez, apresentaram OR de 0,59 e P-valor significativo (0,0305), confirmando os resultados anteriores. O teste com correção aumentou a OR em aproximadamente 8% (0,64) e mais uma vez acarretou a perda de significância estatística (P=0,08). As comparações entre pacientes paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) não detectaram diferença entre os

grupos.

No caso do SNP LTA+252, não foi observada diferença significativa entre as frequências genóticas e alélicas de pacientes e contatos. Este resultado se repete ao compararmos pacientes PB e MB bem como os indivíduos carreadores e não-carreadores do alelo

G. Uma vez que os resultados não apresentaram evidência de associação nos testes preliminares, os testes com correção para co-variáveis foram dispensados.

Tabela 2: Frequências genóticas observadas nos grupos de contatos domiciliares sadios e pacientes para os polimorfismos de base única TNF-308 e LTA+252.

SNP	Genótipos	Contatos (%)*	Pacientes (%)	OR (P-valor)	OR (P-valor)***
<i>TNFA</i> -308	AA	6 ^(0,03)	4 ^(0,02)	0,74 (0,64)	0,96 (0,96)
	GA	54 ^(0,21)	28 ^(0,14)	0,58 (0,03)	0,61 (0,06)
	GG**	193 ^(0,76)	174 ^(0,84)	-	-
<i>LTA</i> +252	AA**	128 ^(0,51)	100 ^(0,48)	-	-
	GA	89 ^(0,36)	88 ^(0,42)	1,26 (0,24)	-
	GG	32 ^(0,13)	20 ^(0,10)	0,80 (0,48)	-

*teste para EHW nos contatos: $\chi^2_{GL=1}$ igual a 0,88 no SNP -308 e 6,4 no SNP +252. Nos pacientes: $\chi^2_{GL=1}$ igual a 4,49 (-308) e 0,01 (+252). **genótipo-base. ***valores calculados com correção para as co-variáveis sexo e etnia.

Após a análise de cada polimorfismo de forma isolada, foi conduzida a análise haplotípica, de modo a verificar se, em conjunto, estes polimorfismos apresentam associação com a doença. As frequências dos haplótipos foram estimadas por máxima verossimilhança e comparadas através de regressão logística (GLM) com e sem correção para as co-variáveis não- genéticas sexo e etnia.

Conforme representado na Tabela 3, não houve diferença significativa entre as frequências dos haplótipos nos grupos de pacientes e contatos (P=0,17), embora o haplótipo TNFA-308A/LTA+252A apresente OR indicando proteção (0,4743) e P-valor considerado *borderline* (0,06). Assim como nas comparações entre frequências genóticas, ao utilizarmos

o teste com correção para as co-variáveis não-genéticas sexo e etnia, observamos uma OR (0,5126)

pouco aumentada em relação a anterior (aproximadamente 8%), com P-valor também aumentado em virtude da redução no poder do teste acarretada pelo uso das correções.

Tabela 3: Frequências dos haplótipos formados pelos polimorfismos LTA+252 e TNF-308 nos grupos de contatos sadios e pacientes.

Haplótipos correção	Frequência		GLM sem correção GLM com	
	Contatos	Pacientes	OR (P-valor)	OR (P-valor)**
+252/-308				
A – G*	0,62322	0,66223	-	-
A – A	0,06902	0,03071	0,47 (0,06)	0,51 (0,11)
G – A	0,06137	0,05712	0,94 (0,85)	0,99 (0,99)
G – G	0,24640	0,24994	0,96 (0,77)	0,91 (0,56)

*haplótipo-base. **valores calculados com correção para as co-variáveis sexo e etnia.

2. Polimorfismos do gene *PARK2*

As análises de polimorfismos do gene *PARK2* incluíram inicialmente a genotipagem de 462 indivíduos para o polimorfismo da posição –2599. As frequências dos alelos T e C dentre os contatos foram, respectivamente, 0,65 e 0,35. No grupo de pacientes foram observadas frequências de 0,32 para o alelo C e 0,68 para o alelo T. Ainda no gene *PARK2* o SNP rs1040079 foi genotipado em um painel de 447 indivíduos, incluindo pacientes e contatos. As frequências alélicas dentre os contatos e pacientes foram, respectivamente, 0,39 e 0,38 para o alelo C e 0,61 e 0,62 para o alelo T.

Os dados da genotipagem (Tabela 4) foram utilizados para os cálculos do EHW e comparações entre as frequências genotípicas e alélicas de cada grupo segundo descrito para os SNPs de TNF. Ambas as populações apresentaram valores de χ^2 elevados para o SNP –2599 e reduzidos no caso do SNP rs1040079, indicando que as populações apresentaram desvio no equilíbrio de EHW apenas para o polimorfismo -2599. As comparações utilizando os modelos logísticos não detectaram diferença significativa entre as frequências genotípicas e alélicas dos grupos de pacientes e contatos tanto para –2599 quanto para rs1040079. Este resultado se repete nas análises com carreadores dos alelos –2599T e rs1040079C. As

comparações entre pacientes PB e MB também não apresentaram diferença significativa. Sendo assim, os testes com correção

para co-variáveis não-genéticas não foram realizados. Os testes realizados utilizando o genótipo TT como base para as comparações também não apresentaram qualquer evidência de associação.

Tabela 4: Frequências genótípicas observadas nos grupos de contatos domiciliares sadios e pacientes para os SNPs -2599 e rs1040079 do gene *PARK2*.

SNP	Genótipos	Contatos (%)*	Pacientes (%)	OR (P-valor)
<i>PARK2</i> -2599	CC**	40 ^(0,16)	31 ^(0,15)	-
	TC	98 ^(0,38)	71 ^(0,34)	0,93 (0,81)
	TT	117 ^(0,46)	105 ^(0,51)	1,16 (0,59)
<i>PARK2</i> rs1040079	CC**	36 ^(0,15)	26 ^(0,13)	-
	TC	119 ^(0,49)	103 ^(0,50)	1,19 (0,53)
	TT	87 ^(0,36)	76 ^(0,37)	1,20 (0,53)

*teste para EHW nos contatos: $\chi^2_{GL=1}$ igual a 6,06 (-2599) e 0,2 (rs1040079). Nos pacientes: $\chi^2_{GL=1}$ igual a 9,43 e 0,96 para -2599 e rs1040079, respectivamente.

**genótipo-base.

Assim como realizado para os polimorfismos do locus de TNF, também no caso do gene *PARK2* foram realizadas análises haplotípicas. As estimativas de frequência dos haplótipos, cálculo de OR e P-valor com e sem correção foram realizadas da mesma forma descrita para o haplótipo de TNF. Conforme discriminado na Tabela 5, não foram observadas diferenças significativas entre as frequências de cada haplótipo quando comparadas às do haplótipo-base nem qualquer sugestão de proteção ou suscetibilidade nos valores de OR.

Tabela 5: Frequências dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs1040079 e PK-2599 nos grupos de contatos sadios e pacientes.

Haplótipos correção	Frequência		GLM sem correção	GLM com
	Contatos	Pacientes	OR (P-valor)	OR (P-valor)**
rs1040079/-2599				
C – T	0,34425	0,32715	0,84 (0,33)	0,90 (0,59)
C – C	0,05200	0,05209	0,90 (0,74)	1,00 (0,99)
T – C	0,29702	0,27046	0,80 (0,22)	0,93 (0,72)

T – T*	0,30673	0,35031	-	-
---------------	---------	---------	---	---

*haplótipo-base. **valores com correção para as co-variáveis sexo e etnia.

3. Caracterização genotípica do polimorfismo asp110ala do gene *NINJI*

Um total de 431 indivíduos distribuídos entre pacientes e contatos domiciliares sadios foi genotipados para o polimorfismo asp110ala. As frequências alélicas dentre os pacientes e contatos foram respectivamente 0,81 e 0,79 para o alelo A e 0,19 e 0,21 para o alelo C.

A distribuição dos genótipos do polimorfismo asp110ala encontra-se discriminada na Tabela 6. Os testes para desvios em relação ao EHW e comparações entre as distribuições genotípicas dos diferentes grupos foram realizadas conforme descrito para os demais polimorfismos analisados neste estudo. Para este polimorfismo, ambas as populações apresentaram valores de χ^2 compatíveis com o EHW. As comparações entre as frequências genotípicas e alélicas dos dois grupos não indicaram evidência de associação entre este polimorfismo e a Hanseníase *per se*. Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre os pacientes PB e MB ou nos carreadores do alelo C.

Tabela 6: Frequências genotípicas do polimorfismo asp110ala em pacientes e contatos sadios.

SNP	Genótipos	Contatos (%)*	Pacientes (%)	OR (P-valor)
<i>NINJI</i> asp110ala	AA**	159 ^(0,64)	128 ^(0,66)	-
	AC	74 ^(0,30)	59 ^(0,30)	0,99 (0,96)
	CC	14 ^(0,06)	7 ^(0,04)	0,62 (0,32)

*teste para EHW: $\chi^2_{GL=1}$ igual a 1,82 nos contatos e 0,004 nos pacientes. **genótipo-base.

Tendo em vista que a ninjurina 1 é uma molécula cuja função está relacionada à regeneração das fibras nervosas periféricas após dano, a segunda etapa da análise visou a determinação das frequências após estratificação do grupo de pacientes de acordo com os graus de incapacidade iniciais (GII). As frequências dos alelos C e A foram iguais a 0,16 e 0,84, respectivamente em pacientes com GII igual a zero (GII=0) e 0,24 e 0,76 nos pacientes que apresentaram grau maior que zero (GII>0). As frequências de cada genótipo em presença ou ausência de GII, bem como os valores de OR e P obtidos a partir do modelo de regressão logística podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Frequências genótípicas do polimorfismo asp110ala em pacientes de acordo com o grau de incapacidade inicial.

Genótipos	GII=0	GII>0	OR (P-valor)
AA*	83 ^(0,70)	43 ^(0,60)	-
AC	34 ^(0,29)	24 ^(0,33)	1,36 (0,34)
CC	2 ^(0,02)	5 ^(0,07)	4,82 (0,06)

*genótipo-base.

A partir da observação da tabela é possível notar que os valores de OR seguem um gradiente à medida que aumenta o número de cópias do alelo C, assumindo valor 1,36 na presença de um alelo e 4,82 em homozigotos para o alelo C. Uma vez que o P-valor dos indivíduos AA pode ser considerado *borderline* nas comparações de acordo com o GI, foi realizado ainda um teste global e outro estratificado de acordo com os carreadores do alelo C. Ambos não detectaram diferença significativa entre os grupos com GII igual ou maior que zero. Uma vez que o valor de OR sugere proteção, supõe-se que a ausência de significância estatística ocorre provavelmente devido à redução no poder do teste em consequência do reduzido número absoluto de indivíduos portadores do genótipo CC dentre os pacientes. As análises utilizando os graus de incapacidade finais não apresentaram resultados significativos nem qualquer sugestão de associação.

A fim de verificar se existe efetivamente associação entre a presença do alelo C e os graus de incapacidade iniciais dos pacientes, optamos por utilizar a população total de pacientes que dispomos no laboratório. Assim, amostras de um painel anterior com 553 pacientes foram adicionadas, para essas análises, já que o asp110ala era, até então, o único SNP que não fora analisado neste primeiro painel (553 pacientes). Desta forma, a redução no poder seria evitada uma vez que a frequência de homozigotos para o alelo C poderia ser elevada. Para esta análise foi utilizada uma população de pacientes composta por 765 indivíduos.

As frequências dos alelos A e C nesta população de pacientes foram, respectivamente iguais a 0,77 e 0,23. A distribuição das frequências genótípicas demonstra que a mesma se encontra em EHW ($\chi^2=0,0016$). Os testes estatísticos foram conduzidos da mesma forma

utilizada na população anterior e não demonstraram diferença entre as frequências genotípicas e

alélicas de pacientes e contatos, confirmando a ausência de associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento de Hanseníase *per se* nesta população (Tabela 8). Também não foi observada diferença significativa nos testes comparativos entre carreadores e não-carreadores do alelo C, bem como nas comparações entre pacientes PB e MB.

Tabela 8: Frequências genóticas do polimorfismo asp110ala em contatos sadios e pacientes da população estendida.

SNP	Genótipos	Contatos (%)*	Pacientes (%)	OR (P-valor)
asp110ala	AA**	159 ^(0,64)	456 ^(0,60)	-
	AC	74 ^(0,30)	269 ^(0,35)	1,27 (0,14)
	CC	14 ^(0,06)	40 ^(0,05)	0,99 (0,99)

*teste para EHW: $\chi^2_{GL=1}$ igual a 1,82 nos contatos e 0,002 nos pacientes. **genótipo-base.

Na etapa seguinte foram realizados os testes utilizando a estratificação de acordo com o grau de incapacidade inicial. As frequências dos alelos A e C foram respectivamente iguais a 0,8 e 0,2 nos indivíduos com GII=0 e 0,73 e 0,27 nos indivíduos com GII>0. As comparações entre as frequências alélicas mostraram que existe diferença significativa entre os grupos (P=0,03), com OR indicativa de risco (1,48) em presença do alelo C. As comparações entre indivíduos carreadores e não-carreadores do alelo C tiveram como resultado uma OR de 1,54, com P-valor significativo (0,007), inclusive após a utilização do teste com correção (OR=1,66 e P=0,002). A Tabela 9 reúne os valores absolutos e frequências de cada genótipo em pacientes nos grupos com GII igual ou maior que zero.

Tabela 9: Frequências genóticas do polimorfismo asp110ala na população estendida de pacientes de acordo com o GII.

Genótipos valor)**	GII=0	GII>0	OR (P-valor)	OR (P-valor)
AA*	275 ^(0,64)	143 ^(0,53)	-	-
AC	137 ^(0,32)	103 ^(0,39)	1,44 (0,03)	1,56 (0,002)
CC	17 ^(0,04)	20 ^(0,08)	2,26 (0,02)	2,42 (0,02)

*genótipo-base. **valores calculados com correção para as co-variáveis sexo e etnia.

A análise da tabela permite a observação de que a utilização deste tamanho amostral de pacientes aumentou o poder do teste, permitindo a observação de diferença estatisticamente significativa entre os grupos com GI=0 e GI>0 nas comparações globais (P=0,01 com e sem correção). Além disso, esta segunda análise permitiu a confirmação dos dados indicativos de um gradiente na OR à medida que aumenta o número de cópias do alelo C. Desta forma, o genótipo CC foi associado ao desenvolvimento de graus de incapacidade em maior intensidade (OR=2,26), quando comparado aos pacientes heterozigotos (OR=1,44) e homozigotos AA, utilizados como base para as comparações através do modelo logístico.

Assim como na amostragem pequena, as análises utilizando graus de incapacidade finais não indicaram associação com este polimorfismo. Da mesma forma, a análise comparativa entre pacientes paucibacilares e multibacilares não apresentou diferença significativa ou qualquer evidência de associação (refletida por valores de OR distantes de 1). Este resultado se repete tanto nas análises de frequências genotípicas quanto alélicas.

Uma vez que o gene NINJ1 foi associado aos graus de incapacidade quando o alelo C do polimorfismo asp110ala está presente, a etapa seguinte consistiu na realização de ensaios funcionais. Além disso, resultados anteriores obtidos no laboratório através de experimentos de imuno-histoquímica demonstram *in situ* uma maior expressão de ninjurina nos pacientes de Hanseníase (Figura 6). Em conjunto, estes dois resultados motivaram análises de expressão do gene *NINJ1*, realizada através da técnica de PCR em tempo real.

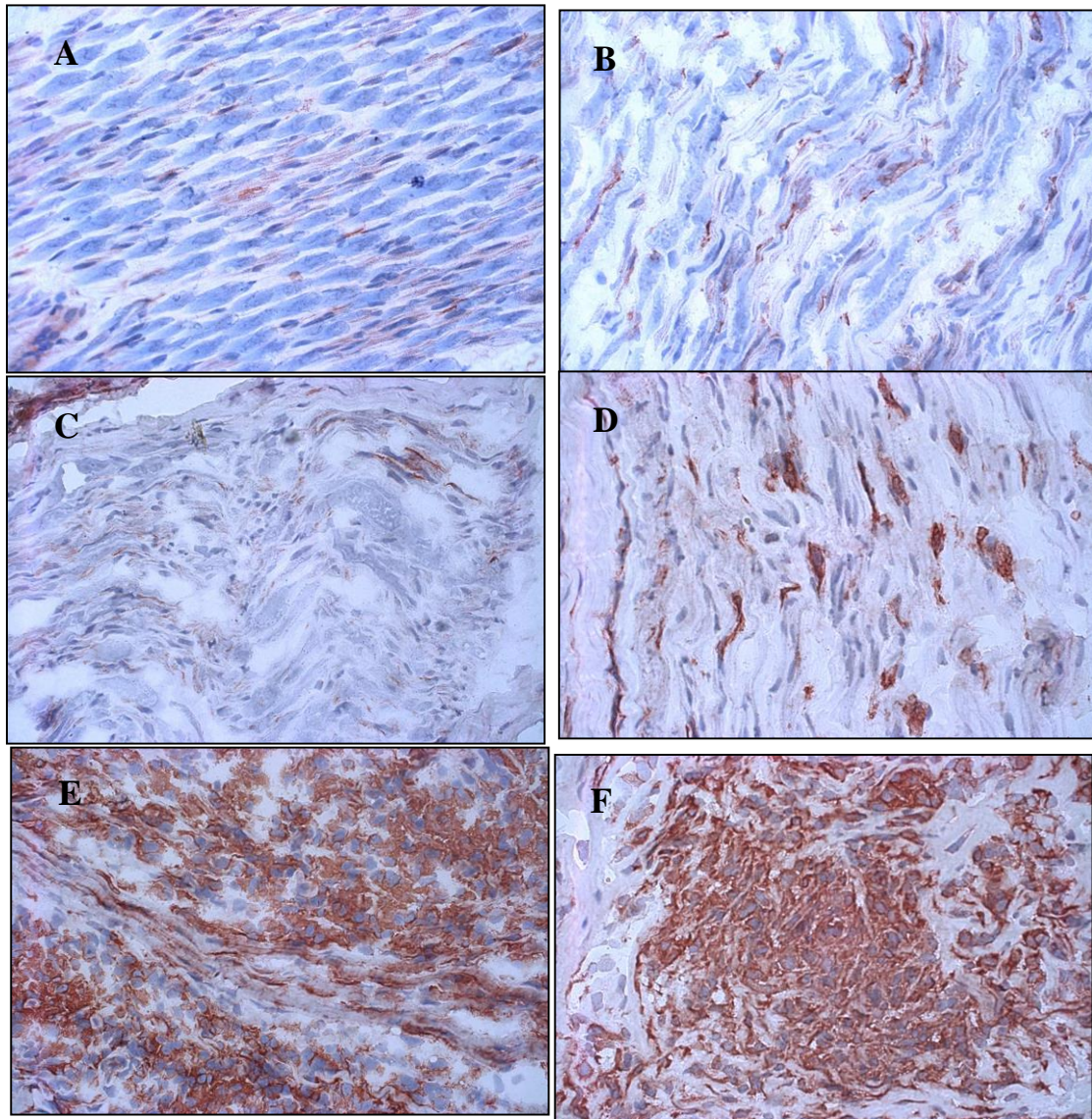


Figura 6: Marcação imunohistoquímica para ninjurina em biópsias de nervo de pacientes de Hanseníase ou outras neuropatias. A e B: dois pacientes diferentes portadores de neuropatias não-hansenianas. C, D, E e F: quatro pacientes diferentes portadores de PNL. Os pacientes tiveram a Hanseníase diagnosticada com base na presença de infiltrado inflamatório (C e D) ou de granuloma epitelióide e fibrose (E e F). Aumento de 40 X.

4. Estudos de expressão do gene *NINJ1*

A etapa de estudos funcionais foi realizada utilizando amostras de biópsias de nervo periférico de pacientes com diferentes neuropatias e culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) cultivadas em presença ou ausência de *M. leprae* por intervalos de tempo variáveis.

Inicialmente foram realizadas análises de expressão de ninjurina utilizando o gene da GAPDH como controle. A Figura 7 apresenta o perfil de expressão em uma cinética de PBMC representativa de 3 experimentos. A partir da observação desta figura nota-se uma indução na expressão de ninjurina nas culturas estimuladas com *M. leprae* (1µg/ml) durante os tempos iniciais de 1 e 3 horas.

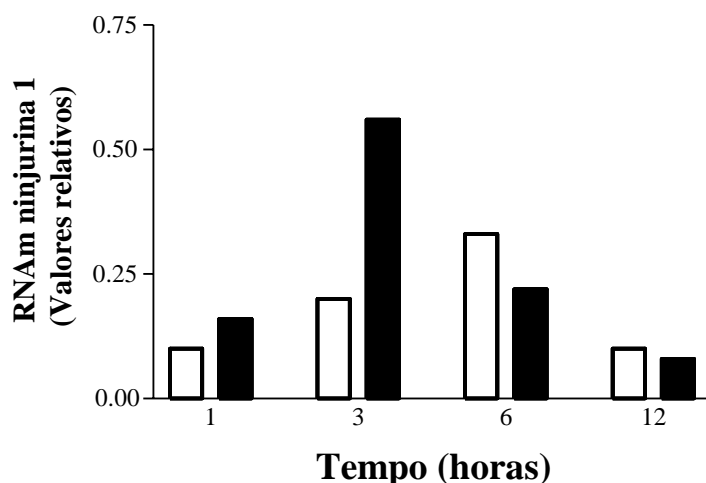


Figura 7: Cinética da expressão de ninjurina em culturas de PBMC. As culturas foram mantidas em presença (barras escuras) ou não (barras claras) de estímulo de *M. leprae* por intervalos de tempo variados. Os níveis de expressão em relação ao GAPDH foram medidos através dos valores de $2^{-\Delta Ct}$. Experimento representativo de 3 cinéticas de indivíduos distintos.

As amostras de biópsia de nervo utilizadas nos estudos de expressão do gene *NINJI* apresentavam dois tipos de variação. A primeira relacionada aos genótipos de acordo com o polimorfismo asp110ala e, a segunda variação de acordo com o diagnóstico de Hanseníase, já que as amostras utilizadas incluem tanto pacientes portadores da forma neural pura (PNL) quanto de outras neuropatias.

Desta forma, as análises de expressão foram realizadas de modo a diferenciar os níveis de expressão do gene *NINJI* de acordo tanto com o diagnóstico de Hanseníase (positivo ou negativo) quanto com o genótipo (carreadores ou não do alelo C). Os resultados encontram-se representados na forma de média e desvio-padrão dos valores de $2^{-\Delta Ct}$, representando quantas vezes a concentração do RNA mensageiro do gene *NINJI* encontra-se aumentado em relação ao gene da GAPDH. Conforme exposto na Figura 8A, a análise de acordo com o diagnóstico de Hanseníase não mostrou diferença entre os padrões de expressão do gene *NINJI* em indivíduos portadores ($0,13 \pm 0,15$, n=9) ou não da PNL ($0,12 \pm 0,11$, n=4). Em seguida foram realizadas análises em função do genótipo para o polimorfismo asp110ala. Conforme observado na Figura 7B, os indivíduos portadores do genótipo AA apresentam níveis de expressão aumentados ($0,14 \pm 0,11$, n=3) em relação aos genótipos AC e CC ($0,08 \pm 0,08$, n=11). Embora esta diferença não tenha sido significativa, estes resultados sugerem uma redução na expressão do gene *NINJI* na presença do alelo C.

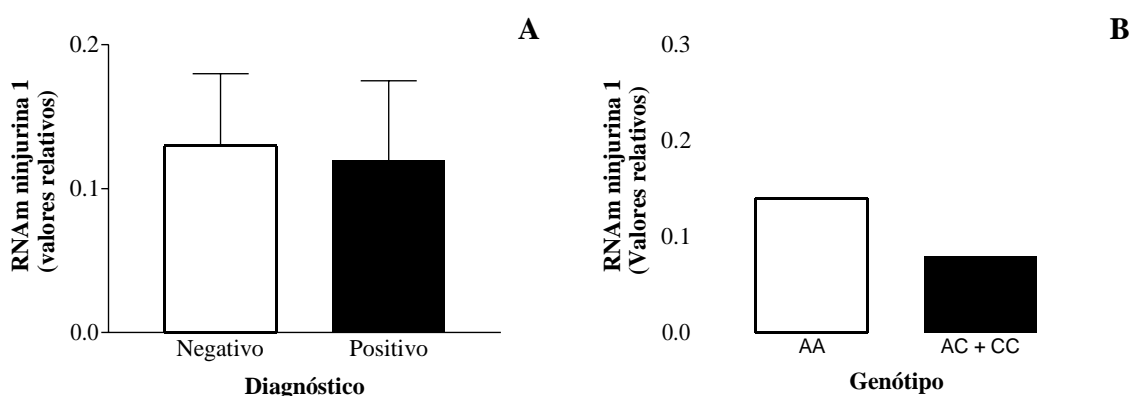


Figura 8: Expressão média de ninjurina em biópsias de nervo periférico. A: Expressão de ninjurina de acordo com o diagnóstico de Hanseníase. B: Expressão de ninjurina de acordo com o genótipo de asp110ala.

5. Quantificação alelo-específica (ASTQ) dos transcritos do gene *NINJI*

Além das análises de expressão total, os estudos funcionais do gene *NINJI* incluíram também a análise de expressão alelo-específica, dada a sugestão de um aumento na expressão do gene em virtude da presença do alelo A. Nesta etapa foram utilizadas apenas amostras de indivíduos heterozigotos, a fim de realizar a comparação entre os níveis de expressão dos dois alelos em um mesmo indivíduo.

Os resultados obtidos confirmam a expressão aumentada dos transcritos contendo alelo A em relação aos que contêm o alelo C. Os perfis de indução nas cinéticas, entretanto, não seguem um padrão definido de acordo com o tempo de cultura ou presença do estímulo, conforme exposto na Figura 9.

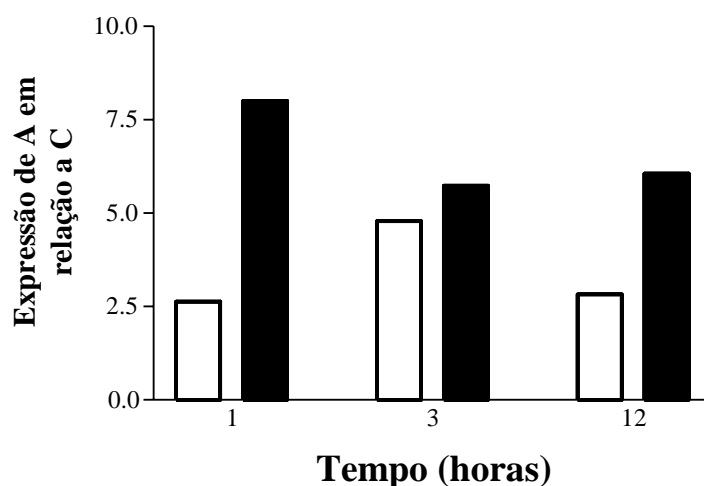


Figura 9: Indução da expressão dos transcritos portadores do alelo A em relação aos portadores do alelo C em culturas de PBMC. As células foram cultivadas por diferentes tempos em presença (barras escuras) ou ausência de *M. leprae* (barras claras). Os níveis de expressão de A em relação a C foram medidos através dos valores de $2^{-\Delta Ct}$.

A Tabela 10 mostra a indução na expressão de A em relação a C em culturas de PBMC de um pacientes de hanseníase, dois contatos operacionais sadios e em biópsias de nervo de pacientes, independente do diagnóstico de hanseníase. Os valores referentes às culturas de células estão expostos como uma média total dos valores de $2^{-\Delta Ct}$, ou subdivididos de acordo com o estímulo.

Tabela 10: Resultados das análises de ASTQ do gene *NINJI* em amostras de PBMC de um indivíduo afetado (1) e dois sadios (2 e 3) e biópsias de nervo.

Amostra	Controle	<i>M. leprae</i>	Todos os resultados
PBMC1	0,91 ± 0,44 (n:3)*	1,67 ± 0,55 (n:3)	1,29 ± 0,61 (n:6)
PBMC2	3,41 ± 1,19 (n:3)	6,60 ± 1,23 (n:3)	5 ± 2,05 (n:6)
PBMC3	7,48 ± 2,23 (n:2)	3,07 ± 1,67 (n:2)	5,28 ± 3,01 (n:4)
Biópsias de nervo	-	-	3,81 ± 2,81 (n:6)

*os valores de $2^{-\Delta Ct}$, representados como média ± desvio-padrão, indicam quantas vezes mais transcritos do alelo A existem em relação aos que contêm o alelo C.

V. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm discutido os estudos de associação no que diz respeito à validação dos resultados, pouco reprodutíveis até então. A principal sugestão para validação dos resultados deste tipo de análise consiste na tentativa de confirmação dos dados em estudos de associação independentes e, de preferência, com desenhos de estudo também diferentes. Sendo assim, o ideal seria que um mesmo resultado fosse observado em estudos de ligação bem como em estudos de associação utilizando tanto amostragens familiares quanto populacionais (Dahlman *et al.*, 2001). Seguindo esta tendência, o presente trabalho teve como objetivo inicial o recrutamento de uma população para uso na confirmação dos resultados de estudos de caso- controle realizados anteriormente em nosso laboratório (Santos *et al.*, 2002; Mira *et al.*, 2004).

Conforme descrito, um dos principais problemas dos estudos de associação reside na seleção equivocada dos controles (Cardon & Bell, 2001). O principal critério que define se um indivíduo pode ou não ser utilizado como controle é o fato de ser um caso em potencial. No contexto da Hanseníase isso significa que o indivíduo deve ter sido exposto ao agente etiológico e ter se mantido sadio após a exposição. Sendo assim, a utilização de uma população controle composta apenas por contatos domiciliares garantia a utilização de um desenho de estudo em que todos os indivíduos que se mantêm sadios o fazem em virtude de características endógenas, e não por ausência de exposição. O fato da distância física para o paciente também ser um dos fatores determinantes do desenvolvimento de hanseníase dentre os contatos (Moet *et al.*, 2006) sugere ainda mais a existência de um componente endógeno conferindo resistência a estes indivíduos.

Uma outra característica importante desta população de contatos consiste no fato de os indivíduos não apresentarem relação de parentesco co-sangüíneo entre si ou com o caso-índice. Este critério foi utilizado a fim de possibilitar a realização de uma análise de caso-controle clássica, sem que fossem necessárias correções no modelo estatístico de acordo com o grau de parentesco. Os pacientes foram selecionados da mesma forma, evitando a presença de indivíduos aparentados entre si.

1. Estudos de polimorfismos de base única e haplótipos utilizando a população para estudos caso-controle de confirmação

Uma vez que o processo de seleção dos indivíduos foi concluído, a etapa seguinte do projeto consistiu na tentativa de reprodução de dados de estudos anteriores obtidos para os genes *TNFA*, *LTA* e *PARK2* nesta nova população. Em ambos os casos, os polimorfismos genotipados foram selecionados devido ao fato de formarem haplótipos considerados “etiquetas” (ou “tags”), uma vez que concentram em conjunto a informação a respeito de um haplótipo estendido, composto também por outros polimorfismos. O principal objetivo da determinação de *tags* para haplótipos ao realizar genotipagens de vários SNPs consiste na redução do número de genotipagens necessárias em estudos subseqüentes (Ke *et al.*, 2004). Em resumo, assumindo-se que as frequências dos haplótipos variem pouco entre as populações, os estudos de confirmação poderiam ser realizados com base apenas na informação do *tag*.

Sendo assim, inicialmente os indivíduos foram genotipados para o polimorfismo TNF- 308, cuja associação já havia sido descrita (Santos *et al.*, 2000 e 2002) e, em seguida para o polimorfismo LTA+252, o qual não foi associado por si só à Hanseníase, mas sim ao formar um haplótipo com o polimorfismo TNF-308, com o qual, segundo descrito, encontra-se em desequilíbrio de ligação (Shaw *et al.*, 2001). Conforme exposto na Tabela 11, a análise das frequências genotípicas reproduz os resultados de associação obtidos anteriormente para o polimorfismo TNF-308 (Santos *et al.*, 2002), uma vez que a frequência de heterozigotos mostrou-se aumentada no grupo de contatos (controles).

Tabela 11: Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas do SNP TNF-308 obtidas a partir de estudos de caso-controle em Hanseníase.

<i>TNFA</i> -308	Roy <i>et al.</i> , 1997		Santos <i>et al.</i> , 2002		Fitness <i>et al.</i> , 2004		Presente estudo	
	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
AA	1	0	3	0	1	2	2	3
GA	8	6	16	33	19	20	14	21
GG	91	94	81	67	80	78	84	76
Alelo A	5	6	10,8	16,3	10	12	9	13

Conforme observado nesta tabela, a frequência do alelo A encontra-se aumentada sempre no grupo controle, sendo que o maior aumento (50%) foi observado no trabalho de Santos e cols. (2002), em que foi considerado significativo, e os menores aumentos foram encontrados nos trabalhos de Fitness e cols. (33%) e Roy e cols. (20%), nos quais não foram observadas diferenças significativas entre as frequências de casos e controles. No presente estudo, embora a comparação entre as frequências alélicas não tenha gerado resultados significativos, a associação obtida nos testes com carreadores reproduz os resultados já publicados à medida que os carreadores do alelo A apresentam OR indicando proteção (0,59) e P-valor significativo (0,03). Sendo assim, pode-se dizer que os dados desta população confirmam o efeito observado tanto em estudos de associação utilizando amostragens populacionais (Santos *et al.*, 2002) quanto os observados em testes de desequilíbrio de transmissão (Shaw *et al.*, 2001).

No caso do SNP LTA+252, a ausência de associação em isolado replica resultados publicados por Shaw e cols. (2001). As análises haplotípicas, por sua vez, embora não tenham apresentado resultados significativos em um teste global, replicam os dados indicativos de proteção para o haplótipo TNF-308A/LTA+252A (OR=0,47) obtidos neste mesmo trabalho (Shaw *et al.*, 2001) com amostragem de famílias, embora o p valor tenha sido *borderline* (0,06).

Uma vez que os indivíduos utilizados como controle nesta população sofrem exposição intensa, os resultados apresentados nos permitem concluir que o SNP TNF-308 realmente apresenta um efeito protetor, sendo, portanto um dos fatores que conferem resistência a estes indivíduos de modo a mantê-los sadios. Admitindo-se que o alelo A regule positivamente a expressão deste gene na presença de componentes bacterianos tais como o LPS, conforme proposto por (Sallacki *et al.*, 2005), podemos supor que este alelo venha a potencializar o efeito indutor do LAM sobre a produção de TNF- α descrito anteriormente (Adams *et al.*, 1993). O fato de os indivíduos que fazem uso de anti-TNF (influximab) no tratamento da artrite reumatóide tornarem-se suscetíveis a infecções micobacterianas como a hanseníase e a tuberculose, havendo até mesmo relatos de casos fatais (Wolfe *et al.*, 2004), reforça ainda mais a importância do TNF na resposta a este tipo de patógeno.

Devemos considerar ainda que o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente depende não só do TNF- α mas sim da atuação conjunta de diversos mediadores, cada um

apresentando suas próprias variações. Desta forma, cada variação em isolado tende a exercer um efeito sutil perante a complexidade da resposta imune, refletido por valores do OR próximos de 1 conforme observado por Rothman e cols (2006). Sendo assim, de uma forma simplificada, poderíamos dizer que os contatos carreadores do alelo A desencadeariam uma resposta protetora de maior ordem do que a observada em indivíduos não-carreadores, com potencialização da formação de granuloma mediada por TNF- α e consequente contenção da infecção.

Em contrapartida, não podemos deixar de considerar que a questão dos desvios em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pode, sem dúvida, representar um viés na análise. Os resultados absolutos de Santos e cols. (2002) demonstram que a população de pacientes deste trabalho apresentava também desvios para EHW, enquanto os controles utilizados apresentaram um valor compatível com o EHW. Conforme observado na Tabela 2, o mesmo ocorre no presente estudo, uma vez que somente a população de pacientes se encontra fora do equilíbrio. Tendo em vista o fato de ambas as amostragens serem representativas da população brasileira e provenientes de uma mesma região (Rio de Janeiro), é possível que este locus esteja sofrendo algum tipo de pressão seletiva, o que justificaria o desequilíbrio observado. Uma outra hipótese, comentada mais adiante, seria a de erros na genotipagem, já que ambos os estudos utilizaram a mesma técnica. A fim de resolver esta questão, outros métodos de genotipagem deste SNP devem, ainda, ser testados.

Da mesma forma, esta população foi também genotipada para os polimorfismos rs1040079 e -2599 do gene *PARK2*, os quais formam um haplótipo cuja associação já foi observada tanto em famílias vietnamitas quanto em estudos de caso-controle em uma população brasileira (Mira *et al.*, 2004). A análise das frequências genotípicas e alélicas de cada polimorfismo em isolado não foi capaz de detectar associação nos polimorfismos do gene *PARK2*. O mesmo ocorreu nas análises com haplótipos. Estes resultados negativos podem ter ocorrido em virtude de diversos fatores, conforme discutido adiante. Entretanto, é importante também comentar resultados recentes (Malhotra *et al.*, 2005) de estudos de confirmação, os quais não conseguiram a reprodução dos resultados obtidos ao utilizar uma população de tamanho reduzido. A Tabela 12 resume as frequências genotípicas e alélicas observadas no estudo de Mira e cols. e na presente análise, permitindo uma análise

comparativa dos resultados.

Tabela 12: Comparação entre as frequências (%) genóticas e alélicas dos polimorfismos rs1040079 e -2599 do gene *PARK2* obtidas em estudos de caso-controle em Hanseníase.

SNP	Genótipo	Mira <i>et al.</i> , 2004		Presente estudo	
		Casos	Controles	Casos	Controles
<i>PARK2</i> rs1040079	CC	18	12	13	15
	TC	44	41	50	49
	TT	38	47	37	36
	Alelo C	47	32	38	39
<i>PARK2</i> -2599	CC	12	14	15	16
	TC	41	49	34	38
	TT	47	37	51	46
	Alelo C	32	39	32	35

A análise da tabela nos permite observar que, no caso do SNP rs1040079, a frequência do alelo de risco C encontra-se bastante aumentada na amostragem de pacientes (47%) utilizada por Mira e cols. em relação ao grupo controle (32%), o que não ocorre na população de confirmação, em que as frequências são praticamente iguais. No caso do SNP -2599, a frequência do alelo C encontra-se aumentada nos controles. Mais uma vez, o aumento observado no trabalho de Mira e cols. (2004) foi maior que o observado na população de confirmação, o que, provavelmente se deve ao reduzido número de heterozigotos. Este por sua vez, pode ser explicado pela frequência elevada de homozigotos CC na população de confirmação em relação à população utilizada anteriormente.

No contexto dos estudos de associação a questão da estratificação populacional constitui um fator importante nos estudos de caso-controle, podendo acarretar tanto associações espúrias quanto dificuldades na reprodução de resultados anteriores (Cardon & Palmer, 2003), conforme observado neste estudo. Ao calcularmos as frequências genóticas observadas e esperadas para cada SNP, os valores de Qui-quadrado resultantes demonstraram que ambas as populações encontram-se fora do EHW para o SNP da posição -2599 do gene *PARK2*, o que provavelmente explica a dificuldade em replicar os resultados de associação já publicados para este gene. Também foram observados desvios em relação ao EHW na

população de contatos no SNP LTA+252 e na população de pacientes no caso do SNP TNF-308, conforme comentado acima.

A chamada Lei de Hardy-Weinberg assume que as frequências gênicas não se alterarão e as proporções genóticas atingirão um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo em uma população que obedeça a três premissas principais: ser infinitamente grande, tornando erros de amostragem e efeito de deriva genética desprezíveis; estar em panmixia, ou seja, os genitores se cruzam ao acaso e, por último, ausência de mutação, migração ou seleção (Beiguelman, 1994). Entretanto, sabemos que, de fato, não existe uma população que obedeça a todas estas premissas. Sendo assim, ao calcularmos o Qui-quadrado para verificar se uma população de estudo está em Equilíbrio de Hardy e Weinberg, utilizamos esta população hipotética como um parâmetro de comparação. Além disso, os artefatos de técnica constituem ainda um importante fator, o que tem motivado a utilização deste teste para a detecção de erros no sistema de genotipagem (Hosking *et al.*, 2004). Considerada esta hipótese, o polimorfismo -2599, que apresentou os valores de Qui-quadrado mais elevados, foi genotipado novamente utilizando o dobro da quantidade da enzima de restrição *RsaI* (4 unidades). Como resultado foi observada uma taxa de erro de 12%, a qual reduziu os valores de Qui-quadrado de ambas as populações. Entretanto, uma vez que o alelo C é o responsável pela criação do sítio de reconhecimento da enzima, os erros de genotipagem não poderiam explicar a frequência elevada de homozigotos para este alelo. Além disso, conforme comentado acima, também foram observados desvios no caso dos SNPs -308 e +252. Sendo assim, uma vez que ambas as populações permaneceram fora do equilíbrio para o SNP -2599 após a repetição do processo de genotipagem, a possibilidade de seleção das amostras passou a ser considerada.

A questão da estratificação populacional pode ser explicada por diversos fatores, dentre os quais se encontram as relações de parentesco, etnia e sexo dos indivíduos. Conforme descrito, os critérios utilizados para a construção da população de contatos resultaram na exclusão de todos os indivíduos que apresentassem parentesco co-sanguíneo com pacientes ou com os demais contatos selecionados. Como resultado, grande parte da população de contatos foi composta por cônjuges, os quais constituem os contatos domiciliares não co-sanguíneos mais comuns. Sendo assim, uma vez que os cônjuges apresentam a maior proximidade física com o paciente, estes indivíduos provavelmente apresentam alguma característica que os torne mais resistentes. Também na amostragem de pacientes foi eliminada a existência de parentesco co-sanguíneo entre os indivíduos.

No que diz respeito à etnia, a classificação dos indivíduos em brancos, negros ou mestiços foi realizada sempre pelo mesmo profissional com base na observação das características do indivíduo e dos familiares que o acompanharam, de modo a reduzir ao máximo o percentual de erro na classificação. A análise de ambas as populações revelou a presença de um percentual extremamente reduzido de negros. A distribuição dos indivíduos de acordo com o sexo, por sua vez, revelou uma frequência aumentada de homens dentre os pacientes e mulheres dentre os contatos. Em conjunto, estes fatores poderiam explicar tanto a questão dos desvios em relação ao EHW quanto a dificuldade em replicar a associação observada, conforme comentado adiante. Entretanto, a análise da população utilizada rotineiramente nos estudos de caso-controle do laboratório (com a qual foi detectada a associação para o haplótipo do gene *PARK2*) mostra que o percentual reduzido de negros e o desequilíbrio entre os sexos são características comuns a ambas as populações.

A questão da etnia por si só consiste em um tópico de discussão devido ao alto nível de miscigenação da população brasileira. O estudo de Parra e cols. (2003) demonstra claramente a contribuição dos diferentes povos colonizadores na composição genética da população brasileira atual, já que critérios como a cor da pele, tipo de cabelo e formatos de nariz e lábios mostraram-se pouco preditivos da ancestralidade do indivíduo. Neste contexto, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de caracterizar geneticamente as diferentes populações. Entretanto, embora alguns polimorfismos apareçam apenas em uma determinada população, como observado por Hinds e cols. (2005), a conclusão mais comum deste tipo de análise é a de que a variação entre os indivíduos de uma mesma população mostra-se muito mais elevada do que a variação entre as populações (Rosenberg *et al.*, 2002; Bamshad *et al.*, 2004; Hinds *et al.*, 2005).

Sendo assim, uma vez que a frequência dos marcadores varia pouco dentre os diferentes grupos étnicos, este tipo de classificação por si só não é capaz de prever o genótipo de um indivíduo (Lohmueller *et al.*, 2006), o que sugere que a etnia não seja o fator responsável pelas frequências genotípicas observadas nesta população. Além disso, tendo em vista os resultados de Parra e cols. (2003), uma vez que apenas as características físicas foram utilizadas para diferenciar os grupos, é possível que o número real de mestiços desta população seja maior que o observado com base nesta classificação. Em contrapartida, sabe-se

que uma das características mais importantes de uma população controle é a distribuição dos indivíduos de acordo com os grupos étnicos, que deve ser igual à observada nos pacientes (Cardon & Bell, 2001), o que, ao

menos de acordo com os critérios de classificação utilizados, não ocorre no presente estudo. Considerados estes argumentos, a etnia foi utilizada como um critério de correção do teste, evitando assim que fossem cometidos erros tanto ao estratificar quanto ao reunir todos os indivíduos em um só grupo. Tendo em vista trabalhos como o de Santos e cols. (2002), em que as frequências do SNP -308 foram diferentes em homens e mulheres, o sexo foi também utilizado como critério de correção, embora esta característica não interfira diretamente no genótipo do indivíduo ou no desenvolvimento da doença.

Conforme descrito nos resultados, a utilização destes critérios de correção alterou os valores de OR em menos de 10%, sugerindo que estas variáveis provavelmente não constituem fatores de confundimento tanto no caso do SNP -308 em isolado quanto nos haplótipos, considerando esta população e este tipo de abordagem (desenvolvimento de hanseníase). No caso específico do SNP -308, em que foram obtidos resultados significativos para os carreadores do alelo A (OR=0,51; P=0,03) e do genótipo GA (Tabela 1), a utilização da correção demonstra que as co-variáveis sexo e etnia influenciam muito pouco o valor da OR. O mesmo ocorre com o haplótipo -308A/+252A, cujo P-valor foi considerado *borderline*. Sendo assim, a maior consequência desta correção foi uma perda de poder em virtude das estratificações, o que poderia resultar estatisticamente em erro do tipo 2.

Uma vez que os fatores acima discutidos aparentemente não se mostraram responsáveis pela estratificação da população, resta ainda um importante fator a ser considerado. O tamanho amostral tem sido citado constantemente como um fator crucial em estudos de associação, uma vez que interfere diretamente no poder do teste e nas frequências dos alelos, que podem sofrer flutuações em amostragens reduzidas (Cardon & Bell, 2001; Dahlman *et al.*, 2002; Cardon & Palmer, 2003). Sendo assim, é possível que ao aumentarmos o tamanho da amostra os valores de qui-quadrado tornem-se compatíveis com o EHW e as evidências de associação possíveis de serem replicadas nesta população através do modelo logístico. Desta forma, a ampliação do tamanho amostral constitui uma das perspectivas futuras deste trabalho.

2. Estudos de polimorfismo e expressão do gene *NINJI*

Um dos principais problemas enfrentados pelos pacientes de Hanseníase reside no desenvolvimento de graus de incapacidade como resultado dos danos neurais. Uma vez que, até

então ainda não existem ferramentas capazes de “prever” quais indivíduos desenvolverão formas severas com evolução para a deformidade, a busca de marcadores genéticos com esta finalidade constitui um campo de estudo especialmente relevante.

Tendo em vista o fato de a ninjurina ser uma molécula envolvida com a adesão entre as células e a matriz extracelular expressa em células de Schwann nos nervos periféricos e com papel importante na regeneração axonal (Araki *et al.*, 1997), o gene *NINJI* constitui um gene candidato importante no contexto da Hanseníase. Por esta razão, a população de confirmação utilizada neste estudo foi também genotipada para o polimorfismo asp110ala do gene *NINJI*. As análises comparativas entre pacientes e contatos bem como as desenvolvidas entre pacientes paucibacilares e multibacilares sugerem que este polimorfismo não esteja associado ao desenvolvimento de Hanseníase *per se*, bem como com a gravidade à doença.

Considerando o papel da ninjurina na regeneração após dano ao sistema nervoso periférico, uma hipótese relevante seria a de observarmos efeito ao comparar as frequências deste polimorfismo em indivíduos com ou sem grau de incapacidade inicial (GII). A análise estatística detectou uma frequência aumentada do alelo C em indivíduos com GII maior que zero, com OR indicativa de risco e dependente do número de cópias do alelo. Entretanto, apesar da forte sugestão de risco, o resultado da análise revelou um valor de P *borderline*, o que provavelmente se deve ao número reduzido de indivíduos homozigotos para o alelo C.

Sendo assim, a fim de aumentar o poder da análise e com isso confirmar o dado preliminar, optamos por utilizar a amostra total de pacientes, de modo a aumentar a frequência de homozigotos CC. Uma vez que as comparações entre casos e controles e de acordo com as formas clínicas permaneceram inalteradas, assumimos que este polimorfismo não apresenta associação à Hanseníase *per se* ou ao desenvolvimento de suas diferentes formas clínicas nesta população. A comparação de acordo com o GII, por sua vez, confirma o gradiente observado na OR, a qual é elevada à medida que aumenta o número de cópias do alelo C. Os resultados da comparação global revelam que a diferença observada apresenta significância estatística (P=0,01) e, os valores de P obtidos a partir da comparação com o genótipo-base AA também foram significativos para os genótipos AC e CC. Estes resultados, em conjunto com as análises comparativas entre carreadores e não carreadores do alelo C indicam que os a presença

deste

alelo aumenta a chance do indivíduo desenvolver dano neural avaliado pelo grau de incapacidade.

Uma vez que este polimorfismo encontra-se em região codificante e acarreta uma troca de aminoácido, é possível que a proteína mutada tenha sua conformação alterada de modo a prejudicar a sua função. Uma outra hipótese seria a de uma alteração nos níveis de expressão de acordo com o alelo presente. Embora a posição do polimorfismo não permita uma interferência na ligação de fatores de transcrição (como os polimorfismos localizados em região promotora) ou na estabilidade do RNA mensageiro (como os presentes na região 3' não traduzida do gene), é possível que este polimorfismo esteja em desequilíbrio de ligação com algum polimorfismo localizado neste tipo de região. Sendo assim, o efeito sobre a expressão do gene estaria sendo detectado de forma indireta, através do SNP asp110ala.

Estas hipóteses, em conjunto com dados preliminares do laboratório obtidos a partir de experimentos de imunohistoquímica (Figura 6), motivaram a realização de estudos de expressão gênica. A marcação para ninjurina obteve resultados positivos tanto em biópsias de nervo de pacientes de hanseníase quanto em biópsias de portadores de outras neuropatias, o que já era esperado em virtude do papel desta proteína na regeneração axonal após dano, demonstrando que a ninjurina não é induzida apenas na infecção pelo *M. leprae*. Ainda assim, a expressão em diferentes formas neurais (Figura 6) demonstra que a expressão parece ser mais proeminente em amostras pacientes com hanseníase. A etapa seguinte do projeto consistiu em verificar se a infecção pelo *M. leprae* é capaz de induzir a expressão de ninjurina. O resultado das análises de expressão em tempo real utilizando cinéticas de células mononucleares de sangue periférico confirmam esta suspeita ao evidenciarem uma indução da expressão de RNA mensageiro do gene *NINJI* nas células estimuladas com *M. leprae*. O fato de indução ter ocorrido durante os tempos iniciais de cultura pode ser um indicativo de que o aumento de expressão ocorra em virtude do dano provocado pela própria invasão das células.

A etapa seguinte consistiu na realização de experimentos visando a identificação de uma possível diferença na expressão de ninjurina em biópsias de nervo de pacientes portadores da forma neural pura da hanseníase e portadores de outras neuropatias, também independentes de trauma. Como resultado, não foi observada diferença entre os dois grupos o que,

aparentemente, elimina a hipótese de uma indução específica por *M. leprae*, conforme sugerido nos dados

obtidos com a imunohistoquímica. Entretanto, assumindo-se que de fato exista indução direta nos indivíduos com diagnóstico positivo para PNL, é possível que os portadores de outras neuropatias (de etiologia desconhecida) apresentem elementos diversos com o mesmo potencial indutor do *M. leprae* sobre a expressão deste gene. É importante lembrar que, de fato, esses pacientes exibem um grau de dano neural que os fez procurar auxílio médico. De qualquer forma, a partir da comparação entre os dados de expressão de RNAm e proteína (histoquímica) em pacientes de acordo com o diagnóstico de hanseníase, é possível sugerir que exista também algum tipo de regulação pós-transcricional, já que as diferenças entre os dois grupos são observáveis apenas na produção da proteína.

Ainda utilizando biópsias de nervo, os indivíduos foram então subdivididos de acordo com o genótipo para o polimorfismo asp110ala. Uma vez que só um indivíduo apresentou genótipo CC, as amostras foram subdivididas em dois grupos: o primeiro composto apenas por homocigotos AA e o segundo composto pelos indivíduos carreadores do alelo C (genótipos AC e CC). As comparações entre estes dois grupos demonstraram uma expressão aumentada de ninjurina em indivíduos carreadores do alelo A, indicando um possível favorecimento da expressão gênica em presença deste alelo. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os níveis de expressão dos dois grupos, o que pode ser explicado pelos elevados valores de desvio-padrão de ambas as amostras.

Um aspecto importante a ser comentado reside no fato de o alinhamento da seqüência do gene *NINJI* humano aos genes de ninjurina de outras espécies ter demonstrado que apenas a espécie humana apresenta este o alelo polimórfico A (Dias-Neto, E. comunicação pessoal). Uma vez que este alelo é o mais freqüente na população humana, é possível que sua presença venha a conferir alguma vantagem para seus carreadores, seja através de um aperfeiçoamento na estrutura da proteína ou através de expressão diferencial, conforme discutido anteriormente.

A fim de responder esta pergunta foram realizados ensaios de quantificação alelo-específica dos transcritos de ninjurina (ASTQ) através de uma metodologia de PCR em tempo real que utiliza sondas alelo-específicas. Métodos diferentes haviam sido publicados anteriormente utilizando PCR convencional para a amplificação, os quais envolvem tanto a utilização de material radioativo (Kurreeman *et al.*, 2004) quanto de primers marcados com

fluorescência (Kimura *et al.*, 2005) para a detecção dos transcritos em géis de poliacrilamida.

Outro método proposto utiliza sondas marcadas com diferentes fluoróforos e discriminação através de eletroforese capilar (Matyas *et al.*, 2002).

Todas estas técnicas mostram-se eficientes no sentido de quantificar os transcritos de cada alelo, entretanto, mostram-se bastante desvantajosas em relação ao PCR em tempo real por serem extremamente longas. Além disso, a análise quando realizada desta forma ocorre após um elevado número de ciclos, o que implica na interferência da fase de platô, como ocorre comumente no PCR semi-quantitativo. A utilização de sondas alelo-específicas marcadas com fluoróforos já havia sido proposta (Zhou *et al.*, 2000), entretanto, esta técnica também não elimina a questão da fase de platô, uma vez que as sondas são hibridizadas após a reação de PCR. Desta forma, a padronização de um sistema em tempo real além de dispensar o uso de material radioativo, eliminaria o problema da fase de platô da reação de PCR, que poderia minimizar um possível efeito indutor por parte do alelo.

O resultado das análises demonstra uma expressão aumentada de RNA mensageiro na presença do alelo A. Estes resultados reforçam a sugestão de um valor adaptativo deste alelo já que o mesmo favorece a expressão de uma molécula neuroprotetora. Além disso, uma vez que a ninjurina é uma molécula de adesão com expressão basal em diferentes tecidos, é possível que a presença do alelo A, com conseqüente aumento de expressão, favoreça a estruturação de diversos tipos de tecido (Araki *et al.*, 1997). No contexto da hanseníase, em que o dano neural é o primeiro a ocorrer em virtude do tropismo do *M. leprae* pelas células de Schwann, a expressão aumentada de uma molécula envolvida no processo de regeneração axonal pode vir a impedir que o dano seja extenso, reduzindo a possibilidade de o indivíduo desenvolver graus de incapacidade.

Tendo em vista que, ao lado da redução das taxas de incidência, o outro aspecto importante a ser considerado na pesquisa em hanseníase é a morbidade dos pacientes, a busca de marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de quadros de incapacidade e deformidade constitui uma área de suma importância. A observação dos dados obtidos a partir das análises de polimorfismo e expressão do gene *NINJI*, nos permite sugerir o SNP asp110ala como um importante marcador prognóstico. Uma vez que não foram observadas diferenças entre as freqüências genótípicas e alélicas de pacientes e contatos, não se pode dizer que este

SNP atue como um marcador de suscetibilidade à hanseníase *per se*. O mesmo pode ser dito com relação às formas clínicas, já que nem mesmo ao utilizar a população estendida de pacientes foi possível

observar diferença entre as frequências deste SNP em paucibacilares e multibacilares. Entretanto, uma vez que ao compararmos pacientes de acordo com os graus de incapacidade iniciais foi observada uma diferença significativa, este polimorfismo passa a ser considerado um importante marcador de suscetibilidade a este tipo de quadro. Os dados de expressão dão ainda mais suporte a esta sugestão, a medida que caracterizam a consequência funcional da presença do alelo C de reduzir a expressão do gene e, conseqüentemente, dificultar a regeneração axonal após o dano provocado pelo *M. leprae*.

Em suma, uma vez que o quadro de incapacidade resultante do dano neural constitui um dos responsáveis pelo estigma relacionado à hanseníase, pode-se dizer que o mesmo prejudica, em última análise, as relações sociais do indivíduo. Soma-se a isso, uma possível consequência econômica, tendo em vista que dependendo da extensão do dano, o indivíduo pode ter dificuldades ao trabalhar. Sendo assim, uma vez que o indivíduo tem a hanseníase diagnosticada, a genotipagem deste polimorfismo seria recomendável como parte dos exames de rotina. Desta forma, indivíduos carreadores do alelo C poderiam receber um tratamento diferencial, de modo a prevenir que fossem desenvolvidos quadros de incapacidade. Da mesma forma, indivíduos que já procurassem ajuda médica com algum tipo de incapacidade poderiam ter seu tratamento reforçado caso fossem carreadores deste alelo.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que:

1. A utilização de uma população controle composta por contatos domiciliares sadios permitiu a confirmação dos dados de proteção conferida pelo alelo TNF-308A publicados anteriormente. O mesmo ocorre com os dados de haplótipos, embora o resultado não seja significativo.
2. Os polimorfismos do gene *PARK2* não estão associados à Hanseníase nesta população, tanto isoladamente quanto ao formar haplótipos.
3. Devido à estratificação críptica revelada por desvios no EHW, o tamanho amostral da população de confirmação deve ser ampliado, a fim de que a mesma se torne mais apropriada para este tipo de estudo.
4. A presença do alelo C no polimorfismo asp110ala do gene *NINJI* confere suscetibilidade ao comprometimento neurológico medido através do grau de incapacidade.
5. A infecção pelo *M. leprae* induz a expressão do gene *NINJI*, evidenciando sua importância na hanseníase.
6. A presença do alelo A no SNP asp110ala aumenta a expressão do gene *NINJI*, provavelmente favorecendo a regeneração axonal e reduzindo a chance de o indivíduo desenvolver algum tipo de incapacidade.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abel L, Dessein AJ. Genetic epidemiology of infectious diseases in humans: design of population-based studies. **Emerg Infect Dis.** 1998 Dec; 4(4): 593-603.

Abel L, Sanchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, Skamene E, Lagrange PH, Schurr E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **J Infect Dis.** 1998 Jan;177(1):133-45.

Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. **Infect Immun.** 1993 Oct; 61(10): 4173-81.

Alcaïs A, Sanchez FO, Thuc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, Schurr E, Abel L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **J Infect Dis.** 2000 Jan; 181(1): 302-8.

Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Shurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Curr Opin Immunol.** 2005 Feb; 17(1): 44-8.

Alves L, de Mendonca Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, Pessolani MC, Barker LP. Mycobacterium leprae infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiol Lett.** 2004 Sep 15; 238(2): 429-37.

Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. **Neuron.** 1996 Aug; 17(2): 353-61.

Araki T, Milbrandt J. Ninjurin2, a novel homophilic adhesion molecule, is expressed in mature sensory and enteric neurons and promotes neurite outgrowth. **J Neurosci.** 2000 Jan 1; 20(1):187- 95.

Araki T, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. Mechanism of Homophilic Binding Mediated by Ninjurin, a Novel Widely Expressed Adhesion Molecule. **J Biol Chem.** 1997; 272(34): 21373-21380.

Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. **Breast Cancer Res.** 2004; 6(4): R395-400.

Bamshad M, Wooding S, Salisbury BA, Stephens JC. Deconstructing the relationship between genetics and race. **Nat Rev Genet.** 2004 Aug;5(8):598-609.

Beiguelman B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. **Acta Genet Med Gemellol.** 1968 Oct; 17(4): 584-594.

Beiguelman B. A lei de Hardy e Weinberg. Em: Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2 ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética; 1995. Págs: 179-194.

Bekker LG, Freeman S, Murray PJ, Ryffel B, Kaplan G. TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. **J Immunol.** 2001 Jun 1; 166(11): 6728-34.

Beyene D, Aseffa A, Harboe M, Kidane D, MacDonald M, Klatser PR, Bjune GA, Smith WC. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. **Epidemiol Infect.** 2003 Oct; 131(2): 841-8.

Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **J Immunol.** 2003 Apr 1; 170(7): 3451-4.

Bouqbis L, Akhayat O, Garchon HJ, Calafell F, Izaabel H. TNFA-TNFB haplotypes modify susceptibility to type I diabetes mellitus independently of HLA class II in a Moroccan population. **Tissue Antigens.** 2003 Jan; 61(1): 72-9.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. **Lancet**. 2004 Apr 10; 363: 1209-1219.

Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. **Lancet**. 2005 Sep 10; 366(9489):941-51.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**. 1995 Nov 1; 182(5): 1259-64.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. **Nat Rev Genet**. 2001 Feb; 2(2): 91-9.

Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. **Lancet**. 2003 Feb 15; 361: 598-604.

Chadwick BP, Heath SK, Williamson J, Obermayr F, Patel L, Sheer D, Frischauf AM. The human homologue of the ninjurin gene maps to the candidate region of hereditary sensory neuropathy type I (HSNI). **Genomics**. 1998 Jan 1;47(1):58-63.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Darris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajadream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature** 2001 Feb 22; 409 (6823): 1007-1011.

Dahlman I, Eaves IA, Kosoy R, Morrison VA, Heward J, Gough SCL, Allahabadia A, Franklyn JA, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Cucca F, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Stevens H, Carr P, Nutland S, McKinney P, Shield JP, Wang W, Cordell HJ, Walker N, Todd JA, Concannon P. Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. **Nat Genet**. 2002 Feb; 30: 149-150.

Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, Lucas SB, Shahid F, Dojki M, Chiang TJ, Ehsan Q, McAdam KP, Hussain R. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. **Infect Immun.** 1996 Oct;64(10):4385-9.

Douglas JT, Cellona RV, Fajardo Jr. TT, Abalos RM, Balagon MVF, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2004 Sep; 11(5): 897-900.

Ferreira FR, Goulart LR, Silva HD, Goulart IMB. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 2004 Dec; 72(4): 457-67.

Fine PE, Sterne JA, Ponnighaus JM, Bliss L, Sauji J, Chihana A, Munthali M, Warndorff DK. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **Am J Epidemiol.** 1997 Jul 1; 146(1): 91-102.

Fitness J, Tosh K, Hill AVS. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes Immun.** 2002 Dec;3(8):441-53.

Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Waungulu LM, Crampin AC, Fine PEM, Hill AVS. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of Northern Malawi. **Am J Trop Med Hyg.** 2004 Sep; 71(3): 330-40.

Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JA, Moraes MO, Antunes SL, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. Em: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Vol. II. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Págs: 1383-1394.

Godal T, Lofgren M, Negassi K. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. **Int J Lepr.** 1971; 40(3): 244-250.

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. **Nature**. 1984; 312(5996): 721-4.

Hagge DA, Robinson SO, Scollard D, McCormick G, Williams D. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on schwann cell and neuron interactions. **J Infect Dis**. 2002 Nov 1; 186: 1283-1296.

Hill AVS. The Immunogenetics of Human Infectious Diseases. **Annu Rev Immunol**. 1998; 16: 593-617.

Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. **Science**. 2005 Feb 18; 307(5712): 1072-9.

Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, Riley J, Purvis I, Xu CF. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. **Eur J Hum Genet**. 2004 May; 12(5): 395-9.

Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microsc Res Tech**. 2000 Aug 1; 50(3): 184-95.

Ihaka R, Gentleman R. A Language for Data Analysis and Graphics. *J Comput Graph Stat* 1996; 5: 299-314.

Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JDR. The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin-ligases. **Trends Cell Biol**. 2000; 10: 429-439.

ILEP. How to diagnose and treat leprosy. The International Federation of Anti-Leprosy Associations [online]. London, 2001; [capturado em 23 jan. 2006]. Disponível em: www.ilep.org.uk-documents-Ig1eng.

Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. **Trends Cell Biol.** 2000 Oct; 10(10): 429-39.

Jamieson SE, Miller EN, Black GF, Peacock CS, Cordell HJ, Howson JMM, Shaw MA, Burgner D, Xu W, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazillians. **Genes Immun.** 2004 Jan; 5(1): 46-57.

Jardim MR, Antunes SL, Santos AR, Nascimento OJ, Nery JA, Sales AM, Illarramendi X, Duppre N, Chimelli L, Sampaio EP, Sarno EM. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **J Neurol.** 2003 Jul; 250(7): 806-9.

Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunology.** 2004 Aug; 112(4): 674-80.

Kaplan NL, Martin ER, Morris RW, Weir BS. Marker selection for the transmission/disequilibrium test, in recently admixed populations. **Am J Hum Genet.** 1998 Mar; 62(3): 703-12.

Ke X, Durrant C, Morris AP, Hunt S, Bentley DR, Deloukas P, Cardon LR. Efficiency and consistency of haplotype tagging of dense SNP maps in multiple samples. **Hum Mol Genet.** 2004 Nov 1; 13(21): 2557-65.

Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, Lockwood DN. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. **Clin Exp Immunol.** 1995 Feb; 99(2): 196-202.

Kimura R, Nishioka T, Soemantri A, Ishida T. Allele-specific transcript quantification detects haplotypic variation in the levels of the SDF-1 transcripts. **Hum Mol Genet.** 2005 Jun 15; 14(12): 1579-85.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**. 1998 Apr 9; 392: 605-608.

Koeleman BP, Dudbridge F, Cordell HJ, Todd JA. Adaptation of the extended transmission/disequilibrium test to distinguish disease associations of multiple loci: the Conditional Extended Transmission/Disequilibrium Test. **Ann Hum Genet**. 2000 May; 64(Pt 3): 207-13.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med**. 2003 May; 9(5): 525-32.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med**. 2005 Jun;11(6):653-60.

Kubo T, Yamashita T, Yamaguchi A, Hosokawa K, Tohyama M. Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. **J Neurochem**. 2002 Sep; 82(5): 1129- 36.

Kurreeman FAS, Schonkeren JJM, Heijmans BT, Toes REM, Huizinga TWJ. Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. **Hum Mol Genet**. 2004 Aug 15; 13(16): 1755-62.

Lange C, DeMeo D, Silverman EK, Weiss ST, Laird NM. Using the Noninformative Families in Family-Based Association Tests: A Powerful New Testing Strategy. **Am J Hum Genet**. 2003 Oct; 73(4): 801-11.

Lee SB, Kim BC, Jin SH, Park YG, Kim SK, Kang TJ, Chae GT. Missense mutations of the interleukin-12 receptor beta 1(IL12RB1) and interferon-gamma receptor 1 (IFNGR1) genes

are not associated with susceptibility to lepromatous leprosy in Korea.
Immunogenetics. 2003 Jun; 55(3): 177-81.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lohmueller KE, Mauney MM, Reich D, Braverman JM. Variants Associated with Common Disease Are Not Unusually Differentiated in Frequency across Populations. **Am J Hum Genet**. 2006 Jan; 78(1): 130-6.

Lu LY, Cheng HH, Sung PK, Tai MH, Yeh JJ, Chen A. Tumor necrosis factor-beta +252A polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus in Taiwan. **J Formos Med Assoc**. 2005 Aug; 104(8): 563-70.

Lunetta KL, Faraone SV, Biederman J, Laird NM. Family-Based Tests of Association and Linkage That Use Unaffected Sibs, Covariates, and Interactions. **Am J Hum Genet**. 2000; 66: 605–614.

Malhotra D, Darvishi K, Lohra M, Kumar H, Grover C, Sood S, Reddy BS, Bamezai RN. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. **Eur J Hum Genet**. 2005 Dec 14;

Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, Reddy BS, Bamezai RN. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Hum Genet**. 2005 Nov; 118(2): 295-300.

Malhotra D, Relhan V, Reddy BSN, Bamezai R. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. **Hum Genet**. 2005 Apr; 116(5): 413-5.

Mandich P, Bellone E, Di Maria E, Pigullo S, Pizzuti A, Schenone A, Soriani S, Varese A, Windebank AJ, Ajmar F. Exclusion of the ninjurin gene as a candidate for hereditary sensory neuropathies type I and type II. **Am J Med Genet**. 1999; 83(5): 409-10.

Marquet S, Schurr E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. **Drug Metab Dispos.** 2001; 29: 479-83.

Martin ER, Bass MP, Hauser ER, Kaplan NL. Accounting for Linkage in Family-Based Tests of Association with Missing Parental Genotypes. **Am. J. Hum. Genet.** 2003; 73: 1016–1026.

Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim M, Sarno EN, Moraes MO. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples of leprosy patients: evaluation of real time and conventional PCR targeting complex 85 genes. **J Clin Microbiol.** No prelo.

Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, Sanpei K, Koike R, Mori H, Kondo T, Mizutani Y, Schffer AA, Yamamura Y, Nakamura S, Kuzuhara S, Tsuji S, Misuno Y. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. **Am J Hum Genet.** 1997; 60: 588-596.

Matyas G, Giunta C, Steinmann B, Hossle JP, Hellwig R. Quantification of single nucleotide polymorphisms: a novel method that combines primer extension assay and capillary electrophoresis. **Hum Mutat.** 2002 Jan; 19(1): 58-68.

McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. **Nature.** 1994 Oct 6; 371(6497): 508-10.

Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AVS. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **Am J Trop Med Hyg.** 2001 Dec; 65(6): 733-5.

Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, Cordell HJ, Shaw MA, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. **Genes Immun.** 2004 Jan; 5(1):

63-7.

Ministério da Saúde. Boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde. **Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Dermatologia Sanitária.** Brasília. 2003.

Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Verner A, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nat Genet.** 2003 Mar; 33: 412-415.

Mira MT, Alcaïs A, VanThuc N, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VH, Phuong MC, Huong NT, Ba NN, Khoa PX, Sarno EN, Alter A, Monpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Doré C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van de Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* e *PACRG*. **Nature** 2004 Feb 12; 427 (6975): 636-640.

Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, Singh S, Colston MJ, Nath I. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. **Immunology.** 1995 Sep; 86(1): 97-103.

Mitra DK, Rajalingam R, Taneja V, Bhattacharyya BC, Mehra NK. HLA-DR polymorphism modulates the cytokine profile of *Mycobacterium leprae* HSP-reactive CD4⁺ T cells. **Clin Immunol Immunopathol.** 1997 Jan;82(1):60-7.

Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **J Infect Dis.** 2006 Feb 1; 193(3): 346-53.

Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofo V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. **Science.** 2005 May 13; 308(5724): 1040-2.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BCC, Nery JAC, Martins RCL, Sampaio EP. Cytokine mRNA Expression in Leprosy: a Possible Role for Interferon- γ and Interleukin-12 in

Reactions (RR and ENL). **Scand J Immunol** 1999; 50: 541–549.

Moraes MO, Sarno EN, Teles RMB, Almeida AS, Saraiva BCC, Nery JAC, Sampaio EP. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. **J Invest Dermatol.** 2000; 115: 935-941.

Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JAC, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. **Immunogenetics.** 2001; 53: 45-47.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborcht PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes Immun.** 2004 Nov;5(7):592-5.

Neill MA, Klebanoff SJ. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. **J Exp Med.** 1988 Jan 1; 167(1): 30-42.

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 1998; 40(6): 363-70.

Newton J, Brown MA, Milicic A, Ackerman H, Darke C, Wilson JN, Wordsworth BP, Kwiatkowski D. The effect of HLA-DR on susceptibility to rheumatoid arthritis is influenced by the associated lymphotoxin alpha-tumor necrosis factor haplotype. **Arthritis Rheum.** 2003 Jan; 48(1): 90-6.

Ng, V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic-glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell.** 2000 Oct 27; 103(3): 511-24.

Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, Naruishi H, Ohira

T, Hashimoto K, Liu T, Suzuki M, Uemura Y, Matsushita S. Polymorphism of the 5' flanking region

of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. **J Clin Pathol.** 2005; 58(7):740-3.

Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun.** 2003 Mar; 71(3): 1427-33.

Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F, Teles RM, Silva TP, Oliveira AL, Antas PR, Sarno EN. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2005 Oct; 64(10): 882-90.

Ottenhoff THM, Converse PJ, Gebre N, Wondimu A, Ehrenberg JP, Kiessling R. T cell responses to fractionated *Mycobacterium leprae* antigens in leprosy. The lepromatous nonresponder defect can be overcome *in vitro* by stimulation with fractionated *M. leprae* components. **Eur J Immunol.** 1989; 19: 707–13.

Ottenhoff TH, Neuteboom S, Elferink DG, de Vries RR. Molecular localization and polymorphism of HLA class II restriction determinants defined by *Mycobacterium leprae*-reactive helper T cell clones from leprosy patients. **J Exp Med.** 1986; 164(6):1923-39.

Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin- α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. **Nat Genet.** 2002 Dec; 32(4): 650-4.

Padovani JC, Pazin-Filho A, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA, Franco RF. Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. **Thromb Res.** 2000 Nov 15; 100(4): 263-9.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Jan 7; 100(1): 177-82.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**. 1984; 312(5996): 724-9.

Pessolani MCV, Marques MAM, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? **Microbes Infect**. 2003 Jun; 5(7): 677-84.

Preston RJ. Molecular epidemiology: potential impacts on the assessment of public health. **Mutat Res**. 2003 Mar; 543(2): 121-4.

Purcell S, Sham P, Daly MJ. Parental Phenotypes in Family-Based Association Analysis. **Am J Hum Genet**. 2005; 76: 249–259.

Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. **Tissue Antigens**. 1997 Feb; 49(2): 168-72.

Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Curr Opin Microbiol**. 2001; 4: 21-27.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science**. 2002 May 3; 296: 927-931.

Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Weiss ST. Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes. **Am J Respir Crit Care Med**. 2005 Sep 15; 172(6): 687-92.

Rea TH, Sieling PA. Delayed-type hypersensitivity reactions followed by erythema nodosum leprosum. **Int J Lepr**. 1998; 66: 316-27.

Ress RFW. The microbiology of leprosy. In: **Hastings RC (ed) Leprosy**, 1st edition, New

York, Churchill Livingstone Inc; 1985 p. 31-52.

Ridley, D.S & Joplin, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1966; 34(3):255-73.

Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Neupane KD, Theuvenet WJ. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1993 Mar; 61(1): 35-43.

Rodriguez-Perez JM, Cruz-Robles D, Hernandez-Pacheco G, Perez-Hernandez N, Murguia LE, Granados J, Reyes PA, Vargas-Alarcon G. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. **Immunol Lett.** 2005 Apr 15; 98(1): 97-102.

Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. Genetic structure of human populations. **Science.** 2002 Dec 20; 298(5602): 2381-5.

Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, Spinelli JJ, Willet E, De Sanjose S, Cocco P, Berndt SI, Brennan P, Brooks-Wilson A, Wacholder S, Becker N, Hartge P, Zheng T, Roman E, Holly EA, Bofetta P, Armstrong B, Cozen W, Linet M, Bosh FX, Ennas MG, Holford TR, Gallagher RP, Rollinson S, Bracci PM, Cerhan JR, Whitby D, Moore PS, Leaderer B, Lai A, Spink C, Davis S, Bosh R, Scarpa A, Zhang Y, Severson RK, Yeager M, Chanock S, Nieters A. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. **Lancet Oncol.** 2006 Jan;7(1):27-38.

Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, Kwiatkowski D. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J Infect Dis.** 1997 Aug; 176(2): 530-2.

Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis.** 1999 Jan; 179(1): 187-91.

Sallakci N, Akcurin G, Koksoy S, Kardelen F, Uguz A, Coskun M, Ertug H, Yegin O. TNF-

alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF- alpha production. **J Autoimmun.** 2005 Sep; 25(2): 150-4.

Sampaio EP, Moraes MO, Nery JAC, Santos AR, Matos HC, Sarno EN. Pentoxifylline decreases *in vivo* and *in vitro* tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). **Clin Exp Immunol.** 1998; 111: 300-308.

Sampaio EP, Moraes MO, Pessolani MCV, Sarno EN. Role of Th1 cytokines in host defenses against *Mycobacterium leprae*. In: Kotb M, Kallindra T, eds. **Cytokines and Chemokines in infectious diseases handbook.** Totowa: Humana Press; c2003. p. 1-24.

Santos AR, Nery JC, Duppre NC, Gallo ME, Filho JT, Suffys PN, Degraeve WM. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. **J Med Microbiol.** 1997 Feb; 46(2): 170-2.

Santos AR, Almeida AS, Suffys PN, Moraes MO, Filho VF, Mattos HJ, Nery JA, Cabello PH, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 2000 Sep; 68(3): 325-7.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TJW, Ottenhoff THM, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis.** 2002; 186: 1687-1691.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LMM, Nery JAC. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. **Clin Exp Immunol.** 1991; 84: 103-8.

Sarno EN, Santos AR, Jardim MR, Suffys PN, Almeida AS, Nery JAC, Vieira LMM, Sampaio EP. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF alpha. **Lepr Rev.** 2000; 71 (Suppl.): S154-160.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3

(CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. **J Immunol.** 1991a Sep 15; 147(6): 1983-94.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **J Exp Med.** 1991b Nov 1;174(5):1031-8.

Scollard DM, McCormick G, Allen JL. Localization of *Mycobacterium leprae* to endothelial cells of epineurial and perineurial blood vessels and lymphatics. **Am J Pathol.** 1999; 154(5):1611-20.

Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes Immun.** 2001;2(4):196-204.

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-Kda surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc Nat Acad Sci.** 1999; 96: 9857-9862.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nature.** 2000 Jul; 25: 302-305.

Shumin C, Lin Z, Diangchang L, Bing L. Should Household Contact Examination in a Low Endemic Situation of Leprosy Continue? **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 2003; 71(2): 95-100.

Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, Golding M, Shanker Narayan NP, Sitaraman T, Sengupta U, Pitchappan R, Hill AV. A major susceptibility locus for leprosy on chromosome 10p13. **Nat Genet.** 2001 Apr; 27(4): 439-41.

Smith CM, Smith WC. Chemoprophylaxis is effective in the prevention of leprosy in endemic countries: a systematic review and meta-analysis. **J infect.** 2000 Sep; 41: 137-142.

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). **Am J Hum Genet.** 1993 Mar; 52(3): 506-16.

Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff THM. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. **Immunol Cell Biol.** 2000 Aug;78(4):349-55.

Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. **Immunol Ser.** 1992; 56: 3-34.

Strachan T, Read AP. Mapeamento genético de caracteres complexos. Em: *Genética Molecular Humana*. 2 ed. São Paulo: ArtMed. Págs: 283-293.

Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005 Jun 28; 102(26): 9188-93.

Teare MD, Barret JH. Genetic linkage studies. **Lancet.** 2005; 366: 1036-1044.

Terwilliger JD and Ott J. Linkage disequilibrium between alleles at marker loci In: **Handbook of human genetics linkage**. Baltimore and London: The John Hopkins University Press; 1994, p. 188-193.

Thole JE, Janson AA, Cornelisse Y, Schreuder GM, Wieles B, Naafs B, de Vries RR, Ottenhoff TH. HLA-class II-associated control of antigen recognition by T cells in leprosy: a prominent role for the 30/31-kDa antigens. **J Immunol.** 1999 Jun 1; 162(11): 6912-8.

Tosh K, Meisner S, Siddiqui MR, Balakrishnan K, Ghei S, Golding M, Sengupta U, Pitchappan RM, Hill AV. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. **J Infect Dis.** 2002 Oct 15;186(8):1190-3.

Van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. **Int J Lepr.** 1999; 67: 119-28.

Vanderborgh PR, Matos HJ, Salles AM, Vasconcellos SE, Silva-Filho VF, Huizinga TW,

Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN, Santos AR, Moraes MO. Single nucleotide

polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNF α promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 2004 Jun; 72(2): 143-8.

Vendrell J, Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Zamora A, Simon I, Bardaji A, Ricart W, Richart C. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor- α gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. **Atherosclerosis.** 2003 Apr; 167(2): 257-64.

Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol** 2001; 2(8): REVIEWS1023.

Wang JP, Rought SE, Corbeil J, Guiney DG. Gene expression profiling detects patterns of human macrophage responses following *Mycobacterium tuberculosis* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2003; 39: 163-172.

Wang LM, Kimura A, Satoh M, Mineshita S. HLA linked with leprosy in southern China: HLA-linked resistance alleles to leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1999; 67(4): 403-8.

West AB, Lockhart PJ, O'Farrel C, Farrer MJ. Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. **J Mol Biol.** 2003; 326: 11-19.

WHO. World Health Organization Leprosy Elimination Project. **Who reports** [online]. Geneva, 2004; [capturado em 12 ago. 2004]. Disponível em: <http://www.who.int/lep/reports/s20042.pdf>.

WHO. Global leprosy situation, 2005. **Weekly epidemiological record** [online]. 2005a; [capturado em 5 de dez. 2005]. Disponível em <http://www.who.int/lep/Reports/wer8034.pdf>.

WHO. Global strategy for further reducing the Leprosy burden and sustaining leprosy control activities. **Who Media Center** [online]. 2005b; [capturado em 9 dez. 2005]. Disponível em

<http://www.who.int/lep/Reports/GlobalStrategy-PDF-verison.pdf>.

Wibawa T, Soebono H, Matsuo M. Association of a missense mutation of the laminin a2 gene with tuberculoid type of leprosy in Indonesian patients. **Trop Med Int Health.** 2002 Jul; 7(7): 631-6.

Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. **Arthritis Rheum.** 2004 Feb;50(2):372- 9.

Yamamura M, Uyemura U, Deans R, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science.** 1991 Oct 11; 254(5029): 277-9.

Young D. Genomics: Leprosy – a degenerative disease of the genome. **Curr Biol.** 2001; 11: 381-383.

Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Ruge M, Di Mario F, Plebani M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection: interactions influence outcome. **Cytokine.** 2005 Feb 21; 29(4): 141-52.

Zhou W, Galizia G, Lieto E, Goodman SN, Romans KE, Kinzler KW, Vogelstein B, Choti MA, Montgomery EA. Counting alleles reveals a connection between chromosome 18q loss and vascular invasion. **Nat Biotechnol.** 2001 Jan;19(1):78-81.