

**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

**Epidemiologia genética em hanseníase: estudo de
associação da região genômica candidata 6p21 e do
gene *TLR1***

Weber Laurentino da Silva

BOTUCATU

2013

Weber Laurentino da Silva

**Epidemiologia genética em hanseníase: estudo de
associação da região genômica candidata 6p21 e do
gene *TLR1***

*Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de
Medicina de Botucatu, da UNESP, para obtenção
do título de Mestre em doenças tropicais.*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carla Pereira Latini

BOTUCATU

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Silva, Weber Laurentino da.

Epidemiologia genética em hanseníase : estudo de associação da região genômica candidata 6p21 e do gene TLR1 / Weber Laurentino da Silva. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Carla Pereira Latini

Capes: 20202008

1. Hanseníase. 2. Genética molecular. 3. Epidemiologia – Pesquisa - Metodologia. 4. Mycobacterium leprae. 5. Polimorfismo (Genética).

Palavras-chave: Estudo de associação; Hanseníase; Polimorfismo de base única.

A Deus

Por me dar forças no decorrer desta caminhada.

Pelas bênçãos de cada dia.

*À minha família, em especial a
Minha Mãe Neide, Meu Pai Cicero,
Meus irmãos Sarah e Newton,
Pelos ensinamentos, exemplos e amor sempre a mim proferidos.*

*A minha esposa Harumi,
Que por mais que eu tente expressar o que eu sinto,
meras palavras não são suficientes para demonstrar meu grande e eterno amor.*

*A minha querida Beatriz,
Teu sorriso é meu passa tempo,
abençoado o dia em que você nasceu e mudou a minha vida.*

Agradecimientos

*À Profa Dra Ana Carla Pereira Latini,
Como exemplo de profissional e pessoa. Por me conduzir como um filho,
compreendendo minhas dificuldades e mostrando o caminho da ciência.*

*A todos os Pesquisadores e funcionários
Do Instituto Lauro de Souza Lima,
Que de maneira direta ou indiretamente contribuíram,
fazendo parte da minha vida e deste trabalho.*

Aos meus amigos, em especial ao meu irmão Phiquinho, pelo incentivo e apoio.

Aos Colaboradores deste estudo, por toda a atenção oferecida.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina e do Departamento de Doenças Tropicais, em especial a Solange Sako Fagliari pela atenção e pelos serviços sempre disponibilizados.

Aos colegas de Pós-Graduação e estagiários pela amizade e ensinamentos compartilhados.

Aos pacientes, objetivo maior deste trabalho científico.

Dedicatórias	2
Agradecimentos	6
Sumário.....	11
Lista de figuras	15
Lista de tabelas	17
Lista de abreviaturas e siglas	20
Introdução.....	27
1.1 Características do <i>Mycobacterium leprae</i>	28
1.2 Classificação Clínica da Hanseníase	30
1.3 Epidemiologia.....	31
1.4 Diagnóstico e tratamento	32
1.5 Imunologia da Hanseníase.....	33
1.6 Epidemiologia Genética	35
1.6.1 Susceptibilidade Genética.....	35
1.6.2 Desenhos de Estudos	37
1.6.3 Marcadores Genéticos	39
1.7 Região 6p21 e gene <i>TLR1</i>	40
Objetivos.....	43
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 Objetivos Específicos	44
Casuística e Métodos	45
3.1 Populações analisadas.....	46
3.2 População de Rondonópolis - MT	46
3.3 População do estado de São Paulo	47
3.4 Seleção de genes e marcadores.....	48
3.4.1 Investigação do gene <i>TLR1</i> - toll-like receptor 1	51
3.5 Extração de DNA.....	52
3.6 Genotipagem.....	53
3.7 Análise dos dados	54
Resultados.....	55
4.1 Polimorfismos do gene <i>AIF1</i> - <i>allograft inflammatory factor 1</i>	56
4.2 Polimorfismos do gene <i>BAT5</i> - <i>HLA-B transcript associated 5</i>	57
4.3 Polimorfismos do gene <i>CFB</i> - <i>complement factor B</i>	57
4.4 Polimorfismos do gene <i>DAXX</i> - <i>death-domain associated protein</i>	58
4.5 Polimorfismos do gene <i>HLA-DPA1</i> - <i>major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1</i>	59

4.6 Polimorfismos do gene <i>HLA-DPB1</i> - <i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	59
4.7 Polimorfismos do gene <i>MSH5</i> - <i>mutS homolog 5</i>	60
4.8 Polimorfismos do gene <i>TAPBP</i> - <i>TAP binding protein (tapasin)</i>	61
4.9 Polimorfismos do gene <i>TAP1</i> - <i>transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B</i>	62
4.10 Polimorfismos de <i>C6orf47</i> - <i>chromosome 6 open reading frame 47</i>	62
4.11 Polimorfismos do gene <i>TNFRSF21</i> - <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i>	63
4.12 Polimorfismos do gene <i>LTA</i> - <i>lymphotoxin alpha</i>	64
4.13 Polimorfismos do gene <i>TLR1</i> - <i>toll-like receptor 1</i>	65
4.14 Análise de desequilíbrio de ligação	67
Discussão	69
Conclusões.....	78
Referências Bibliográficas.....	81
Anexo 1	87
Anexo 2	100

- Figura 1** Classificação clínica da hanseníase demonstrando os aspectos imunológicos, baciloscopia e o perfil espectral da doença, baseado na classificação de Ridley e Jopling (1966). Adaptado de Britton and Lockwood, 2004..... 30
- Figura 2** Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase, segundo a participação de conjuntos diferentes de genes no controle das duas etapas da patogênese da doença. Fonte: Prevedello & Mira, An. Bras. Dermatol., 2007. 37
- Figura 3** Mapa de desequilíbrio de ligação com valores de r^2 obtidos a partir do software Haploview para os SNPs com dados significantes da região cromossômica 6p21. 68
- Figura 4** Mapa de desequilíbrio de ligação com valores de r^2 obtidos a partir do software Haploview para os dois SNPs do gene TLR1. 68

Tabela 1	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2259571 no gene <i>AIFI</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	56
Tabela 2	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs707917 no gene <i>BAT5</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	57
Tabela 3	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs4151657 no gene <i>CFB</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	58
Tabela 4	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2239839 no gene <i>DAXX</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	58
Tabela 5	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs9277341 no gene <i>HLA-DPA1</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	59
Tabela 6	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs1431402 no gene <i>HLA-DPBI</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	60
Tabela 7	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs707939 no gene <i>MSH5</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	61
Tabela 8	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2282851 no gene <i>TAPBP</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.....	61

Tabela 9	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs20711538 no gene <i>TAPI</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.	62
Tabela 10	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs7029 da sequência de leitura aberta <i>C6orf47</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.	63
Tabela 11	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs6458555 no gene <i>TNFRSF21</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.	63
Tabela 12	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2239704 no gene <i>LTA</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.	65
Tabela 13	Frequência de alelos, genótipos e carreador dos marcadores rs4833095 e rs5743618 no gene <i>TLR1</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção.	66
Tabela 14	Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs4833095 no gene <i>TLR1</i> nos grupos controle e pacientes e dados de OR e <i>p-valor</i> da análise comparativa destas frequências sem e com correção obtidos da análise da população de Rondonópolis.	66

Lista de abreviaturas e siglas

µl	Microlitro
µM	Micromolar
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
DD	Dimorfo-dimorfo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT	Dimorfo-tuberculóide
DV	Dimorfo-virchowiano
ENH	Eritema nodoso hansênico
EWH	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
GWA	<i>Genome-Wide Association</i>
HI	hanseníase Indeterminada
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Complexo principal de Histocompatibilidade)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LAM	Lipoarabinomanana
LD	Desequilíbrio de ligação
LTA	Gene da Linfotoxina-alfa
LT-α	Linfotoxina-alfa
Mb	Mega base
MB	Multibacilar
ml	Mililitro
ng	Nanôgrama
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetro
nM	NanoMolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos
PB	Paucibacilar
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PQT	Poliquimioterapia
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RR	Reação reversa
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de base única)
TDT	Teste de desequilíbrio de transmissão
Th	T helper
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Tuberculóide

Lista de abreviaturas e siglas

VV	Virchowiano
WHO	do ingles “World Health Organization”

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, que acomete pele e sistema nervoso periférico e tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um patógeno exclusivamente intracelular, que tem predileção por macrófagos e pelas células de Schwann. É um traço complexo e fatores genéticos do hospedeiro têm sido repetidamente implicados com o risco para a doença. A região cromossômica 6p21 vem sendo sistematicamente envolvida com a hanseníase, não só pelos genes do HLA de classe II, como também pelos estudos envolvendo marcadores em genes como o *TNF* e a *LTA*. O gene *TLR1* também é um importante candidato e polimorfismos deste já têm sido associados com hanseníase *per se* e com reação hansênica. O objetivo desta pesquisa foi conduzir estudo de associação de base populacional do tipo caso-controle em hanseníase testando marcadores do tipo *tag* SNPs em genes candidatos da região cromossômica candidata 6p21 e do gene *TLR1*. Oitenta e nove marcadores do tipo *tag* SNPs, localizados em trinta e seis genes foram genotipados. O presente trabalho envolveu 1718 indivíduos, 981 casos e 737 controles, provenientes de dois estados brasileiros: Mato Grosso e São Paulo. As genotipagens da população de Rondonópolis, MT foram realizadas em plataforma de médio rendimento (VeraCode GoldenGate Genotyping Assay – Illumina) e as genotipagens da população de São Paulo foram feitas usando discriminação alélica baseada na tecnologia TaqMan (Applied Biosystems). Para as análises estatísticas foi empregado modelo de regressão logística, com correção para as co-variáveis etnia e sexo, usando o software R, para Windows. Treze genes localizados na região 6p21 tiveram marcadores associados com hanseníase *per se*. O alelo S do polimorfismo N248S do gene *TLR1* também foi associado com susceptibilidade para hanseníase *per se*. Estes dados ressaltam o papel destes genes na susceptibilidade genética para a hanseníase e sugerem a necessidade de estudos de replicação e funcionais para melhor explicar o envolvimento destes com a doença.

Palavras-chaves: hanseníase, *Mycobacterium leprae*, polimorfismo genético de base única, estudo de associação.

Abstract

Leprosy is an chronic infectious disease that attacks skin and peripheral nervous system. The causative agent is *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular pathogen that infects macrophage and Schwann cells. It is a complex trait and host genetic factors have been extensively implicated in leprosy susceptibility. The chromosomal region 6p21 has been involved with leprosy susceptibility due to HLA class II, and *TNF* and *LTA* genes, as well. The *TLR1* gene is also an important candidate gene and polymorphisms at this *locus* have been associated to leprosy *per se* and leprosy reactions. This research is a population-based association study in leprosy which tested tag SNPs located at candidate genes in chromosomal region 6p21 and in *TLR1* gene. Eighty-nine markers distributed in thirty-six genes were genotyped. The present work enrolled 1,718 individuals, 981 cases and 737 controls from Mato Grosso and São Paulo States, Brazil. The genotypes for Rondonópolis population were obtained using by medium-scale genotyping platform (VeraCode GoldenGate Genotyping Assay – Illumina), while to São Paulo samples the genotyping were done by allelic discrimination based on TaqMan technology (Applied Biosystems). Statistical analysis were performed by logistic regression models adjusted for the covariates sex and ethnicity, using R software. Thirteen genes located at 6p21 region presented markers associated to leprosy *per se*. The S allele for N248S polymorphism at *TLR1* gene was also associated to leprosy susceptibility. These data show the role of these genes in genetic host resistance and susceptibility to leprosy and suggest the necessity of replication and functional studies in order to better explain their involvement with the disease.

Keywords: leprosy, *Mycobacterium leprae*, single nucleotide polymorphism, association study.

A hanseníase é considerada uma das doenças mais antigas com relatos na literatura, sendo um destes acerca de 1.500 a.C. na Índia. Por volta de 500 a.C. há também referências indicando que a disseminação da doença na Ásia ocorreu devido à passagem do exército persa por aquela região. Na Europa, a doença chegou com o exército de Alexandre o Grande, quando retornaram ao continente, após passagem da campanha realizada na Índia (300 a.C.) pela conquista do mundo então conhecido.¹

A hanseníase chegou às Américas por volta do século XVI com os colonizadores europeus. Mais especificamente na América do Sul a doença teria sido trazida pelos colonos portugueses e espanhóis. Hoje na maior parte do continente sul-americano há casos de hanseníase, com exceção do Chile, sendo o Brasil o segundo país em número de casos no mundo.¹

No Brasil, documentos datados do fim do século XVII, foram os primeiros achados que atestavam a existência da doença, tanto que em 1696 o governador Artur de Sá e Menezes procurava auxiliar na cidade do Rio de Janeiro os “miseros leprosos”, que já se apresentavam em um número crescente. Na década de 30 o modelo isolacionista, isto é, internação compulsória de todos os pacientes de hanseníase, já utilizado em outros países endêmicos, foi adotada também no Brasil. Esta medida pretendia eliminar a hanseníase, uma doença para a qual ainda não havia tratamento, afastando os doentes da comunidade, internando-os em um dos Asilos-Colônias como o existente no estado de São Paulo. Medida esta que não surtiu efeito e, após atestar a sua ineficiência, foi recomendado o fim do isolamento compulsório, adotando medida de isolamento apenas nos casos em que o paciente necessita de atendimento médico-social ou de conveniência profilática.²

Ainda hoje a hanseníase continua sendo uma doença estigmatizante, na qual os indivíduos continuam sofrendo preconceitos sociais, o que pode ser um indício da dificuldade da busca de auxílio médico para a obtenção de diagnóstico e tratamento, mantendo assim um elevado índice epidemiológico da doença no país.

1.1 Características do *Mycobacterium leprae*

Pode-se definir a hanseníase como doença infecciosa crônica, que acomete pele e sistema nervoso periférico e tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um patógeno exclusivamente intracelular, que tem predileção por macrófagos, onde pode ser observado formando aglomerados ou globias, e pelas células de Schwann.³ O homem é reconhecido como a única fonte de infecção, embora tenham sido identificados animais naturalmente infectados como o tatu, o macaco mangabeí e o chimpanzé.¹

O *M. leprae* foi identificado inicialmente por Gerard Henrik Armauer Hansen, em 1873, em biopsias de lesões de pacientes, sendo descrito como o primeiro agente patológico associado a uma doença humana.⁴

No que se refere às características morfológicas o *M. leprae*, ou bacilo de Hansen, é um bastonete ligeiramente encurvado, de 1 a 8 µm de comprimento por 0,3 µm de diâmetro. Apresenta reprodução do tipo divisão binária e é um bacilo gram-positivo álcool-ácido resistente (BAAR) devido a sua capacidade de se corar de vermelho pela fucsina e não se descorar após a lavagem com solução álcool-ácida.⁵

O envoltório celular do *M. leprae* possui cerca de 20nm de espessura e apresenta características semelhantes à de outras bactérias, mas com algumas pequenas peculiaridades, entre elas, no peptídeoglicano a L-alanina é substituída pela glicina, e a forma com que os ácidos micólicos estão associados à parede celular é distinta da observada em outras micobactérias. Outro componente importante na parede desta bactéria é a lipoarabinomanana (LAM), que proporciona ao bacilo uma proteção contra os metabólitos tóxicos derivados de oxigênio pelos macrófagos.⁶

A maior dificuldade para o estudo sobre o bacilo reside no fato de este não ser cultivável *in vitro*, ficando restrito aos experimentos com modelos animais. O primeiro pesquisador a obter algum sucesso na inoculação experimental do bacilo foi Shepard, em 1960, em coxim plantar de camundongos com base na hipótese de que o bacilo iria crescer em locais do corpo em que a temperatura fosse consideravelmente mais baixa.

Em 2001 foi publicado o sequenciamento completo do genoma do *M. leprae*, demonstrando que o bacilo da hanseníase possui aproximadamente 3,27 Mb, e que ele

teve uma redução na variabilidade genética, comparado ao *M. tuberculosis* que possui aproximadamente 4,41 Mb, apresentando ainda um aumento notável do número de pseudogenes no seu genoma, sendo esta a mais provável justificativa para o seu desenvolvimento lento e a incapacidade do cultivo *in-vitro*.⁷

Mais recentemente, um grupo de pesquisadores veio apresentar que há diferenças entre sete cepas oriundas de diferentes partes do planeta, utilizando para isso polimorfismos de base única (SNPs) selecionados a partir de uma cepa Brasileira (Br4923), sendo esta escolhida devido ao isolamento geográfico relativo do país e pelo fato do Brasil ser o segundo em número de casos. A análise encontrou cinco SNPs, sendo que um localiza-se em uma região não-codificante e quatro inseridos em pseudogenes. Quando foram feitas as análises de sete cepas distintas observou-se que o DNA do *M. leprae* é excepcionalmente bem conservado e que este bacilo é altamente clonal.⁸

Posteriormente, analisando três SNPs informativos, encontraram-se quatro combinações diferentes, demonstrando que existe uma correlação entre a origem geográfica do paciente e o perfil genético da cepa. A partir daí foi possível obter informações plausíveis quanto à rota de disseminação da doença pelo mundo, demonstrando a provável origem no continente africano e uma possível disseminação através do comércio de escravos, os quais eram levados para outros continentes. Tudo indica que na maior parte do continente americano, a doença foi introduzida por colonizadores e imigrantes do velho mundo, entre os séculos XVIII e XIX.⁸

Em estudo mais recente a estirpe de Tamil Nadu, da Índia e a Br4923 do Brasil foram novamente sequenciadas e comparadas revelando um baixo nível de diversidade. Para fins filogeográficos foram feitas novas análises envolvendo 78 SNPs informativos, permitindo classificar o *M. leprae* em 16 subtipos, para os quais foi possível fazer uma correlação entre distribuição geográfica, padrões de migração para os continentes e a rota de comércio. A partir destes dados foi possível o aprofundamento da compreensão da disseminação da hanseníase pelo mundo e a confirmação da associação entre o tipo de SNP e a origem geográfica das cepas.⁹

1.2 Classificação Clínica da Hanseníase

A classificação da hanseníase proposta e aceita no Congresso Internacional de Madri, em 1953, dividiu a hanseníase em dois grupos polares, o tuberculóide (T) e o virchowiano (V), nos quais a doença era estável e mutuamente incompatível, e em dois grupos instáveis, o indeterminado (I) e o dimorfo (D).¹⁰

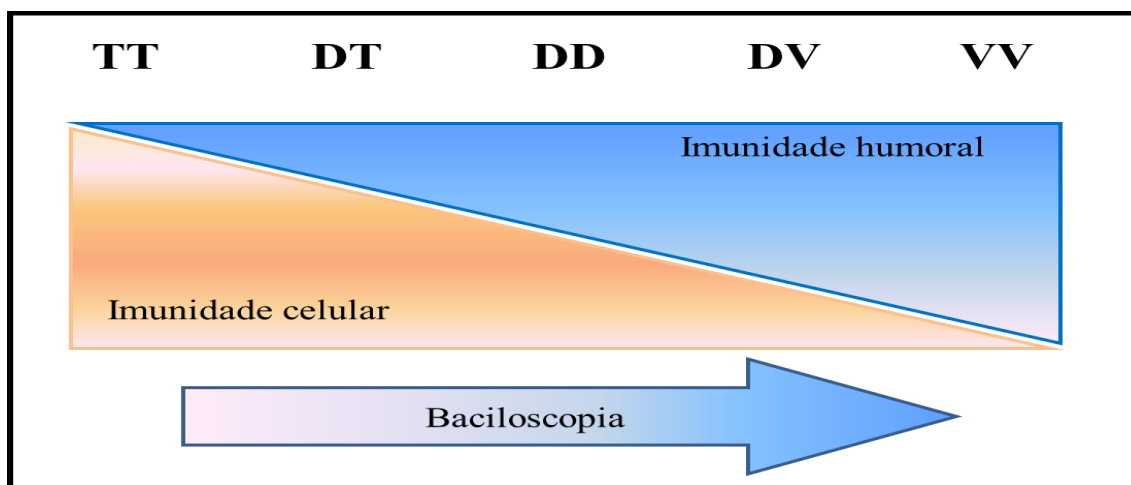


Figura 1: Classificação clínica da hanseníase demonstrando os aspectos imunológicos, baciloscopia e o perfil espectral da doença, baseado na classificação de Ridley e Jopling (1966): tuberculóide polar (TT), dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo- virchowiano (DV) e virchowiano polar (VV). Adaptado de Britton and Lockwood, 2004.

A classificação proposta por Ridley e Jopling, em 1966, é a mais utilizada e aceita até hoje, pois supre as necessidades dos pesquisadores. Ela é espectral e baseada em critérios imunológicos e histológicos apresentando duas formas polares, TT e VV, no centro estão presentes as formas dimorfas DT, DD e DV e há ainda a hanseníase indeterminada, HI, considerada a fase inicial da doença. (Figura 1).

Na forma polar TT a doença se manifesta com poucas ou apenas uma lesão, presença de lesão em nervos periféricos, índice baciloscópico negativo, e reação ao antígeno de Mitsuda positiva. Nesta forma o indivíduo apresenta uma resposta imunológica representada pelas células T auxiliares do tipo Th1, que por se tratar da resposta celular, melhor controla a infecção.

No extremo oposto do espectro encontra-se a forma polar VV, onde o indivíduo apresenta um número maior de lesões com distribuição simetricamente bilateral, tem índice baciloscópico com alta positividade e reação de Mitsuda negativa. Neste caso, a

resposta imunológica produzida pelo indivíduo é uma resposta imune humoral (Th2), que apresenta um baixo poder de combate ao bacilo.

No centro do espectro estão às formas intermediárias denominadas dimorfas, onde os indivíduos apresentam fenótipos intermediários entre o tuberculóide e o virchowiano. O paciente dimorfo pode ser classificado como DD, DT ou DV de acordo com a proximidade de suas características com as formas polares. Este recebe a classificação DT quando apresenta lesões que se assemelham à forma tuberculóide, porém em número mais elevado, com reação de Mitsuda positiva ou negativa e índice baciloscópico positivo. Por outro lado, o paciente que apresenta características que se assemelham ao polo virchowiano é classificado como DV, com lesões múltiplas, não apresentando em sua distribuição simetria bilateral, reação de Mitsuda negativa e alto índice baciloscópico. Aqueles pacientes classificados como DD são os mais instáveis dentro do espectro, tanto na imunidade quanto nas lesões, as quais podem ser numerosas, com distribuição simétrica e de diversos tipos e tamanhos com bordas definidas ou não.

A indeterminada (HI), considerada a fase inicial da doença, apresenta-se como sendo puramente macular, na qual o indivíduo irá apresentar algumas manchas hipocrômicas. Ocorre o comprometimento sensitivo na lesão, sendo utilizado como principal método de diagnóstico a biópsia de nervos periféricos. Nesta fase o paciente apresenta índice baciloscópico negativo.⁴

Para auxiliar no tratamento poliquimioterápico (PQT) da hanseníase, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs em 1982, uma classificação que divide os pacientes em dois grupos distintos com base no número de lesões. O paciente será classificado como paucibacilar (PB) quando tiver até cinco lesões e multibacilar (MB) os que apresentarem mais de cinco lesões de pele.¹¹

1.3 Epidemiologia

A hanseníase ainda é um problema de saúde pública em vários países, principalmente naqueles onde o nível de desenvolvimento sócio-econômico é baixo. O número de casos novos globais foi de 228.474 no ano de 2010, segundo relatórios da WHO.¹² O Brasil é o segundo país em número de casos novos, com 34.894 casos

novos/ano, ficando apenas atrás da Índia, país que apresenta uma incidência de 126.800 casos novos/ano.¹²

Apesar de inúmeros esforços a fim de eliminar a doença, a taxa de detecção de novos casos permanece estável em países endêmicos como o Brasil e a Índia.¹³ O Brasil encontra-se atualmente com prevalência de 1,56 casos/10.000 habitantes, sendo que a OMS preconiza como meta de eliminação da doença uma prevalência inferior a 1/10.000 habitantes.¹⁴

Com a introdução da PQT, a OMS previu a possibilidade de eliminar a doença em todo mundo, mas o número de casos novos ainda é preocupante e o número de casos em indivíduos menores de 15 anos é alto, mostrando manutenção da sua disseminação.

Como já descrito, a hanseníase, assim como qualquer outra doença infecciosa, possui características de caráter complexo, ou seja, ela é influenciada por diversos fatores, relacionados ao hospedeiro, ao patógeno e ao ambiente, que devem contribuir para a manutenção dos índices epidemiológicos acima discutidos.

1.4 Diagnóstico e tratamento

O principal método de diagnóstico da hanseníase ainda hoje é o exame clínico, pois nele encontram-se evidências iniciais de manifestação da doença. Neste exame investiga-se o comprometimento neurológico periférico e a presença de lesão cutânea. O médico pode ainda buscar alterações na sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, que possam nortear o tratamento.¹⁵

Como suporte ao exame clínico existem várias ferramentas de auxílio ao diagnóstico. Dentre estas, temos os exames microscópicos que fornecem evidências da presença do bacilo íntegro ou fragmentado. Estes são os exames de histopatologia, da biópsia de pele, a fim de identificar o padrão histológico de resposta do hospedeiro, o envolvimento dos nervos e a presença de bacilo e a baciloscopia para a detecção do bacilo em esfregaço de linfa. Estes testes são essenciais para a classificação da forma clínica da doença segundo Ridley e Jopling.¹⁶

Outra ferramenta que auxilia na classificação das formas clínicas é a reação cutânea de Mitsuda, que consiste de um teste prognóstico. Este avalia a capacidade de

resposta imune celular do indivíduo específica para o *M. leprae*, estando intimamente relacionada à progressão e a manifestação clínica da doença.¹⁷

Mais recentemente, surgiram as técnicas laboratoriais que empregam a reação da polimerase em cadeia (PCR) convencional e em tempo real para detecção de ácidos nucleicos do bacilo. Tais técnicas apresentam uma taxa de especificidade de 100% e de sensibilidade de 34% a 80% em pacientes paucibacilares e chegando a 90% em pacientes multibacilares. Os resultados obtidos por estas podem ser definidos como de alta sensibilidade na identificação do DNA do *M. leprae*, e podem utilizar diferentes amostras do paciente, como biópsias de pele e nervos e *swab* de mucosa nasal.¹⁸ Apesar do PCR ter se mostrado uma ótima ferramenta para o auxílio no diagnóstico da hanseníase, esta metodologia ainda é uma ferramenta de pesquisa e não é usada na rotina diagnóstica em larga escala, uma vez que requer equipamentos e técnicas especializadas, tem um custo relativamente alto e apresenta sensibilidade baixa para o diagnóstico de pacientes paucibacilares.

No que tange ao tratamento, desde 1984 o comitê de peritos da OMS recomendou como método eficaz para o combate à hanseníase a PQT, que foi padronizada oficialmente em 1995, com o início da distribuição gratuita pela OMS no mesmo ano. Este tratamento propõe a administração de rifampicina, clofazimina e dapsona em esquema que será indicado pelo médico de acordo com a classificação do paciente em PB ou MB.

Tendo como referência a classificação da OMS, o médico irá estipular a duração do tratamento. O paciente PB recebe dose mensal supervisionada de rifampicina e diária de dapsona por 6 meses. Ao paciente MB será administrada dose mensal supervisionada de rifampicina, 100mg de dapsona e 300mg de clofazimina, mais dose diária de dapsona e clofazimina, durante 12 meses. Estes esquemas interrompem a transmissão do bacilo pelo paciente logo após o início do tratamento, e leva a cura da doença.¹⁹

1.5 Imunologia da Hanseníase

As manifestações clínicas e histopatológicas da doença variam de acordo com a resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo. Por se tratar de um parasita intracelular obrigatório, a resposta imune eficaz contra este bacilo é a mediada por células, representada pela fagocitose dos bacilos pelos macrófagos, pela ocorrência do

processamento dos antígenos e a apresentação dos antígenos aos linfócitos T auxiliares (Th). A ocorrência de um desequilíbrio nesta interação ou a ineficiência desta resposta pode favorecer a multiplicação do bacilo, contribuindo para o estabelecimento da doença.²⁰

A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem envolve receptores presentes nas células denominados receptores de reconhecimento de padrões, ou PRRs (*pattern recognition receptors*), que possuem a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, ou PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), e desencadear uma resposta pró-inflamatória. Dentre estes receptores encontram-se os do tipo *toll-like* (TLRs), que são fundamentais para o reconhecimento de patógenos e estão presentes em células endoteliais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos B, além de outros grupos celulares que estão relacionados à resposta imune inata.²¹

Um estudo demonstrou que o homodímero TLR2 e o heterodímero TLR2-TLR1 foram os únicos capazes de promover a ativação celular na presença do *M. leprae*, mais especificamente pela ligação à lipoproteínas descritas a partir da exploração completa do genoma deste patógeno.²² Estes resultados demonstram a importância do TLR1 e 2 no reconhecimento do *M. leprae* e na ativação da resposta protetora ao bacilo. Os receptores TLRs promovem também a diferenciação de monócitos em macrófagos ou células dendríticas, sugerindo assim a importância destes na interação entre a imunidade inata e a adaptativa.²³

Os TLRs funcionam como sensores primários do sistema imune inato, cuja ativação desencadeia a imunidade adaptativa.²⁴ Quando ocorre a polarização da resposta para células do tipo Th1, esta resposta imune celular será eficaz contra o *M. leprae*. Neste contexto, a síntese das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-12 e TNF são essenciais para o combate ao bacilo. A IL-2 tem como função ativar os receptores das células CD4+, estimulando a proliferação de linfócitos T ativados, os quais serão responsáveis pela permanência da produção de citocinas, e simultaneamente estimulando células *natural killers* (NK) responsáveis pela apoptose.¹⁸ A IL12, produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos, funcionam como uma ponte de ligação entre a resposta imune inata e a adquirida, sendo a principal citocina responsável pela indução da produção de IFN- γ por células Th1 e células NK. Já as citocinas IFN- γ e TNF irão apresentar função

pro-inflamatória agindo de maneira simultânea e cíclica. O IFN- γ terá o importante papel de agir sobre o macrófago, estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular, levando assim a produção de TNF e aumentando a ativação macrofágica.

Adversamente, a resposta Th2 irá estimular a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, que têm papel anti-inflamatório. A IL-4 e IL-10 são supressoras da atividade macrofágica. A IL-4 estimula os linfócitos B aumentando a produção de imunoglobulinas.²⁰

Assim, nota-se que a capacidade dos linfócitos T *helper* em desenvolver uma resposta imune celular ou humoral está relacionada ao padrão de citocinas secretadas, proporcionando o desenvolvimento de um padrão imunológico predominante Th1 em pacientes tuberculóides e Th2 em pacientes vichorwianos.²⁵

No decorrer da doença o paciente tratado, não tratado ou em tratamento, poderá ainda apresentar os chamados episódios reacionais, que se caracteriza por uma inflamação aguda que pode levar à comprometimento sistêmico, cutâneo e neurológico.

Os episódios reacionais podem ser classificados como Reação tipo 1 ou reação reversa (RR), que ocorre frequentemente em pacientes paucibacilares e parece estar associada a um aumento abrupto da resposta imune mediada por célula contra antígenos do *M. leprae* e/ou Reação tipo 2 ou reação de eritema nodoso hansênico (ENH), que ocorre em pacientes multibacilares (LL e BL), caracterizando uma reação inflamatória sistêmica, apresentando imunopatologia mais complexa. Pode ocorrer em pacientes não tratados, mas se apresenta em maior ocorrência nos pacientes sob tratamento e pode ser recorrente.^{26,27}

1.6 Epidemiologia Genética

1.6.1 Susceptibilidade Genética

Apesar do aprimoramento nas medidas terapêuticas e profiláticas, as doenças infecciosas ainda constituem a principal causa de morte na maior parte do mundo. Neste contexto, a ideia de que fatores genéticos humanos devam contribuir com a susceptibilidade às doenças infecciosas vem sendo estudado há muitos anos.²⁸

Até meados do século XIX a hanseníase era considerada por vários pesquisadores uma doença de caráter hereditário. Após a descoberta do *M. leprae* ou como também é conhecido bacilo de Hansen em 1873, por Gerhard Armauer Hansen, a doença começou a ser vista como puramente infecciosa. Atualmente ela é compreendida como uma doença complexa, na qual vários fatores influenciam, desde a infecção do indivíduo pelo bacilo até o desfecho clínico que este paciente irá apresentar.²⁹ Assim, deu-se início ao processo de investigação, identificação e mapeamento de determinantes genéticos, tanto do hospedeiro quanto do bacilo, que estão diretamente ligados e atuantes na doença, utilizando ferramentas que expliquem a associação entre genótipos e fenótipos.

Inúmeras pesquisas com diferentes abordagens a partir de então começaram a ser desenvolvidas e novos estudos começaram a surgir a fim de elucidar a susceptibilidade genética humana para a doença.²⁹

A existência de uma resistência natural à doença fortalece a ideia da participação de fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade à doença. Dados apontam que apenas 12%, isso é, uma pequena parcela da população infectada, desenvolve a hanseníase. Este porcentual aumenta à medida que outros fatores não genéticos como idade, sexo e etnia se somam ao efeito do genótipo.³⁰

Em uma doença infecciosa, é importante mencionar, que a exposição ao agente infeccioso é necessária, mas não suficiente para a ocorrência desta. Como já exposto, o curso da doença apresenta certa complexidade que inclui vários fatores além da genética do hospedeiro (Figura 2).

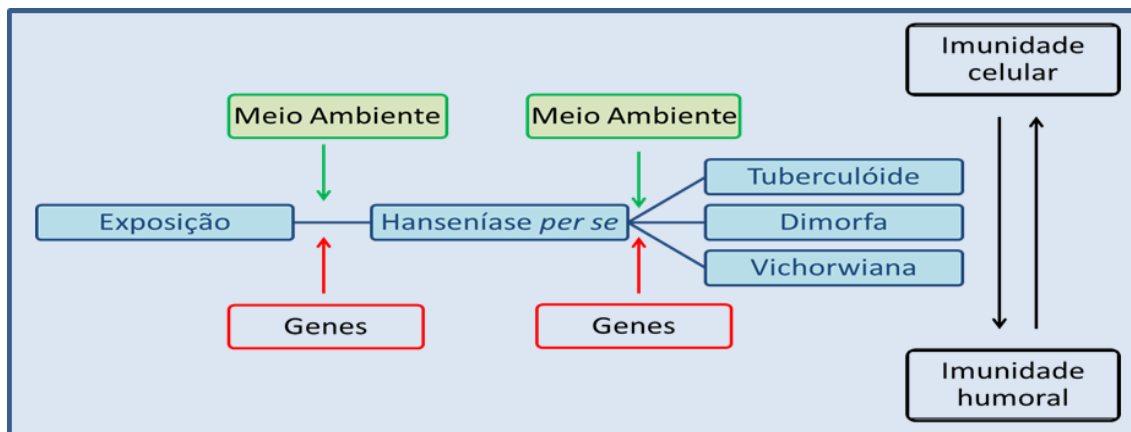


Figura 2: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase, segundo a participação de conjuntos diferentes de genes no controle das duas etapas da patogênese da doença – infecção per se e manifestação clínica. Fonte: Prevedello & Mira, An. Bras. Dermatol., 2007.

1.6.2 Desenhos de Estudos

Uma doença complexa não apresenta padrões de herança de doença mendeliana clássica, sendo o controle genético de caráter multigênico. Assim sendo, os estudos genéticos investigam a associação entre variantes genéticas e a doença, a fim de encontrar marcadores genéticos para esta.^{3,25}

Estudos de agregação familiar, estudos com gêmeos e estudos de adoção são métodos que apontam a importância do componente genético para o fenótipo. As análises de segregação complexa descrevem o modo de herança genética. Entretanto, estes métodos não apontam a exata localização e quais os genes envolvidos. Para esta elucidação são empregados os estudos moleculares, feitos por meio de análises de ligação e de associação.³

As primeiras investigações com o intuito de demonstrar o envolvimento da genética em hanseníase foram estudos com gêmeos conduzidos na população indiana. Estes demonstraram maior taxa de concordância em pares monozigóticos que em dizigóticos, indicando um forte componente genético.³¹

Os estudos de ligação têm por finalidade mapear regiões cromossômicas que alberguem *loci* relacionados à doença. O primeiro estudo de ligação conduzido para a hanseníase foi realizado na população da Índia, que detectou picos na região cromossômica 10p13. Esta região abriga o gene *MRC1* que codifica um receptor de manose, também um PRR, envolvido no reconhecimento do LAM e na internalização do *M. leprae*.³¹ Um estudo de associação conduzido com amostra familiar do Vietnam e

amostra caso-controle brasileira confirmou o envolvimento do gene *MRC1* na susceptibilidade a hanseníase *per se* e com a forma multibacilar.³²

Um segundo estudo de ligação foi realizado com a população vietnamita que mostrou picos de ligação na região 6q25 para a hanseníase.³³ O mapeamento fino desta região, com estudo de clonagem posicional, identificou variantes de susceptibilidade em um gene denominado *PARK2*, que codifica a parkina que está associada com a doença de Parkinson, e um gene co-regulado da parkina, o *PACRG*.³⁴

Outra estratégia de estudo que vem sendo amplamente empregada é o estudo de associação com base familiar. Este tem como ferramenta de análise o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), que determina o padrão de transmissão dos alelos dos pais heterozigotos para os filhos afetados. Os trios informativos neste caso são aqueles formados por um filho afetado e pais heterozigotos para o *locus* testado, tornando esta metodologia um pouco desvantajosa devido à dificuldade na formação destes trios. O TDT usa o teste de χ^2 de Mc Nemar (1947) para verificar a hipótese nula de que o alelo testado obedece ao padrão de transmissão de 50% pelo progenitor heterozigoto.³⁵

No estudo de associação de base populacional adota-se comumente o desenho caso-controle que se baseia na comparação das frequências alélicas de um dado marcador genético entre indivíduos com a doença e indivíduos controles. Este deve ser feito de maneira bastante criteriosa para que não sejam encontradas falsas associações. Como resultado esperado para este estudo, temos a provável diferença de frequência entre os grupos, sendo que o aumento no grupo de casos caracteriza associação com susceptibilidade, e, o contrário, irá caracterizar uma provável associação com resistência ao fenótipo. A medida de associação neste tipo de análise é dada através do valor da *odds ratio* (OR), que representa a razão entre as chances da ocorrência do desfecho de acordo com a exposição.³⁶

Quanto à estratégia de busca dentro do genoma, os estudos podem ter como alvo genes candidatos. Estes genes são selecionados por meio de três critérios: possível papel crítico na patogênese da doença, localização na região cromossômica previamente envolvida na doença ou combinação das duas (candidato funcional e posicional).³ Com o avanço na área da genômica e com a possibilidade de genotipagem em larga escala,

encontramos a estratégia denominada *GWAS*, do inglês “*Genome-Wide Association Study*”, que possibilita interrogar milhares de variações genéticas ao longo de todo genoma e apresenta potencial para a descoberta de novos genes e polimorfismos associados à doença, sem que haja o conhecimento prévio de sua função. Ou seja, estes seriam estudos geradores de hipóteses.

Os mais comumente envolvidos são os genes de citocinas e outros envolvidos na resposta imunológica frente ao agente causador da doença. A seguir, discutiremos sobre a região cromossômica 6p21 e sobre o gene *TLR1*.

1.6.3 Marcadores Genéticos

Na década de 1970, técnicas de sequenciamento, PCR e uso de enzimas de restrição geraram ferramentas laboratoriais poderosas para a investigação da variabilidade genética. No campo da epidemiologia genética, estudos com marcadores do tipo SNPs (polimorfismos de base única), passaram a ser comumente utilizados. Estas variações se sucedem aproximadamente uma vez a cada 1.350pb no genoma humano e apresentam-se com frequência de ocorrência maior do que 1% na população em geral. Acredita-se que os SNPs são a verdadeira fonte da variabilidade entre os seres humanos.²⁵

Os SNPs são caracterizados pela substituição de uma base nucleotídica por outra na sequência do DNA, e podem estar presentes tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras do genoma. Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição no aminoácido, estes são denominados não-sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. As variantes não-sinônimas têm sido relacionadas como diversas doenças, já que podem alterar a função, desestabilizar a estrutura e até reduzir a solubilidade da proteína codificada. Já as variantes sinônimas são aquelas em que a troca da base não acarreta alteração no aminoácido codificado. Apesar dos SNPs sinônimos não causarem alterações na sequência de aminoácidos, eles podem modificar a estrutura do mRNA e assim alterar a quantidade de proteína que será traduzida.

Quando presentes em introns os SNPs podem influenciar no *splicing* do mRNA. Apesar das regiões intrônicas não serem codificantes, os SNPs presentes nesta região

podem estar em desequilíbrio de ligação com outros em regiões codificantes, o que pode torna-los informativos para a associação com determinadas doenças.³⁷

Com ampla distribuição no genoma, os SNPs são facilmente identificados podendo constituir marcadores muito úteis para estudos de associação. Isto pode ser atestado pelo crescente número de SNPs que vem sendo associados com diversas doenças.

1.7 Região 6p21 e gene *TLR1*

A região 6p21 vem sendo sistematicamente envolvida com hanseníase, não só pela associação com os genes do HLA de classe II, como também pelos estudos envolvendo SNPs em genes do *TNF* e *LTA*, associados com a doença em várias populações.

O complexo *HLA* (antígeno leucocitário humano) é constituído por um grupo de genes que estão no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3, abrangendo 4 milhões de pares de bases. Estes genes são altamente polimórficos resultando em diversas combinações haplotípicas. O sistema HLA está subdividido em três regiões, classe I, classe II e classe III, levando em conta a estrutura e a função dos genes nelas contidos.

Para o HLA de classe I já foi demonstrado que o alelo A11 encontra-se associado com hanseníase.³⁸ Recentemente, um estudo sugeriu a associação de *tag* SNPs do gene HLA-C na susceptibilidade à hanseníase na população vietnamita. Este gene já foi associado com doenças inflamatórias e infecciosas.³⁹ Na hanseníase este gene tem um efeito importante na resposta imune inata do hospedeiro frente à infecção pelo *M. leprae*.

Os resultados descritos para o HLA de classe II indicam uma associação entre os alelos DR2, DRB1*15 e DRB1*10 com hanseníase *per se* e formas clínicas.⁴⁰ Também uma associação de proteção foi descrita para o alelo DRB1*04 em diversas populações, incluindo a brasileira.^{40,33,41,42,43}

Como já citado anteriormente, estudos têm sugerido que SNPs em promotores e região codificante nos genes da LT- α (linfotoxina-alfa) e do TNF (fator de necrose

tumoral) localizados na região do *HLA* de classe III, vem sendo associados com hanseníase em diversas populações, incluindo a brasileira.^{33,44}

A *LT- α* apresenta uma ação pró-inflamatória e, a baixa produção desta proporciona uma deficiência frente à infecção pela micobactéria. Estudos realizados com as populações vietnamita, indiana e brasileira mostraram uma associação entre o gene *LTA* e hanseníase. Entre os marcadores estudados foi identificada uma associação do *LTA+80* com susceptibilidade para os indivíduos com diagnóstico abaixo dos 25 anos de idade na população indiana e vietnamita.⁴⁵ Na população brasileira o efeito não pôde ser observado devido à manifestação tardia, em torno de 36 anos. Para os autores estes dados confirmam a associação deste gene com a doença, que atua de maneira altamente dependente da idade.⁴⁵

O gene *TNF* codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional que é secretada principalmente pelos macrófagos. Esta citocina participa de vários processos biológicos incluindo a proliferação e diferenciação celular, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação.³ Diversos estudos de associação vêm evidenciando o envolvimento deste gene candidato com a doença em populações distintas, sendo que o polimorfismo *-308G*→*A*, na região promotora do gene, sendo um importante alvo dos estudos de associação.

Um estudo realizado com a população indiana indicou uma associação significativa entre o alelo *TNF-308A* com a forma clínica multibacilar.⁴⁶ O exato sentido do efeito ainda é controverso, uma vez que estudos realizados na população brasileira mostrou uma associação de proteção à hanseníase para o mesmo alelo.⁴⁷ Em estudo de meta-análise, envolvendo diferentes estudos brasileiros, a proteção pôde ser claramente observada de forma específica para a população brasileira. No mesmo sentido, estudos funcionais mostraram que portadores do alelo *-308A* produzem níveis mais elevados de *TNF*. Estes resultados fortalecem a associação de proteção para a hanseníase encontrada para este alelo, sugerindo-o como um marcador de resistência à doença na nossa população.⁴⁸

Os receptores *TLRs* formam uma família de proteínas que se localizam em membranas das células de defesa e que tem a capacidade de reconhecer *PAMPs*. São responsáveis pela indução de produção de citocinas pró-inflamatórias essenciais para a

ativação da resposta imune inata. Embora estes receptores desempenhem um papel primordial para a defesa do hospedeiro, deve-se manter um equilíbrio destes evitando assim uma resposta exacerbada. Além disso, a ativação da resposta imune inata é um passo crítico para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa antígeno específica.^{49,50} Assim, estes receptores têm um papel importante porque constituem a primeira linha de interação entre o *M. leprae* e as células do hospedeiro. Os polimorfismos dos genes *TLRs* têm sido associados tanto com hanseníase *per se* quanto com as reações hansênicas.⁵¹ O alelo S do polimorfismo I602S está associado com proteção para a doença e com a diminuição na expressão do *TLR1* na superfície celular.⁵² No entanto, o mesmo marcador I602S não apresentou associação com a doença em um estudo realizado na população de Bangladesh.⁵³ Um trabalho mais recente mostra que o SNP I602S está fortemente associado ao aumento da susceptibilidade a hanseníase.⁵¹

Um estudo envolvendo a população de Bangladesh mostrou associação do marcador N248S com reação reversa.⁵³

Estudos de associação vêm identificando marcadores de susceptibilidade e/ou proteção para a hanseníase. Estes estudos requerem não somente uma evidência de associação, mas também a confirmação dos resultados encontrados em amostras distintas, a fim de evitar resultados controversos ou falsa associação, devido a fatores como estratificação populacional, tamanho reduzido da amostra e seleção inadequada dos controles. Assim, a replicação dos achados positivos em outras populações torna-se essencial para a confirmação dos resultados de associação com a doença.

Neste cenário, este trabalho objetiva identificar marcadores genéticos para a hanseníase na população brasileira na região cromossômica candidata 6p21 e no gene *TLR1*, que poderão ter valor preditivo para o risco de desenvolvimento da doença.

2.1 Objetivo Geral

Conduzir estudo de associação de base populacional do tipo caso-controle em hanseníase testando marcadores do tipo *tag* SNPs em genes candidatos da região cromossômica candidata 6p21 e do gene *TLR1*.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar genes responsáveis pela ligação da região cromossômica 6p21 com a hanseníase investigando 87 marcadores localizados em 37 genes candidatos.

Identificar marcadores moleculares do tipo SNPs representativos da associação da região cromossômica 6p21 com a hanseníase.

Conduzir estudo de associação genética em hanseníase *per se* para os polimorfismos N248S e I602S no gene *TLR1*.

Testar os achados positivos do gene *TLR1* encontrados na população de Rondonópolis na população de São Paulo.

3.1 Populações analisadas

O presente trabalho é um estudo caso-controle que envolveu 1.718 indivíduos, 981 casos e 737 controles, provenientes de duas regiões brasileiras: município de Rondonópolis, MT e estado de São Paulo. A amostra de Rondonópolis foi composta por 411 pacientes e 357 controles, e a de São Paulo por 570 pacientes e 380 controles.

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru – SP, local onde está sendo realizado o estudo (CEP 172/09). Cópia assinada do TCLE foi obtida de todos os participantes deste estudo.

3.2 População de Rondonópolis - MT

Esta amostra foi constituída a partir de um estudo epidemiológico multidisciplinar conduzido no município de Rondonópolis – MT, que é uma região hiper-endêmica para a doença. Esta população está composta por 411 casos e 357 controles todos provenientes do município de Rondonópolis.

Segundo dados do Sinan/SVS-MS (2011), a prevalência do município no ano de 2011 foi de 2.364 casos novos, com um coeficiente de prevalência de 7,52 casos para cada 10.000 habitantes.¹²

Os casos arrolados no estudo foram provenientes do atendimento ambulatorial do programa de saúde da família (PSFs) deste município. A classificação das formas clínicas de hanseníase seguiu os critérios de Ridley e Jopling (1996) e da OMS.

O grupo controle foi proveniente do mesmo município. Estes indivíduos foram selecionados em sistemas de mutirão para a detecção da doença executados em locais públicos do município como faculdades, corporação de bombeiros, presídio, exército e em postos criados para participação voluntária. Um questionário foi previamente aplicado e a negativa para a história pessoal da doença, bem como para o exame clínico realizado nesta ocasião, foram critérios de inclusão. Estes foram selecionados ainda de forma a respeitar as características do grupo caso quanto às variáveis, etnia, sexo e idade.

As características desta amostra caso-controle encontram-se descritas no quadro abaixo.

Quadro 1: Características dos grupos de pacientes e controles selecionados no município de Rondonópolis – MT.

Característica	Categorias	Casos (n=411)	Controles (n=357)
Idade (média±DP)		42,02±16,14	41,98±13,89
Etnia	Caucasóide	147 (35,8%)	117 (32,8%)
	Pardo	247 (60,1%)	226 (63,3%)
	Negro	17 (4,1%)	14 (3,9%)
Sexo	Masculino	250 (60,8%)	217 (60,8%)
	Feminino	161 (39,2%)	140 (39,2%)
Forma clínica (OMS)	Paucibacilar	96 (23,4%)	
	Multibacilar	310 (75,4%)	
	Sem Classificação	5 (1,2%)	
Forma clínica (segundo Ridley & Jopling, 1966)	MHV	21 (5,1%)	
	MHDV	63 (15,3%)	
	MHDD	79 (19,2%)	
	MHDT	159 (38,7%)	
	MHT	60 (14,6%)	
	MHI	27 (6,6%)	
	Sem Classificação	02 (0,5%)	

DP – desvio padrão; MHV – hanseníase virchowiana; MHDV - hanseníase dimorfa virchowiana; MHDD – hanseníase dimorfa dimorfa; MHDT – hanseníase dimorfa tuberculóide; MHT – hanseníase tuberculóide; MHI – hanseníase indeterminada.

3.3 População do estado de São Paulo

A segunda população foi consistida de uma amostra caso-controle proveniente do estado de São Paulo.

O grupo de pacientes foi proveniente do atendimento ambulatorial de hanseníase do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru-SP). A classificação da forma clínica foi a mesma utilizada na população de Rondonópolis - MT.

O grupo controle foi constituído de indivíduos candidatos à doação de sangue do Hemonúcleo de Bauru.

Esta população está composta de 950 indivíduos, sendo 570 casos e 380 controles. As características desta população encontram-se descritas no quadro abaixo.

Quadro 2: Características dos grupos de pacientes e controles selecionados no estado de São Paulo.

Característica	Categorias	Casos (n=570)	Controles (n=380)
Idade (média±DP)		42 ± 18,01	36 ± 10,81
Etnia	Caucasoide	456 (80%)	238 (62,6%)
	Pardo	55 (9,6%)	104 (27,4%)
	Negro	32 (5,6%)	24 (6,3%)
	Amarelo	1 (0,2%)	
	Sem Classificação	26 (4,6%)	14 (3,7%)
Sexo	Masculino	385 (67,5%)	253 (66,6%)
	Feminino	185 (32,5%)	127 (33,4%)
Forma clínica (OMS)	Paucibacilar	108 (18,9%)	
	Multibacilar	434 (76,1%)	
	Sem Classificação	28 (4,9%)	
Forma clínica (segundo Ridley & Jopling, 1966)	MHV	112 (19,6%)	
	MHDV	147 (25,8%)	
	MHDD	142 (24,9%)	
	MHDT	59 (10,3%)	
	MHT	72 (12,6%)	
	HNP	1 (0,2%)	
	MHI	3 (0,5%)	
	Sem Classificação	34 (6,0%)	

DP – desvio padrão; MHV – hanseníase virchowiana; MHDV - hanseníase dimorfa virchowiana; MHDD – hanseníase dimorfa dimorfa; MHDT – hanseníase dimorfa tuberculóide; MHT – hanseníase tuberculóide; HNP – hanseníase neural pura; MHI – hanseníase indeterminada.

3.4 Seleção de genes e marcadores

A seleção dos genes candidatos da região 6p21 foi feita a partir do banco de dados de acesso público *NCBI Map Viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)⁵⁴ em toda a banda cromossômica candidata, de acordo com a função da proteína codificada. Em seguida, foi feita uma busca no *International HapMap Project*

(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>)⁵⁵ dos SNPs etiquetas destes genes utilizando os seguintes parâmetros: população de ancestralidade Yoruba (africanos), desequilíbrio de ligação entre os marcadores de r^2 maior ou igual a 0,8, método de pareamento “*tagger multimarker*” e frequência mínima do alelo menor de 0,1. A partir desta estratégia de busca foram retornados 87 marcadores que foram interrogados neste estudo na amostra caso-controle de Rondonópolis. Os genes e marcadores selecionados estão descritos no quadro 3.

Quadro 3: Genes candidatos selecionados e *tag* SNPs analisados na região candidata 6p21.

Genes	<i>tag</i> SNPS
<i>ABCF1</i> <i>ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1</i>	rs3130244 rs3132610
<i>AIF1</i> <i>allograft inflammatory factor 1</i>	rs2259571 rs2269475
<i>APOBEC2</i> <i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2</i>	rs1014737 rs2057002 rs2076472
<i>BAK1</i> <i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	rs11757379 rs210137 rs210139
<i>BAT5</i> <i>HLA-B transcript associated 5</i>	rs1266071 rs707917
<i>C2</i> <i>complement component 2</i>	rs547154
<i>C6orf47</i> <i>chromosome 6 open reading frame 47</i>	rs7029
<i>CFB</i> <i>complement factor B</i>	rs12614 rs2072633 rs4151657 rs537160
<i>CNPY3</i> <i>canopy 3 homolog</i>	rs2234185 rs4714634 rs9471969
<i>DAXX</i> <i>death-domain associated protein</i>	rs2239839 rs3130018
<i>DEFB110</i> <i>defensin, beta 110 locus</i>	rs12208740
<i>DEFB112</i> <i>defensin, beta 112</i>	rs628337 rs7739604
<i>DEFB114</i> <i>defensin, beta 114</i>	rs17736782 rs9349509

<i>FLOT-1</i> <i>flotillin 1</i>	rs1059612 rs2844704 rs3094127
<i>HLADPA1</i> <i>major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1</i>	rs1367728 rs2301220 rs2301226 rs9277341 rs9277342
<i>HLADPB1</i> <i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	rs1431402 rs2071353 rs3135021 rs9277469
<i>IER3</i> <i>immediate early response 3</i>	rs8512
<i>LST1</i> <i>leukocyte specific transcript 1</i>	rs2256974
<i>LTA</i> <i>lymphotoxin alpha</i>	rs2229094 rs2239704
<i>LTB</i> <i>lymphotoxin beta</i>	rs3093553
<i>MAPK13</i> <i>mitogen-activated protein kinase 13</i>	rs2071863 rs2071864 rs2859141
<i>MSH5</i> <i>mutS homolog 5</i>	rs2075788 rs3117572 rs707939
<i>NCR3</i> <i>natural cytotoxicity triggering receptor 3</i>	rs1052248 rs986475
<i>NFKBIE</i> <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon</i>	rs2233437
<i>PSMB8</i> <i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8</i>	rs2071543 rs9276810
<i>PSMB9</i> <i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9</i>	rs2071476 rs9276815
<i>PTCRA</i> <i>pre T-cell antigen receptor alpha</i>	rs6901007
<i>RXRB</i> <i>retinoid X receptor, beta</i>	rs2076310
<i>SRF</i> <i>serum response factor</i>	rs4711741
<i>TAP1</i> <i>transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B</i>	rs1057141 rs2071538 rs2284190 rs4148882

<p style="text-align: center;">TAP2 <i>transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B</i></p>	rs1015166 rs1044043 rs1800454 rs1894411 rs241424 rs241427 rs241438 rs241440 rs3819715 rs3819720 rs3819721 rs4148870
<p style="text-align: center;">TAPBP <i>TAP binding protein (tapasin)</i></p>	rs2282851 rs9277972
<p style="text-align: center;">TNF <i>tumor necrosis factor</i></p>	rs3093661 rs3093662
<p style="text-align: center;">TNFRSF21 <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i></p>	rs10807350 rs11758366 rs2103868 rs2236035 rs2281449 rs2295257 rs2295259 rs2295265 rs6458555 rs6914371 rs910554 rs9473045 rs993612
<p style="text-align: center;">TREM1 <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i></p>	rs1817537 rs2234243 rs4711668 rs6939973
<p style="text-align: center;">TREM2 <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i></p>	rs7748513

3.4.1 Investigação do gene *TLR1* - toll-like receptor 1

No gene *TLR1* foram interrogados dois polimorfismos não sinônimos, I602S (rs5743618) e N248S (rs4833095), na população do Estado de São Paulo.

O polimorfismo N248S foi testado na população de Rondonópolis, com a finalidade de confirmação do achado positivo para a população de São Paulo.

3.5 Extração de DNA

A extração de DNA a partir de leucócitos do sangue periférico foi realizada utilizando a técnica de “*salting out*” de Miller (1988) com algumas modificações.⁵⁷ Primeiramente, o sangue coletado em tubo a vácuo com EDTA K3, em volume de 4ml, foi submetido à centrifugação por 15 minutos em 1500 rpm. O anel de leucócitos, foi transferido para um microtubo estéril, onde foi adicionado 800µl de tampão de lise de hemácias. A mistura foi homogeneizada em *vortex* por 10 segundos e centrifugada por 2 minutos em 12.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* submetido a esta lavagem por mais 3 vezes. Ao *pellet* foi então adicionado 1ml de água ultrapura e repetido o processo de lavagem e a sobrenadante desprezado. Foram adicionados ao *pellet* 30µl de proteinase K em 10mg/ml, 40µl de tampão de proteinase K, 25µl de SDS 20% e 240µl de H₂O. A mistura foi levada ao *vortex* por aproximadamente 1 minuto e colocada em banho-maria a 55°C (temperatura ótima da proteinase K) por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 100µl de solução saturada de NaCl (6 molar) para a precipitação das proteínas digeridas. A mistura foi novamente homogeneizada por 10 segundos e centrifugada por 6 minutos em 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril por inversão. A esta solução foi adicionado o mesmo volume de etanol absoluto gelado e a mistura homogeneizada suavemente por aproximadamente 30 segundos até a formação do “fio de DNA” e centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm, para a sedimentação do DNA. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado por inversão e ao *pellet* adicionado 1ml de etanol a 70% também gelado. A solução foi agitada manualmente, ou em *vortex* em baixa rotação, até que o *pellet* tenha se soltado da parede do tubo. Foi realizada uma última centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o tubo foi deixado invertido sobre uma compressa de gaze para a secagem em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Após seco, o DNA foi reconstituído em 100µl de água estéril e armazenado no freezer a -80°C.

A quantificação do DNA genômico desta solução foi feita por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop 2000c - Termo Scientific. Onde o grau de pureza do DNA foi avaliado com base na razão da leitura da absorbância de 260/280nm, uma vez que o valor de 1,8 para essa relação sugere que o DNA está essencialmente puro e passível de uso. Utilizando para esta leitura um volume de 1µl do DNA.

Após a quantificação do DNA foram preparadas soluções de trabalho em concentração de 20ng/μl para ser utilizado no processo de genotipagem.

3.6 Genotipagem

As genotipagens da população primária foram feitas no McGill University and Génome Québec – Innovation Center, Montréal (Québec) – Canadá, utilizando a plataforma VeraCode GoldenGate Genotyping Assay – Illumina, que permite a genotipagem de 384 *loci* em um única microplaca de 96 poços. A técnica consiste em ativar 250ng de DNA genômico e ligar a ele uma partícula paramagnética. Os oligonucleotídeos, o tampão de hibridização e as partículas paramagnéticas são combinados ao DNA iniciando o processo de hibridização. Três oligonucleotídeos são desenhados para cada SNP, sendo dois alelos específicos e um *locus* específico, que hibridiza em uma sequência posterior ao SNP, identificando e discriminando cada alelo, ocorrendo assim a genotipagem do produto amplificado.

As genotipagens dos marcadores no gene *TLR1* foram feitas pela técnica de discriminação alélica baseada em emissão de fluorescência empregando ensaio *TaqMan* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) utilizando o aparelho StepOne Plus da Applied Biosystems, seguindo instruções do fabricante. Nesta técnica são utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada alelo, na qual a genotipagem se baseia na intensidade da fluorescência.

Para o marcador I602S uma reação prévia de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi empregada. Para esta reação de amplificação foi utilizado o termociclador MJ Research PTC-100 (MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação foram (I602S Direto: 5'–CTTGATCTTCACAGCAATAAAATAAAGAGCATTCC–3' e Reverso: 5'–GGCCATGATACATAGAACACACACATCACT – 3'). A amplificação foi realizada em volume final de 25μl contendo tampão para *Taq* DNA polimerase, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) a 0,2mM, 0,3μM de cada oligonucleotídeo (direto e reverso), MgCl₂ a 2,5mM, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carsbad, California, USA) e aproximadamente 100ng de DNA genômico. As condições de ciclagem do PCR foram as seguintes: 94°C por 5 min (desnaturação), 35 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 45s e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 min. O produto

amplificado foi então submetido à técnica de discriminação alélica baseada em emissão de fluorescência empregando ensaio *TaqMan* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), como descrito anteriormente.

3.7 Análise dos dados

As frequências dos alelos, genótipos, carreadores e haplótipos foram calculadas para os grupos de caso e controle e comparadas utilizando modelo de regressão logística com e sem ajuste para as co-variáveis sexo e etnia. A partir destas análises valores de *odds ratio* (OR), intervalo de confiança de 95% e *p*-valor foram obtidos como medidas de associação. Nível de significância estatística de *p*-valor < 0,05 foi adotado.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com uso do software estatístico R para Windows, versão 2.5.1, utilizando os pacotes “genetics”, “Design”, “Hmisc” e “haplo.states”.

Após a análise de cada polimorfismo isolado, foi conduzida a análise de haplótipos de modo a verificar se os marcadores em conjunto apresentavam algum tipo de associação com a doença. As frequências haplotípicas foram estimadas por meio da técnica da máxima verossimilhança, e comparadas através de regressão logística sem e com correção para co-variáveis etnia e sexo.

Os cálculos de desequilíbrio de ligação (LD) entre os marcadores foram realizados utilizando o software HaploView (versão 4.1 para windows). O Haploview é uma ferramenta de análise de haplótipos, que nos fornece entre outros dados as informações do LD, análise de blocos de haplótipos e as frequência de haplótipos da população.

As frequências dos genótipos para cada marcador no grupo controle foram testadas quanto ao enquadramento à lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Para tanto, as frequências observadas e esperadas foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado.

Na região 6p21 foram encontrados 13 SNPs com resultados significantes em 12 genes distintos. Dentre os dois marcadores testados para o gene *TLR1* apenas o N248S apresentou dados com significância estatística.

Cinco marcadores não se enquadraram ao EHW e foram excluídos de nossa análise, sendo estes: rs3117572, rs12614, rs3819721, rs1175836 e rs2523605.

Abaixo estão apresentados os dados dos marcadores com resultados significantes. Os marcadores com resultados não significantes têm seus dados apresentados no Anexo 1.

4.1 Polimorfismos do gene *AIF1* - allograft inflammatory factor 1

Dentre os dois marcadores analisados no gene *AIF1* o rs2259571 apresentou dados com significância estatística. Os dados apresentados na Tabela 1 demonstram as frequências obtidas para este marcador e que o genótipo AC apresentou OR de susceptibilidade à hanseníase de 1,61 (p -valor = 0,002) nas análises com e sem correção. A análise de carreador do alelo C confirma a associação de susceptibilidade (OR = 1,52 e p -valor = 0,003) em ambas as análises, sem e com correção.

Tabela 1: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2259571 no gene *AIF1* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e p -valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>AIF1</i> rs2259571	A	0,75	0,69	*	*
	C	0,25	0,31	1,29 (0,11)	1,29 (0,11)
	AA	204 (0,58)	191 (0,47)	*	*
	AC	118 (0,34)	178 (0,44)	1,61 (0,002)	1,60 (0,002)
	CC	30 (0,09)	34 (0,08)	1,21 (0,47)	1,20 (0,48)
	Carreadores C			1,52 (0,003)	1,52 (0,004)
		n= 352	n= 403		

* categoria referência

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

4.2 Polimorfismos do gene *BAT5 - HLA-B transcript associated 5*

A análise do gene *BAT5* apresentou resultado com significância estatística apenas para o marcador rs707917 entre os dois genes testados. As frequências dos alelos C e G foram respectivamente, 0,55 e 0,45 no grupo controle e de 0,61 e 0,39 no grupo de pacientes. O genótipo GG deste marcador apresentou OR de proteção à hanseníase de 0,63 com significância estatística (p -valor = 0,02) nas análises corrigidas e não corrigidas (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs707917 no gene *BAT5* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e p -valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
BAT5 rs707917	C	0,55	0,61	*	*
	G	0,45	0,39	0,78 (0,10)	0,78 (0,10)
	CC	115 (0,32)	158 (0,39)	*	*
	CG	165 (0,46)	182 (0,45)	0,80 (0,17)	0,80 (0,18)
	GG	76 (0,21)	66 (0,16)	0,63 (0,02)	0,63 (0,02)
	Carreadores G			0,74 (0,05)	0,75 (0,06)
		n=356	n=406		

* categoria referência

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

4.3 Polimorfismos do gene *CFB - complement factor B*

Foram analisados quatro marcadores no gene *CFB* sendo que destes apenas o marcador rs4151657 apresentou dados com significância. As frequências dos alelos A e G deste marcador foram respectivamente, 0,77 e 0,23 no grupo controle e 0,74 e 0,26 no grupo de pacientes (Tabela 3). Os dados apresentados na Tabela 3 demonstram que para o genótipo AG, em ambas as análises, foram obtidas OR de susceptibilidade de 1,43, com p -valores de 0,01 e 0,02. A análise de carreadores do alelo G confirma a associação de susceptibilidade com OR = 1,35 e p -valor = 0,04, em ambas as análises.

Tabela 3: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs4151657 no gene *CFB* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>CFB</i> rs4151657	A	0,77	0,74	*	*
	G	0,23	0,26	1,18 (0,31)	1,18 (0,31)
	AA	214 (0,60)	214 (0,53)	*	*
	AG	118 (0,33)	169 (0,42)	1,43 (0,01)	1,43 (0,02)
	GG	24 (0,07)	23 (0,06)	0,95 (0,88)	0,95 (0,87)
	Carreadores G			1,35 (0,04)	1,35 (0,04)
		n= 355	n= 406		

* categoria referência

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

4.4 Polimorfismos do gene *DAXX* - *death-domain associated protein*

Conforme apresentado na Tabela 4, apenas um dos 2 marcadores testados para o gene *DAXX* apresentou dados com significância, sendo este o marcador rs2239839. A frequência dos alelos A e C deste marcador foram respectivamente, 0,27 e 0,73 no grupo controle e 0,24 e 0,76 no grupo de pacientes. Nas análises para o genótipo AA, observou-se uma OR de proteção à doença de 0,54 e 0,53 (*p*-valor = 0,03 e *p*-valor = 0,02) para as análises sem e com correção, respectivamente.

Tabela 4: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2239839 no gene *DAXX* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>DAXX</i> rs2239839	A	0,27	0,24	0,82 (0,23)	0,82 (0,23)
	C	0,73	0,76	*	*
	AA	35 (0,10)	23 (0,06)	0,54 (0,03)	0,53 (0,02)
	AC	124 (0,35)	145 (0,36)	0,96 (0,83)	0,97 (0,86)
	CC	197 (0,55)	238 (0,59)	*	*
	Carreadores A			0,87 (0,36)	0,87 (0,37)
		n= 356	n= 406		

* categoria referência

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

4.5 Polimorfismos do gene *HLA-DPA1* - major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1

Os alelos A e G apresentaram uma frequência de respectivamente 0,56 e 0,44 no grupo controle e 0,5 para ambos os alelos no grupo de pacientes para o SNP rs9277341 do gene *HLA-DPA1*, sendo que dos 5 dos marcadores testados para este gene apenas este apresentou dados com significância estatística.

A análise de frequência do genótipo AG apresentou OR = 1,62 (*p*-valor = 0,005) na análise sem correção, e na análise corrigida apresentou OR = 1,61 (*p*-valor = 0,005). Para o genótipo GG a análise mostrou também um valor significativo com OR = 1,63 (*p*-valor = 0,02) sem correção e OR = 1,62 (*p*-valor = 0,02) com correção. A análise de carreadores do alelo G reforçou o resultado desta associação de susceptibilidade apresentando OR = 1,62 (*p*-valor = 0,003), nas análises sem e com correção (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs9277341 no gene *HLA-DPA1* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>HLA-DPA1</i> rs9277341	A	0,56	0,5	*	*
	G	0,44	0,5	1,28 (0,08)	1,28 (0,08)
	AA	115 (0,32)	92 (0,23)	*	*
	AG	172 (0,48)	223 (0,55)	1,62 (0,005)	1,61 (0,005)
	GG	69 (0,19)	90 (0,22)	1,63 (0,02)	1,62 (0,02)
	Carreador G			1,62 (0,003)	1,62 (0,003)
		n= 356	n= 405		

* categoria referência

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

4.6 Polimorfismos do gene *HLA-DPB1* - major histocompatibility complex, class II, DP beta 1

Foram analisados quatro marcadores para o gene *HLA-DPB1*, sendo que apenas o rs1431402 teve dados com significância estatística (Tabela 6). As frequências dos alelos A e T deste marcador foram, respectivamente, 0,84 e 0,16 no grupo controle e 0,81 e 0,19 no grupo de pacientes. A análise de regressão para o genótipo AT

apresentou OR de susceptibilidade para a hanseníase *per se* de 1,47 (p -valor = 0,01) na análise sem correção e 1,46 (p -valor = 0,02) na análise corrigida. Esta associação de susceptibilidade foi confirmada na análise para os carreadores do alelo T com OR = 1,36 (p -valor = 0,04) na análise sem correção, e OR = 1,35, e tendência à significância com p -valor = 0,05, na análise com correção.

Tabela 6: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs1431402 no gene *HLA-DPBI* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e p -valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>HLA-DPBI</i> rs1431402	A	0,84	0,81	*	*
	T	0,16	0,19	1,20 (0,31)	1,20 (0,33)
	AA	254 (0,71)	262 (0,65)	*	*
	AT	87 (0,24)	132 (0,33)	1,47 (0,01)	1,46 (0,02)
	TT	15 (0,04)	12 (0,03)	0,77 (0,52)	0,77 (0,51)
	Carreadores T			1,36 (0,04)	1,35 (0,05)
		n=356	n=406		

* categoria referência

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

4.7 Polimorfismos do gene *MSH5 - mutS homolog 5*

Dos três marcadores testados para o gene do gene *MSH5*, apenas para o marcador rs707939 foram obtidos dados com significância estatística. A frequência dos alelos A e C foram, respectivamente, 0,24 e 0,76 no grupo controle, e 0,29 e 0,71 no grupo dos pacientes.

Os dados apresentados na Tabela 7 demonstram que, para o marcador rs707939, a análise das frequências do genótipo AC apresentou OR de susceptibilidade à hanseníase de 1,67 com significância estatística (p -valor = 0,0009), em ambas as análises. A análise de carreadores do alelo A para este marcador confirma a associação de susceptibilidade com OR = 1,55 e p -valor = 0,002, para ambas as análises.

Tabela 7: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs707939 no gene *MSH5* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>MSH5</i> rs707939	A	0,24	0,29	1,29 (0,12)	1,28 (0,12)
	C	0,76	0,71	*	*
	AA	28 (0,08)	28 (0,07)	1,06 (0,81)	1,06 (0,83)
	AC	113 (0,32)	177 (0,44)	1,67 (0,0009)	1,67 (0,0009)
	CC	215 (0,60)	201 (0,50)	*	*
	Carreadores A			1,55 (0,002)	1,55 (0,002)
		n=356	n=406		

* categoria referência

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

4.8 Polimorfismos do gene *TAPBP* - *TAP binding protein (tapasin)*

A análise do gene *TAPBP* envolveu dois marcadores, sendo que apenas o SNP rs2282851 mostrou dados com significância estatística. As frequências dos alelos A e G foram 0,27 e 0,73 no grupo controle e 0,24 e 0,76 no grupo de pacientes. Os resultados da Tabela 8 mostram que o genótipo AA apresenta uma OR associada à proteção a hanseníase de 0,55 em ambas as análises, com *p*-valores de 0,04 e 0,03.

Tabela 8: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2282851 no gene *TAPBP* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>TAPBP</i> rs2282851	A	0,27	0,24	0,82 (0,25)	0,82 (0,25)
	G	0,73	0,76	*	*
	AA	34 (0,10)	23 (0,06)	0,55 (0,04)	0,55 (0,03)
	AG	125 (0,35)	145 (0,36)	0,96 (0,79)	0,96 (0,82)
	GG	197 (0,55)	238 (0,59)	*	*
	Carreadores A			0,87 (0,36)	0,87 (0,37)
		n=356	n=406		

* categoria referência

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

4.9 Polimorfismos do gene *TAP1* - transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B

Dois marcadores para o gene *TAP1* foram testados e apenas o rs2071538 mostrou dados com significância. Neste *locus* os alelos A e G apresentaram frequências de, respectivamente, 0,13 e 0,87 no grupo controle e 0,17 e 0,83 no grupo de pacientes. Os resultados da Tabela 9 demonstram que o genótipo AG apresenta OR de susceptibilidade à hanseníase de 1,41 com significância estatística (p -valor = 0,04) em ambas as análises. A análise de carreadores do alelo A reforça esta associação de susceptibilidade com OR = 1,40 (p -valor = 0,04) na análise sem correção e 1,39 (p -valor = 0,04) na análise com correção.

Tabela 9: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2071538 no gene *TAP1* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e p -valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>TAP1</i> rs2071538	A	0,13	0,17	1,32 (0,17)	1,31 (0,18)
	G	0,87	0,83	*	*
	AA	9 (0,03)	12 (0,03)	1,28 (0,58)	1,25 (0,60)
	AG	76 (0,21)	1112 (0,28)	1,41 (0,04)	1,41 (0,04)
	GG	271 (0,76)	282 (0,69)	*	*
	Carreadores A			1,40 (0,04)	1,39 (0,04)
		n=356	n=406		

* categoria referência

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

4.10 Polimorfismos de *C6orf47* - chromosome 6 open reading frame 47

Conforme apresentado na Tabela 10, o marcador rs7029 localizado na sequência de leitura aberta *C6orf47* apresentou frequências dos alelos A e G de, respectivamente, 0,56 e 0,44 no grupo controle e 0,61 e 0,39 no grupo de pacientes. A análise de regressão logística para o genótipo GG mostrou OR associada à resistência à hanseníase de 0,64 em ambas as análises, com p -valores de 0,03 na análise sem correção e 0,04 na análise corrigida.

Tabela 10: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs7029 da sequência de leitura aberta *C6orf47* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>C6orf47</i> rs7029	A	0,56	0,61	*	*
	G	0,44	0,39	0,79 (0,12)	0,79 (0,12)
	AA	115 (0,32)	158 (0,39)	*	*
	AG	168 (0,47)	183 (0,45)	0,79 (0,15)	0,79 (0,16)
	GG	73 (0,21)	35 (0,16)	0,64 (0,03)	0,64 (0,04)
	Carreadores G			0,74 (0,05)	0,75 (0,06)
		n=356	n=406		

* categoria referência

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

4.11 Polimorfismos do gene *TNFRSF21* - tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21

A investigação do gene *TNFRSF21* incluiu treze SNPs, sendo que dois marcadores rs6458555 e rs2295265 apresentaram dados com significância estatística, conforme descrito na tabela 11.

O marcador rs6458555 apresentou frequências dos alelos A e G de, respectivamente, 0,4 e 0,6 no grupo controle e 0,45 e 0,55 no grupo de pacientes. A análise de carreadores do alelo A mostrou significância estatística com OR de susceptibilidade de 1,37 (*p*-valor = 0,04) na análise sem correção e 1,38 (*p*-valor = 0,03) na análise corrigida.

Para o marcador rs229565 as frequências dos alelos A e G foram de 0,5 no grupo controle e, respectivamente, 0,51 e 0,49 no grupo de pacientes. A análise para o genótipo AG deste marcador apresentou significância estatística com OR de proteção de 0,66 e *p*-valor = 0,02 em ambas as análises.

A análise através do Haploview indicou que os marcadores rs645855 e rs229565 não estão em DL, este dado indica que os dois são indicadores independentes da associação com a doença.

Tabela 11: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs6458555 no gene *TNFRSF21* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>TNFRSF21</i> rs6458555	A	0,4	0,45	1,22 (0,16)	1,23 (0,14)
	G	0,6	0,55	*	*
	AA	58 (0,16)	79 (0,19)	1,47 (0,06)	1,50 (0,05)
	AG	169 (0,47)	208 (0,51)	1,33 (0,07)	1,34 (0,07)
	GG	129 (0,36)	119 (0,29)	*	*
	Carreadores A			1,37 (0,04)	1,38 (0,03)
		n= 356	n= 406		
<i>TNFRSF21</i> rs2295265	A	0,5	0,51	*	*
	G	0,5	0,49	0,96 (0,77)	0,96 (0,83)
	AA	80 (0,22)	114 (0,28)		
	AG	194 (0,54)	184 (0,45)	0,66 (0,02)	0,66 (0,02)
	GG	82 (0,23)	108 (0,27)	0,92 (0,70)	0,93 (0,76)
	Careadores G			0,74 (0,07)	0,74 (0,08)
		n= 356	n= 406		

* categoria referência

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

4.12 Polimorfismos do gene *LTA* - *lymphotoxin alpha*

Para o gene *LTA* foram analisados 2 marcadores e o marcador rs2239704 apresentou dados significantes. As frequências dos alelos A e C foram, respectivamente, 0,33 e 0,67 no grupo controle e 0,38 e 0,62 no grupo de pacientes. O resultado da análise para o genótipo AA mostrou OR=1,61 na análise sem correção e 1,59 na análise corrigida, com *p*-valores de 0,04 em ambas as análises (Tabela 12).

Para este marcador foi realizada análise estratificada por idade de manifestação da doença. Para tanto, o grupo de casos foi dividido em abaixo e acima de trinta anos, de acordo com a idade na ocasião do diagnóstico. O resultado desta análise apresentou uma OR no sentido de susceptibilidade de 1,36 com significância mais acentuada, indicada pelo *p*-valor = 0,007.

Tabela 12: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs2239704 no gene *LTA* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>LTA</i> rs2239704	A	0,33	0,38	1,23 (0,16)	1,22 (0,18)
	C	0,67	0,62	*	*
	AA	37 (0,10)	61 (0,15)	1,61 (0,04)	1,59 (0,04)
	AC	158 (0,45)	183 (0,45)	1,13 (0,41)	1,13 (0,42)
	CC	158 (0,45)	161 (0,40)	*	*
	Carreadores A			1,22 (0,16)	1,21 (0,17)
		n= 353	n= 406		

* categoria referência

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

4.13 Polimorfismos do gene *TLR1* - toll-like receptor 1

Foram analisados dois polimorfismos no gene *TLR1* o *I602S* e *N248S* na população de São Paulo.

A análise do marcador *N248S* (rs4833095) na população de São Paulo apresentou para o alelo G associação de susceptibilidade para a doença conforme descrito na Tabela 13. Indicando para o genótipo GG uma OR de 1,46 (*p*-valor = 0,05) na análise sem correção e OR de 1,81 (*p*-valor = 0,004) na análise corrigida. O genótipo AG apresentou OR = 1,44 (*p*-valor = 0,03) na análise sem correção e OR = 1,58 (*p*-valor = 0,01) na análise corrigida. A análise do alelo G apresentou dados de significância com OR = 1,34 (*p*-valor = 0,04) apenas para a análise corrigida. A análise para o carreador de G reforça a afirmação de associação com OR = 1,45 (*p*-valor = 0,02) na análise sem correção e OR = 1,65 (*p*-valor = 0,03) na análise corrigida para as co-variáveis.

A análise do marcador *I602S* (rs5743618) para a população de São Paulo não apresentou dados de significância estatística conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13: Frequência de alelos, genótipos e carreador dos marcadores rs4833095 e rs5743618 no gene *TLR1* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
TLR rs4833095	A	0,51	0,46	*	*
	G	0,49	0,54	1,21 (0,17)	1,34 (0,04)
	AA	105 (0,28)	95 (0,21)	*	*
	AG	174 (0,46)	227 (0,50)	1,44 (0,03)	1,58 (0,01)
	GG	97 (0,26)	128 (0,28)	1,46 (0,05)	1,81 (0,004)
	Carreadores G			1,45 (0,02)	1,65 (0,003)
		n=376	n=450		
TLR1 rs5743618	G	0,63	0,66		
	T	0,37	0,34	0,86 (0,31)	0,85 (0,28)
	GG	1,58 (0,39)	173 (0,43)		
	GT	198 (0,48)	184 (0,46)	0,85 (0,28)	0,83 (0,23)
	TT	54 (0,13)	44 (0,11)	0,74 (0,20)	0,73 (0,18)
	Carreadores T			0,83 (0,18)	0,81 (0,15)
		n=410	n=401		

* categoria referência

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

O SNP N248S teve o dado replicado na população de Rondonópolis. As frequências para os alelos A e G foram de 0,5 no grupo controle e, respectivamente, 0,45 e 0,55 no grupo de pacientes. Conforme apresentado na Tabela 14, o alelo G deste marcador apresenta associação de susceptibilidade para a hanseníase *per se*. Para o genótipo heterozigoto foi encontrada OR = 1,47 e *p*-valor = 0,03 em ambas as análises, enquanto o genótipo homozigoto obteve OR = 1,55 (*p*-valor = 0,03) na análise sem correção e OR = 1,56 (*p*-valor = 0,03) na análise corrigida. A análise de carreadores de G reforçou o efeito com OR = 1,50 e *p*-valor = 0,02 em ambas as análises.

Tabela 14: Frequência de alelos, genótipos e carreador do marcador rs4833095 no gene *TLRI* nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção obtidos da análise da população de Rondonópolis.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>TLRI</i> rs4833095	A	0,5	0,45	*	*
	G	0,5	0,55	1,23 (0,14)	1,24 (0,13)
	AA	107 (0,26)	76 (0,19)	*	*
	AG	197 (0,48)	206 (0,51)	1,47 (0,03)	1,47 (0,03)
	GG	109 (0,26)	120 (0,30)	1,55 (0,03)	1,56 (0,03)
	Carreadores G			1,50 (0,02)	1,50 (0,02)
			n= 413	n= 402	

* categoria referência

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

4.14 Análise de desequilíbrio de ligação

Os mapas de desequilíbrio de ligação (LD) dos marcadores de mesma região cromossômica foram construídos a fim de entender possíveis interações ou comprovar as independências dos efeitos observados.

A análise dos marcadores da região cromossômica 6p21 demonstra que dois marcadores encontram-se em forte LD: rs2282851 (*TAPBP*) e rs2239839 (*DAXX*) apresentando $r^2 = 0,99$, como mostra a Figura 3.

Entre outros marcadores como rs2259571 (*AIF1*) e rs707939 (*MSH5*), $r^2 = 0,66$; rs7029 (*C6orf47*) e rs707917 (*BAT5*) $r^2 = 0,65$; e rs707939 (*MSH5*) e rs4151657 (*CFB*) $r^2 = 0,60$, existe um fraco LD.

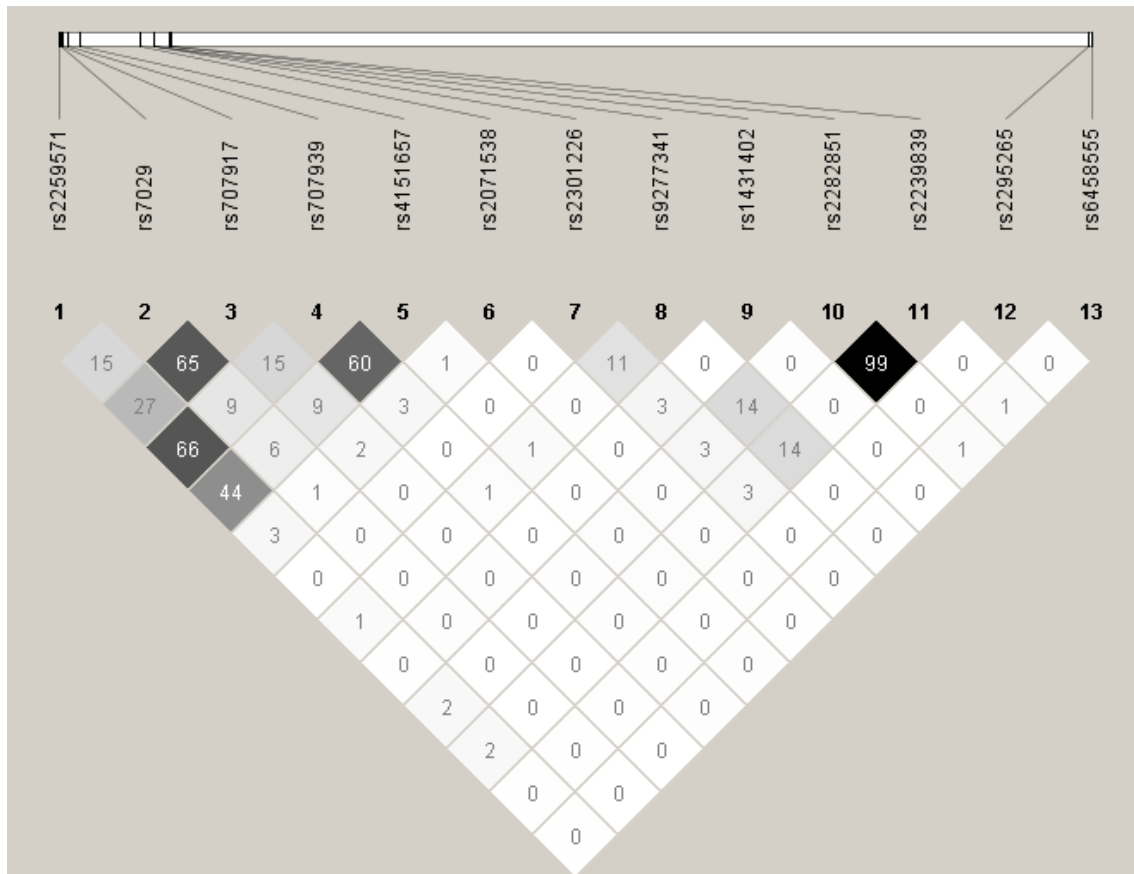


Figura 3: Mapa de desequilíbrio de ligação com valores de r^2 obtidos a partir do software Haploview para os SNPs com dados significantes da região cromossômica 6p21.

A análise de LD entre os dois marcadores no gene *TLRI* apresentou $r^2 = 0,67$, indicando um fraco desequilíbrio de ligação.

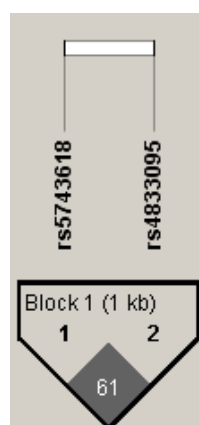


Figura 4: Mapa de desequilíbrio de ligação com valores de r^2 obtidos a partir do software Haploview para os dois SNPs do gene *TLRI*.

A genética humana tem sido mostrada como um importante determinante da susceptibilidade às doenças infecciosas. Muito se discute sobre a validação dos resultados obtidos em estudos de associação genética devido a não replicação em diferentes populações. Nesse contexto, a ideia principal desta investigação científica é testar os dados obtidos em estudos de ligação e de associação, que apontam o envolvimento da região cromossômica 6p21 e do gene *TLR1* com hanseníase, aprofundando o conhecimento dos fatores de riscos genéticos para a doença na população brasileira, a partir da identificação dos genes e marcadores envolvidos.

O recrutamento dos indivíduos na formação de uma amostra do tipo caso-controle para o estudo populacional de associação é muito importante para que não haja viés no estudo. Levando isso em consideração, buscamos adotar critérios de seleção com o objetivo de manter a proporcionalidade entre os grupos de pacientes e de controle para as co-variáveis idade, etnia e sexo na amostra de Rondonópolis, MT. Asseguramos também que todos os participantes fossem provenientes da mesma região geográfica reduzindo a influência na diferença de exposição ao agente etiológico.

Nosso trabalho analisou 89 marcadores do tipo “tag” SNPs, ou SNPs etiqueta distribuídos em 36 genes candidatos na região cromossômica 6p21. Os tag SNPs fornecem informação de um conjunto de SNPs, a partir dos haplótipos formados pelos marcadores contidos no gene de acordo com os parâmetros adotados. Neste estudo foram encontradas associações com a doença para 14 destes marcadores, as quais serão discutidas a seguir.

A associação da doença com o gene *TNF* tem sido descrita na literatura por vários autores, fato este que não se confirmou em nossas análises. Esta discordância de resultados em relação a este gene e a doença já vem sendo apresentada em alguns estudos. Num primeiro trabalho, a associação do marcador TNF-308 foi com a forma multibacilar da doença para a população indiana.⁴⁶ No entanto, outros estudos conduzidos na população brasileira apontaram uma associação com sentido de proteção para a doença.^{47,40,58} No estudo de meta-análise conduzido por Cardoso et al (2001), observou-se um efeito de proteção, este podendo ser específico para a população brasileira. Tal controvérsia pode ser explicada devido à diferença de organização na formação dos blocos haplotípicos entre as populações estudadas.

Na análise para o marcador rs2239704 do gene *LTA* uma associação de susceptibilidade (OR=1,59; *p*-valor=0,04) confirmando a prévia associação do gene com a doença. A análise estratificada para indivíduos com idade de diagnóstico superior a 30 anos demonstrou uma associação ainda mais forte (OR = 1,36; *p*-valor=0,007). Estudo envolvendo a região confirmou a associação do gene *LTA* com a hanseníase, sendo que o marcador LTA+80 foi o mais informativo da associação deste gene. Como já citado, as análises estratificadas esclareceram que a associação está intimamente ligada à idade de manifestação, sendo que para a população vietnamita observou-se associação apenas para indivíduos com idade inferior a 16 anos. Para a população brasileira, apesar de não ser estatisticamente significativa (*p* = 0,07), observou-se também um enriquecimento do alelo de susceptibilidade na faixa etária mais jovem.⁴⁵ Portanto, pode-se dizer que nossos resultados vêm corroborar com os achados de Alcais *et al* (2007) quanto à dependência que o efeito deste gene apresenta com relação à idade de manifestação da doença.

Estudos de ligação conduzidos com as populações vietnamita e brasileira, relataram picos na região 6p21, indicando a presença de um *locus* de susceptibilidade para a hanseníase.^{44,42} Esta região cromossômica abriga os genes do *HLA* que têm sido sistematicamente associados com hanseníase, genes estes que apresentam um importante papel no desfecho da doença.³

Encontramos em nossas análises uma associação no sentido de susceptibilidade com hanseníase para o marcador rs9277341 do *HLA-DPA1* (OR=1,63 e *p*-valor=0,003) para os carreadores do alelo G. Adicionalmente, o marcador rs1431402 do gene *HLA-DPBI* também apresentou uma associação no mesmo sentido de susceptibilidade (OR=1,47 e *p*-valor=0,01) para o genótipo AT com dados significantes também para os carreadores do alelo T (*p*-valor=0,04).

Os genes do *HLA-DP* pertencem ao grupo do HLA de classe II. Estas moléculas são heterodímeros constituídos por uma cadeia alfa (DPA) e uma cadeia beta (DPB). Estas são proteínas ancoradas na membrana de células apresentadoras de antígenos como os linfócitos B, células dendríticas e macrófagos. Estas desempenham um papel importante no sistema imune, pois são responsáveis por apresentarem peptídeos derivados de patógenos. A maioria dos trabalhos que abordam esta região, apenas investigam os genes do *HLA-DR* e *HLA-DQ* com enfoque em determinar a associação

entre os antígenos do HLA com a doença.^{59,60,61} Nossos resultados mostram a importância de estudos envolvendo os outros genes do complexo.

Estes dois genes, *HLA-DPA1* e *HLA-BPBI*, apresentam-se em sobreposição parcial no genoma, havendo assim a necessidade de expansão na quantidade de marcadores analisados na região, a fim de descobrir qual o causador da associação com a doença. De qualquer forma, os dados obtidos sugerem uma associação da molécula de HLA-DP com hanseníase, o que ainda não havia sido demonstrado, já que as associações apontavam importância apenas para as moléculas DR e DQ. Atualmente, um estudo do tipo *GWAS* (*genome wide association study*) realizado com as populações japonesa e coreana indicou associação destes genes com hepatite B. Estes dados foram replicados em outras populações asiáticas.⁶²

Outro gene por nós investigado que apresentou dados significantes foi o *TAP1*. Os dados mostraram uma associação de susceptibilidade para o marcador rs2071538 (OR=1,41; p-valor=0,04). Sabe-se que este gene codifica uma proteína associada com o transporte de antígenos processados para a superfície celular, onde se ligarão ao HLA de classe I e serão reconhecidos por células T CD8, estas serão ativadas a fim de combater os patógenos intracelulares.⁶³ Assim, este gene codifica uma proteína importante na resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo.

Estudos indicaram que polimorfismos nos genes *TAP* podem influenciar na proteína codificada, afetando a apresentação do antígeno, constituindo um mecanismo de escape viral frente à imunidade mediada por células. Estudo realizado em um grupo de pacientes HIV+ com tuberculose (TB) mostrou uma associação positiva de marcadores do gene *TAP1* com a co-infecção.⁶⁴ Deste modo, este gene deve desempenhar um importante papel como fator de risco para o desenvolvimento da co-infecção.

Uma recente pesquisa em uma coorte de 222 pacientes e 233 controles, conduzido na população indiana, investigou a associação de polimorfismos dos genes *TAP1* e *TAP2* com a hanseníase.⁶⁵ Este trabalho observou que o alelo G do marcador rs1135216 do gene *TAP1* contribuiu para o aumento da susceptibilidade para a hanseníase *per se*. Estes dados concordam com nossos achados que também demonstraram associação de susceptibilidade para marcadores do mesmo gene,

reafirmando a importância do gene *TAP1* no contexto da susceptibilidade genética para a doença.

O marcador rs2282851 do gene *TAPBP* apresentou associação no sentido de proteção à doença indicada pela $OR = 0,55$ e $p\text{-valor} = 0,04$. Conforme descrito na literatura, o gene *TAPBP* codifica uma glicoproteína de membrana denominada *tapasin*, responsável pela interação entre o HLA de classe I e o transportador de antígenos processados (TAP). Esta proteína é de essencial importância para a condução de peptídeos antigênicos através da membrana do retículo endoplasmático.^{66,67} Tendo em vista nossos resultados é possível sugerir que a *tapasin* encontra-se intimamente ligada ao aumento do reconhecimento imunológico de antígenos específicos, reforçando nosso resultado no sentido de proteção à doença.

Outro gene que mostrou envolvimento com a doença foi o *DAXX*. Foi demonstrada para o marcador rs2239839 deste gene uma associação no sentido de proteção ($OR = 0,54$; $p\text{-valor} = 0,03$). Este gene codifica uma proteína multifuncional, localizada em várias regiões do núcleo e do citoplasma, que interage com várias proteínas. Pode atuar no núcleo como repressor de transcrição e no citoplasma como reguladora de apoptose.⁶⁸

A análise de LD conduzida no HaploView indicou que os marcadores rs2282851 (*TAPBP*) e rs2239839 (*DAXX*) encontram-se em desequilíbrio de ligação com um valor de $r^2=0,99$ (Figura 3). A análise da região cromossômica mostra que estes dois marcadores estão muito próximos, apresentando entre si um intervalo de 23Kb, o que justifica o forte desequilíbrio de ligação. Frente a estas informações, uma maior exploração da região com mapeamento fino se faz necessária a fim de melhor esclarecer se estes são eventos independentes ou se apenas um destes é o causador do efeito observado.

O marcador rs707939 no gene *MSH5* também foi associado com susceptibilidade para a hanseníase *per se* ($OR=1,67$; $p\text{-valor}=0,0009$), sendo que este SNP foi o que apresentou a associação mais acentuada em nossas análises.

O gene *MSH5* codifica uma proteína membro da família *mutS*, que está envolvida na reparação do emparelhamento incorreto do DNA e no processo de recombinação meiótica. Resultados de um trabalho de meta-análise realizado com a

população hispânica demonstraram associação para seis genes, dentre eles o *MSH5*, com lúpus eritematoso sistêmico.⁶⁹

Em função dos dados observados para este gene, torna-se imprescindível a realização de um estudo com o intuito de avaliar a importância de seu papel na fisiopatologia da hanseníase.

Conforme descrito em nossos resultados, a análise do gene *BAT5* apresentou associação no sentido de proteção para o marcador rs707917 com (OR = 0,63; *p*-valor=0,02). Por estar localizado na região do HLA de classe III, ao redor do fator de necrose tumoral (*TNF*), o grupo de genes *BATI-BAT5* têm sido estudado com intuito de investigar seu envolvimento com as doenças infecciosas.

Estudo de associação conduzido sobre a doença de Kawasaki, que envolve uma complexa interação de processos inflamatórios, ativação de citocinas e fatores genéticos, encontrou associação de susceptibilidade do gene *BAT5* com a doença.⁷⁰ Outro estudo conduzido com duas amostras populacionais da Índia encontrou associação de genes da região 6p21 com hanseníase, entre eles encontram-se marcadores dos genes *BATI*, *LTA* e *TNF* associados com proteção à doença.⁷¹ Um aumento na quantidade de marcadores e estudos funcionais se fazem necessários para melhor entender a influencia que estes exercem sobre as doenças complexas.

O fator do complemento B é um componente da via alternativa de ativação do complemento que está envolvido na regulação da resposta imune.⁷² Os resultados indicaram uma associação de susceptibilidade para o marcador rs4151657 do gene *CFB* (OR=1,43; *p*-valor=0,01). Um estudo mostrou o envolvimento deste gene com degeneração macular, uma doença complexa influenciada pela idade, fatores genéticos e ambientais, sendo uma das principais causas de perda de visão em populações ocidentais. Com a finalidade de identificar a presença de *loci* de susceptibilidade foi realizado um *GWAS* com a população do Reino Unido, o qual encontrou uma associação deste gene com a doença.⁷³ Nossos dados de associação indicam que este gene pode ter um possível envolvimento na eficácia da proteção do hospedeiro contra o *M. leprae*.

Conforme descrito nos resultados, encontramos associação de susceptibilidade para o marcador rs6458555 (OR = 1,37; *p*-valor = 0,04) e associação no sentido de

proteção para o rs2295265 (OR = 0,66; *p*-valor = 0,02) do gene *TNFRS21*. Este gene codifica uma proteína membro da superfamília de receptores de TNF, sendo um ativador de NF-KappaB, MAPK8/JNK e capaz de induzir a apoptose celular. Estudos sugerem que este gene desempenha um papel importante na ativação de células Th e podem estar envolvidas na inflamação e na regulação da resposta imune.⁷⁴ Estudo de replicação se faz necessário a fim de descobrir se ambos os marcadores, ou apenas um, está realmente associado com a doença.

A análise dos marcadores do gene *AIFI* apresentou associação do polimorfismo rs2259571 no sentido de proteção (OR=0,64; *p*-valor=0,03). Sabe-se que este gene codifica uma proteína que é induzida por citocinas como o interferon e encontra-se presente em macrófagos ativados.

Foi também estudada a sequência de leitura aberta *C6orf47* (*chromosome 6 open reading frame 47*), no qual o marcador rs7029 apresentou uma associação de proteção (OR de 0,64 e *p*-valor = 0,03). Esta sequência foi recentemente associada à codificação de uma proteína que interage com o receptor do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3).

Dados oriundos de um estudo sobre artrite reumatoide (AR), uma doença complexa que afeta cerca de 1% da população em todo mundo, que investigou genes candidatos da região do HLA de classe III, mostraram associação com marcadores no *AIFI* e na *C6orf47* (Harney, 2008).

As causas da AR não estão completamente esclarecidas, mas a ação de diferentes estímulos em

As causas da AR não estão completamente esclarecidas, mas a ação de diferentes estímulos em indivíduos predispostos geneticamente deve desencadear a resposta inflamatória que leva à doença. Os locais de inflamação apresentam um processo característico de inflamação crônica, que acontece quando macrófagos e células T são constantemente ativados e se acumulam no sitio da lesão.⁷⁵

Os resultados aqui apresentados deverão ser melhor esclarecidos através da análise de novos marcadores nesses genes, confirmação dos polimorfismos associados em uma população distinta e condução de estudos funcionais.

Tendo em vista que os TLRs são de primordial importância pelo fato de reconhecerem os PAMPs dando início à resposta inflamatória, tem sido sugerido que alterações no gene *TLR1* são de fundamental importância para determinar o desfecho de doenças infecciosas.

A análise conduzida sobre o gene *TLR1* apresentou resultados indicando associação no sentido de susceptibilidade para o polimorfismo N248S (rs4833095), conforme descrito nos resultados. Estes dados se fortaleceram após a confirmação do efeito na população de São Paulo, corroborando com os dados obtidos no estudo anterior da população de Bangladesh.⁵³

Polimorfismos neste gene já vêm sendo associados à hanseníase. Um estudo de 2007, realizado com a população da Turquia, mostrou que o SNP I602S no gene *TLR1* está associado à proteção para a doença.⁵⁶ Outro trabalho mostrou também uma associação deste mesmo polimorfismo com regulação da resposta imune inata e com proteção para reação tipo I na população do Nepal.⁵²

Um desdobramento do *GWAS* conduzido com a população chinesa mostrou que este polimorfismo está fortemente associado com susceptibilidade para a hanseníase.⁵¹

Em nossos estudos o polimorfismo I602S não foi investigado nas duas populações pelo fato de não ter apresentado significância na análise da população de São Paulo.

A análise de um número maior de polimorfismos nos genes que apresentaram dados positivos neste estudo é indispensável com a finalidade de buscar marcadores mais informativos da associação destes genes. A replicação em outras populações também é extremamente necessária a fim de confirmar o envolvimento desses genes com a doença.

Por fim, estudos funcionais abordando os genes replicados serão necessários para confirmar e explicar estes resultados do ponto de vista fenotípico.

Os dados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- 1) Dentre os 37 genes investigados na região cromossômica candidata 6p21, 13 genes apresentaram marcadores associados com hanseníase *per se*.
- 2) Os genes *AIF1*, *CFB*, *HLADP-A1*, *HLADP-B1*, *LTA*, *MSHS*, *TAPBP* e *TAP1*, localizados na região cromossômica 6p21, apresentaram marcadores associados com susceptibilidade para hanseníase *per se* na população estudada de Rondonópolis.
- 3) Os genes *BAT5*, *DAXX* e *C6orf47*, localizados na região cromossômica 6p21, apresentaram marcadores associados com proteção para hanseníase *per se* na população estudada de Rondonópolis.
- 4) O gene *TNFRSF21* (*tumor necrosis fator receptor superfamily, member 21*) localizados na região cromossômica 6p21 teve dois marcadores que apresentaram significância estatística: rs6458555 com sentido de susceptibilidade e rs229565 com sentido de proteção para hanseníase *per se* na população estudada de Rondonópolis.
- 5) O alelo 248S do polimorfismo N248S (rs4833095) do gene *TLR1* apresentou associação com sentido de susceptibilidade para hanseníase *per se* na população de Rondonópolis e este dado foi replicado na população de São Paulo.

Referências Bibliográficas

1. Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações. In: Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000; p.1-4.
2. QUEIROZ, MS., and PUNTEL, MA. A endemia hansênica: uma perspectiva multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 120 p. ISBN 85-85676-33-7.
3. Prevedello FC., Mira MT., Leprosy: a genetic disease?. *An Bras Dermatol.* 2007; 82(5):451-459.
4. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five groups system. *International Journal of Leprosy.* 1966; 34: 255-273.
5. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2002; 35(4): 365-375.
6. Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações. In: Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000; p.13-17.
7. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001; 1007-1011.
8. Monot M., Hanoré N., Garnier T., Araoz R., Coppée JY., Lacroix C., et al. On the Origin of Leprosy. *Science.* 2005; 308:1040-1042.
9. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature Genetics.* 2009; 41 (12):1282-9.
10. Congresso Internacional de Leprologia, 6, Madrid, 1953. Memória Association International de la Lepra, 1953: p.1344.
11. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento Vigilância em Epidemiologia. Guia procedimentos técnicos Baciloscopia em Hanseníase. Brasília. DF; 2010.
12. World Health Organization. Global leprosy situation, 2010. *Weekly Epidemiol Record,* 2011; 86:389-400.
13. Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bulletin of the World Health Organization.* 2005; 83: 230-235
14. Barbosa J. Situação Epidemiológica Hanseníase Brasil. Secretaria de vigilância em Saúde-SVS-MS. 2012.

15. Opromolla DVA. Diagnóstico da Hanseníase. In: Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000; p.59-61.
16. Dhungel S., Ranjit C., Sapkota BR., Macdonald M. Role of PGL-I of *M. leprae* in TNF-a production by *In vitro* whole blood assay. Nepal Med Coll J 2008; 10(1):1-3.
17. Souza FC, Marcos EVC, Ura S, Opromolla PA, Nogueira MES. Estudo comparativo entre reação de Mitsuda e antígeno leucocitário humano em pacientes hansenianos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2007;40(2):188-191.
18. Scollard DM., Admas LB., Gillis TP., Krahenbuhl JL., Truman RW., Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. Clinical Microbiology Reviews. 2006. April;19(2): 338-381.
19. Guia de Vigilância Epidemiológica: Hanseníase. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Caderno 7. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_hansenia.pdf.
20. Foos NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. Medicina de Ribeirão Preto. 1997; 30:335-339.
21. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science. 1999; 285(5428):732-6.
22. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat Med. 2003;9(5):525-32.
23. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. Nat Med. 2005;11(6):653-60.
24. Basith S, Manavalan B, Lee G, Kim SG, Choi S. Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010). Expert Opin Ther Pat. 2011;21(6):927-44.
25. Moraes, MO., Cardoso, CC., Vanderborght, PR., Pacheco, AG. Genetics of Host Response in Leprosy. Leprosy Review. 2006; 77:189-202.
26. Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações. In: Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000; p.79-84.
27. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. J Infect Dis. 2008;197(2):253-61.

28. Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(1):55-66.
29. Beiguelman, B. Genética e Hanseníase. *Ciência & Saúde Coletiva*, vol.7, no.1. Rio de Janeiro, 2002.
30. Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CCO, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J infect Dis* 2001: 1598-1605.
31. Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility *locus* for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet.* 2001; 27:439-441.
32. Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet.* 2010;127(3):337-48.
33. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet.* 2003; 33:412-415.
34. Mira MT, Alcaïs A, Nguyer VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with Park2 and PACRG. *Nature.* 2004; 427:636-340.
35. Feitosa, MF., Krieger, H. O Futuro da Epidemiologia Genética de Características Complexas. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2002; 7(1): 73-83.
36. Pacheco AG and Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease Markers.* 2009.
37. Stitzel NO, Binkowski TA, Tseng YY, Kasif S, Liang J. TopoSNP: A topographic database of non-synonymous single nucleotide polymorphisms with and without known disease association. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:520-522.
38. Shankarkumar U. HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. *Lepr Rev.* 2004;75(1):79-85.
39. Alter A, Huong NT, Singh M, Orlova M, Van Thuc N, Katoch K, et al. Human Leukocyte Antigen Class I Region Single-Nucleotide Polymorphisms are Associated with Leprosy Susceptibility in Vietnam and India. *J Infect Dis.* 2011; 203:1274-1281.
40. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with *HLA* class II and tumour necrosis factor genes. *Genes and Immunity.* 2001; 2:196-204.

41. Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AV, Pitchappan R. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet.* 2006;15(19):2880-7.
42. Mira MT, Alcais A, Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes and Immunity.* 2003;(4):67-73.
43. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun.* 2007;8(4):320-4.
44. Miller EM, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004; 5:63-67.
45. Alcais, A., Alter, A., Antoni, G., Orlova, M., Thuc, NV., Singh, M., et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nature Genetics.* 2007.
46. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CGN, Saha B, Hazra SK, Hill AVS, Kwiatkowski D. Tumor Necrosis Factor Promoter Polymorphism and Susceptibility to Lepromatous Leprosy. *The Journal of Infectious Diseases.* 1997; 176:530-532.
47. Santos AR, Suffis PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, et al. Role of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms in Leprosy. *The Journal of Infectious Diseases.* 2002; 186:1687-1691.
48. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, Nery JAC, et al. TNF -308G>A Single Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Among Brazilians: A Genetic Epidemiology Assessment, Meta-Analysis, and Functional Study. *J Infect Dis.* 2011;204:1256-1263.
49. Ferraz EG, Silveira BBB, Sarmiento VA. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. *RGO - Rev Gaúcha Odontol.* 2011;3(59):483-490.
50. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1-14.
51. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000979.
52. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(5):e231.

53. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis.* 2009;199(12):1816-9.
54. NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
55. International HapMap Project - <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
56. Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsy E, et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol.* 2007;178(12):7520-4.
57. S A Miller, D D Dykes, and H F Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3):1215.
58. Franceschi DSA, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases.* 2009;13:493-498.
59. Marcos EVC, Souza FC, URA S, Opromolla DVA. Estudo de associação entre antígenos HLA e reação hansênica tipo 1 ulcerada. *Na Brás Dermatol.* 2000;75(3): 283,290.
60. Viscentainer JEL, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PRF, Petzl-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research.* 1997; 30:51-59.
61. Silva SMUR, Carvalho CPM, Marcos EVC, Souza FC, Ura S, Almeida RAMB. Identificação dos alelos *HLA* de classe I e classe II em pacientes co-infectados com hanseníase e AIDS. *Hansen Int.* 2006; 31(2):29-34.
62. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, et al. Genome-wide association study confirming association of *HLA-DP* with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *Plos ONE.* 2012;7:39075.
63. Corradi V, Singh G, Tieleman DP. The Human Transporter Associated with Antigen Processing. *J Biol Chem.* 2012; 287(33):28099-28111.
64. Sunder SR, Hanumanth SR, Gaddam S, Jonnalagada S, Valluri VL. Association of TAP 1 and 2 gene polymorphisms with human immunodeficiency virus-tuberculosis co-infection. *Hum Immunol.* 2011; 72(10):908-911.
65. Shinde V, Marcinek P, Rani DS, Sunder SR, Arun S, Jain S, et al. Genetic evidence of TAP1 gene variant as a susceptibility factor in Indian leprosy patients. *Hum Immunol.* 2013;74(6):803-7.

66. Praveen PV, Yaneva R, Kalbacher H, Springer S. Tapasin edits peptides on MHC class I molecules by accelerating peptide exchange. *Eur J Immunol* 2010 Jan; 40 (1):214-24.
67. Zhang Y, Williams DB. Assembly of MHC class I molecules within the endoplasmic reticulum. *Immunol Res.* 2006;35(1-2):151-62.
68. Chen LY, Chen JD. Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol.* 2003;23(20):7108-21.
69. Sanchez E, Webb RD, Rasmussen A, Kelly JA, Riba L, Kaufman KM. Genetically Determined Amerindian Ancestry Correlates With Increased Frequency of Risk Alleles for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism.* 2010;62(12):3722-3729.
70. Hsieh YY, Lin YJ, Chang CC, Chen DY, Hsu CM, Wang YK, et al. Human lymphocyte antigen B-associated transcript 2, 3, and 5 polymorphisms and haplotypes are associated with susceptibility of Kawasaki disease and coronary artery aneurysm. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(4):262-8.
71. Ali S, Chopra R, Aggarwal S, Srivastava AK, Kalaiarasan P, Malhotra D, et al. Association of variants in BAT1-LTA-TNF-BTNL2 genes within 6p21.3 region show graded risk to leprosy in unrelated cohorts of Indian population. *Hum Genet.* 2012;131(5):703-16.
72. Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, et al. Significance of C2/CFB variants in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(2):794-8.
73. Cipriani V, Leung HT, Plagnol V, Bunce C, JC Khan JC, Shahid H, et al. Genome-wide association study of age-related macular degeneration identifies associated variants in the TNXB-FKBPL-NOTCH4 region of chromosome 6p21.3. *Hum Mol Genet.* 2012;21(18):4138-50.
74. Fujikura D, Ito M, Chiba S, Harada T, Perez F, Reed JC, et al. CLIPR-59 regulates TNF- α -induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1. *Cell Death Dis.* 2012;3:e264.
75. Bilate, AMB. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de Reumatologia Clinica*, 2007; 2(8):47-51.

Frequência de alelos, genótipos e carreador dos marcadores da região 6p21 que não apresentaram significância estatística nos grupos controle e pacientes e dados de OR e *p*-valor da análise comparativa destas frequências sem e com correção.

SNP	Alelos ou Genótipos	Frequência em controles	Frequência em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
<i>ABCF1</i> rs3130244	A	0,34	0,36	1,08 (0,58)	1,08 (0,59)
	C	0,66	0,64	*	*
	AA	38 (0,11)	47 (0,12)	1,16 (0,54)	1,15 (0,55)
	CA	164 (0,46)	196 (0,48)	1,12 (0,45)	1,11 (0,46)
	CC	153 (0,43)	163 (0,40)	*	*
	Carreadores A			1,12 (0,41)	1,12 (0,42)
		n=355	n=406		
<i>ABCF1</i> rs3132610	A	0,96	0,97	*	*
	G	0,04	0,06	0,90 (0,79)	0,89 (0,77)
	AA	330 (0,93)	379 (0,93)	*	*
	AG	25 (0,07)	26 (0,06)	0,90 (0,73)	0,89 (0,71)
	GG	1 (0,00)	1 (0,00)	0,87 (0,92)	0,84 (0,90)
	Carreadores G			0,90 (0,72)	0,89 (0,69)
		n=356	n=406		
<i>AIFI</i> rs2269475	A	0,13	0,12	0,92 (0,73)	0,92 (0,73)
	G	0,87	0,88	*	*
	AA	9 (0,03)	5 (0,01)	0,48 (0,1)	0,48 (0,20)
	AG	72 (0,20)	86 (0,21)	1,04 (0,81)	1,04 (0,80)
	GG	275 (0,77)	315 (0,78)	*	*
	Carreadores A			0,98 (0,91)	0,98 (0,92)
		n= 356	n= 406		
<i>APOBEC2</i> rs1014737	A	0,88	0,89	*	*
	T	0,12	0,11	0,98 (0,93)	0,98 (0,94)
	AA	280 (0,79)	319 (0,79)	*	*
	AT	70 (0,20)	82 (0,20)	1,02 (0,87)	1,03 (0,86)
	TT	6 (0,06)	5 (0,01)	0,73 (0,60)	0,73 (0,61)
	Carreadores T			1,00 (0,97)	1,00 (0,96)
		n=356	n=406		

	A	0,46	0,45	0,95 (0,77)	0,95 (0,77)
	C	0,54	0,55	*	*
APOBEC2 rs2057002	AA	79 (0,31)	80 (0,20)	0,89 (0,60)	0,90 (0,61)
	AC	166 (0,47)	202 (0,50)	1,07 (0,64)	1,07 (0,67)
	CC	110 (0,31)	124 (0,31)	*	*
	Carreadores A			1,02 (0,89)	1,01 (0,90)
		n= 355	n= 406		
	A	0,8	0,84	*	*
	G	0,2	0,16	0,80 (0,23)	0,79 (0,22)
APOBEC2 rs2076472	AA	231 (0,65)	282 (0,62)	*	*
	AG	111 (0,31)	116 (0,29)	0,85 (0,33)	0,84 (0,29)
	GG	14 (0,04)	8 (0,02)	0,46 (0,09)	0,46 (0,08)
	Carreadores G			0,81 (0,17)	0,80 (0,15)
		n= 356	n= 406		
	A	0,14	0,13	0,96 (0,84)	0,94 (0,78)
	C	0,86	0,87	*	*
BAKI rs11757379	AA	0,03	0,02	0,78 (0,60)	0,75 (0,54)
	CA	0,22	0,22	1,00 (0,97)	0,99 (0,95)
	CC	0,75	0,75	*	*
	Carreadores A			0,98 (0,90)	0,96 (0,83)
		n=356	n=406		
	A	0,18	0,19	1,10 (0,58)	1,10 (0,58)
	G	0,82	0,81	*	*
BAKI rs210137	AA	0,03	0,04	1,52 (0,29)	1,55 (0,28)
	AG	0,29	0,30	1,03 (0,82)	1,03 (0,84)
	GG	0,68	0,66	*	*
	Carreadores A			1,07 (0,62)	1,07 (0,63)
		n=356	n=406		

	A	0,48	0,51	1,11 (0,43)	1,11 (0,46)
	C	0,52	0,49	*	*
BAKI rs210139	AA	0,23	0,27	1,24 (0,27)	1,23 (0,30)
	AC	0,49	0,48	1,03 (0,85)	1,02 (0,89)
	CC	0,27	0,25	*	*
	Carreadores A			1,10 (0,55)	1,09 (0,59)
		n= 356	n= 406		
	A	0,05	0,06	1,28 (0,44)	1,27 (0,46)
	G	0,95	0,94	*	*
BAT5 rs1266071	AA				
	AG	34 (0,1)	49 (0,12)	1,29 (0,26)	1,28 (0,28)
	GG	322 (0,9)	357 (0,88)	*	*
	Carreadores A			1,29 (0,26)	1,28 (0,28)
		n= 356	n= 406		
	A	0,14	0,12	0,9 (0,62)	0,9 (0,64)
	C	0,86	0,88	*	*
C2 rs547154	AA	7 (0,02)	11 (0,03)	1,32 (0,56)	1,34 (0,55)
	AC	83 (0,23)	79 (0,20)	0,80 (0,21)	0,80 (0,22)
	CC	265 (0,75)	315 (0,78)	*	*
	Carreadores A			0,84 (0,31)	0,84 (0,32)
		n= 355	n= 405		
	A	0,19	0,22	1,19 (0,31)	1,20 (0,30)
	G	0,81	0,78	*	*
CFB rs12614	AA	25 (0,07)	36 (0,09)	1,35 (0,27)	1,36 (0,25)
	AG	86 (0,25)	105 (0,27)	1,14 (0,41)	1,15 (0,40)
	GG	25 (0,07)	254 (0,64)	*	*
	Carreadores A			1,19 (0,25)	1,20 (0,23)
		n= 350	n= 395		

CFB rs2072633	A	0,43	0,41	0,91 (0,55)	0,91 (0,55)
	G	0,57	0,59	*	*
	AA	72 (0,20)	64 (0,16)	0,78 (0,25)	0,78 (0,25)
	AG	164 (0,46)	206 (0,51)	1,10 (0,52)	1,10 (0,54)
	GG	120 (0,34)	136 (0,33)	*	*
	Carreadores A			1,00 (0,95)	1,00 (0,96)
		n=356	n=406		
CFB rs537160	A	0,24	0,25	1,03 (0,85)	1,02 (0,86)
	G	0,76	0,75	*	*
	AA	29 (0,08)	23 (0,06)	0,74 (0,30)	0,74 (0,31)
	AG	116 (0,33)	157 (0,39)	1,26 (0,13)	1,25 (0,14)
	GG	211 (0,59)	266 (0,56)	*	*
	Carreadores A			1,15 (0,31)	1,15 (0,32)
		n=356	n=406		
CNPY3 rs2234185	A	0,37	0,36	0,96 (0,80)	0,95 (0,77)
	G	0,63	0,64	*	*
	AA	51 (0,14)	50 (0,12)	0,86 (0,52)	0,84 (0,47)
	AG	161 (0,45)	194 (0,48)	1,06 (0,69)	1,05 (0,71)
	GG	142 (0,40)	161 (0,40)	*	*
	Carreadores A			1,01 (0,91)	1,00 (0,95)
		n= 354	n= 405		
CNPY3 rs4714634	A	0,42	0,44	1,08 (0,60)	1,07 (0,61)
	G	0,58	0,56	*	*
	AA	59 (0,17)	77 (0,19)	1,19 (0,40)	1,18 (0,41)
	AG	179 (0,50)	200 (0,49)	1,02 (0,89)	1,01 (0,91)
	GG	118 (0,33)	129 (0,32)	*	*
	Carreadores A			1,06 (0,68)	1,06 (0,70)
		n= 356	n= 406		

	A	0,28	0,27	0,91 (0,56)	0,91 (0,58)
	C	0,72	0,73	*	*
<i>CNPY3</i> rs9471969	AA	28 (0,08)	24 (0,06)	0,72 (0,27)	0,72 (0,28)
	AC	146 (0,41)	168 (0,41)	0,97 (0,85)	0,97 (0,87)
	CC	181 (0,51)	214 (0,53)	*	*
	Carreadores A			0,93 (0,63)	0,93 (0,65)
		n=355	n=406		
	A	0,43	0,42	0,98 (0,89)	0,97 (0,88)
	G	0,57	0,58	*	*
<i>DAXX</i> rs3130018	AA	73 (0,21)	81 (0,20)	0,96 (0,84)	0,95 (0,83)
	AG	160 (0,45)	183 (0,45)	0,99 (0,95)	0,99 (0,97)
	GG	123 (0,35)	142 (0,35)	*	*
	Carreadores A			0,98 (0,90)	0,98 (0,91)
		n= 356	n= 406		
	A	0,14	0,15	1,10 (0,62)	1,10 (0,64)
	G	0,86	0,85	*	*
<i>DEFB110</i> rs12208740	AA	7 (0,02)	11 (0,03)	1,82 (0,22)	1,84 (0,21)
	GA	99 (0,24)	86 (0,24)	1,00 (0,97)	0,99 (0,98)
	GG	300 (0,74)	259 (0,73)	*	*
	Carreadores A			1,06 (0,72)	1,05 (0,76)
		n=356	n=406		
	A	0,71	0,71	*	*
	G	0,29	0,29	0,99 (0,99)	1,01 (0,94)
<i>DEFB112</i> rs628337	AA	182 (0,51)	212 (0,52)	*	*
	AG	141 (0,40)	152 (0,37)	0,92 (0,61)	0,93 (0,67)
	GG	33 (0,09)	42 (0,10)	1,09 (0,72)	1,11 (0,67)
	Carreadores G			0,95 (0,76)	0,96 (0,83)
		n=356	n=406		

	A	0,15	0,14	0,89 (0,57)	0,89 (0,59)
	G	0,85	0,86	*	*
DEFB112 rs7739604	AA	11 (0,03)	7 (0,02)	0,54 (0,22)	0,54 (0,21)
	AG	85 (0,24)	96 (0,24)	0,97 (0,88)	0,98 (0,92)
	GG	260 (0,73)	301 (0,75)	*	*
	Carreadores A			0,92 (0,64)	0,93 (0,67)
		n=356	n=404		
	A	0,08	0,09	1,19 (0,50)	1,20 (0,48)
	G	0,92	0,91	*	*
DEFB114 rs17736782	AA	0,01	0,00	0,23 (0,19)	0,23 (0,20)
	GA	0,13	0,18	1,39 (0,10)	1,40 (0,10)
	GG	0,85	0,82	*	*
	Carreadores A			1,30 (0,18)	1,31 (0,17)
		n=356	n=406		
	A	0,45	0,47	1,05 (0,72)	1,05 (0,74)
	C	0,55	0,53	*	*
DEFB114 rs9349509	AA	0,21	0,23	1,12 (0,58)	1,11 (0,61)
	CA	0,49	0,48	0,99 (0,97)	0,99 (0,95)
	CC	0,30	0,29	*	*
	Carreadores A			1,03 (0,85)	1,03 (0,87)
		n=354	n=406		
	A	0,04	0,03	0,94 (0,87)	0,93 (0,86)
	G	0,96	0,97	*	*
FLOT1 rs1059612	AA	2 (0,01)	1 (0,00)	0,43 (0,50)	0,41 (0,47)
	AG	22 (0,06)	26 (0,06)	1,03 (0,90)	1,03 (0,91)
	GG	332 (0,93)	379 (0,93)	*	*
	Carreadores A			0,98 (0,95)	0,98 (0,95)
		n=356	n=406		

	A	0,12	0,1	0,78 (0,29)	0,77 (0,27)
	C	0,88	0,9	*	*
<i>FLOT1</i> rs28844704	AA	7 (0,02)	3 (0,01)	0,35 (0,14)	0,33 (0,12)
	AC	71 (0,20)	72 (0,18)	0,85 (0,38)	0,83 (0,34)
	CC	278 (0,78)	331 (0,82)	*	*
	Carreadores A			0,80 (0,23)	0,79 (0,20)
		n= 356	n= 406		
	A	0,7	0,72	*	*
	G	0,3	0,28	0,90 (0,55)	0,91 (0,57)
<i>FLOT1</i> rs3094127	AA	181 (0,51)	212 (0,52)	*	*
	AG	138 (0,39)	162 (0,40)	1,00 (0,98)	1,00 (0,97)
	GG	37 (0,10)	32 (0,08)	0,73 (0,24)	0,74 (0,26)
	Carreadores G			0,94 (0,70)	0,95 (0,72)
		n= 356	n= 406		
	A	0,14	0,12	0,85 (0,48)	0,86 (0,48)
	G	0,86	0,88	*	*
<i>HLADP A1</i> rs1367728	AA	9 (0,03)	315 (0,78)	0,84 (0,71)	0,84 (0,72)
	GA	82 (0,23)	82 (0,20)	1,19 (0,32)	0,84 (0,33)
	GG	265 (0,74)	9 (0,02)	*	*
	Carreadores A			0,84 (0,30)	0,84 (0,31)
		n=356	n=406		
	A	0,31	0,32	1,06 (0,67)	1,06 (0,67)
	G	0,69	0,68	*	*
<i>HLADP A1</i> rs23010220	AA	36 (0,10)	38 (0,09)	0,99 (0,99)	1,00 (0,98)
	AG	146 (0,41)	184 (0,45)	1,19 (0,25)	1,19 (0,25)
	GG	174 (0,49)	184 (0,45)	*	*
	Carreadores A			1,15 (0,32)	1,15 (0,32)
		n=356	n=406		

	A	0,16	0,2	1,31 (0,15)	1,31 (0,15)
	G	0,84	0,8	*	*
<i>HLADP A1</i> rs2301226	AA	10 (0,03)	18 (0,04)	1,73 (0,17)	1,74 (0,16)
	AG	92 (0,26)	124 (0,31)	1,29 (0,11)	1,29 (0,11)
	GG	254 (0,71)	264 (0,65)	*	*
	Carreadores A			1,33 (0,06)	1,33 (0,06)
		n= 356	n= 406		
	A	0,22	0,2	0,88 (0,48)	0,88 (0,49)
	G	0,78	0,8	*	*
<i>HLADP A1</i> rs9277342	AA	18 (0,05)	15 (0,04)	0,69 (0,32)	0,70 (0,33)
	AG	119 (0,33)	130 (0,32)	0,91 (0,57)	0,91 (0,59)
	GG	219 (0,62)	261 (0,64)	*	*
	Carreadores A			0,88 (0,42)	0,89 (0,44)
		n= 356	n= 406		
	A	0,71	0,69	*	*
	G	0,29	0,31	1,09 (0,55)	1,09 (0,55)
<i>HLADP B1</i> rs2071353	AA	179 (0,50)	189 (0,47)	*	*
	AG	143 (0,40)	179 (0,44)	1,18 (0,26)	1,18 (0,26)
	GG	33 (0,09)	38 (0,09)	1,09 (0,73)	1,09 (0,72)
	Carreadores G			1,16 (0,28)	1,16 (0,28)
		n=355	n=406		
	A	0,35	0,38	1,13 (0,40)	1,13 (0,40)
	G	0,65	0,62	*	*
<i>HLADP B1</i> rs3135021	AA	50 (0,14)	57 (0,14)	1,15 (0,52)	1,15 (0,52)
	AG	150 (0,42)	195 (0,48)	1,31 (0,07)	1,31 (0,08)
	GG	156 (0,44)	154 (0,38)	*	*
	Carreadores A			1,27 (0,09)	1,27 (0,1)
		n=356	n=404		

	A	0,37	0,38	1,04 (0,74)	1,04 (0,74)
	C	0,63	0,62	*	*
HLADP B1 rs9277469	AA	55 (0,15)	51 (0,13)	0,92 (0,73)	0,93 (0,74)
	CA	152 (0,43)	206 (0,51)	1,35 (0,05)	1,34 (0,05)
	CC	149 (0,42)	149 (0,37)	*	*
	Carreadores A			1,24 (0,14)	1,23 (0,15)
		n=356	n=406		
	A	0,12	0,14	1,27 (0,26)	1,27 (0,26)
	G	0,88	0,86	*	*
IER3 rs8512	AA	3 (0,01)	5 (0,01)	1,56 (0,54)	1,59 (0,52)
	GA	77 (0,22)	107 (0,26)	1,30 (0,12)	1,29 (0,12)
	GG	276 (0,78)	294 (0,72)	*	*
	Carreadores A			1,31 (0,10)	1,31 (0,10)
		n=356	n=406		
	A	0,25	0,22	0,84 (0,31)	0,84 (0,31)
	C	0,75	0,78	*	*
LST1 rs2256974	AA	23 (0,03)	18 (0,04)	0,63 (0,17)	0,64 (0,17)
	AC	134 (0,38)	144 (0,36)	0,87 (0,38)	0,87 (0,39)
	CC	198 (0,56)	243 (0,60)	*	*
	Carreadores A			0,84 (0,23)	0,84 (0,24)
		n=355	n=406		
	A	0,71	0,71	*	*
	G	0,29	0,29	0,99 (0,96)	0,99 (0,98)
LTA rs2229094	AA	181 (0,51)	213 (0,52)	*	*
	AG	143 (0,40)	151 (0,37)	0,89 (0,48)	0,90 (0,50)
	GG	32 (0,09)	42 (0,10)	1,11 (0,48)	1,11 (0,66)
	Carreadores G			0,93 (0,65)	0,94 (0,68)
		n= 352	n= 403		

	A	0,92	0,93	*	*
	C	0,08	0,07	0,86 (0,59)	0,86 (0,59)
<i>LTB</i> rs3093553	AA	300 (0,85)	348 (0,86)	*	*
	AC	52 (0,15)	58 (0,14)	0,96 (0,84)	0,96 (0,85)
	CC	3 (0,01)	0	0 (0,97)	0 (0,97)
	Carreadores C			0,90 (0,64)	0,91 (0,64)
		n=355	n=406		
	A	0,18	0,18	1,02 (0,89)	1,03 (0,85)
	G	0,82	0,82	*	*
<i>MAPK13</i> rs2071863	AA	12 (0,03)	13 (0,03)	0,43 (0,92)	0,97 (0,94)
	AG	103 (0,29)	122 (0,30)	1,05 (0,74)	1,06 (0,70)
	GG	240 (0,68)	270 (0,67)	*	*
	Carreadores A			1,04 (0,78)	1,05 (0,73)
		n= 355	n= 405		
	A	0,63	0,61	*	*
	G	0,37	0,39	1,06 (0,66)	1,07 (0,61)
<i>MAPK13</i> rs2071864	AA	140 (0,39)	152 (0,38)	*	*
	AG	167 (0,47)	192 (0,47)	1,05 (0,71)	1,07 (0,64)
	GG	49 (0,14)	61 (0,15)	1,14 (0,54)	1,17 (0,48)
	Carreadores G			1,07 (0,61)	1,09 (0,54)
		n= 356	n= 405		
	A	0,3	0,28	0,93 (0,65)	0,92 (0,63)
	C	0,7	0,72	*	*
<i>MAPK13</i> rs2859141	AA	30 (0,08)	32 (0,08)	0,89 (0,67)	0,87 (0,62)
	CA	152 (0,43)	166 (0,41)	0,91 (0,55)	0,91 (0,53)
	CC	174 (0,49)	208 (0,51)	*	*
	Carreadores A			0,91 (0,51)	0,90 (0,49)
		n=356	n=406		

	A	0,76	0,76	*	*
	C	0,24	0,24	1,00 (0,97)	1,00 (0,97)
MSH5 rs2075788	AA	210 (0,60)	239 (0,60)	*	*
	AC	115 (0,33)	131 (0,33)	1,00 (0,99)	1,00 (0,96)
	CC	25 (0,07)	29 (0,07)	1,01 (0,94)	1,00 (0,98)
	Carreadores C			1,00 (0,97)	1,00 (0,96)
		n=350	n=399		
	A	0,09	0,08	0,80 (0,40)	0,80 (0,39)
	G	0,91	0,92	*	*
MSH5 rs3117572	AA	8 (0,02)	3 (0,01)	0,31 (0,09)	0,31 (0,09)
	AG	50 (0,14)	56 (0,14)	0,95 (0,82)	0,95 (0,81)
	GG	295 (0,84)	346 (0,85)	*	*
	Carreadores A			0,86 (0,47)	0,86 (0,46)
		n= 353	n= 405		
	A	0,30	0,33	1,13 (0,43)	1,12 (0,35)
	T	0,7	0,67	*	*
NCR3 rs1052248	AA	37 (0,10)	52 (0,13)	1,30 (0,26)	1,30 (0,26)
	AT	143 (0,40)	165 (0,41)	1,07 (0,64)	1,07 (0,63)
	TT	176 (0,49)	189 (0,47)	*	*
	Carreadores A			1,12 (0,42)	1,12 (0,42)
		n= 356	n= 406		
	A	0,92	0,89	*	*
	G	0,08	0,11	1,42 (0,15)	1,42 (0,15)
NCR3 rs986475	AA	302 (0,85)	323 (0,80)	*	*
	AG	50 (0,14)	75 (0,18)	1,40 (0,08)	1,40 (0,08)
	GG	4 (0,01)	8 (0,02)	1,87 (0,31)	1,89 (0,30)
	Carreadores G			1,43 (0,05)	1,43 (0,05)
		n= 356	n= 406		

	A	0,42	0,44	*	*
	G	0,58	0,56	0,94 (0,71)	0,94 (0,71)
<i>NFKB1E</i>					
rs2233437	AA	61 (0,17)	75 (0,18)	1,12 (0,58)	1,12 (0,58)
	AG	179 (0,50)	204 (0,50)	1,04 (0,80)	1,04 (0,80)
	GG	116 (0,33)	127 (0,31)	*	*
	Carreadores G			0,91 (0,63)	0,91 (0,62)
		n= 356	n= 406		
	A	0,11	0,9	0,90 (0,65)	0,90 (0,68)
	C	0,89	0,1	*	*
<i>PSMB8</i>					
rs2071543	AA	7 (0,02)	1 (0,0)	0,12 (0,05)	0,12 (0,05)
	AC	65 (0,18)	80 (0,2)	1,07 (0,69)	1,08 (0,66)
	CC	284 (0,80)	325 (0,8)	*	*
	Carreadores A			0,98 (0,92)	0,99 (0,97)
		n= 356	n= 406		
	A	0,38	0,38	1,00 (0,95)	1,00 (0,97)
	G	0,62	0,62	*	*
<i>PSMB8</i>					
rs9276810	AA	49 (0,14)	54 (0,13)	0,98 (0,95)	0,98 (0,94)
	AG	169 (0,47)	198 (0,49)	1,04 (0,75)	1,04 (0,79)
	GG	138 (0,39)	154 (0,38)	*	*
	Carreadores A			1,03 (0,81)	1,02 (0,84)
		n= 356	n= 406		
	A	0,57	0,56	*	*
	G	0,43	0,44	1,05 (0,70)	1,05 (0,72)
<i>PSMB9</i>					
rs2071476	AA	122 (0,34)	119 (0,29)	*	*
	AG	161 (0,45)	213 (0,52)	1,35 (0,06)	1,35 (0,06)
	GG	73 (0,21)	74 (0,18)	1,03 (0,85)	1,03 (0,87)
	Carreadores G			1,25 (0,14)	1,25 (0,14)
		n= 356	n= 406		

<i>PSMB9</i> rs9276815	A	0,25	0,26	1,05 (0,76)	1,04 (0,78)
	G	0,75	0,74	*	*
	AA	21 (0,06)	30 (0,07)	1,26 (0,43)	1,25 (0,45)
	AG	138 (0,39)	153 (0,38)	0,97 (0,89)	0,97 (0,86)
	GG	197 (0,55)	223 (0,55)	*	*
Carreadores A			1,01 (0,90)	1,01 (0,93)	
		n= 356	n= 406		
<i>PTCRA</i> rs6901007	A	0,64	0,66	*	*
	C	0,36	0,34	0,90 (0,51)	0,89 (0,48)
	AA	139 (0,39)	169 (0,42)	*	*
	AC	173 (0,49)	196 (0,48)	0,93 (0,64)	0,92 (0,61)
	CC	43 (0,12)	41 (0,10)	0,78 (0,32)	0,76 (0,28)
Carreadores C			0,90 (0,48)	0,89 (0,45)	
		n= 355	n= 406		
<i>RXRB</i> rs2076310	A	0,7	0,71	*	*
	G	0,3	0,29	0,96 (0,82)	0,96 (0,81)
	AA	182 (0,51)	202 (0,50)	*	*
	AG	135 (0,38)	171 (0,42)	1,14 (0,39)	1,13 (0,40)
	GG	39 (0,11)	33 (0,08)	0,76 (0,29)	0,75 (0,28)
Carreadores G			1,05 (0,70)	1,05 (0,72)	
		n= 356	n= 406		
<i>SRF</i> rs4711741	A	0,23	0,25	1,05 (0,73)	1,06 (0,72)
	G	0,77	0,75	*	*
	AA	22 (0,06)	30 (0,07)	1,21 (0,51)	1,21 (0,51)
	AG	123 (0,35)	139 (0,34)	1,00 (0,96)	1,01 (0,94)
	GG	211 (0,59)	237 (0,58)	*	*
Carreadores A			1,03 (0,80)	1,04 (0,78)	
		n= 356	n= 406		

	A	0,12	0,15	1,25 (0,28)	1,16 (0,30)
	T	0,88	0,85	*	*
TAPBP rs9277972	AA	8 (0,02)	10 (0,02)	1,17 (0,73)	1,17 (0,74)
	AT	72 (0,20)	102 (0,25)	1,32 (0,10)	1,32 (0,11)
	TT	276 (0,78)	294 (0,72)	*	*
	Carreadores A			1,31 (0,10)	1,30 (0,11)
		n= 356	n= 406		
	A	0,04	0,03	0,62 (0,25)	0,63 (0,26)
	G	0,96	0,97	*	*
TNF rs3093661	AA	2 (0,01)	0	0 (0,97)	0 (0,97)
	AG	26 (0,07)	0,05	0,71 (0,26)	0,72 (0,28)
	GG	326 (0,92)	0,95	*	*
	Carreadores A			0,66 (0,16)	0,67 (0,18)
		n= 354	n= 406		
	A	0,91	0,92	*	*
	G	0,09	0,08	0,82 (0,45)	0,82 (0,45)
TNF rs3093662	AA	296 (0,83)	344 (0,85)	*	*
	AG	55 (0,15)	62 (0,15)	0,97 (0,87)	0,97 (0,88)
	GG	5 (0,01)	0	0 (0,97)	0 (0,97)
	Carreadores G			0,88 (0,55)	0,89 (0,55)
		n= 356	n= 406		
	G	0,49	0,5	1,03 (0,81)	1,03 (0,80)
	C	0,51	0,5	*	*
TREMI rs1817537	GG	81 (0,23)	101 (0,25)	*	*
	GC	187 (0,53)	200 (0,50)	0,92 (0,65)	0,92 (0,67)
	CC	88 (0,25)	101 (0,25)	1,07 (0,72)	1,07 (0,71)
	Carreadores G			0,96 (0,85)	0,97 (0,87)
		n= 356	n= 403		

	A	0,07	0,07	1,00 (0,98)	1,20 (0,20)
	G	0,93	0,93	*	*
TREMI rs2234243	AA	1 (0,0)	2 (0,0)	1,75 (0,64)	1,83 (0,62)
	AG	46 (0,13)	51 (0,13)	0,97 (0,89)	0,96 (0,87)
	GG	309 (0,87)	353 (0,87)	*	*
	Carreadores A			0,98 (0,95)	0,98 (0,94)
		n= 356	n= 406		
	A	0,22	0,2	0,86 (0,40)	0,85 (0,37)
	G	0,78	0,8	*	*
TREMI rs4711668	AA	17 (0,05)	12 (0,03)	0,58 (0,17)	0,57 (0,15)
	AG	123 (0,35)	135 (0,33)	0,91 (0,56)	0,90 (0,52)
	GG	216 (0,61)	259 (0,64)	*	*
	Carreadores A			0,87 (0,37)	0,86 (0,33)
		n= 356	n= 406		
	A	0,86	0,88	*	*
	G	0,14	0,12	0,84 (0,42)	0,84 (0,43)
TREMI rs6939973	AA	267 (0,75)	318 (0,78)	*	*
	AG	80 (0,22)	80 (0,20)	0,83 (0,32)	0,84 (0,33)
	GG	9 (0,03)	8 (0,02)	0,74 (0,55)	0,75 (0,56)
	Carreadores G			0,83 (0,27)	0,83 (0,29)
		n= 356	n= 406		
	A	0,83	0,82	*	*
	G	0,17	0,18	1,08 (0,68)	1,09 (0,63)
TREM2 rs7748513	AA	251 (0,71)	276 (0,68)	*	*
	AG	90 (0,25)	114 (0,28)	1,15 (0,39)	1,16 (0,35)
	GG	15 (0,04)	16 (0,04)	0,97 (0,93)	0,98 (0,97)
	Carreadores G			1,12 (0,45)	1,14 (0,39)
		n= 356	n= 406		

TAPI rs1057141	A	0,79	0,79	*	*
	G	0,21	0,21	1,02 (0,88)	1,02 (0,89)
	AA	227 (0,64)	247 (0,61)	*	*
	AG	111 (0,31)	147 (0,36)	1,21 (0,20)	1,21 (0,21)
	GG	18 (0,05)	12 (0,03)	0,61 (0,20)	0,60 (0,19)
	Carreadores G			1,13 (0,40)	1,13 (0,41)
		n= 356	n= 406		
TAPI rs2284190	A	0,89	0,89	*	*
	G	0,11	0,11	0,93 (0,77)	0,94 (0,82)
	AA	285 (0,80)	326 (0,80)	*	*
	AG	62 (0,17)	74 (0,18)	1,04 (0,82)	1,06 (0,74)
	GG	9 (0,03)	6 (0,01)	0,58 (0,31)	0,58 (0,31)
	Carreadores G			0,98 (0,93)	1,00 (0,98)
		n= 356	n= 406		
TAPI rs4148882	A	0,75	0,72	*	*
	G	0,25	0,28	1,19 (0,27)	1,18 (0,29)
	AA	206 (0,58)	213 (0,52)	*	*
	AG	124 (0,35)	157 (0,39)	1,22 (0,19)	1,21 (0,21)
	GG	26 (0,07)	36 (0,09)	1,33 (0,28)	1,33 (0,30)
	Carreadores G			1,24 (0,13)	1,23 (0,15)
		n= 356	n= 406		
HLA-A rs2499	A	0,07	0,08	1,31 (0,32)	1,31 (0,32)
	C	0,93	0,92	*	*
	AA	1 (0,0)	4 (0,01)	3,63 (0,24)	3,63 (0,24)
	AC	45 (0,13)	61 (0,15)	1,23 (0,32)	1,23 (0,32)
	CC	310 (0,87)	341 (0,84)	*	*
	Carreadores A			1,28 (0,22)	1,28 (0,22)
		n= 356	n= 406		

	A	0,75	0,72	*	*
	C	0,25	0,28	1,13 (0,42)	1,13 (0,43)
HLA-B rs1058026	AA	203 (0,57)	209 (0,51)	*	*
	AC	126 (0,35)	168 (0,41)	1,29 (0,09)	1,29 (0,09)
	CC	27 (0,08)	29 (0,07)	1,04 (0,88)	1,03 (0,90)
	Carreadores C			1,25 (0,12)	1,24 (0,12)
		n= 356	n= 406		
	A	0,62	0,64	*	*
	G	0,38	0,36	0,90 (0,50)	0,90 (0,51)
HLA-B rs2523608	AA	141 (0,40)	166 (0,41)	*	*
	AG	159 (0,45)	190 (0,47)	1,01 (0,92)	1,02 (0,88)
	GG	56 (0,16)	50 (0,12)	0,75 (0,22)	0,75 (0,22)
	Carreadores G			0,94 (0,71)	0,95 (0,75)
		n= 356	n= 406		
	A	0,13	0,12	0,91 (0,69)	0,91 (0,69)
	G	0,87	0,88	*	*
HLA-C rs1049853	AA	5 (0,01)	9 (0,02)	1,52 (0,45)	1,53 (0,44)
	AG	80 (0,22)	77 (0,19)	0,81 (0,25)	0,81 (0,25)
	GG	271 (0,76)	320 (0,79)	*	*
	Carreadores A			0,85 (0,37)	0,85 (0,37)
		n= 356	n= 406		
	C	0,15	0,15	1,04 (0,84)	1,04 (0,83)
	G	0,85	0,85	*	*
HLA-C rs2394885	CC	7 (0,02)	11 (0,03)	1,38 (0,50)	1,37 (0,51)
	CG	92 (0,26)	103 (0,25)	0,98 (0,92)	0,98 (0,94)
	GG	257 (0,72)	292 (0,72)	*	*
	Carreadores C			1,01 (0,93)	1,01 (0,91)
		n= 356	n= 406		

<i>HLA-C</i> rs2922997	A	0,54	0,52	*	*
	G	0,46	0,48	1,09 (0,52)	1,09 (0,51)
	AA	103 (0,29)	103 (0,25)	*	*
	AG	182 (0,51)	218 (0,54)	1,19 (0,29)	1,20 (0,28)
	GG	71 (0,20)	85 (0,21)	1,19 (0,39)	1,20 (0,38)
	Carreadores G			1,19 (0,26)	1,20 (0,25)
		n= 356	n= 406		
<i>TNFRSF 21</i> rs10807350	A	0,88	0,89	*	*
	G	0,12	0,11	0,89 (0,62)	0,88 (0,60)
	AA	275 (0,77)	323 (0,80)	*	*
	AG	76 (0,21)	77 (0,19)	0,86 (0,41)	0,85 (0,39)
	GG	5 (0,01)	6 (0,01)	1,02 (0,97)	0,97 (0,97)
	Carreadores G			0,87 (0,43)	0,86 (0,41)
		n= 356	n= 406		
<i>TNFRSF 21</i> rs11758366	A	0,83	0,85	*	*
	G	0,17	0,15	0,86 (0,45)	0,85 (0,43)
	AA	244 (0,69)	297 (0,73)	*	*
	AG	103 (0,29)	96 (0,24)	0,76 (0,10)	0,75 (0,09)
	GG	9 (0,03)	13 (0,03)	1,18 (0,69)	1,16 (0,72)
	Carreadores G			0,79 (0,16)	0,79 (0,14)
		n= 356	n= 406		
<i>TNFRSF 21</i> rs2103868	A	0,93	0,093	*	*
	G	0,07	0,07	0,92 (0,78)	0,91 (0,75)
	AA	310 (0,87)	356 (0,88)	*	*
	AG	41 (0,12)	46 (0,11)	0,97 (0,91)	0,96 (0,88)
	GG	5 (0,01)	4 (0,01)	0,69 (0,59)	0,68 (0,57)
	Carreadores G			0,94 (0,80)	0,93 (0,77)
		n= 356	n= 406		

	A	0,21	0,22	1,04 (0,81)	1,03 (0,84)
	C	0,79	0,78	*	*
<i>TNFRSF 21</i> rs2236035	AA	13 (0,04)	19 (0,05)	1,28 (0,49)	1,27 (0,51)
	AC	126 (0,35)	141 (0,35)	0,98 (0,93)	0,97 (0,89)
	CC	217 (0,61)	246 (0,61)	*	*
	Carreadores A			1,01 (0,91)	1,00 (0,96)
		n= 356	n= 406		
	A	0,77	0,78	*	*
	G	0,23	0,22	0,94 (0,74)	0,95 (0,79)
<i>TNFRSF 21</i> rs2281449	AA	212 (0,60)	249 (0,61)	*	*
	AG	125 (0,35)	136 (0,33)	0,92 (0,62)	0,93 (0,67)
	GG	19 (0,05)	21 (0,05)	0,94 (0,85)	0,95 (0,88)
	Carreadores G			0,92 (0,61)	0,93 (0,67)
		n= 356	n= 406		
	A	0,93	0,94	*	*
	G	0,07	0,06	0,81 (0,48)	0,80 (0,45)
<i>TNFRSF 21</i> rs2295257	AA	307 (0,86)	358 (0,88)	*	*
	AG	45 (0,13)	46 (0,11)	0,87 (0,55)	0,85 (0,50)
	GG	4 (0,01)	2 (0,01)	0,42 (0,32)	0,42 (0,32)
	Carreadores G			0,84 (0,42)	0,82 (0,37)
		n= 356	n= 406		
	A	0,83	0,81	*	*
	C	0,17	0,19	1,15 (0,44)	1,16 (0,43)
<i>TNFRSF 21</i> rs2295259	AA	243 (0,68)	267 (0,66)	*	*
	AC	107 (0,30)	125 (0,31)	1,06 (0,69)	1,06 (0,70)
	CC	6 (0,02)	14 (0,03)	2,12 (0,12)	2,18 (0,11)
	Carreadores C			1,11 (0,46)	1,12 (0,46)
		n= 356	n= 406		

	A	0,69	0,7	*	*
	C	0,31	0,3	0,93 (0,65)	0,92 (0,64)
<i>TNFRSF 21</i> rs6914371	AA	167 (0,47)	197 (0,49)	*	*
	AC	155 (0,44)	176 (0,43)	0,96 (0,80)	0,95 (0,77)
	CC	34 (0,10)	33 (0,08)	0,82 (0,46)	0,82 (0,46)
	Carreadores C			0,93 (0,65)	0,93 (0,63)
		n= 356	n= 406		
	A	0,61	0,61	*	*
	G	0,39	0,39	0,99 (0,99)	1,00 (0,97)
<i>TNFRSF 21</i> rs910554	AA	130 (0,37)	162 (0,40)	*	*
	AG	173 (0,49)	170 (0,42)	0,78 (0,13)	0,79 (0,14)
	GG	53 (0,15)	74 (0,18)	1,12 (0,59)	1,13 (0,56)
	Carreadores G			0,86 (0,33)	0,87 (0,36)
		n= 356	n= 406		
	A	0,57	0,59	*	*
	G	0,43	0,41	0,93 (0,66)	0,93 (0,67)
<i>TNFRSF 21</i> rs9473045	AA	68 (0,19)	69 (0,17)	0,86 (0,49)	0,86 (0,50)
	AG	167 (0,47)	194 (0,48)	0,98 (0,95)	0,99 (0,95)
	GG	121 (0,34)	142 (0,35)	*	*
	Carreadores G			1,14 (0,45)	1,14 (0,47)
		n= 356	n= 406		

* categoria referência

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

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

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

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

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

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

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

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

In this scenario, knowledge of the pathways triggered by pattern-recognition receptors, such as TLR1 and NOD2, is key to defining the outcome of leprosy. TLR1 and TLR2 cooperate to detect mycobacterial triacylated lipoproteins, while the activation of the TLR1/TLR2

Received 4 September 2012; accepted 7 January 2013.

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

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

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

The Journal of Infectious Diseases

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

DOI: 10.1093/infdis/jit133

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

METHODS

Subjects and Study Design

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

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

in the current study provided written informed consent. The study protocol was approved after revision by local ethical boards of participating institutions.

DNA Extraction and SNP Genotyping

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

Sequencing

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

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Culture

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

Cultures were kept at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for 18 hours (for the Bauru samples) or for 24 hours or 72 hours (for the Rio de Janeiro samples). After this, the cell suspension was harvested and centrifuged. For all samples, the supernatant was kept at -80°C for cytokine measurements; for the Bauru samples, the cell pellet was resuspended in the residual volume and evaluated by flow cytometry.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

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

Flow Cytometry

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

Comparative Modeling and Molecular Dynamics

The 8 haplotypes formed by polymorphisms at positions N248S, H305L, and P315L (NHL, NHP, NLL, NLP, SHL, SHP, SLL, and SLP) were incorporated into the crystal structure (PDB code 2Z7X) that corresponds to the NHP haplotype, using the Pymol program [24]. The simulations were run on Gromacs 4.5.4. [25]. The systems were energy minimized, using periodic boundary conditions, to fit the atomic positions to the GROMOS96 force field [26]. The net charge of the complexes was held neutral by adding 4 Na⁺ counterions. The equilibration phase consisted of 2 stages totaling 5 ns: a 3-ns stage to restrain the protein coordinates to their initial positions by applying harmonic potential with a spring constant K of 1000 kJ/(mol nm²) to stabilize water molecules around the protein at 100 K, 200 K, and 300 K, respectively, and a 2-ns stage at 310 K to keep the complexes free. After the equilibration period, simulations evolved freely for an additional 50 ns, saving trajectories and velocities every 5 ps for analysis of structural features.

Statistical Analyses

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

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

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

RESULTS

The N248S SNP Is Associated With Leprosy

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

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

Table 1. Genotype, Allele, and Carriage Frequencies Associated With the N248S and I602S Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) at *TLR1* in a Case-Control Study Involving Subjects From Bauru, São Paulo, Brazil

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

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

Bold values denote statistically significant results.

Abbreviation: OR, odds ratio.

^a By logistic regression analysis.

^b Adjusted for the covariates sex and ethnicity.

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

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

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

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

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

The N248S SNP Is Associated With Hyporesponsive Immune Activation

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

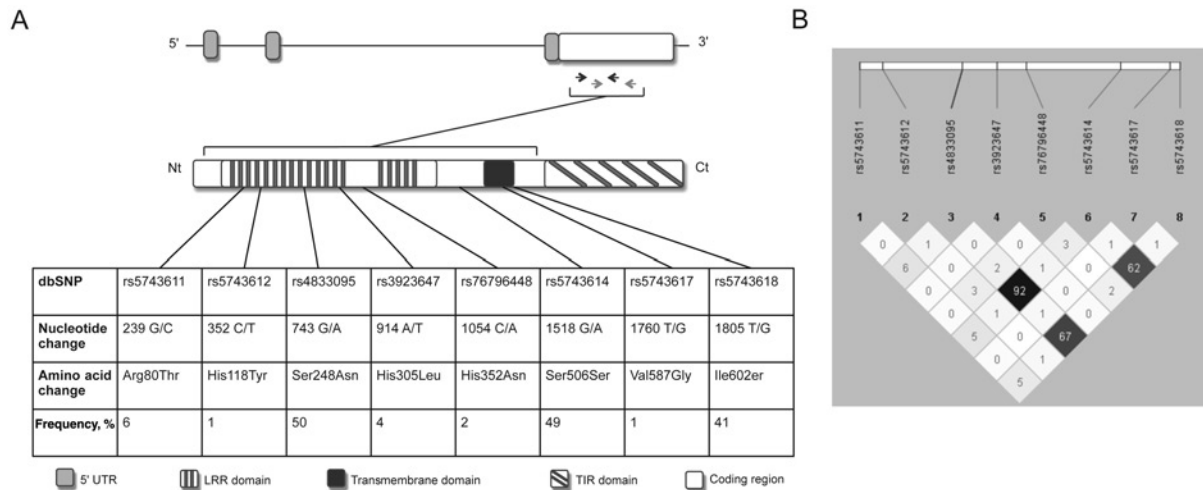


Figure 1. Detailed sequence analysis of the *TLR1* coding region in Brazilians. *A*, Schematics of *TLR1* exons (grey and white squares) and introns (lines). The arrows represent 2 polymerase chain reaction fragments encompassing the most important single-nucleotide polymorphisms (SNPs). A total of 1.823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

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

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

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

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

Bold values denote statistically significant results.

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

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

^b By logistic regression analysis.

^c Adjusted for the covariates sex and ethnicity.

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

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

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

Abbreviation: CI, confidence interval.

^a By logistic regression analysis.

^b Adjusted for the covariates sex and ethnicity.

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

DISCUSSION

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

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

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

Table 4. Genotype, Allele, and Carriage Frequencies Associated With the N248S Single-Nucleotide Polymorphism at *TLR1* in a Case-Control Study Combining Populations From Bauru, Rio de Janeiro, and Rondonopolis, Brazil

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

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

Abbreviation: CI, confidence interval.

^a By logistic regression analysis.

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

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

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

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

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

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

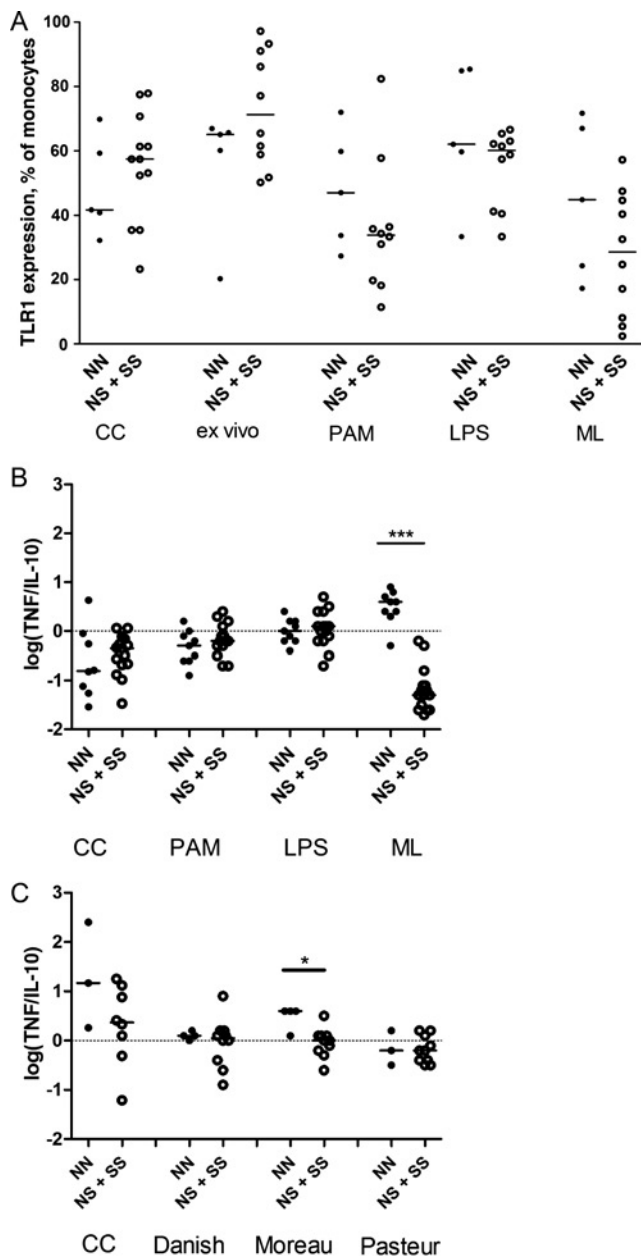


Figure 2. Surface expression of Toll-like receptor 1 (TLR1) on monocytes and the log of the ratio of the tumor necrosis factor level to the interleukin 10 (IL-10) level (TNF/IL-10) in noncarriers (NN) and carriers (NS + SS) of the S allele of N248S. *A*, Monocytes from healthy subjects were assessed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

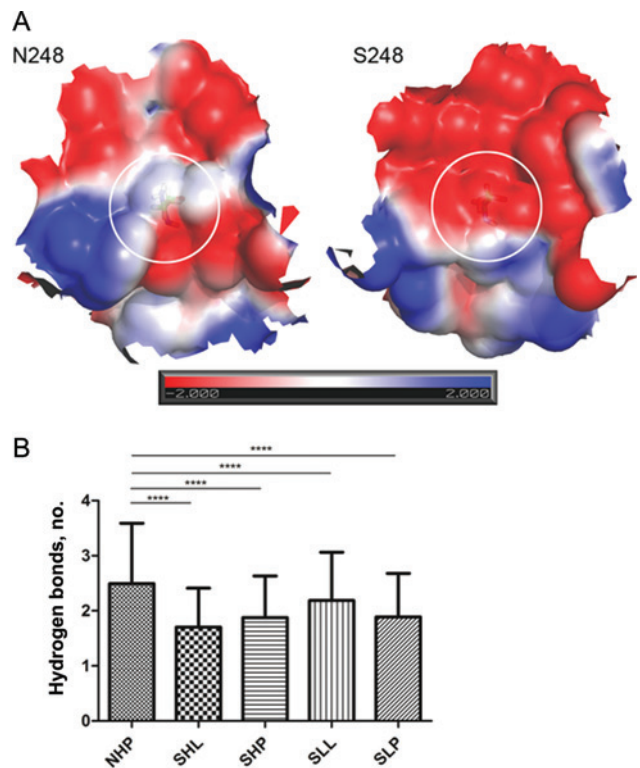


Figure 3. Effect of N248S in electrostatic profile and hydrogen bonds at TLR1. The variation at 248S residue was compared using N248/H305/P315 as a baseline. *A*, The figure corresponds to the initial state ($t = 0$ ns) for both haplotypes. The white circles encompass the N248 or S248 regions. Note the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

polymorphism. Indeed, a subtle decrease in water interaction 435
 may reflect a diminished ability of the TLR1 248S molecule to
 ligate to hydrophilic components. The molecular analysis adds
 important information suggesting that a decreased immune re-
 sponse, as measured by log(TNF/IL-10), could be associated
 with the molecular structure of TLR1 248S. 440

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases*
 online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of
 data provided by the author that are published to benefit the reader. The
 posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data 445
 are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding
 errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank Valcemir França, Suelen Moreira, and
 Cintia Oliveira Santos, for technical support; Anna Beatriz Robottom Ferre- 450
 ira, for the critical reading of the manuscript; the Ataulpho de Paiva Foun-
 dation, for kindly providing bacillus Calmette-Guerin strains; the Oswaldo

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

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

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **1997**; 388:394–7.
2. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis* **2012**; 205:934–43.
3. Taylor BD, Darville T, Ferrell RE, Kammerer CM, Ness RB, Haggerty CL. Variants in toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with *Chlamydia trachomatis* among women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis* **2012**; 205:603–9.
4. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* **2011**; 6:533–49.
5. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborgh PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* **2006**; 77:189–202.
6. Monot M, Honore N, Garnier T, et al. On the origin of leprosy. *Science* **2005**; 308:1040–2.
7. Monot M, Honore N, Garnier T, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* **2009**; 41:1282–9.
8. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* **2001**; 291:1544–7.
9. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **2006**; 311:1770–3.
10. Zhang FR, Huang W, Chen SM, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* **2009**; 361:2609–18.
11. Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet* **2010**; 127:337–48.
12. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* **2010**; 201:1422–35.
13. Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, et al. Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* **2007**; 178:7520–4.
14. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis* **2008**; 197:253–61.
15. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**; 2:e231.
16. Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2009**; 28:1055–65.
17. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* **2009**; 199:1816–9.
18. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1000979.
19. Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol* **2007**; 37:2280–9.
20. Uciechowski P, Imhoff H, Lange C, et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *J Leukoc Biol* **2011**; 90:377–88.
21. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1966**; 34:255–73.
22. World Health Organization (WHO). Guide to elimination of leprosy as a public health problem. 1st Ed. Geneva; 2000.
23. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun* **2009**; 10:174–80.
24. Schrodinger. The PyMOL molecular graphics system. Version 1.3r1. 2010. Open access available at: <http://www.pymol.org/>.
25. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* **2005**; 26:1701–18.
26. Daura X, Mark AE, Van Gunsteren WF. Parametrization of aliphatic CHn united atoms of GROMOS96 force field. *J Comput Chem* **1998**; 19:535–47.
27. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis* **2011**; 204:1256–63.
28. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, **2012**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/>.
29. Warnes G, Leisch F. Genetics: population genetics. R package. Version 120. **2012**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/genetics/genetics.pdf>.
30. Sinnwell J, Schaid DJ. Haplo.stats: statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous. R package. Version 122. **2013**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/haplo.stats.pdf>.
31. Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, Zeileis A. Coin: conditional inference procedures in a permutation test framework. R package. Version 10–2. **2012**. Open access available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/coin/coin.pdf>.
32. Allison DB. Transmission-disequilibrium tests for quantitative traits. *Am J Hum Genet* **1997**; 60:676–90.
33. Clayton D, Jones H. Transmission/disequilibrium tests for extended marker haplotypes. *Am J Hum Genet* **1999**; 65:1161–9.
34. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet* **2001**; 9:301–6.
35. Kazeem GR, Farrall M. Integrating case-control and TDT studies. *Ann Hum Genet* **2005**; 69:329–35.
36. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10–1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* **2008**; 123:477–84.
37. Nicodemus KK. Catmap: case-control and TDT meta-analysis package. *BMC Bioinformatics* **2008**; 9:130.
38. Omueti KO, Beyer JM, Johnson CM, Lyle EA, Tapping RI. Domain exchange between human Toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem* **2005**; 280:36616–25.
39. Xu Y, Tao X, Shen B, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **2000**; 408:111–5.
40. Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals Toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One* **2007**; 2:e1318.
41. Zhang F, Liu H, Chen S, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet* **2011**; 43:1247–51.
42. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* **2011**; 12:683–91.

- 585 43. Di Pietrantonio T, Hernandez C, Girard M, et al. Strain-specific differences in the genetic control of two closely related mycobacteria. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1001169.
44. Di Pietrantonio T, Correa JA, Orlova M, Behr MA, Schurr E. Joint effects of host genetic background and mycobacterial pathogen on susceptibility to infection. *Infect Immun* **2011**; 79:2372–8.
- 590 45. Randhawa AK, Shey MS, Keyser A, et al. Association of human TLR1 and TLR6 deficiency with altered immune responses to BCG vaccination in South African infants. *PLoS Pathog* **2011**; 7:e1002174.
46. Phillipps KS, Wykes MN, Liu XQ, Brown M, Blanchfield J, Toth I. A novel synthetic adjuvant enhances dendritic cell function. *Immunology* **2009**; 128:e582–8. 595
47. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev* **2011**; 239:178–96.
48. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. 600 Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **2003**; 24:528–33.