

Priscila Medeiros

“Epidemiologia genética em hanseníase: estudo de associação do gene *GATA3*”

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista - UNESP “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, em exame geral de qualificação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Carla Pereira Latini
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Vânia Nieto Brito de Souza

Botucatu – SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Medeiros, Priscila.

Epidemiologia genética em hanseníase : estudo de
associação do gene GATA3 / Priscila Medeiros. - Botucatu,
2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Ana Carla Pereira Latini

Coorientador: Vânia Nieto Brito de Souza

Capes: 20202008

1. Hanseníase. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Fator de
Transcrição GATA3. 4. Medicina tropical. 5. Epidemiologia
- Pesquisa.

Palavras-chave: Estudo de associação; Fator de transcrição
GATA-3; GATA3; Hanseníase; Polimorfismo genético.

Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena.

Quem quer passar além do Bojador

Tem que passar além da dor.

Deus ao mar o perigo e o abismo deu,

Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

Dedicatória

Dedico este trabalho, especialmente, à minha família (Eduardo, Ede, Jhonatan e Cleber) pelo apoio, confiança e respeito pelas minhas decisões. Obrigada pelo imensurável carinho e amor que temos. “...*são anjos enviados de Deus que eu escolhi amar...*”

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Carla Pereira Latini, pela credibilidade e confiança. Sou grata pela oportunidade e pelo conhecimento dado.

À coordenadora, Prof.^a Dr.^a Vânia Nieto Brito de Souza, pelo auxílio, sugestões e colaboração.

Aos meus companheiros de laboratório, Francisco, Weber e Priscila, que me deram suporte para a realização deste trabalho.

Aos participantes que fizeram parte deste estudo, não haveria pesquisa científica sem a contribuição de vocês.

Às minhas amigas-irmãs, Luiza, Luisa, Caroline, Isabela, Nádia, por todo apoio, conselho, amizade e companheirismo, vocês são peças-chaves na minha vida. *“Esta parte da minha vida, se chama felicidade.”*

Ao meu companheiro, Luís Gustavo, pelo apoio, carinho e paciência. *“...simplesmente assim, sem data, sem hora, apenas coincidências, ou será o destino?!”*

Aos amigos, Eduardo, Ícaro e Marcos, por estarem presentes durante esta etapa.

À Patrícia, Letícia De Lamano, Amanda, Eloise, Bruna, André, Beatriz, Keren, Rodrigo, Giovanna, Letícia e Mariane, pelo companheirismo e conselhos. Com certeza a amizade gerada ultrapassará o ambiente de trabalho.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), onde realizei também minha iniciação científica, e pesquisadores. Todos que passaram por fase da minha carreira serão lembrados com muito carinho e serei eternamente grata.

Aos Prof.(s) Dr.(s) Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza e Ana Paula Fávaro Trombone Garlet pela contribuição durante o exame de Qualificação.

Agradecimentos

Aos Prof.(s) Dr.(s) Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza e Milton Ozório Moraes, por
aceitarem o convite para composição da banca examinadora.

À Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu pelo suporte técnico.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Doenças Tropicais pelo suporte
técnico e acadêmico.

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade de São Paulo (USP) de
Bauru, por realizar as análises de citometria de fluxo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão
da bolsa de estudo.

À Fundação Paulista Contra a Hanseníase, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo (FEPESP) e CNPq/DECIT pelos auxílios financeiros, que viabilizaram a execução
deste trabalho.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a
realização deste trabalho.

Resumo

A hanseníase é uma doença de caráter complexa causada pelo *Mycobacterium leprae*, que é um patógeno intracelular obrigatório com predileção por macrófagos na pele e células de Schwann nos nervos periféricos. O genoma altamente conservado do bacilo sugere que o patógeno não seja o responsável pela variedade de fenótipos clínicos e biológicos observada na doença, atribuindo grande importância aos fatores genéticos do hospedeiro. Estudos de ligação do tipo *genome-wide* apontaram um *locus* de susceptibilidade para a doença na região cromossômica 10p13 e o gene *GATA3*, localizado na região 10p15, é um forte candidato a fazer parte dessa associação devido à sua localização no genoma e ao seu papel na resposta imune. O GATA-3 é um fator de transcrição clássico na diferenciação de células Th2, no entanto, sabe-se hoje que essa proteína possui outras funções importantes para o sistema imune. Nós empregamos a estratégia de estudo de associação do tipo caso-controle em série, utilizando duas amostras populacionais do Brasil com 1.633 indivíduos, para testar sete variantes genéticas do *GATA3*. Um estudo funcional também foi conduzido para avaliar o efeito dos polimorfismos associados sobre a expressão de GATA-3 e produção de citocinas. O alelo A do polimorfismo rs10905284 foi associado com resistência para a hanseníase em ambas as amostras. Na análise combinando as duas amostras este efeito do alelo A foi confirmado (OR 0,67; IC95%: 0,54-0,84; p=0,0004). A análise funcional mostrou que os indivíduos portadores do genótipo AA expressam altos níveis da proteína GATA-3 nos linfócitos. Portanto, nós confirmamos que o marcador rs10905284 está associado à hanseníase na população brasileira e influencia os níveis de expressão do fator de transcrição GATA-3.

Palavras-chave: hanseníase, *GATA3*, polimorfismo genético, estudo de associação, fator de transcrição GATA-3.

Abstract

Leprosy outcome is a complex trait and the host-pathogen-environment interaction defines the emergence of the disease. The causative agent of the disease, *Mycobacterium leprae*, exhibits a conserved genome and could not be accountable for the variety of outcomes observed from exposition, infection and disease. Thus, host genetic risk factors have been successfully associated to leprosy. The 10p13 chromosomal region was linked to leprosy in familial studies and the *GATA3* gene is a strong candidate to be part of this association due to its locus and the role that exerts in the immune response. The GATA-3 is a transcription factor involved in the Th2 cell differentiation, however, today it is recognized the ample role of this protein in the immune response. Here, we applied a stepwise strategy to test genetic variants at *GATA3* in two case-control samples from Brazil comprising a total of 1,633 individuals. A functional investigation was also conducted to evaluate the effect of the polymorphisms on the GATA-3 protein and the cytokines production. The A allele of rs10905284 marker was associated to leprosy resistance in both samples. In the analysis combining the two samples this effect was reinforced (OR 0,67; CI95%: 0,54-0,84; p=0,0004). The functional analysis showed that individuals carrying AA genotype express higher levels of GATA-3 protein in lymphocytes. So, we confirmed that the rs10905284 is a locus associated to leprosy in the Brazilian population and influences the levels of this transcription factor.

Keywords: leprosy, *GATA3*, polymorphisms, association study, GATA-3 transcription factor.

Lista de abreviações

OMS – Organização Mundial da Saúde
BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes
LAM – Lipoarabinomanana
PGL-1 – Glicolípido fenólico - 1
Ig – Imunoglobulina
M. leprae – *Mycobacterium leprae*
TN – Tamil Nadu
M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
VNTR – *Variable number tandem repeats*
STR – *Single tandem repeats*
SNP – Polimorfismos de base única
MHI – Hanseníase indeterminada
MHT – Hanseníase tuberculóide
MHD – Hanseníase dimorfa
MHV – Hanseníase virchowiana
TT – Forma tuberculóide-tuberculóide
DT – Forma dimorfa-tuberculóide
DD – Forma dimorfa-dimorfa
DV – Forma dimorfa-virchowiana
VV – Forma virchowiana-virchowiana
PB – Paucibacilar
MB – Multibacilar
ELISA – Ensaio imunoenzimático
NDO-BSA – *Natural disaccharide-octyl-bovine serum albumin*
LID-1 – *Leprosy IDRI diagnostic 1*
PQT – Poliquimioterapia
RR – Reação reversa
ENH – Eritema nodoso hansênico
APCs – Células apresentadoras de antígenos
NKs – Células *natural killer*
PRRs – Receptores de reconhecimento padrão

TLRs – Receptores do tipo Toll
NLRs – Receptores do tipo Nod
PAMP – Padrões moleculares associados ao patógeno
IL – Interleucina
IFN- γ – Interferon gama
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
DCs – Células dendríticas
TCD4⁺ – Linfócitos T CD4
T_n – Linfócitos T *naive*
T_h – Linfócitos T *helper*
Treg – Células T reguladoras
IMC – Imunidade mediada por células
HLA-DR – Antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1
TNF – Fator de necrose tumoral
T-bet – Fator de transcrição específico da resposta Th1
STAT – Ativador de fatores de transcrição
TCD8⁺ – Linfócito T citotóxico
TCR – receptor de células T
GATA-3 – Fator de transcrição específico da resposta Th2
FoxP3 – Fator de transcrição das células T reguladoras
ILCs – Células linfoides inatas
LD – Desequilíbrio de ligação
GWAS – *Genome Wide Association Study*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRIA	1
1.2 <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	3
1.2.1 Microbiologia	4
1.2.2 Genômica	5
1.3 TRANSMISSÃO	6
1.4 CLASSIFICAÇÃO	6
1.5 DIAGNÓSTICO	7
1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	8
1.6.1 Hanseníase Indeterminada	9
1.6.2 Tuberculóide-Tuberculóide (TT)	9
1.6.3 Virchowiana-Virchowiana (VV)	9
1.6.4 Dimorfos	10
1.6.5 Reações Hansênicas	10
1.7 TRATAMENTO	11
1.8 IMUNOLOGIA	11
1.8.1 Imunidade Inata	12
1.8.2 Imunidade Específica	13
1.8.2.1 Perfil de resposta Th1	13
1.8.2.2 Perfil de resposta Th2	14
1.9 GENÉTICA	17
1.9.1 Genética nas doenças infecciosas	17
1.9.2 Genética na hanseníase	19
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MANUSCRITO	25
1. INTRODUCTION	27
2. METHODS	28
2.1. Subjects and Study Design	28
2.2. SNPs selection	29

2.3.	<i>DNA Extraction and SNP genotyping</i>	29
2.4.	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Culture</i>	29
2.5.	<i>Flow Cytometry</i>	30
2.6.	<i>Cytokines measurement by CBA</i>	30
2.7.	<i>Statistical Analyses</i>	30
3.	RESULTS	31
3.1.	<i>A allele of the rs10905284 SNP at GATA3 gene is associated to leprosy resistance in Brazilian patients</i>	31
3.2.	<i>rs10905284 SNP at GATA3 gene modulates in vitro expression of GATA-3 in T cells</i>	32
3.3.	<i>rs10905284 SNP at GATA3 gene has no effect in the production of cytokines</i>	32
4.	DISCUSSION	32
	ACKNOWLEDGEMENTS	35
	REFERENCES	36
	LEGEND OF THE FIGURES	41
	TABLES	42
	FIGURES	45
	SUPPLEMENTARY MATERIAL	48
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 História

Conhecida desde os tempos Bíblicos, e até mesmo antes desta era, a hanseníase é uma doença crônica infecciosa causada por um patógeno intracelular, *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos.

Uma descrição característica de uma moléstia é necessária para que se possa datar a época do seu surgimento. A notória complexidade da hanseníase torna questionáveis as referências datadas do passado, já que nem todos estes registros fazem menções fidedignas à hanseníase que conhecemos hoje. Para os gregos, por exemplo, o termo *lepra* significava doenças escamosas cutâneas e, naquela época, eles categorizavam junto à hanseníase outras doenças, como o pênfigo, a psoríase e a elefantíase.¹ Por muito tempo a expressão *lepra* era designada para qualquer deformidade cutânea, como inflamações e ulcerações.² Assim, devido ao grande impacto estigmatizante que o termo *lepra* trazia, dentre outras sinônimas como mal de São Lázaro e Morfeia, o termo hanseníase foi sugerido por Abraão Rotberg na década de sessenta com intuito de minimizar o estigma.^{2,3,4}

As ideias mais aceitas sobre o surgimento da hanseníase são as oriundas de referências que corroboram com a ideia de que o início da doença se deu no continente Asiático, mais precisamente na Índia, através dos achados datados dos séculos XI ao XIV, e que sua disseminação pela Europa se deu através do retorno dos soldados gregos das tropas de Alexandre, o Grande. Da Grécia, acredita-se que a doença se espalhou por toda bacia do Mediterrâneo e, com os romanos, atingiu o oeste da Europa. Acredita-se que a disseminação para o Oriente se deu da Índia para a China, e daí para o Japão e ilhas do Pacífico.^{5,6}

A chegada da hanseníase ao continente americano se deu por volta dos séculos XVI e XVII e admite-se estar relacionada à colonização, visto que não há evidências da existência da mesma nas tribos nativas.^{2,5} No Brasil, acredita-se que seu ingresso sucedeu-se pelos colonizadores portugueses e espanhóis e sua ampliação se deu pela entrada de escravos africanos. Esta expansão é discutível, pois, segundo Opromolla¹, a negociação de escravos era difícil para aqueles que apresentassem qualquer tipo de lesão cutânea. No entanto, segundo Monteiro⁷, existe uma importância nessa via de introdução visto que os escravos eram provenientes de um continente endêmico e podem ter entrado no Brasil quando ainda estavam no período de incubação, ou seja, sem exibir qualquer manifestação aparente.

Os primeiros registros de hanseníase no Brasil são datados de 1600 no Rio de Janeiro.² Em São Paulo, a propagação foi mais tardia, por volta do século XVIII com o ciclo do ouro, e com um notável aumento no número de casos, que acompanhou o progresso do estado.⁷ Desde então, esforços globais tem sido realizados para eliminar a hanseníase do contexto de problemas de saúde pública.⁸

Apesar do estabelecimento de programas de controle da hanseníase e do crescente aumento de pesquisas na área, a doença ainda é considerada um problema de saúde pública mundial e nacional. Assim como outros países, desde 1991 o Brasil vem tentando alcançar metas de eliminação propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).^{9,10,11} No entanto, no último boletim fornecido pela OMS, o país permanece em segundo lugar em número de casos.¹² A média da prevalência global, ou seja, o número de doentes a cada dez mil habitantes, nos últimos três anos fica em torno de 221.000.^{13,14,12} No registro epidemiológico da OMS, o número global de casos novos durante o ano de 2014 foi de 213.899, sendo o Brasil encarregado por 14,5% (31.064) destes novos casos. O país líder em números de casos é a Índia, responsável por 62% (125.785) dos casos novos detectados em 2014.¹⁴

A alta prevalência observada no Brasil não está homogeneamente distribuída. Existem regiões, chamadas de *clusters*, que apresentam elevados índices epidemiológicos da doença, e, embora esses *clusters* estejam dispersos, eles se concentram mais nas regiões norte, nordeste e centro-oeste do país.¹⁵ A **Figura 1** mostra os dez principais *clusters* endêmicos nos últimos três anos. Dentre todos os estados dessas regiões, Mato Grosso lidera o ranking com maior prevalência da doença (7,69 por 10 mil habitantes).¹⁶ O estado de São Paulo, não é endêmico para a doença apresentando prevalência baixa (0,34 por 10 mil habitantes), no entanto, nos últimos três anos esta prevalência manteve-se revelando uma deficiência na eliminação de focos de transmissão.¹⁶

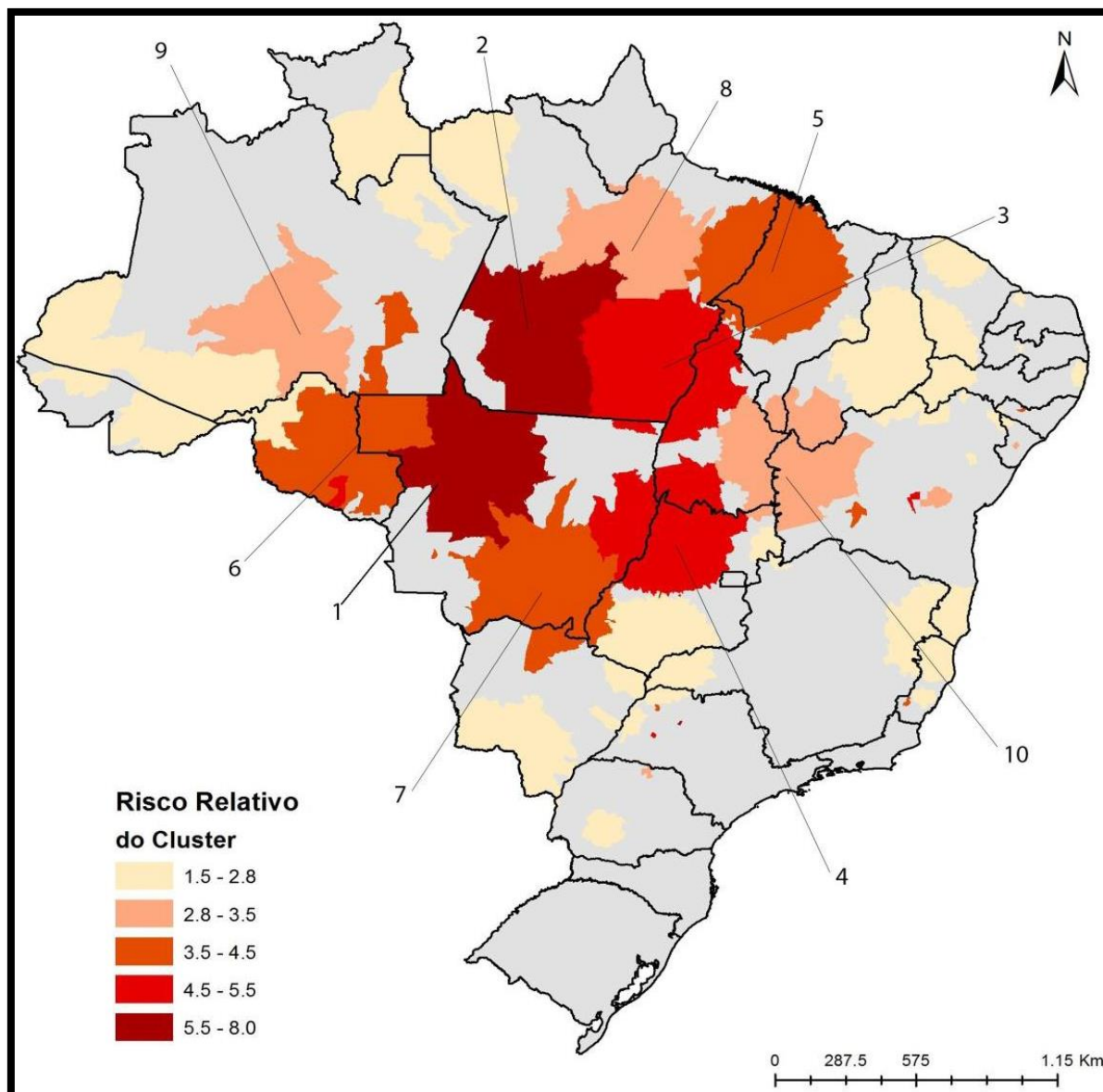


Figura 1. Localização dos dez principais *clusters* endêmicos no Brasil, no triênio 2011-2013. As cores representam as regiões onde se concentra os casos com risco maior para ocorrência da hanseníase. Fonte: MS/SVS/CGHDE-Sinan

1.2 *Mycobacterium leprae*

1.2.1 Microbiologia

Da ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, e gênero *Mycobacterium*; as micobactérias são organismos unicelulares, procariontes, não esporulados com comprimento de 1 a 4 μm e diâmetro 0,3 a 0,6 μm . São denominados como bacilos imóveis, retos ou ligeiramente encurvados, aeróbios e álcool-ácido resistentes (BAAR).^{17,18} Ziehl-Neelsen demonstrou a resistência desses micro-organismos à descoloração quando tratados com fucsina fenicada e em seguida lavados com álcool e ácido. A propriedade tintorial distinta é conferida pela presença de ácidos micólicos na parede celular que, mesmo quando a bactéria sofre desintegração da camada lipídica, de natureza hidrofóbica, permanece intacta.¹⁷

O primeiro contato do micro-organismo com o sistema imunológico é através da parede celular. As micobactérias em geral apresentam uma parede celular extremamente singular. Composta basicamente por lipídios, a identificação dos constituintes de parede permitiu detectar componentes exclusivos ao gênero *Mycobacterium*, como o peptideoglicano lipoarabinomanana (LAM), o micosídeo C, o glicolípido fenólico- 1 (PGL-1), dentre outros. O PGL-1, característico do *M. leprae*, apresenta na sua composição química um trissacarídeo que é um importante determinante antigênico deste patógeno. Desde a descoberta deste antígeno, a detecção de anticorpos anti-PGL-1, principalmente da classe de imunoglobulinas IgM¹⁹, tem sido uma ferramenta auxiliar importante no diagnóstico da hanseníase.²⁰ Ensaios sorológicos que quantificam níveis desses anticorpos remetem à carga bacilar do indivíduo e ao tipo de resposta imunológica frente à infecção.²¹

O bacilo da hanseníase foi descrito pela primeira vez por um médico norueguês, Gerhard H. A. Hansen, em 1873, e foi a primeira bactéria relacionada a uma doença humana. O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório com predileção por macrófagos na pele e tropismo pelas células de Schwann no sistema nervoso periférico. Estas células apresentam a laminina, um componente exclusivo na lâmina basal dos nervos periféricos, que é alvo de ligação para a entrada do bacilo.²² A medida que o bacilo invade a célula, busca regiões superficiais onde a temperatura fica em torno de 27°C a 30°C, como a pele e a mucosa nasal, e então se reproduz lentamente, em torno de 11 a 13 dias.

É possível que o longo período de replicação e a dificuldade na obtenção de bacilos *in vitro* seja consequência da evolução reducional que o *M. leprae* sofreu.^{23,24} No entanto, Shepard (1962) foi capaz de induzir granulomas contendo BAAR em patas de camundongos imunocompetentes após os mesmos serem inoculados com bactérias colhidas de *swab* nasal

ou de biópsias de casos de hanseníase em humanos.²⁵ A obtenção de bacilos pode ser realizada com diferentes linhagens de camundongos, isogênicos, imunocompetentes e imunodeficientes, como BALB/c, C57BL/6, *nude* (deficientes em células T) com background de BALB/c, C57BL/6 e de *swiss*. No entanto, o *nude* com background de BALB/c é mais rentável na obtenção de bacilos, atingindo 10¹⁰ micro-organismos em seis a nove meses.^{26,27}

1.2.2 Genômica

A dificuldade na obtenção de cultura *in vitro* do *M. leprae* é um dos reflexos da evolução reducional que o bacilo sofreu.^{23,26} Essa característica, dentre outras, só foi possível após o sequenciamento completo do genoma circular do bacilo (cepa Tamil Nadu - TN) que assinalou um marco histórico na genética do micro-organismo.^{6,28}

Com o sequenciamento genômico foi possível realizar análises genômicas e proteômicas comparativas com o *Mycobacterium tuberculosis* e, portanto, constatar perdas significativas de genes de grande impacto no metabolismo do *M. leprae*. Enquanto o *M. tuberculosis* apresenta 3959 genes codificadores de proteínas, o *M. leprae* apresenta apenas 1604 genes.²³ Na análise comparativa observou-se também que cerca de 1500 genes funcionais são comuns para ambos e que 27% do genoma do *M. leprae* trata-se de pseudogenes.^{29,30}

Do ponto de vista funcional dos genes, foram observadas vias anabólicas íntegras, porém, mutações em genes envolvidos na regulação, na detoxificação, no reparo de DNA e no transporte de metabólitos foram encontradas.³¹ A brutal diferença entre os dois micro-organismos, de comum ancestralidade, sugere que o *M. leprae*, ao longo de sua evolução, adaptou em seu genoma um conjunto mínimo de genes que o possibilitou sobreviver no interior das células de hospedeiros e causar a doença.^{24,30}

A identificação de marcadores moleculares, como os VNTRs (do inglês *variable number of tandem repeats*), STRs (do inglês *single tandem repeats*) e SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphisms*), permitiu identificar a variabilidade de cepas do *M. leprae* e, com isso, possibilitou traçar rotas migratórias da doença, bem como definir a evolução dessas cepas.^{6,24}

1.3 Transmissão

O contato íntimo e prolongado de uma pessoa saudável com um paciente multibacilar tem sido considerado como o principal meio de transmissão da hanseníase. Embora as portas de saída e entrada do bacilo permaneçam desconhecidas, acredita-se que a principal via, para ambas, seja as vias aéreas superiores por meio da expulsão e inalação de aerossóis, respectivamente.³² Apesar de essas vias serem as mais aceitas, existem alguns raros relatos de casos de contaminação por outros meios como, contágio com exsudatos, secreções, inoculações acidentais, água etc.^{32,33} Na Índia, principal país em números de casos¹⁴, há relatos de transmissão por tatuagens.³⁴ O diagnóstico precoce e objetivo é que deve interromper a transmissão e levar a redução do número de casos novos e ao controle e eliminação da doença.^{27,35}

Interessantemente, a probabilidade de recorrência familiar de hanseníase é maior nas famílias que incluem pacientes multibacilares³⁶, devido à alta carga bacilar que esses pacientes expõe aos seus contatos domiciliares. De certa forma, essa é uma prova de conceito em favor da teoria que a forma multibacilar seja a transmissora da doença.

1.4 Classificação

Conforme o surgimento de novos conhecimentos, e devido à abundância de fenótipos clínicos e biológicos com que a hanseníase se manifesta, a forma de classificação da doença sofreu modificações com o decorrer do tempo. A doença foi interpretada desde o início sob a ótica de caráter polar, conforme proposto por Rabello em 1938.³⁷ Sempre com o objetivo de separar a forma mais localizada da doença de uma outra mais disseminada, a hanseníase apresenta três formas de classificação: a proposta no Congresso de Madri em 1953^{38,37}, a de Ridley & Jopling de 1966³⁹ e a recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1982⁴⁰, sendo as duas últimas as mais utilizadas nos dias de hoje.

Com avanços nos estudos sobre a doença, principalmente na imunologia, foi possível observar que as manifestações clínicas e histopatológicas dependem da imunidade do hospedeiro frente ao bacilo. A classificação de Madri adotou quatro critérios para a classificação: o clínico, que considera a quantidade e padrão das lesões; o bacteriológico, baseado na detecção de BAAR por meio da baciloscopia; o histológico, que possibilita a visualização do padrão do infiltrado de células na lesão; e o imunológico, através da reação de Mitsuda, que proporciona a detecção da resposta imune celular do indivíduo frente ao

bacilo.^{38,41} De acordo com esses critérios, a classificação de Madri foi então estabelecida com dois grupos polares: hanseníase tuberculóide (MHT) e virchowiana (MHV); um grupo transitório, denominado hanseníase indeterminada (MHI); e um grupo instável, designado como dimorfo (MHD). Este último foi incluído para classificar formas difíceis de categorizar devido à similaridade com os grupos polares, porém com diferenças sutis.^{41,42}

Em 1966 Ridley e Joplin propuseram uma classificação espectral para a hanseníase subdividindo o grupo dimorfo. Baseada também nos critérios clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos, esta classificação também inclui uma forma inicial MHI, duas extremidades bem definidas e distintas e a porção intermediária instável, os dimorfos.^{39,42} A forma MHI é considerada a forma inicial da doença, que pode evoluir, curar espontaneamente ou, ainda, envolver até um ressurgimento posterior com características mais definidas. O polo tuberculóide-tuberculóide (TT) caracteriza-se pelo grupo de pacientes que possuem poucas lesões, quando não única, com baixa carga bacilar e com uma resposta imune celular eficaz. No outro extremo do espectro está a forma virchowiana-virchowiana (VV), onde os pacientes apresentam um número elevado de lesões, deficiência na resposta imune celular e intensa multiplicação bacilar. As formas clínicas intermediárias, designadas como dimorfos, ou *borderlines*, são definidas de acordo com a proximidade a uma das extremidades, dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV).^{22,39}

A OMS, em 1982, propôs uma classificação baseada na quantidade de lesões com o intuito de simplificar e tornar mais rápido o diagnóstico de campo da hanseníase, para fins de tratamento. Nesta, pacientes com menos de cinco lesões distribuídas pelo corpo são classificados como paucibacilares (PB), e aqueles com cinco ou mais lesões como multibacilares (MB).^{22,43}

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da hanseníase, incluindo uma boa anamnese do indivíduo, é imprescindível. Um exame clínico mais rebuscado, como a pesquisa de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, é também de grande valia. Por se tratar de uma doença em que a transmissão deve se dar pelo contato contínuo com pacientes não tratados, o conhecimento sobre a história familiar do indivíduo ajuda na suposição do diagnóstico, bem como denuncia a fonte auxiliando na interrupção da cadeia de transmissão.

Os exames que atuam como ferramentas auxiliares à clínica para diagnóstico são a baciloscopia, o exame histopatológico, a reação de Mitsuda e a busca por anticorpos contra antígenos do bacilo.

A baciloscopia na hanseníase é feita a partir do raspado intradérmico das extremidades, como lóbulos auriculares, cotovelos, joelhos, ou de lesões aparentes que, quando fixados e corados pelo método de Ziehl-Nielsen, permitem a detecção de BAAR. O resultado é dado por uma escala baciloscópica baseada em um índice logarítmico proposto por Ridley & Jopling.^{17,22,39,44}

O exame histopatológico do fragmento tecidual das lesões permite observar as alterações histopatológicas que a doença manifesta com o tipo de infiltrado celular da lesão, como formação de granulomas, ausência ou baixa quantidade de linfócitos, que por sua vez dão ideia da imunidade do hospedeiro.

A reação de Mitsuda é uma intradermorreação que avalia o grau de resposta imune celular do hospedeiro. É feita por meio da inoculação intradérmica de uma suspensão composta por *M. leprae* inativados.²⁰ A leitura desse teste é realizada no vigésimo oitavo dia e, se há formação de um nódulo maior que cinco milímetros o teste é dado como positivo, e, portanto, indica relativa resistência ao bacilo. Sendo assim, esse teste reflete a capacidade do organismo reagir ou não contra o bacilo, sendo utilizado mais para fins de prognóstico e classificação clínica do que para o diagnóstico.⁴⁵ Esta reação foi incorporada aos critérios de classificação no 6º Congresso Internacional de Madri em 1953.

Os níveis do anticorpo específico anti-PGL-1 são determinados por ELISA (ensaio imunoenzimático). O anticorpo predominantemente aumentado conforme o aumento da carga antigênica é do isotipo IgM.²⁰ Essa dosagem é utilizada para monitorar a resposta ao tratamento, servindo também como marcador de recidiva da doença. O desenvolvimento de ferramentas simples e práticas para testes de diagnóstico rápido em hanseníase tem explorado a detecção de anticorpos específicos contra o PGL-1. Com o uso de moléculas híbridas miméticas ao PGL-1, como NDO-BSA (*natural disaccharide-octyl-bovine serum albumin*) e LID-1 (*leprosy IDRI diagnostic I*), é possível detectar as principais classes de anticorpos IgM e IgM/IgG, respectivamente.^{46,47}

1.6 Manifestações Clínicas

Segundo a classificação de Ridley & Jopling.³⁹

1.6.1 Hanseníase Indeterminada (MHI)

A hanseníase nessa forma pode assumir uma condição puramente macular com uma ou mais manchas distribuídas pelo corpo. As lesões podem ser hipocrômicas com eritema nas bordas, se localizam geralmente na face, tronco, pernas, braços e nádegas. Embora a baciloscopia, o histopatológico e a reação de Mitsuda sejam exames que auxiliam a clínica, o comprometimento sensitivo já é conclusivo para fechar o diagnóstico.

A baciloscopia nesse caso é sempre negativa. No exame histopatológico não é possível diferenciar a forma MHI da hanseníase de uma dermatite crônica. Por se tratar de uma forma inicial da doença, onde a evolução da mesma, se não tratada, pode atingir desde a forma mais branda até a mais disseminada, a reação de Mitsuda pode ser positiva ou negativa. Os casos que são persistentemente positivos podem evoluir para o polo tuberculóide do espectro, enquanto os que persistem no resultado negativo evoluem para as formas mais bacilíferas.

O diagnóstico precoce, mesmo que difícil, permite uma eficácia do tratamento com poliquimioterapia (PQT), promovendo então a regressão da doença.^{39,48}

1.6.2 Tuberculóide-Tuberculóide (TT)

Esta é a forma mais localizada da hanseníase. No exame clínico, as lesões são únicas ou se apresentam em pequenas quantidades, são assimétricas, se manifestam como placas eritematosas com elevações na periferia delimitando as lesões, apresentam alterações sensitivas bem pronunciadas com anidrose, perda de pelo e um ligeiro comprometimento dos troncos nervosos.

A baciloscopia é sempre negativa, logo, não há BAAR. No quadro histopatológico é possível identificar granulomas bem definidos com infiltrados do tipo sarcóide ou folicular com células epitelióides (macrófagos que após destruição dos bacilos adquirem este aspecto epitelióide).³⁶ Pacientes nessas condições, quando são submetidos ao teste de Mitsuda, apresentam reposta imune celular efetiva.^{22,39,41,48}

1.6.3 Virchowiana-Virchowiana (VV)

No extremo oposto do espectro, essa forma assume uma condição mais disseminada da hanseníase. No início, as manifestações clínicas são compostas por numerosas máculas e pápulas eritematosas simétricas e, conforme a doença se acentua, as lesões tornam-se placas e

nódulos, formando os chamados hansenomas. Neste momento há comprometimento simétrico dos troncos nervosos e perda de sensibilidade.

A baciloscopia é largamente positiva. No histopatológico é possível observar uma grande quantidade de bacilos aglomerados em globias³⁶; infiltrados perineural, perivascular e periglandular de macrófagos inativos; presença de célula de Virchow; e baixa atividade funcional de linfócitos. A resposta imune ineficaz contra a carga bacilar é evidenciada pela intrademorreação de Mitsuda negativa.^{22,39,41,48}

1.6.4 Dimorfos

Esses grupos são caracterizados pela instabilidade e transitoriedade imunológica. As variações clínicas estão correlacionadas aos aspectos imunológicos, histopatológicos e bacteriológicos.

Clinicamente, as formas DT e DV são semelhantes às formas extremas, diferenciando em número, tamanho e simetria das lesões. Quanto ao índice baciloscópico, os casos DT são diferentes dos TT, pois podem apresentar baixa positividade. Já quanto ao histopatológico, a maior diferença está entre DV e VV onde se observam áreas de infiltrado linfocitário, enquanto entre TT e DT não há uma clara distinção. Por fim, em relação ao teste de Mitsuda, os dimorfos pode ser semelhantes aos extremos, com DT positivo e DV negativo, porém, o DT pode ser negativo.^{22,39,48}

A forma DD é clinicamente um intermédio das extremidades do espectro, e suas lesões são conhecidas como “*hole in cheese*” pela característica irregular e mal definida. É a forma clínica mais instável dentro do espectro. A baciloscopia nesses casos é sempre positiva e o Mitsuda negativo. Uma característica histopatológica indicativa desse grupo, ainda que rara, é a presença de grande quantidade de edema.^{22,39,48}

1.6.5 Reações Hansênicas

Durante a lenta evolução da doença todas as formas clínicas, exceto a forma indeterminada, podem ter surtos reacionais quando em tratamento ou não.^{48,30} Esses surtos estão estreitamente relacionados com a resposta imunológica, a qual varia desde uma exacerbação da resposta imune mediada por células até um aumento acentuado de imunocomplexos.⁴¹ Há dois tipos de reação na hanseníase, a reação tipo 1 em que os dimorfos dispõem de um risco maior de ocorrência, e reação tipo 2 que acomete mais os pacientes com

maior carga bacilar, DV e VV.^{48,30} Essas reações são denominadas também, respectivamente, de reação reversa (RR) e reação eritema nodoso hansênico (ENH).

A reação tipo 1 (RR) é caracterizada pela agravamento das lesões preexistentes e aparecimento de novas lesões espalhadas pelo corpo.^{41,48} Clinicamente as lesões tornam-se mais sensíveis, intumescidas, elevadas e, ocasionalmente, podem ulcerar. Esse tipo de reação pode também acometer os nervos causando a neurite, sensorial e motora.⁴⁸

A reação tipo 2 (ENH) é determinada por novas lesões, sem abranger as lesões preexistentes. Há uma inesperada manifestação de nódulos eritematosos por toda a extensão do corpo, principalmente no rosto e nas extremidades, e, naqueles casos mais severos, pode ocorrer ulceração das lesões.³⁰ A reação inflamatória é sistêmica, progredindo para os órgãos, linfonodos, testículos etc.⁴⁹

1.7 Tratamento

A hanseníase é uma questão de saúde pública que, se devidamente tratada, é passível de cura.²² Sabe-se que a principal chave para eliminação dessa enfermidade é a interrupção da cadeia de transmissão. No entanto, informar a população sobre as características da doença, eliminar falsos conceitos, enfatizar a importância da duração e a não suspensão do tratamento, mesmo se houver reações, e fornecer às equipes médicas treinamento sobre a clínica, diagnóstico etc., são estratégias de extrema importância para o controle da doença.⁵⁰

O tratamento contra a hanseníase é realizado através de um esquema de PQT que foi adotada no Brasil a partir de 1986. A terapêutica com a PQT consiste em uma associação de medicamentos específicos contra o patógeno, e é baseada nos critérios de classificação proposto pela OMS (1992). Nesta, PB e MB são diferentes quanto ao tempo de administração e associação dos medicamentos. Para os PB os fármacos rifampicina e dapsona são ministrados por seis meses e, para os MB a clofazimina, além dos demais, são administrados por 12 meses.^{22,50,51}

1.8 Imunologia

Os mecanismos de defesa frente a patógenos compreendem uma resposta inicial, denominada imunidade inata ou natural, e uma resposta subsequente, chamada imunidade específica (adaptativa ou adquirida).⁵² Na hanseníase, a resposta imune se inicia quando

células pertencentes à imunidade inata reconhecem o *M. leprae* como um micro-organismo invasor e desencadeiam uma resposta com intuito de conter o bacilo. Essas células ao mesmo tempo que buscam controlar a proliferação bacilar, também exibem fragmentos deste aos linfócitos T os quais irão iniciar uma resposta imune específica.⁵²

Na hanseníase a interação entre o patógeno e o hospedeiro é complexa e compreende uma série de fatores. Os mecanismos que permitem o desenvolvimento de uma resposta adequada ainda não são totalmente esclarecidos, mas são dependentes de vários fatores, genéticos e não genéticos relacionados ao bacilo e ao hospedeiro, bem como da interação entre eles.^{53,49}

1.8.1 Imunidade Inata

Os principais componentes do sistema imune envolvidos no desencadeamento de uma resposta inata são as barreiras físicas e químicas (epitélio), proteínas séricas, citocinas e células como os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), células dendríticas (DC's) e células *natural killer* (NK).^{52,20} Fagócitos e células dendríticas reconhecem os patógenos através da ligação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) expressos na sua superfície, tais como os receptores do tipo toll (TLRs) e NOD (NLRs), aos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são comuns a vários grupos de micro-organismos. Quando este reconhecimento ocorre, o patógeno é fagocitado, processado e seus fragmentos são apresentados aos linfócitos, pelos macrófagos e células dendríticas que são as principais células apresentadoras de antígeno (APCs) conhecidas.⁵²

Quando os PRRs das APCs reconhecem o *M. leprae*, passam a produzir mediadores, tais como reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas, dentre outros com o propósito de eliminar o patógeno.^{20,54} Por exemplo, os receptores TLR2 e TLR4 ao reconhecerem o bacilo ativam monócitos e promovem a liberação de interleucina 12 (IL-12) que ativa a imunidade inata induzindo células NK a produzirem interferon gama (IFN- γ). Esta citocina atua na ativação de macrófagos fazendo com que estes aumentem sua produção de mediadores, maximizando a ação microbicida, a fim de prevenir a disseminação da infecção.⁵⁵

Subsequentemente, ocorre a apresentação de antígenos ligados a molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II aos linfócitos T. As células dendríticas são as APCs responsáveis por ativar linfócitos T CD4+ *naive* (Tn) ligando a resposta imune inata à específica.⁵⁶ Após fagocitarem o bacilo as células dendríticas migram para os linfonodos mais próximos e sofrem maturação neste percurso tornando-se aptas a ativar

os *T_n*. Os linfócitos T ativados podem se diferenciar em subpopulações distintas de acordo com a presença e/ou ausência de algumas citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias.⁵⁷ A produção de IL-12 pelas DCs leva a diferenciação das células *T_n* em linfócitos de perfil Th1 e é dependente da interação entre CD40 presente nestas células com o ligante CD40L encontrando nos linfócitos.⁵⁸ Na ausência de IL-12 ou presença de IL-4, ocorre a diferenciação das células *T_n* em linfócitos com perfil Th2.⁵⁹

1.8.2 Imunidade Específica

Os perfis de resposta imune mais estudados na hanseníase são Th1 e Th2 responsáveis, respectivamente, pela imunidade celular e humoral. Esse conceito binário do sistema imunológico, paradigma Th1-Th2, foi mantido por vinte anos.⁶⁰ No entanto, sabe-se hoje que outros perfis de resposta tem efeito na resposta contra o bacilo como Th17^{61,62} e Treg⁶³ que estão associados com os episódios reacionais da hanseníase, ENH e RR.

1.8.2.1 Perfil de resposta Th1

Esse perfil compreende a imunidade mediada por células (IMC), que é a mais efetiva na destruição de patógenos intracelulares.^{20,53} A citocina chave deste subgrupo é o IFN- γ , responsável pela ativação dos macrófagos e, conseqüentemente, pela destruição dos microrganismos fagocitados. O IFN- γ também aumenta a expressão de moléculas envolvidas na interação com linfócitos T, como HLA-DR (antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1).^{64,49}

O que sustenta o macrófago ativado é a citocina TNF (fator de necrose tumoral), que o próprio macrófago ativado produz. Esta proteína, além de amparar de forma autócrina a ativação dos macrófagos, exerce outras funções biológicas, como induzir a expressão de receptores de IL-2 nos linfócitos T, atuar em sinergia com IFN- γ no aumento da expressão de MHC II e estimular a produção de citocinas, tais como a IL-6 e a IL-1, que possuem um papel aditivo ao TNF.⁴⁹ A IL-2 atua de forma autócrina nas células TCD4⁺ ativadas, promovendo a expansão clonal destas e aumentando a produção de IFN- γ .

Todo esse aparato de citocinas envolvido no perfil de resposta Th1, quando atua em harmonia e equilíbrio, proporciona uma IMC efetiva contra o patógeno, que resulta na contenção da proliferação bacilar.⁶⁵

O principal regulador da diferenciação de células Th1 é o fator de transcrição T-bet, membro da família T-box. A existência de IFN- γ no meio celular induz a expressão do T-bet

via ativação de STAT1, que é um transdutor de sinal e ativador de transcrição. A IL-12, por meio da ligação a receptores específicos presentes nos linfócitos TCD4⁺ ativados, ativa outro fator de transcrição, o STAT4, que intensifica a produção de IFN- γ , e assim, reforça a polarização de células com perfil de resposta Th1.⁵⁷

Quando existem deficiências na produção, ou mesmo na ligação dessas proteínas aos seus respectivos receptores, a resposta IMC não ocorre. Deficiências na produção de IFN- γ ou em seu receptor estão associadas à susceptibilidade a infecções por microrganismos intracelulares, devido à ativação defeituosa dos macrófagos.⁶⁴ O que também pode barrar o desempenho da imunidade celular é a existência de outras citocinas com ações antagônicas às citocinas Th1, como por exemplo, a IL-4, uma citocina antagonista da IL-2, e a IL-10.⁴⁹

A **Figura 2** ilustra as principais vias envolvidas na imunidade Th1.

1.8.2.2 Perfil de resposta Th2

Esse perfil de resposta, ao contrário da IMC, é o principal mecanismo de defesa contra patógenos extracelulares, principalmente helmintos, e esta presente também nos processos alérgicos.⁵³ Na hanseníase, esse tipo de resposta é ineficiente, uma vez que inibe a ativação dos macrófagos, principais células envolvidas na contenção do bacilo. Embora a produção de anticorpos seja característica deste perfil, estes não são efetivos frente aos patógenos intracelulares. Além disso, os anticorpos atuam como agentes opsonizantes facilitando a entrada do bacilo na célula.⁴⁹

A citocina chave deste tipo de resposta é a IL-4.^{64,65} Quando esta citocina está presente no meio celular, produzida pelos linfócitos TCD4⁺ de perfil Th2, atua de forma autócrina induzindo e expandindo a produção de células Th2. Os linfócitos TCD4⁺ também promovem a ativação dos linfócitos B e, portanto, a produção de anticorpos. O efeito inibitório da IL-4 sobre a IMC se dá pela expressão dos receptores de IL-2 nas células T, impedindo assim a produção de IFN- γ e, consequentemente, ações de aniquilamento de microrganismos intracelulares, ocasionando aumento expressivo da carga bacilar.^{49,64}

A IL-4 promove o desenvolvimento de células Th2 por ativar a via da STAT6, que, junto com os sinais via TCR (receptores de células T), induzem a expressão do fator de transcrição GATA-3. Estudos realizados com camundongos *knockout* para os receptores de IL-4 ou STAT6 enfatizaram a importância funcional destes no direcionamento da resposta imune humoral. A ausência destas promoveu deficiência no desenvolvimento e manutenção de células Th2.⁶⁴

O GATA-3 é tido como regulador mestre da diferenciação de linfócitos Th2, estabilizando sua diferenciação e atuando diretamente nos promotores dos genes produtores de IL-4, IL-5 e IL-13; sua inibição promove a diferenciação de células Th1.⁵⁷ Sabe-se hoje, entretanto, que a função deste fator de transcrição transpõe a diferenciação de células Th2.⁶⁶ Além de regular a função das Treg visto que modula a expressão do fator de transcrição destas células (FoxP3)⁶⁷, o GATA-3 controla a proliferação e sobrevivência dos linfócitos TCD8+⁶⁸ e promove o desenvolvimento de vários subconjuntos especializados de células NK⁶⁹. Este fator também é essencial para o desenvolvimento de células que atuam antes da imunidade adquirida, denominadas de células linfoides inatas (ILCs)⁷⁰, que contribuem com uma defesa primária contra patógenos e tem a capacidade de produzir uma grande quantidade de citocinas pró inflamatórias⁷¹. O GATA-3 também tem influência na metilação de vários genes relacionados com a resposta imune.⁶⁶

Uma outra citocina presente nesse perfil de resposta é a IL-10. Seu papel imunossupressor e anti-inflamatório faz desta citocina um importante regulador da resposta imune do hospedeiro inibindo a ação dos macrófagos e, em conjunto com IL-4, potencializa a inibição da resposta IMC.^{49,64}

A **Figura 2** ilustra as principais vias de resposta Th2.

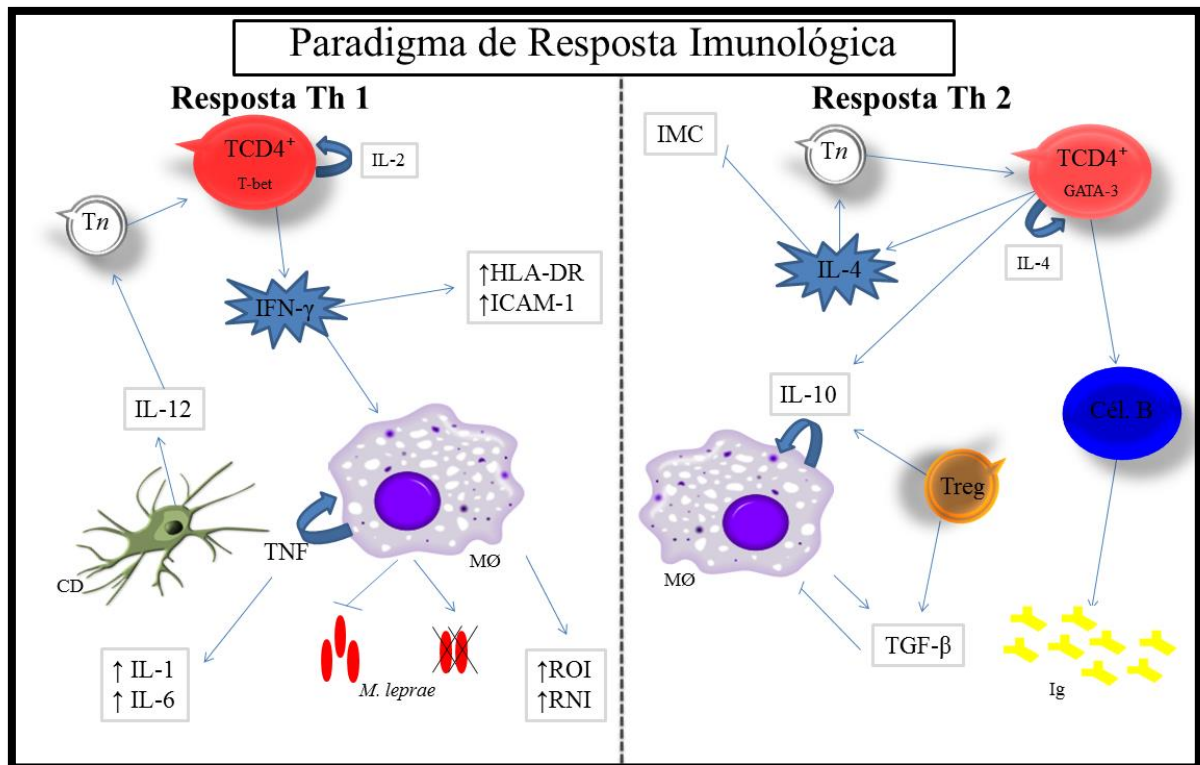


Figura 2. Paradigma de resposta imune na hanseníase. Principais células e citocinas implicadas no perfil de resposta Th1 e Th2. Tn: Células T auxiliares CD4⁺ *naives*; TCD4⁺: Células T auxiliares CD4⁺; NK: Células *natural killer*; IL: Interleucinas; CD: Células dendríticas; MØ: Macrófagos; IFN-γ: Interferon gama; HLA-DR: Antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR; ICAM-1: Molécula de adesão intercelular 1; ROI: Reativos intermediários de oxigênio; RNI: Reativos intermediários de nitrogênio; *M. leprae*: *Mycobacterium leprae*; TNF: Fator de necrose tumoral; T-bet e GATA-3: Fatores de transcrição; Treg: Células T auxiliares CD4⁺ reguladoras; TGF-β: Fator de crescimento transformador-β; Cél. B: Linfócitos B; Ig: Anticorpos. Revisto e adaptado de Goulart, IMB; Penna, GO; Cunha, G, 2002.

1.9 Genética

Embora os conhecimentos em genética tenham expandido durante o século XX, o progresso nessa área foi bastante impulsionado pelas inúmeras descobertas em imunologia e microbiologia.⁷²

Ao longo de muitos anos os esclarecimentos sobre as doenças infecciosas foram proferidos pelos imunologistas e microbiologistas, que tinham essas moléstias como foco de seus estudos devido à alta mortalidade por essas doenças na época. Embora cada uma dessas áreas possuísssem teorias convictas, mas diferentes, quando Charles Nicolle, entre 1910 e 1920, evidenciou a existência de infecções assintomáticas, nenhuma destas teorias esclareciam esta descoberta.⁷³ E foi então que as pesquisas no campo da genética tomaram força para estudar as doenças infecciosas que, ainda hoje, são consideradas as principais causas de morte na maior parte do mundo.

1.9.1 Genética nas doenças infecciosas

A exposição ao patógeno é necessária para o estabelecimento de uma doença infecciosa, no entanto, não é suficiente para a ocorrência desta, uma vez que o hospedeiro pode debelar o agente infeccioso. É notório também, que o curso de uma infecção envolve fatores intrínsecos ao hospedeiro e ao patógeno, mas também fatores ambientais, sociais, interação com outros micro-organismos, etc.^{73,74,75} Decorre disso o caráter complexo de uma doença infecciosa.

A variabilidade clínica observada entre os indivíduos no curso de uma infecção é um grande desafio para o estudo das doenças infecciosas. Como doenças complexas, elas não seguem um padrão de herança mendeliana, mas sim um padrão de herança imperfeita. Nesse caso ainda, a variação de componentes que determinam o fenótipo provém, além dos fatores já citados acima, da interação de múltiplos genes.^{8,73,76}

A partir da década de 50 a concepção sobre a genética das doenças infecciosas foi introduzida à era molecular e, desde então, estudos genéticos com diferentes abordagens têm emergido a fim de colaborar com a compreensão da predisposição para estas doenças, bem como da sua fisiopatologia.⁷³

Como existem vários genes atuando no desfecho clínico, a busca por genes candidatos, cuja função tem implicação biológica na doença, é uma das abordagens utilizadas em estudos de epidemiologia genética para testar hipóteses.^{77,78} Ou ainda, são genes candidatos àqueles localizados em regiões candidatas oriundas de estratégias *genome wide*, que são geradoras de

hipóteses. Essas abordagens apresentam potencial para esclarecer novas vias de interação entre patógenos e hospedeiros. Nesse caso, a epidemiologia genética da hanseníase fornece um exemplo interessante, qual seja o de que a ligação da região 6q25 com a doença⁷⁸ possibilitou o conhecimento da participação do gene *PARK2* em doenças causadas por micro-organismos intracelulares.^{79,80} Somente a partir destes estudos genéticos que a compreensão sobre o papel desta proteína no controle de micro-organismos no hospedeiro pode ser esclarecido.^{80,81} Modelos experimentais, usando por exemplo camundongos *knock-out* ou *knock-in*, também possibilitam o esclarecimento dos mecanismos de controle e imunidade gerando novos genes candidatos.⁸²

A abordagem de genes candidatos testa a associação de variantes nestes genes com a doença, que são então utilizados como marcadores de risco genético. O tipo principal de polimorfismo empregado nestes estudos são os SNPs, que são definidos como alterações pontuais que ocorrem com uma frequência maior que 1% na população, e são a principal causa de variabilidade genética entre os seres humanos.^{77,83,84} Os SNPs podem ou não acarretar em alterações qualitativas e/ou quantitativas nos produtos transcritos, e por terem efeitos mais brandos são mantidos em frequências mais altas do que as mutações. Essas alterações são classificadas de acordo com a sua posição dentro da organização do genoma e com a mudança que causa na proteína ou RNA mensageiro que o gene codifica.

Vários critérios devem ser considerados na escolha dos marcadores a serem investigados como localização no gene, efeito funcional e perfil de desequilíbrio de ligação (do inglês *linkage disequilibrium* – LD), que indica quais marcadores estão segregando juntos. Este último parâmetro evita redundância de genotipagem, bem como permite avaliações sobre a cobertura da região avaliada. A medida de LD pode ser dada por D' ou r^2 , onde o valor 1 denota perfeito LD. A partir desses dados são construídos então os blocos de LD, também denominados *bins*. Esses blocos podem englobar vários SNPs e um deles pode representar todo o grupo funcionando como um SNP “etiqueta” (*tag SNP*), sendo informativo do bloco.⁸⁴

Os estudos de associação fornecem uma estratégia eficiente na identificação de marcadores de susceptibilidade ou resistência à doenças.⁸ Esta abordagem de estudo permite dois desenhos: o estudo baseado em população do tipo coorte ou caso-controle e o estudo baseado em família. O primeiro desenho de associação consiste em uma comparação das frequências dos marcadores nos grupos de indivíduos afetados e não afetados, determinando

se há ou não uma associação do marcador com o risco da doença. No desenho familiar o que se analisa são os números de transmissões dos alelos de pais heterozigotos para filhos afetados.⁸⁵

Na composição de um painel caso-controle é imprescindível ter cautela na seleção dos indivíduos que irão compor os grupos, no tamanho amostral, que pode não ser o bastante para detectar uma diferença significativa e na possibilidade de estratificação dos grupos, que podem estar sujeitos à variáveis que influenciam no desfecho, tais como etnia, sexo, atuando como uma variável de confundimento. Na seleção do grupo de casos, a escolha por métodos de diagnóstico que sejam os mais sensíveis e específicos possíveis é a melhor opção para evitar erros de classificação. A escolha dos controles é ainda mais cuidadosa. Além de respeitar as proporções de sexo, etnia e idade entre os grupos, para evitar possíveis efeitos de confundimento ligados a estas variáveis, também é imprescindível que os indivíduos sejam escolhidos a partir da mesma população de origem dos casos, a fim de se respeitar o máximo possível que tenham as mesmas condições de exposição ao patógeno. Assim, podemos parcialmente inferir que, mesmo sendo expostos ao mesmo agente patogênico, os controles não adoeceram. No caso da hanseníase, não existem meios que confirmem que a exposição ao patógeno foi a mesma entre os casos e controles, assim, realizando uma escolha criteriosa dos controles entre contatos domiciliares ou vizinhos é possível diminuir os vieses.⁷⁷

1.9.2 Genética na hanseníase

A hanseníase é considerada uma doença infecciosa de caráter complexo e, assim, não segue um padrão de herança Mendeliana.⁸ Embora não exista um dado exato, observa-se que a maioria das pessoas que são expostas ao bacilo não adoecem, apresentando uma resistência natural contra o patógeno, revisto por Beiguelman.³⁶ Abraão Rotberg, em 1937, foi o primeiro a presumir que os indivíduos apresentavam um fator natural genético de resistência ao *M. leprae*, observado pela reação de Mitsuda.³⁶ Contudo, a investigação sistemática desse componente genético humano atuando na manifestação da hanseníase só foi iniciada na década de 60.⁸⁶ Estudos de agregação familiar revelaram que pessoas geneticamente aparentadas exibem maior concordância quanto à forma clínica da doença.³⁶

As primeiras investigações genéticas realizadas na hanseníase foram estudos com gêmeos e estudos familiares.^{26,36} Na década de 70 um estudo com gêmeos na Índia mostrou maior taxa de concordância da doença entre pares monozigóticos do que entre dizigóticos, revelando a presença de um componente genético associado à doença.⁸⁷ Subsequentemente,

análises de segregação familiar evidenciaram a existência de um modelo de herança *major gene* subjacente a hanseníase *per se* e suas formas clínicas.²⁶ No Brasil, este modelo genético pôde ser confirmado com dados da Colônia de Santo Antônio do Prata – PA, uma comunidade formada por descendentes de indivíduos afetados pela hanseníase.⁸⁸

Com o advento da genética molecular, novas abordagens de estudo na hanseníase foram estabelecidas a fim de esclarecer os marcadores genéticos envolvidos com a susceptibilidade à doença.^{75,89}

Estudos de ligação são estudos de mapeamento genômico que, por meio do princípio de recombinação entre *loci* genéticos, permitem apontar regiões genômicas próximas ao *locus* ligado à doença. Esses estudos são conduzidos a partir da análise de *pedigrees* e, como desdobramento, necessitam de estudos com maior poder de resolução para apontar genes e marcadores responsáveis pelo efeito observado.^{8,90}

Os pioneiros nos estudos de ligação na hanseníase conduziram uma abordagem de rastreamento genômico com uma amostra familiar da Índia.⁹¹ Neste estudo, Siddiqui e colaboradores encontraram um pico de ligação para a hanseníase *per se* em uma região do braço curto do cromossomo 10, região 10p13.⁹¹ No entanto, como esta amostra foi composta predominantemente por pacientes PB, o dado obtido neste estudo foi melhor elucidado em um estudo seguinte. Utilizando-se da mesma abordagem de rastreamento genômico de ligação, entretanto com famílias provenientes do Vietnã, Mira e colaboradores⁷⁸ confirmaram a presença de um pico de ligação para a forma PB da hanseníase na região 10p13.

A região 10p13 compreende genes importantes na interação entre parasita e hospedeiro. Dentre esses, o *MRC1* (do inglês *mannose receptor, C type 1*) já teve SNPs associados à hanseníase *per se* e formas clínicas^{92,93} e, recentemente, à tuberculose pulmonar nos chineses⁹⁴. Esse gene codifica um receptor de manose (MR) que reconhece antígenos importantes para a resposta imune inata. Macrófagos e células dendríticas reconhecem estruturas presentes em micro-organismos, como as micobactérias, por meio da expressão desses receptores.⁹⁵ Alter e colaboradores⁹², em um estudo de associação realizado com variantes não sinônimas do exon 7 do gene *MRC1*, apontaram o SNP rs1926736 como uma variante informativa do efeito genético na população vietnamita. No entanto, na população brasileira, o efeito observado depende do haplótipo formado com duas outras variantes, podendo ter efeito protetor ou de risco para a doença. Em avaliação funcional, estas variantes não influenciaram na internalização de dois ligantes de MRC1 (zymosan e ovoalbumina). No entanto, quando as células foram cultivadas com *M. leprae* e *Mycobacterium bovis* (BCG) não

houve internalização dos mesmos. Assim, os autores sugerem a existência de uma molécula acessória necessária para a ligação e internalização destes micro-organismos, provavelmente presente em fagócitos profissionais.⁹²

Ainda com o propósito de explicar os picos de ligação previamente^{91,78} associados à forma clínica da hanseníase, um mapeamento de associação com alta densidade de marcadores para investigar 39 genes da região 10p13 foi realizado com duas amostras familiares independentes do Vietnã, dando enfoque para as formas clínicas MB e PB da hanseníase. Os resultados apontaram que dois SNPs, localizados nos genes da cubulina (*CUBN*) e nebulina (*NEBL*), estão associados à hanseníase MB.⁹⁶ No entanto, até o momento nenhum estudo de associação encontrou dados que expliquem os picos de ligação encontrados na região do cromossomo 10.⁹⁶ Em vista disso, regiões bem próximas à região de interesse possuem genes de importância biológica que podem auxiliar na validação dos dados prévios. O gene *GATA3*, localizado na região 10p15, possui variantes genéticas associadas a diferentes doenças, como asma^{97,98}, leucemia⁹⁹, rinite¹⁰⁰, cânceres de mama¹⁰¹, próstata¹⁰² e bexiga¹⁰³, porém, não há relatos na literatura de associação com doenças infecciosas. Recentemente, uma variante genética (rs1058240), localizada em um sítio de ligação de miRNA na região 3'UTR, foi associada com a expressão de GATA-3 e parece ter um papel na regulação pós-transcricional do gene *GATA3*.¹⁰⁴ Embora o GATA-3 exerça um papel crucial na resposta imune Th1, evidências mais recentes demonstraram uma ampla função dessa proteína.⁶⁶ Sendo assim, pela proximidade com um *locus* de interesse e pelo efeito na resposta imune, esse gene é um forte candidato e merece ser melhor estudado.

Outras regiões cromossômicas candidatas foram estabelecidas através dessa abordagem de estudos de *scan* genômico de ligação. A mesma pesquisa que confirmou a associação da região 10p13 com a hanseníase PB, constatou picos para a doença *per se* na região 6q25.⁷⁸ Um ano mais tarde, o mesmo grupo realizou um mapeamento por clonagem posicional desta região que revelou polimorfismos provenientes de dois genes associados à doença, o gene da parkina (*PARK2*) e o co-regulador da parkina (*PACRG*).^{79,105} Este estudo, realizado com famílias vietnamitas e com a população brasileira, é considerado um dos estudos pioneiros em clonagem posicional. Miller e colaboradores¹⁰⁶ também apontaram regiões cromossômicas com picos de ligação em amostra de famílias brasileiras. Através de um *scan* genômico as regiões 6p21, 17q22 e 20p13 apresentaram picos de ligação para a hanseníase *per se*, sendo esta última também ligada à hanseníase MB.¹⁰⁶ Mais recentemente,

um grupo chinês conduziu um *scan* de ligação encontrando um *locus* de susceptibilidade para a hanseníase na região cromossômica 2p14.¹⁰⁷

Os estudos de associação do genoma completo (do inglês *genome-wide association studies* – GWAS), diferente dos estudos de ligação prévios que alcançaram resolução de regiões cromossômicas, identificam genes e marcadores associados à doença. A grandeza e riqueza de dados gerados nesse tipo de estudo requer cuidados importantes nas análises, com adoção de correções estatísticas adequadas, bem como estudos de validação, replicação e funcionais, a fim de se evitar resultados espúrios.⁷⁷ O primeiro GWAS realizado na hanseníase foi feito com a população chinesa.¹⁰⁸ Esse estudo englobou a análise de 491.833 SNPs tipados na amostra primária, geradora dos resultados. Subsequentemente, os SNPs que apresentaram forte evidência de associação, foram genotipados em três diferentes amostras de replicação, todas provenientes da mesma etnia, constituídas no total por 3254 casos e 5955 controles. Os genes *HLA-DR-DQ*, *RIPK2*, *TNFSF15*, *CCDC122*, *LACC1* e *NOD2* foram fortemente associados a hanseníase neste estudo. Sales-Marques e colaboradores¹⁰⁹ investigaram as associações destes genes com a hanseníase em cinco amostras populacionais de diferentes regiões do Brasil, e encontraram associação positiva entre marcadores nos genes *NOD2* e *CCDC122* com a hanseníase.¹⁰⁹

Um segundo estudo em larga escala avaliou 48.000 variantes em mais de 2.000 genes em uma população da Índia.¹¹⁰ Variantes dos genes *HLA-DRB1/DQA1* e *TLR1* foram apontadas, respectivamente, como determinantes importantes na susceptibilidade e proteção à hanseníase naquela população. Avaliando a distribuição da frequência da variante I602S do TLR1 em diferentes regiões geográficas, os autores sugerem que as micobactérias tenham contribuído para a distinção observada.¹¹⁰

Partindo de hipóteses funcionais, vários outros importantes genes candidatos foram estabelecidos em diferentes estudos, utilizando amostras de diferentes etnias. O polimorfismo *IL10* -819C/T foi analisado por estudos conduzidos com a população brasileira e indiana. O gene que codifica a IL-10, que é uma citocina de grande impacto na resposta imune Th2 do hospedeiro, atuando como imunossupressor da resposta efetiva contra o bacilo, teve o alelo T do polimorfismo -819C/T da região promotora associado à susceptibilidade para a doença nas duas populações.^{38,111,112}

O SNP rs2430561 do gene *IFNG* tem sido alvo de estudos de doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares. O IFN- γ atua como modulador das respostas imune inata e adaptativa pois, além de ativar macrófagos, induz a produção de IL-2 e inibe a de IL-

4.⁶⁴ Cardoso e colaboradores conduziram um estudo de associação do tipo caso-controle com esse marcador na população Brasileira, provenientes de São Paulo e Rio de Janeiro, e encontraram um efeito de proteção à hanseníase naqueles que carregam o alelo T.¹¹³

O TNF- α é uma citocina alvo de estudos genéticos devido a grande importância na fisiopatologia das doenças infecciosas. Considerada uma citocina pró-inflamatória e imunoestimulatória que participa de vários processos biológicos, incluindo a modulação da resposta imune inata e adaptativa⁸, o gene *TNF* está localizado na região cromossômica 6p21 que alberga os genes do complexo HLA. O SNP -308G/A, localizado na região promotora do gene *TNF*, tem tido resultados conflitantes quanto à associação com a hanseníase.¹¹⁴ Uma investigação englobando dois estudos de associação baseado em família e dois do tipo caso controle, provenientes de diferentes regiões do Brasil, mostrou que o alelo A deste SNP está associado com a resistência à hanseníase. Os resultados de meta análise mostraram ainda que esta associação é específica para a população brasileira, uma vez que, quando são incluídas na análise estudos com outras populações, este efeito deixa de ser observado.¹¹⁵

O primeiro contato do patógeno com o sistema imune é através da ligação de PRRs, presentes nos macrófagos e células dendríticas, aos PAMPs.⁵³ O PRR mais conhecido e estudado na literatura são os TLRs. Polimorfismos presentes nesses genes TLRs foram amplamente associados a hanseníase *per se* e reações hansênicas.^{116,117,118,110} O polimorfismo N248S do *TLR1*, investigado em estudos de associação no Brasil, foi importantemente associado à hanseníase *per se* na população brasileira.¹¹⁹

A complexidade dos fatores envolvidos no desfecho da hanseníase evidenciada pela resistência natural que a maioria dos expostos possuem, pelo tempo de incubação da doença, pela riqueza dos fenótipos clínicos e biológicos, dentre outras características, fazem desta doença um modelo rico e interessante para o estudo sobre genética de doenças infecciosas. Nesse cenário, a busca por componentes genéticos que estejam inequivocamente envolvidos com o risco da doença e compreensão das variantes genéticas que acarretam em alterações de vias importantes, devem trazer conhecimentos importantes para o estabelecimento de condutas de prevenção e terapia.

Perante dados prévios que demonstraram a importância da região cromossômica 10p13 na susceptibilidade genética para a hanseníase^{78,91}, o presente estudo teve como objetivo investigar a associação de marcadores no gene *GATA3*, que constitui um importante candidato devido à localização no genoma e ao papel que exerce na resposta imune.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação de polimorfismos do gene *GATA3* com a hanseníase *per se* e formas clínicas por meio de estudo de associação com duas amostras do tipo caso-controle de Rondonópolis-MT e do Estado de São Paulo.

2.2 Objetivos Específicos

1- Testar a associação com hanseníase dos seguintes marcadores do gene *GATA3* na população de Rondonópolis-MT:

- rs10905284
- rs1399180
- rs2280015
- rs3781094
- rs3802604
- rs444929
- rs569421

2- Testar as associações dos marcadores encontradas na população de Rondonópolis na população do Estado de São Paulo.

3- Investigar o efeito funcional dos marcadores associados, avaliando a expressão de GATA-3 de acordo com o genótipo destes marcadores.

3. MANUSCRITO

THE GATA3 GENE IS INVOLVED IN LEPROSY SUSCEPTIBILITY IN BRAZILIAN PATIENTS

Priscila Medeiros^a, Weber Laurentino da Silva^a, Bruna Beatriz de Oliveira Gimenez^a, Keren Bastos Valezi^a, Milton Ozório Moraes^b, Vânia Nieto Brito de Souza^a, Ana Carla Pereira Latini^{a,*}

^a Instituto Lauro de Souza Lima, ILSL, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros Km 225/226, Aimorés, CEP: 17034-97, Bauru, São Paulo, Brazil.

^b Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil nº4365, Manguinhos, CEP: 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil.

* Corresponding author: Dra. Ana Carla Pereira Latini, Instituto Lauro de Souza Lima, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros Km 225/226, Aimorés, CEP: 17034-971, Bauru, São Paulo, Brazil.

E-mail: anacarlap@gmail.com, telephone: +55 (14) 3103-5944 and fax number: +55 (14) 3103-5907.

ABSTRACT

Leprosy outcome is a complex trait and the host-pathogen-environment interaction defines the emergence of the disease. The causative agent of the disease, *Mycobacterium leprae*, exhibits a conserved genome and could not be accountable for the variety of outcomes observed from exposition, infection and disease. Thus, host genetic risk factors have been successfully associated to leprosy. The 10p13 chromosomal region was linked to leprosy in familial studies and *GATA3* gene is a strong candidate to be part of this association. Here, we applied a stepwise strategy to test genetic variants at *GATA3* in two case-control samples from Brazil comprising a total of 1,633 individuals. The A allele of rs10905284 marker was associated with leprosy resistance in both samples. Then, a functional analysis was conducted and showed that individuals carrying AA genotype express higher levels of GATA-3 protein in lymphocytes. So, we confirmed that the rs10905284 is a locus associated to leprosy in the Brazilian population and influences the levels of this transcription factor.

KEYWORDS: leprosy, *GATA3*, polymorphisms, association study, GATA-3 transcription factor.

1. INTRODUCTION

Leprosy is still a public health problem exhibiting around 225,000 new cases by year, while Brazil ranks second in the number of patients in the world (WHO, 2014).

Leprosy is caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*, which has tropism for macrophages in skin and Schwann cells in the nerves turning leprosy the primary cause of nerve incapacity due to an infectious agent. *M. leprae* exhibits an extremely conserved and compact genome associated with long generation time. This bacillus is well adapted to the humans, but a large range of outcomes may emerge from the interplay between host and mycobacterium, and individuals can either eliminate the bacteria or develop infection.

The spectrum of clinical phenotypes of leprosy is based on clinical, immunological and histopathological criteria. The patients can evolve to a localized form, known as tuberculoid (TT), or to a disseminated form, named lepromatous (LL). This polar pattern of leprosy, TT or LL disease, resembles a Th1 or Th2 profiles of immune response, respectively (Modlin 1994; Goulart, Penna and Cunha 2002). The TT patients prevent the replication of the bacillus by a cell mediated immune (CMI) response, while LL patients present a poor CMI resulting in bacterial persistence, replication and spread throughout the body. Besides, the World Health Organization (WHO) proposed a clinical classification based on the number of skin lesions, focusing on the treatment, that includes paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) forms (WHO, 1998).

Due to the low genetic variability of the pathogen and the diversity of phenotypes emerging from its interaction to the host, it is assumed that the host genetic background has a main role in the control of the leprosy development (Monot et al. 2005; Alter et al. 2011). In fact, twin studies showed the genetic influence in leprosy, revealing the higher concordance rate of disease per se and clinical forms in monozygotic than dizygotic pairs (Chakravarti and Vogel, 1973). Afterwards, familial segregation studies demonstrated the presence of a major gene controlling the disease susceptibility (Abel and Demenais 1988; Lázaro et al. 2010). Noteworthy, genetic epidemiology approaches are consistently emphasizing the presence of a genetic control in leprosy. A variety of genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) influencing the susceptibility to leprosy were identified in different populations: TNF/LTA/HLA (Roy et al. 1997; Santos et al. 2002; Cardoso et al. 2011; Vanderborght et al. 2007), IL10 (Santos et al. 2002; Malhotra et al. 2005; Pereira et al. 2009), PARK2 and PACRG (Mira et al., 2004), LTA (Alcaïs et al., 2007), NOD2 (Zhang et al. 2009; Grant et al. 2012; Sales-Marques et al. 2014), CCDC122 (Zhang et al. 2009; Grant et al. 2012; Sales-Marques et al. 2014), IFNG (Cardoso et al., 2010), and TLR1 (Marques et al., 2013).

Two genome-wide linkage studies for leprosy pointed peaks at the 10p13 chromosomal region. The first one, from India, described the peak linked to the leprosy per se (Siddiqui et al., 2001). However, the second, from Vietnam, concluded that this region is involved in PB leprosy (Mira et al.,

2003). The region contains many candidate genes and among them some were associated to leprosy. Markers at the *MRC1* (mannose receptor, C type 1) gene were associated to the disease per se or clinical forms in Vietnamese, Brazilian and Chinese populations (Alter et al. 2010; Wang et al. 2012). Recently, a high-density association scan was performed in two family-based samples from Vietnam, and two SNPs were associated to MB leprosy at the *CUBN* and *NEBL* genes (Grant et al., 2014).

GATA3 gene is located at 10p15 chromosomal region and is a strong candidate gene to leprosy susceptibility since encodes the GATA-3 transcription factor that induces Th2 immune response that favors the permissiveness to *M. leprae* replication and spread (Yang et al., 2014). Besides, GATA-3 acts in other points of innate and adaptive immunity such as T cells development, innate lymphoid cell development and function, regulatory and CD8⁺ T cells as well as thymic natural killer cells (Tindemans et al., 2014).

Here, we investigated the association of *GATA3* gene to leprosy using a stepwise strategy in two case-control samples from Brazil enrolling 922 patients and 737 controls. Then, we verified the functional effect of rs10905284 SNP at *GATA3* on the expression of this gene.

2. METHODS

The inclusion as participant occurred only after the concordance and assignment of the informed consent term. This work was approved by the Ethics Committee from Instituto Lauro de Souza Lima.

2.1. Subjects and Study Design

The genetic epidemiology study enrolled 1,633 individuals distributed in two independent case-control samples. A stepwise strategy was adopted. We tested seven markers in 762 individuals in a discovery sample from endemic region of Rondonópolis, Mato Grosso State, located at the west center of Brazil. The SNPs associated were, then, investigated in a replication sample comprising 871 individuals from São Paulo State, located at the southeastern region of Brazil.

Both groups of cases were assembled from the two clinics specialized in leprosy from Rondonópolis and Instituto Lauro de Souza Lima. Controls from Rondonópolis were recruited during the campaigns for detect new leprosy cases in public places of the region. The control group in Bauru was derived from blood donors. More general characteristics of these groups have already been presented in recent articles (Supplementary Table 1) (Marques et al. 2013; Sales-Marques et al. 2014).

Patients were classified according to the Ridley and Jopling criteria (Ridley and Jopling 1966). However, to evaluate the genetic effect of *GATA3* SNPs in the severity of leprosy, patients were classified into PB and MB based on the bacillary index. Patients presenting a positive index were

classified as MB and a negative index was criterium to the PB patients. The leprosy subtype distribution was 75% MB and 23% PB in the discovery sample, and 76% MB and 19% PB in the replication sample.

The maximum power of our sample to reveal the same effect of the rs10905284 observed to leprosy per se in the leprosy subsets was 0.83, using an additive model and one-sided type I error rate of 0.05 for PB and MB subsets (Table 1). In practice, a power of 80% to detect what we want to test is advisable (Pacheco and Moraes, 2009).

The study of the functional effect of rs10905284 at GATA3 gene was based on the homozygous genotypes. We studied sixteen women, healthcare workers of the Instituto Lauro de Souza Lima, eight presenting the AA genotype and eight presenting the CC genotype.

2.2. SNPs selection

To select tag SNPs to cover GATA3 gene we used the tagger multimaker method considering the minor allele frequency of 0.1 in the Yoruba population and a cutoff r^2 of 0.8 in International HapMap Project database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Thus, seven tag SNPs across the GATA3 gene were picked, as follow: rs10905284, rs1399180, rs2280015, rs3781094, rs3802604, rs444929 and rs569421.

2.3. DNA Extraction and SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes samples by salting-out method. The genotyping of the discovery sample was made using the GoldenGate assay with VeraCode technology in BeadXpress reader (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). For the replication sample and to select the genotypes for the functional study, the genotyping was made by allelic discrimination using fluorogenic probes in TaqMan SNP genotyping assay in StepOnePlus equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.4. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Culture

Twenty-four milliliters of peripheral blood were collected from each individual in heparinized tubes by venipuncture. PBMCs were obtained by gradient centrifugation using Histopaque - 1077 (Sigma - Aldrich - Saint Louis - USA) and total cell number was estimated by counting in a Neubauer chamber. The concentration of the cell suspension was adjusted to 1.2×10^6 cells/ml and the cells were cultured for 48 hours in 24-well polystyrene plates at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. RPMI 1640 medium supplemented with 10% serum fetal bovine and 1% antibiotics was used.

Phytohemagglutinin (PHA, 8 ug/ml) and *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10 ug/ml) were used as stimuli; unstimulated cultures (US) were kept on the same conditions as controls. After 48 hours, the supernatants were collected and stored at -80°C for cytokine assay. Cells were used to analysis of GATA-3 expression by flow cytometry.

2.5. Flow Cytometry

For the analysis of GATA-3 expression, cells were harvested, washed in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 and submitted to blockage of nonspecific sites for 1 hour at 4°C with normal mouse serum and normal human serum. Lymphocytes were labeled employing anti-CD4 FITC and CD69 PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 1 hour at 4°C in the dark. The cell suspension was washed twice with PBS containing 5% fetal bovine serum. For GATA-3 labeling, cells were fixed and permeabilized using a specific kit (Buffer TranscriptionFactor Set BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and then incubated with anti-GATA-3 antibody labeled with AlexaFluor-647 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 1 hour at 4°C in the dark. To control the specificity of the reactions we employed unrelated antibodies presenting the same isotype and conjugated with the same fluorochrome (isotype controls, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Data collection was performed in a FACSCalibur flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), including a minimum of 10,000 events. For data analyses we used the FlowJo software version 7.6.5 (2011) and consider the mean fluorescence intensity values (MFI).

2.6. Cytokines measurement by CBA

For the measurement of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF and IFN- γ it was used a multiplex bead-based assay for Th1/Th2 profiles (CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Data collection was performed in a FACSCalibur flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and data were analyzed using FCAP software version 3 (2011).

2.7. Statistical Analyses

The frequencies of alleles, genotypes and carriers were analyzed using logistic regression model to calculate the values of odds ratio (OR). Analyses with adjustment for sex and ethnicity co-variables were also done. The combined analysis was done applying the same method and adjusting by origin population variable. The analyses were performed using the R statistical software for Windows (version 2.14.0). The p values ≤ 0.01 were taken as statistically significant. We excluded from analyses the markers that failed the Hardy-Weinberg test and/or presented a call rate lower than 95%.

To confirm the independent signals of the SNPs at *GATA3* we measured the linkage disequilibrium (LD) through r^2 statistics using the Haploview software, version 4.2 (Barrett et al., 2005).

In both group of cases, the set of MB is more representative than PB set. Therefore, we calculated if the subsets have a sufficient power to detect the same association found for leprosy per se. The power estimate was done using sample size and the minor allele frequency (MAF) of each subset of cases and the odds ratio obtained for leprosy per se (Supplementary Table 2), from the combined samples. For this analysis we used QUANTO Power and Sample Size Program version 1.2.4 (Gauderman and Morrison 2006).

Statistical analyses for the functional study were done using non-parametric tests. A p-value lower than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.01 (La Jolla, CA, USA; 2007).

3. RESULTS

3.1. A allele of the rs10905284 SNP at *GATA3* gene is associated to leprosy resistance in Brazilian patients

Seven SNPs at the *GATA3* gene were tested in 762 individuals of the discovery sample (Supplementary Table 3). Among them, the rs10905284 marker was associated to leprosy per se at p-value < 0.01 (Table 2). The association could be observed for CA genotype (OR 0.65; 95% CI 0.47-0.90; p=0.0099) and for the A carriers (OR 0.67; 95% CI 0.50-0.92; p=0.0117). The linkage disequilibrium analysis including the seven markers showed that rs10905284 has an independent signal (Fig. 1).

Thus, we tested this marker in a replication sample from Bauru and the findings confirmed the association of the rs10905284 to leprosy per se for A carriers (OR 0.67; 95% CI 0.48-0.92; p=0.0151), heterozygous CA (OR 0.69; 95% CI 0.49-0.97; p=0.0344), and also for homozygous AA (OR 0.61; 95% CI 0.40-0.93; p=0.0201) (Table 2).

Then, a combined analysis was conducted joining the data from both samples and using the population covariate for adjustment of the analysis. A stronger association with the combined population was observed for CA (OR 0.67; 95% CI 0.53-0.85; p=0.0009) and AA (OR 0.67; 95% CI 0.50-0.89; p=0.0056) genotypes; A carriers (OR 0.67; 95% CI 0.53-0.84; p=0.0004), and for the A allele (OR 0.81; 95% CI 0.66-0.98; p=0.0341) (Table 3). We also made analyses considering clinical forms for both samples, and we did not find any statistical significance (Supplementary Table 4 and Supplementary Table 2).

None of the SNPs evaluated deviated from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

3.2. rs10905284 SNP at *GATA3* gene modulates *in vitro* expression of GATA-3 in T cells

Next, we evaluated the expression of GATA-3 and CD69 in CD4⁺ lymphocytes by flow cytometry to verify the influence of the rs10905284 genotype in the response against *M. leprae* antigens (Fig. 2). Unstimulated cultures (US) showed a low expression of GATA-3. When cells were stimulated with ML a small intensification in the expression of GATA-3 was observed. After stimulation with PHA, an important increase in the expression of this transcription factor in most of the subjects, mainly in the individuals with AA genotype, was detected (Fig. 2). Then, GATA-3 expression in stimulated cultures was normalized by the values found in US cultures. We observed a higher expression of GATA-3 in AA individuals when compared to CC after stimulation with PHA (Fig. 2, $p=0.0415$).

We also investigated the T cells activation using CD69 as a marker. However there were no significant differences considering the genotypes AA and CC to the expression of CD69 (Fig. 2).

3.3. rs10905284 SNP at *GATA3* gene has no effect in the production of cytokines

We also evaluated the production of the cytokines IL-2 (interleukin-2), TNF (tumor necrosis factor), IFN- γ (interferon-gamma), IL-4 (interleukin-4), IL-5 (interleukin-5) and IL-10 (interleukin-10), according to the genotype for the rs10905284 variant. There was no significant variation in the levels of these cytokines related to the genotype for rs10905284 SNP (Fig. 3). PHA and ML stimulated TNF and IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), while only PHA induced IFN- γ and IL-5. The production of IL-2 and IL-4 was very low regardless of the stimulus (data not shown). Individuals with CC genotype for rs10905284 SNP presented negative correlation between the levels of GATA-3 expression and the production of cytokines IL-5 ($r = -0.90$; $p<0.01$) and IL-10 ($r = -0.71$; $p=0.03$).

4. DISCUSSION

Here, we investigated if *GATA3* gene is associated to leprosy, since it is a strong candidate because it is located in an interval of 6.5Mb from the previously published peak of linkage on chromosome 10p13 and has an important role in immunology (Siddiqui et al. 2001; Mira et al. 2003). For this, we applied a stepwise strategy in two Brazilian case-control samples and we focused on markers covering the gene based on linkage disequilibrium data of the HapMap. We found an association of the rs10905284 polymorphism to leprosy per se that could be confirmed for the Brazilian population since we used two samples from different regions of the country. Besides, we

looked for a functional evidence for our data and we found changes in the cell surface expression of GATA-3 dependent on the rs10905284 genotype.

Three genes at 10p13 region have already been associated to clinical forms of leprosy. Non-synonymous variants at exon 7 of the *MRC1* gene were associated to MB form in Vietnamese and Brazilian (Alter et al., 2010). SNPs at this gene were also associated to PB form in the Chinese population (Wang et al., 2012). At the same region, *CUBN* and *NEBL* genes were associated to MB leprosy in Vietnamese (Grant et al., 2014). Thus, the original involvement of the 10p13 region with the clinical form of leprosy seems to be reliable. However, this hypothesis does not preclude some association of this region to leprosy per se since these genes were also associated to leprosy per se (Alter et al. 2010; Grant et al. 2014). Here, we did not find *GATA3* markers associated to clinical forms of the disease, although we maintained a reasonable power for that (0.83). Thus, we can assume that the association found here also does not explain the PB linkage peak at 10p13, but is indubitably a strong association to leprosy per se.

The rs10905284 marker is located in an intron and close to the 3'UTR region of the *GATA3* gene. It is located just 1,200bp from the rs1058240 in the 3'UTR, which has three potential miRNA binding sites and influences the mRNA expression of *GATA3* (Yang et al., 2014). Thus, is reasonable speculate that the association seen to the rs10905284 can reflect the effect of some causative marker at 3'UTR. Nonetheless, our data allow saying that the rs10905284 is a representative marker of the *GATA3* involvement in the leprosy susceptibility for Brazilian population.

Polymorphisms in *GATA3* gene have been associated with the occurrence of several diseases with inflammatory background such as asthma, allergy and cancer (Guthikonda et al. 2014; Pykäläinen et al. 2005; Glubb et al. 2015; Cook et al. 2014; Andrew et al. 2012; Perez-Andreu et al. 2015; Chang et al. 2010; Arshad et al. 2008; Wang et al. 2008). However, there are no reports regarding infectious diseases. Also, no functional effect of variants at *GATA3* on immune response was already described, in spite of the broad effect of this transcription factor (Tindemans et al., 2014).

Individuals with AA genotype associated to leprosy resistance showed higher expression of GATA-3 protein. Besides, we have observed a negative correlation between the levels of GATA-3 expression and the production of IL-5 and IL-10 in individuals with CC genotype, but no significant difference in the production of classical Th1 and Th2 cytokines considering the genotypes for rs10905284. Recent evidences show that the role of this transcription factor goes beyond the induction of Th2 differentiation, and includes the control of Treg cells function and immune tolerance, since GATA-3 controls FoxP3 expression (Wang et al., 2011). GATA-3 is also involved in proliferation and survival of CD8+ T cells (Wang et al., 2013), and in the development of some subpopulations of natural killer (NK) cells (Vosshenrich et al., 2006). Experiments including *GATA3* knockout mice result in the complete ablation of T-cell development (Yang et al., 2013). This transcription factor is expressed on a variety of cell types and acts as a repressor or activator of the transcription and more

than 14,000 binding sites for GATA-3 have been identified in the DNA in human lymphocytes. GATA-3 also influences the pattern of methylation of various genes related to the immune response (Tindemans et al., 2014). Considering its broad range of action, it is possible that GATA-3 acts in other points of the immune response further than Th2 polarization, influencing the host-parasite interaction and contributing to leprosy susceptibility. One of these points can be the involvement of GATA-3 in the survival of CD8⁺ T cells (Wang et al., 2013), that are important in the response against *M. leprae* (Steinhoff and Kaufmann 1988; Sasiain et al. 1992; de la Barrera et al. 1997). In line with this idea, our data show association of *GATA3* with leprosy per se and not with the clinical form, that classically depends on the Th profile, suggesting the participation of GATA-3 also in events prior to the acquired immunity.

We demonstrated the association of the *GATA3* gene to leprosy in Brazilian. Besides, we verified an influence of the associated variant on the expression of this transcription factor. No data regarding the *GATA3* gene and infectious diseases is available in the literature. Thus, here we presented a new gene associated to leprosy and a new fact to the better understanding of the pathways involving GATA-3 in infectious diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the individuals who participated in this study. This study was supported by FAPESP Grant 2009/16873-8, CNPq/DECIT Grant 576051/2008-0 and Fundação Paulista Contra a Hanseníase. PM received a master fellowship from CAPES-DS and BBOG received a graduation fellowship from FAPESP (Grant 2014/04143-3).

REFERENCES

- Abel, L; Demenais, F., 1988. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet* 42, 256–266.
- Alcaïs, A., Alter, A., Antoni, G., Orlova, M., Nguyen, V.T., Singh, M., Vanderborght, P.R., Katoch, K., Mira, M.T., Vu, H.T., Ngyuen, T.H., Nguyen, N.B., Moraes, M., Mehra, N., Schurr, E., Abel, L., 2007. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat. Genet.* 39, 517–22. doi:10.1038/ng2000
- Alter, A., De Léséleuc, L., Van Thuc, N., Thai, V.H., Huong, N.T., Ba, N.N., Cardoso, C.C., Grant, A.V., Abel, L., Moraes, M.O., Alcaïs, A., Schurr, E., 2010. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum. Genet.* 127, 337–348. doi:10.1007/s00439-009-0775-x
- Alter, A., Grant, A., Abel, L., Alcaïs, A., Schurr, E., 2011. Leprosy as a genetic disease. *Mamm. Genome* 22, 19–31. doi:10.1007/s00335-010-9287-1
- Andrew, A.S., Hu, T., Gu, J., Gui, J., Ye, Y., Marsit, C.J., Kelsey, K.T., Schned, A.R., Tanyos, S. a., Pendleton, E.M., Mason, R. a., Morlock, E. V., Zens, M.S., Li, Z., Moore, J.H., Wu, X., Karagas, M.R., 2012. HSD3B and Gene-Gene Interactions in a Pathway-Based Analysis of Genetic Susceptibility to Bladder Cancer. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0051301
- Arshad, S.H., Karmaus, W., Kurukulaaratchy, R., Sadeghnejad, A., Huebner, M., Ewart, S., 2008. Polymorphisms in the interleukin 13 and GATA binding protein 3 genes and the development of eczema during childhood. *Br. J. Dermatol.* 158, 1315–1322. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08565.x
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457
- Cardoso, C.C., Pereira, a C., Brito-de-Souza, V.N., Dias-Baptista, I.M., Maniero, V.C., Venturini, J., Vilani-Moreno, F.R., de Souza, F.C., Ribeiro-Alves, M., Sarno, E.N., Pacheco, a G., Moraes, M.O., 2010. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum. Genet.* 128, 481–90. doi:10.1007/s00439-010-0872-x
- Cardoso, C.C., Pereira, A.C., Brito-de-Souza, V.N., Duraes, S.M.B., Ribeiro-Alves, M., Nery, J.A.C., Francio, Â.S., Vanderborght, P.R., Parelli, F.P.C., Alter, A., Salgado, J.L., Sampaio, E.P., Santos, A.R., Oliveira, M.L.W.R., Sarno, E.N., Schurr, E., Mira, M.T., Pacheco, A.G., Moraes, M.O., 2011. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J. Infect. Dis.* 204, 1256–63. doi:10.1093/infdis/jir521
- Chakravartti, M; Vogel, F., 1973. A twin study on leprosy (Topics in human genetics).
- Chang, J.S., Wiemels, J.L., Chokkalingam, A.P., Metayer, C., Barcellos, L.F., Hansen, H.M., Aldrich, M.C., Guha, N., Urayama, K.Y., Scelo, G., Green, J., May, S.L., Kiley, V.A., Wiencke, J.K., Buffler, P.A., 2010. Genetic Polymorphisms in Adaptive Immunity Genes and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 2152–2163. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0389

- Cook, M.B., Wang, Z., Yeboah, E.D., Tettey, Y., Biritwum, R.B., Adjei, A. a., Tay, E., Truelove, A., Niwa, S., Chung, C.C., Chokkalingam, A.P., Chu, L.W., Yeager, M., Hutchinson, A., Yu, K., Rand, K. a., Haiman, C. a., Hoover, R.N., Hsing, A.W., Chanock, S.J., 2014. A genome-wide association study of prostate cancer in West African men. *Hum. Genet.* 133, 509–521. doi:10.1007/s00439-013-1387-z
- De la Barrera, S., Finiasz, D.M., Fink, S., Valdez, R., Bottasso, O., Balina, L.M., Sasiain, M.C., 1997. Differential development of CD4 and CD8 cytotoxic T cells (CTL) in PBMC across the leprosy spectrum; IL-6 with IFN-gamma or IL-2 generate CTL in multibacillary patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 65, 45–55.
- Gauderman, WJ; Morrison, J., 2006. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies. [WWW Document]. <http://hydra.usc.edu/gxe>. URL <http://biostats.usc.edu/software> (accessed 2.13.15).
- Glubb, D.M., Maranian, M.J., Michailidou, K., Pooley, K.A., Meyer, K.B., Kar, S., Carlebur, S., O'Reilly, M., Betts, J.A., Hillman, K.M., Kaufmann, S., Beesley, J., Canisius, S., Hopper, J.L., Southey, M.C., Tsimiklis, H., Apicella, C., Schmidt, M.K., Broeks, A., Hogervorst, F.B., van der Schoot, C.E., Muir, K., Lophatananon, A., Stewart-Brown, S., Siriwanarangsarn, P., Fasching, P.A., Ruebner, M., Ekici, A.B., Beckmann, M.W., Peto, J., dos-Santos-Silva, I., Fletcher, O., Johnson, N., Pharoah, P.D.P., Bolla, M.K., Wang, Q., Dennis, J., Sawyer, E.J., Tomlinson, I., Kerin, M.J., Miller, N., Burwinkel, B., Marme, F., Yang, R., Surowy, H., Guénel, P., Truong, T., Menegaux, F., Sanchez, M., Bojesen, S.E., Nordestgaard, B.G., Nielsen, S.F., Flyger, H., González-Neira, A., Benitez, J., Zamora, M.P., Arias Perez, J.I., Anton-Culver, H., Neuhausen, S.L., Brenner, H., Dieffenbach, A.K., Arndt, V., Stegmaier, C., Meindl, A., Schmutzler, R.K., Brauch, H., Ko, Y.-D., Brüning, T., Nevanlinna, H., Muranen, T.A., Aittomäki, K., Blomqvist, C., Matsuo, K., Ito, H., Iwata, H., Tanaka, H., Dörk, T., Bogdanova, N.V., Helbig, S., Lindblom, A., Margolin, S., Mannermaa, A., Kataja, V., Kosma, V.-M., Hartikainen, J.M., Wu, A.H., Tseng, C., Van Den Berg, D., Stram, D.O., Lambrechts, D., Zhao, H., Weltens, C., van Limbergen, E., Chang-Claude, J., Flesch-Janys, D., Rudolph, A., Seibold, P., Radice, P., Peterlongo, P., Barile, M., Capra, F., Couch, F.J., Olson, J.E., Hallberg, E., Vachon, C., Giles, G.G., Milne, R.L., McLean, C., Haiman, C.A., Henderson, B.E., Schumacher, F., Le Marchand, L., Simard, J., Goldberg, M.S., Labrèche, F., Dumont, M., Teo, S.H., Yip, C.H., See, M.-H., Cornes, B., Cheng, C.-Y., Ikram, M.K., Kristensen, V., Zheng, W., Halverson, S.L., Shrubsole, M., Long, J., Winqvist, R., Pylkäs, K., Jukkola-Vuorinen, A., Kauppila, S., Andrulis, I.L., Knight, J.A., Glendon, G., Tchatchou, S., Devilee, P., Tollenaar, R.A.E.M., Seynaeve, C., Van Asperen, C.J., García-Closas, M., Figueroa, J., Chanock, S.J., Lissowska, J., Czene, K., Klevebring, D., Darabi, H., Eriksson, M., Hooning, M.J., Hollestelle, A., Martens, J.W.M., Collée, J.M., Hall, P., Li, J., Humphreys, K., Shu, X.-O., Lu, W., Gao, Y.-T., Cai, H., Cox, A., Cross, S.S., Reed, M.W.R., Blot, W., Signorello, L.B., Cai, Q., Shah, M., Ghoussaini, M., Kang, D., Choi, J.-Y., Park, S.K., Noh, D.-Y., Hartman, M., Miao, H., Lim, W.Y., Tang, A., Hamann, U., Torres, D., Jakubowska, A., Lubinski, J., Jaworska, K., Durda, K., Sangrajrang, S., Gaborieau, V., Brennan, P., McKay, J., Olswold, C., Slager, S., Toland, A.E., Yannoukakos, D., Shen, C.-Y., Wu, P.-E., Yu, J.-C., Hou, M.-F., Swerdlow, A., Ashworth, A., Orr, N., Jones, M., Pita, G., Alonso, M.R., Álvarez, N., Herrero, D., Tessier, D.C., Vincent, D., Bacot, F., Luccarini, C., Baynes, C., Ahmed, S., Healey, C.S., Brown, M.A., Ponder, B.A.J., Chenevix-Trench, G., Thompson, D.J., Edwards, S.L., Easton, D.F., Dunning, A.M., French, J.D., 2015. Fine-Scale Mapping of the 5q11.2 Breast Cancer Locus Reveals at Least Three Independent Risk Variants Regulating MAP3K1. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 5–20. doi:10.1016/j.ajhg.2014.11.009
- Goulart, Isabela Maria Bernades; Penna, Gerson Oliveira; Cunha, G., 2002. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 365–375.

- Grant, A. V., Alter, A., Huong, N.T., Orlova, M., Van Thuc, N., Ba, N.N., Thai, V.H., Abel, L., Schurr, E., Alcais, A., 2012. Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the Vietnamese population. *J. Infect. Dis.* 206, 1763–7. doi:10.1093/infdis/jis588
- Grant, A. V., Cobat, A., Van Thuc, N., Orlova, M., Huong, N.T., Gaschignard, J., Alter, A., Ba, N.N., Thai, V.H., Abel, L., Alcais, A., Schurr, E., 2014. CUBN and NEBL common variants in the chromosome 10p13 linkage region are associated with multibacillary leprosy in Vietnam. *Hum. Genet.* 133, 833–93. doi:10.1007/s00439-014-1430-8
- Guthikonda, K., Zhang, H., Nolan, V.G., Soto-Ramírez, N., Ziyab, A.H., Ewart, S., Arshad, H.S., Patil, V., Holloway, J.W., Lockett, G. a, Karmaus, W., 2014. Oral contraceptives modify the effect of GATA3 polymorphisms on the risk of asthma at the age of 18 years via DNA methylation. *Clin. Epigenetics* 6, 17. doi:10.1186/1868-7083-6-17
- Lázaro, F.P., Werneck, R.I., Mackert, C.C.O., Cobat, A., Prevedello, F.C., Pimentel, R.P., Macedo, G.M.M., Eleutério, M. a M., Vilar, G., Abel, L., Xavier, M.B., Alcais, A., Mira, M.T., 2010. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J. Infect. Dis.* 201, 1598–1605. doi:10.1086/652007
- Malhotra, D., Darvishi, K., Sood, S., Sharma, S., Grover, C., Relhan, V., Reddy, B.S.N., Bamezai, R.N.K., 2005. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum. Genet.* 118, 295–300. doi:10.1007/s00439-005-0042-8
- Marques, C.D.S., Brito-de-Souza, V.N., Guerreiro, L.T.A., Martins, J.H., Amaral, E.P., Cardoso, C.C., Dias-Batista, I.M.F., Silva, W.L. Da, Nery, J.A.C., Medeiros, P., Gigliotti, P., Campanelli, A.P., Virmond, M., Sarno, E.N., Mira, M.T., Lana, F.C.F., Caffarena, E.R., Pacheco, A.G., Pereira, A.C., Moraes, M.O., 2013. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J. Infect. Dis.* 208, 120–9. doi:10.1093/infdis/jit133
- Mira, M.T., Alcais, A., Moraes, M.O., Flumeri, C. Di, Thai, V.H., Khoa, P.X., Sarno, E.N., Alter, A., Montpetit, A., Gallant, C.J., Lepage, P., Verner, A., Vosse, E. Van De, 2004. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG 427, 636–640. doi:10.1038/nature02287.1.
- Mira, M.T., Alcais, A., Van Thuc, N., Thai, V.H., Huong, N.T., Ba, N.N., Verner, A., Hudson, T.J., Abel, L., Schurr, E., 2003. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat. Genet.* 33, 412–5. doi:10.1038/ng1096
- Modlin, R.L., 1994. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. *J. Invest. Dermatol.* 106, 828–832.
- Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J.-Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.S., Truman, R.W., Williams, D.L., Gelber, R., Virmond, M., Flageul, B., Cho, S.-N., Ji, B., Paniz-Mondolfi, A., Convit, J., Young, S., Fine, P.E., Rasolofo, V., Brennan, P.J., Cole, S.T., 2005. On the origin of leprosy. *Science* 308, 1040–2. doi:10.1126/science/1109759
- Pacheco, A.G., Moraes, M.O., 2009. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis. Markers* 27, 173–86. doi:10.3233/DMA-2009-0654
- Pereira, a C., Brito-de-Souza, V.N., Cardoso, C.C., Dias-Baptista, I.M.F., Parelli, F.P.C., Venturini, J., Villani-Moreno, F.R., Pacheco, a G., Moraes, M.O., 2009. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 10, 174–80. doi:10.1038/gene.2008.97

- Perez-Andreu, V., Roberts, K.G., Xu, H., Smith, C., Zhang, H., Yang, W., Harvey, R.C., Payne-Turner, D., Devidas, M., Cheng, I.-M., Carroll, W.L., Heerema, N.A., Carroll, A.J., Raetz, E.A., Gastier-Foster, J.M., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Mrózek, K., Kohlschmidt, J., Stock, W., Kornblau, S.M., Konopleva, M., Paietta, E., Rowe, J.M., Luger, S.M., Tallman, M.S., Dean, M., Burchard, E.G., Torgerson, D.G., Yue, F., Wang, Y., Pui, C.-H., Jeha, S., Relling, M. V, Evans, W.E., Gerhard, D.S., Loh, M.L., Willman, C.L., Hunger, S.P., Mullighan, C.G., Yang, J.J., 2015. A genome-wide association study of susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Blood* 125, 680–6. doi:10.1182/blood-2014-09-595744
- Pykäläinen, M., Kinos, R., Valkonen, S., Rydman, P., Kilpeläinen, M., Laitinen, L.A., Karjalainen, J., Nieminen, M., Hurme, M., Kere, J., Laitinen, T., Lahesmaa, R., 2005. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 80–7. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.006
- Ridley, D. S. e Jopling, W.H., 1966. Classification of Leprosy According to Immunity - A five-group System. *Int. J. os Lepr.* 34, 225–273.
- Roy, S., McGuire, W., Mascie-Taylor, C.G., Saha, B., Hazra, S.K., Hill, a V, Kwiatkowski, D., 1997. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J. Infect. Dis.* 176, 530–532.
- Sales-Marques, C., Salomão, H., Fava, V.M., Alvarado-Arnez, L.E., Amaral, E.P., Cardoso, C.C., Dias-Batista, I.M.F., da Silva, W.L., Medeiros, P., da Cunha Lopes Virmond, M., Lana, F.C.F., Pacheco, A.G., Moraes, M.O., Mira, M.T., Pereira Latini, A.C., 2014. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum. Genet.* 133, 1525–1532. doi:10.1007/s00439-014-1502-9
- Santos, A.R., Suffys, P.N., Vanderborght, P.R., Moraes, M.O., Vieira, L.M.M., Cabello, P.H., Bakker, A.M., Matos, H.J., Huizinga, T.W.J., Ottenhoff, T.H.M., Sampaio, E.P., Sarno, E.N., 2002. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J. Infect. Dis.* 186, 1687–91. doi:10.1086/345366
- Sasiain, M.C., De la Barrera, S., Minnucci, F., Valdez, R., De Bracco, M.M.E., Balina, L.M., 1992. T-cell-mediated cytotoxicity against Mycobacterium antigen-pulsed autologous macrophages in leprosy patients. *Infect. Immun.* 60, 3389–3395.
- Siddiqui, M.R., Meisner, S., Tosh, K., Balakrishnan, K., Ghei, S., Fisher, S.E., Golding, M., Narayan, N.P.S., Sitaraman, T., Sengupta, U., Hill, A.V.S., 2001. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat. Genet.* 27, 439–441.
- Steinhoff, U., Kaufmann, S.H.E., 1988. Specific lysis by CD8+ T cells of Schwann cells expressing Mycobacterium leprae antigens. *Eur. J. Immunol.* 18, 969–972.
- Tindemans, I., Serafini, N., Di Santo, J.P., Hendriks, R.W., 2014. GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* 41, 191–206. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.006
- Vanderborght, P.R., Pacheco, A.G., Moraes, M.E., Antoni, G., Romero, M., Verville, A., Thai, V.H., Huong, N.T., Ba, N.N., Schurr, E., Sarno, E.N., Moraes, M.O., 2007. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun.* 8, 320–4. doi:10.1038/sj.gene.6364390
- Vosshenrich, C. a J., García-Ojeda, M.E., Samson-Villéger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., Rogge, L., Ezine, S., Di Santo,

- J.P., 2006. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat. Immunol.* 7, 1217–1224. doi:10.1038/ni1395
- Wang, D., Feng, J.Q., Li, Y.Y., Zhang, D.F., Li, X.A., Li, Q.W., Yao, Y.G., 2012. Genetic variants of the MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum. Genet.* 131, 1251–1260. doi:10.1007/s00439-012-1153-7
- Wang, X.-D., Zhang, L., Duan, H., She, W.-Y., Zhao, Y., Liu, S., Han, D.-M., 2008. [Association of single nucleotide polymorphisms of GATA3 with allergic rhinitis phenotypes in Chinese]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 43, 494–8.
- Wang, Y., Misumi, I., Gu, A.-D., Curtis, T.A., Su, L., Whitmire, J.K., Wan, Y.Y., 2013. GATA-3 controls the maintenance and proliferation of T cells downstream of TCR and cytokine signaling. *Nat. Immunol.* 14, 714–22. doi:10.1038/ni.2623
- Wang, Y., Su, M. a., Wan, Y.Y., 2011. An Essential Role of the Transcription Factor GATA-3 for the Function of Regulatory T Cells. *Immunity* 35, 337–348. doi:10.1016/j.immuni.2011.08.012
- World Health Organization, 2014. Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. *Weekly Epidemiological Record*, 89, 389-400.
- World Health Organization, 1998. WHO Model Prescribing Information Drugs used in leprosy.
- Yang, F., Chen, F., Gu, J., Zhang, W., Luo, J., Guan, X., 2014. Genetic variant rs1058240 at the microRNA-binding site in the GATA3 gene may regulate its mRNA expression. *Biomed Rep* 2, 404–407. doi:10.3892/br.2014.254
- Yang, Q., Monticelli, L. a, Saenz, S. a, Chi, A.W.-S., Sonnenberg, G.F., Tang, J., De Obaldia, M.E., Bailis, W., Bryson, J.L., Toscano, K., Huang, J., Haczku, A., Pear, W.S., Artis, D., Bhandoola, A., 2013. T cell factor 1 is required for group 2 innate lymphoid cell generation. *Immunity* 38, 694–704. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.003
- Zhang, F.-R., Huang, W., Chen, S.-M., Sun, L.-D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X.-X., Yang, H.-T., Yang, R.-D., Chu, T.-S., Zhang, C., Zhang, L., Han, J.-W., Yu, G.-Q., Quan, C., Yu, Y.-X., Zhang, Z., Shi, B.-Q., Zhang, L.-H., Cheng, H., Wang, C.-Y., Lin, Y., Zheng, H.-F., Fu, X.-A., Zuo, X.-B., Wang, Q., Long, H., Sun, Y.-P., Cheng, Y.-L., Tian, H.-Q., Zhou, F.-S., Liu, H.-X., Lu, W.-S., He, S.-M., Du, W.-L., Shen, M., Jin, Q.-Y., Wang, Y., Low, H.-Q., Erwin, T., Yang, N.-H., Li, J.-Y., Zhao, X., Jiao, Y.-L., Mao, L.-G., Yin, G., Jiang, Z.-X., Wang, X.-D., Yu, J.-P., Hu, Z.-H., Gong, C.-H., Liu, Y.-Q., Liu, R.-Y., Wang, D.-M., Wei, D., Liu, J.-X., Cao, W.-K., Cao, H.-Z., Li, Y.-P., Yan, W.-G., Wei, S.-Y., Wang, K.-J., Hibberd, M.L., Yang, S., Zhang, X.-J., Liu, J.-J., 2009. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 361, 2609–18. doi:10.1056/NEJMoa0903753

LEGEND OF THE FIGURES

Fig. 1. Linkage disequilibrium (LD) map at seven polymorphisms (tagSNPs) from *GATA3*. The number within boxes represent r^2 values, calculated by Haploview software (4.2).

Fig. 2. *GATA-3* and *CD69* expression in *CD4+* lymphocytes according to the genotypes for rs10905284 SNP. **A.** *GATA-3* expression in AA and CC individuals in unstimulated cultures (US) and after stimulation with *M. leprae* sonicate antigen (ML) and phytohemagglutinin (PHA). **B and C.** The mean fluorescence intensity (MFI) was normalized by the values observed in unstimulated cultures. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test.

Fig. 3. Cytokine levels in culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) according to the genotypes for rs10905284. PBMCs were stimulated for 48 hours with ML (10mg/ml) and PHA (8 mg/ml) or unstimulated (US). The median value was indicated by a line. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Friedman nonparametric analysis of variance followed by Dunn's post-test.

TABLES

Table 1. Power to detect the association of OR=0.73 in the PB (n=185) and MB subsets (n=655) considering the minor allele frequencies of the combined sample.

Stratum	MAF^a	Model^b	Power ($\alpha=0,05$)	Power ($\alpha=0,01$)
PB	0.44	ADD	0.83	0.61
MB	0.43	ADD	0.83	0.61

Abbreviation: PB – paucibacillary, MB – multibacillary

^aMAF - Minor allele frequency for the control group in the combined sample

^bGenetic model - ADD (additive).

Table 2. Allele, genotype and carrier frequencies of the rs10905284 polymorphism in case and control groups and logistic regression data for association with leprosy per se in the discovery sample from Rondonopolis and replication sample from Bauru.

SNP rs10905284	Discovery sample (n=762)				Replication sample (n=871)			
	Control	Case	OR(95% CI) p-value	OR(95% CI) p-value ^a	Control	Case	OR(95% CI) p-value	OR(95% CI) p-value ^a
Allele A	0.47	0.42	0.82 (0.62-1.10) 0.1813	0.82 (0.61-1.09) 0.1690	0.5	0.45	0.85 (0.65-1.11) 0.2346	0.79 (0.59-1.05) 0.0985
Allele C	0.53	0.58	*	*	0.5	0.55	*	*
AA	80 (0.22)	87 (0.21)	0.73 (0.49-1.08) 0.1186	0.72 (0.48-1.07) 0.1066	83 (0.23)	105 (0.21)	0.72 (0.49-1.07) 0.1004	0.61 (0.40-0.93) 0.0201
CA	176 (0.49)	170 (0.42)	0.65 (0.47-0.90) 0.0099	0.64 (0.46-0.89) 0.0084	191 (0.53)	255 (0.50)	0.76 (0.55-1.05) 0.0980	0.69 (0.49-0.97) 0.0344
CC	100 (0.28)	149 (0.37)	*	*	86 (0.24)	151 (0.30)	*	*
A carrier			0.67 (0.50-0.92) 0.0117	0.67 (0.49-0.91) 0.0097			0.75 (0.55-1.02) 0.0649	0.67 (0.48-0.92) 0.0151

Bold values denote statistically significant results.

Abbreviation: OR - odds ratio; CI - confidence interval of 95%.

^aOR e p-value were adjusted for covariates sex and ethnicity.

*Indicates the baseline for comparison.

Table 3. Allele, genotype and carrier frequencies of the rs10905284 polymorphism and logistic regression data for association with leprosy per se in the combined populations.

SNP rs10905284	Combined samples (n=1633)			
	Control	Case	OR(95% CI) p-value	OR(95% CI) p-value ^b
Allele A	0.48	0.44	0.84 (0.69-1.02) 0.085	0.81 (0.66-0.98) 0.0341
Allele C	0.52	0.56	*	*
AA	163 (0.23)	192 (0.21)	0.73 (0.55-0.96) 0.0265	0.67 (0.50-0.89) 0.0056
CA	367 (0.51)	425 (0.46)	0.72 (0.57-0.90) 0.0048	0.67 (0.53-0.85) 0.0009
CC	186 (0.26)	300 (0.33)	*	*
A carrier			0.72 (0.58-0.90) 0.0032	0.67 (0.54-0.84) 0.0004

Bold values denote statistically significant results.

Abbreviation: OR - odds ratio; CI - confidence interval of 95%.

^bOR e p-value were adjusted for covariates sex, ethnicity and study.

*Indicates the baseline for comparison.

FIGURES

Figure1

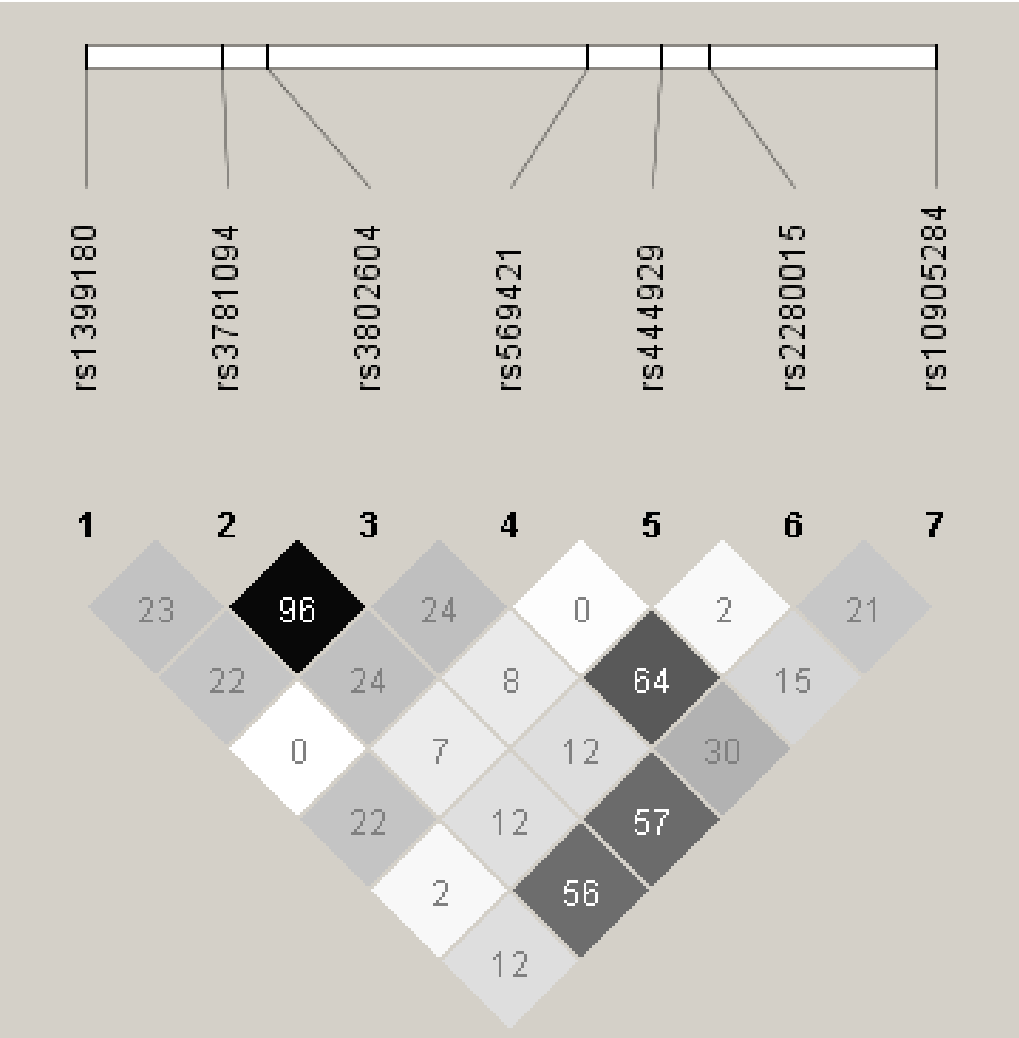


Figure2

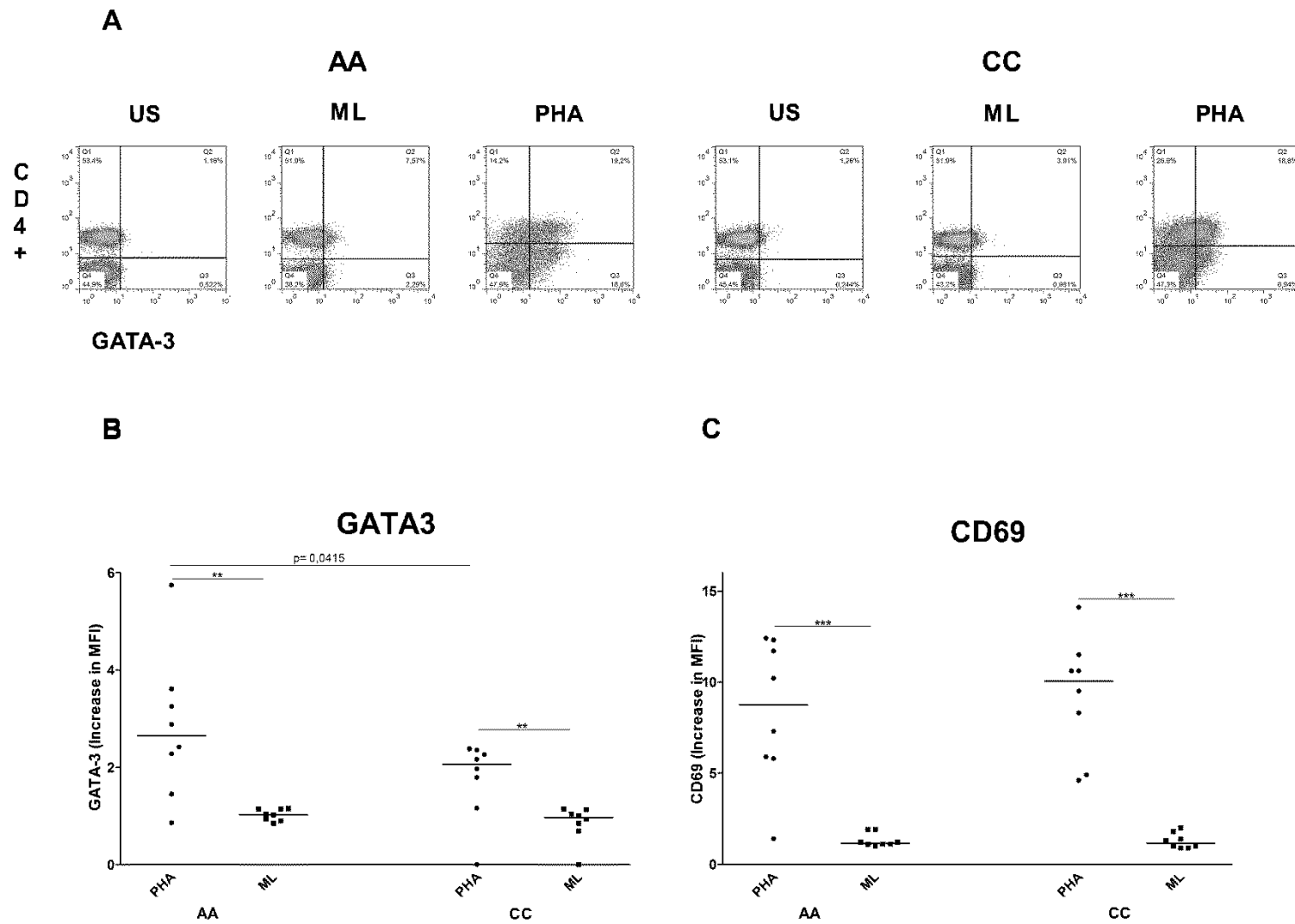
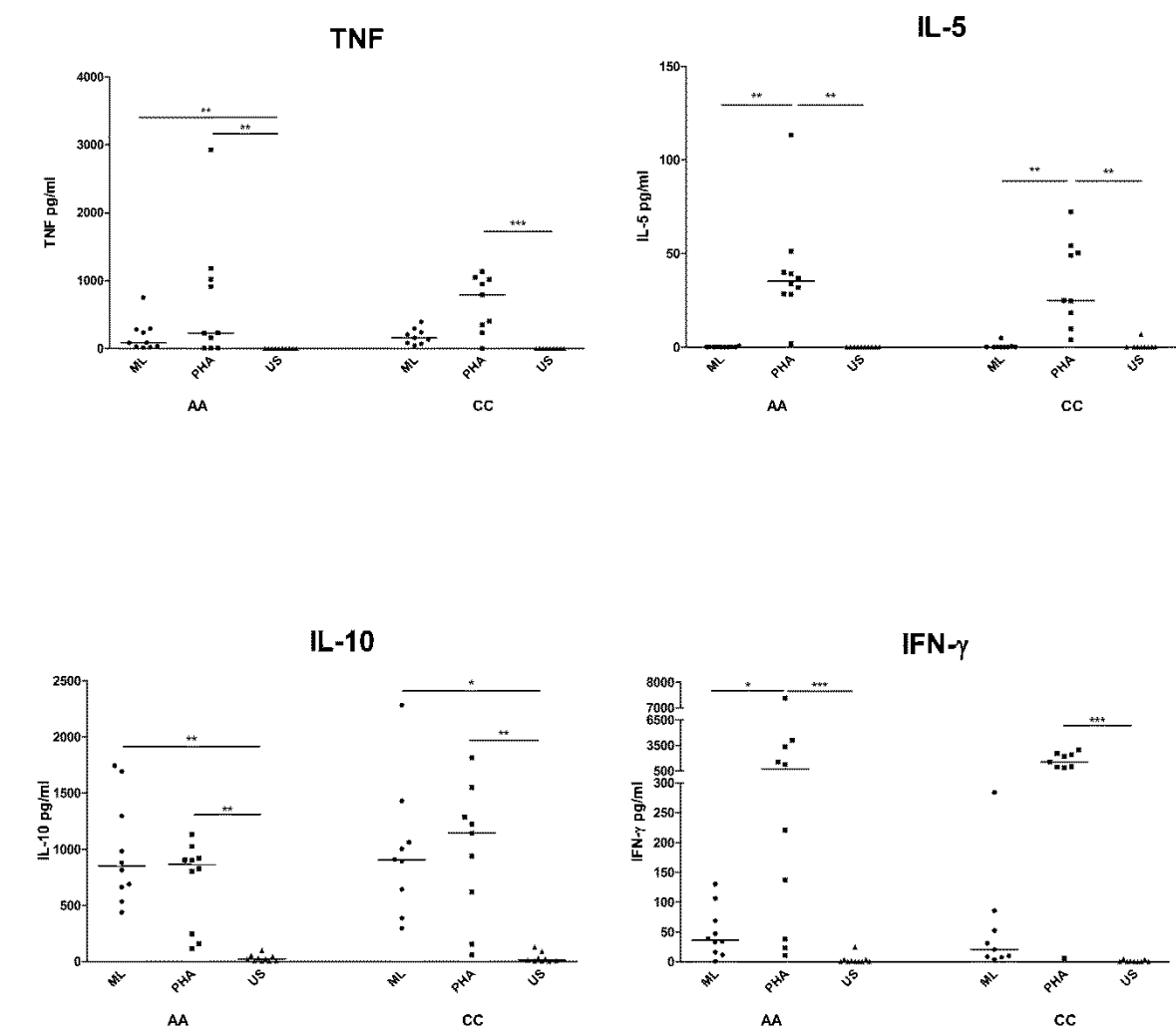


Figure3



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary table 1. General characteristics of the individuals enrolled in case-control association studies from Rondonopolis and Bauru.

Case-Control Studies Characteristics	Rondonopolis		Bauru	
	Case n=411	Control n=357	Case n=511	Control n=380
Age (mean ± SD)	42 ± 16.4	42 ± 13.9	41 ± 18.0	36 ± 10.7
Ethnic group, n* (%)				
Caucasian	147 (0.36)	117 (0.33)	439 (0.86)	240 (0.63)
Mestizo	247 (0.60)	226 (0.63)	63 (0.12)	104 (0.27)
Black	17 (0.04)	14 (0.04)	28 (0.05)	28 (0.07)
Sex, n* (%)				
Male	250 (0.61)	217 (0.61)	381 (0.75)	252 (0.66)
Female	161 (0.39)	140 (0.39)	176 (0.34)	128 (0.34)
WHO classification, n* (%)				
Paucibacillary	96 (0.23)		99 (0.19)	
Multibacillary	310 (0.75)		380 (0.74)	

SD – Standard Deviation.

*The number of individuals may be different from the total number due to missing information.

Supplementary table 2. Allele, genotype and carrier frequencies of the rs10905284 polymorphism in paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) groups and logistic regression data for association with clinical form in the combined populations.

SNP rs10905284	Combined sample (n=840)			
	PB	MB	OR(95% CI) p-value	OR(95% CI) p-value ^b
Allele A	0.44	0.43	0.83 (0.60-1.16) 0.2711	0.83 (0.59-1.17) 0.2874
Allele C	0.56	0.57	*	*
AA	35 (0.19)	134 (0.20)	1.00 (0.63-1.61) 0.9859	1.06 (0.65-1.71) 0.8181
CA	92 (0.50)	298 (0.45)	1.19 (0.82-1.72) 0.3659	1.18 (0.81-1.72) 0.3893
CC	58 (0.31)	223 (0.34)	*	*
A Carrier			1.13 (0.80-1.60) 0.4929	1.14 (0.80-1.63) 0.4600

Abbreviation: OR - odds ratio; CI - confidence interval of 95%.

^bOR e p-value were adjusted for covariates sex, ethnicity and study.

*Indicates the baseline for comparison.

Supplementary table 3. Allele, genotype and carrier frequencies of the *GATA3* SNPs in case and control groups and logistic regression data for association with leprosy per se in the discovery sample from Rondonopolis.

	Alelles or Genotypes	Controls (n=356)	Cases (n=406)	OR (95% CI) p-value	OR (95% CI) p-value ^a
rs1399180	A	0.21	0.23	1.16 (0.82-1.63) 0.4089	1.17 (0.83-1.65) 0.3830
	G	0.79	0.77	*	*
	AA	23 (0.06)	22 (0.05)	0.92 (0.50-1.70) 0.8015	0.94 (0.51-1.74) 0.8438
	GA	102 (0.29)	145 (0.36)	1.37 (1.01-1.88) 0.0454	1.39 (1.01-1.89) 0.0404
	GG	231 (0.65)	239 (0.59)	*	*
	Carrier A			1.29 (0.96-1.73) 0.0883	1.30 (0.97-1.75) 0.0772
rs2280015	A	0.21	0.22	1.10 (0.77-1.55) 0.6050	1.09 (0.77-1.55) 0.6127
	G	0.79	0.78	*	*
	AA	14 (0.04)	21 (0.05)	1.35 (0.67-2.73) 0.3951	1.35 (0.67-2.72) 0.4034
	GA	118 (0.33)	137 (0.34)	1.05 (0.77-1.42) 0.7604	1.05 (0.77-1.42) 0.7667
	GG	224 (0.63)	248 (0.61)	*	*
	Carrier A			1.29 (0.96-1.73) 0.0883	1.30 (0.97-1.75) 0.0772
rs3781094	A	0.46	0.50	1.16 (0.87-1.54) 0.3097	1.17 (0.88-1.56) 0.2781
	C	0.54	0.50	*	*
	AA	82 (0.23)	106 (0.26)	1.32 (0.89-1.95) 0.1689	1.35 (0.91-2.00) 0.1397
	CA	164 (0.46)	192 (0.47)	1.19 (0.85-1.67) 0.3068	1.21 (0.86-1.69) 0.2790
	CC	110 (0.31)	108 (0.27)	*	*
	Carrier A			1.23 (0.90-1.69) 0.1906	1.25 (0.91-1.72) 0.1646

rs3802604	A	0.53	0.50	*	*
	G	0.47	0.50	1.12 (0.85-1.50) 0.4192	1.14 (0.85-1.51) 0.3827
	AA	107 (0.30)	107 (0.26)	*	*
	AG	162 (0.46)	191 (0.47)	1.18 (0.84-1.66) 0.3425	1.19 (0.85-1.68) 0.3170
	GG	87 (0.24)	108 (0.27)	1.24 (0.84-1.83) 0.2763	1.27 (0.86-1.88) 0.2368
	Carrier G			1.20 (0.88-1.65) 0.2569	1.22 (0.88-1.67) 0.2272
rs444929	A	0.84	0.83	*	*
	G	0.16	0.17	1.08 (0.73-1.59) 0.7040	1.08 (0.73-1.59) 0.7033
	AA	254 (0.71)	282 (0.69)	*	*
	AG	92 (0.26)	112 (0.28)	1.10 (0.79-1.52) 0.5770	1.09 (0.79-1.51) 0.5931
	GG	10 (0.03)	12 (0.03)	1.08 (0.46-2.54) 0.8587	1.10 (0.47-2.59) 0.8309
	Carrier G			1.10 (0.80-1.50) 0.5688	1.09 (0.80-1.49) 0.5772
rs569421	A	0.72	0.71	*	*
	G	0.28	0.29	1.04 (0.76-1.42) 0.8199	1.04 (0.76-1.42) 0.8248
	AA	183 (0.51)	205 (0.50)	*	*
	AG	147 (0.41)	169 (0.42)	1.03 (0.76-1.38) 0.8644	1.03 (0.76-1.39) 0.8450
	GG	26 (0.07)	32 (0.08)	1.10 (0.63-1.91) 0.7394	1.09 (0.62-1.90) 0.7666
	Carrier G			1.04 (0.78-1.38) 0.8016	1.04 (0.78-1.38) 0.7925

Abbreviation: OR - odds ratio; CI - confidence interval of 95%.

^aOR e p-value were adjusted for covariates sex and ethnicity.

*Indicates the baseline for comparison.

Supplementary table 4. Allele, genotype and carrier frequencies of the rs10905284 polymorphism in paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) groups and logistic regression data for association with clinical form in the discovery sample from Rondonopolis and replication sample from Bauru.

SNP rs10905284	Discovery sample (n=401)				Replication sample (n=439)			
	PB	MB	OR(95% CI) p-value	OR(95% CI) p-value ^a	PB	MB	OR(95% CI) p-value	OR(95% CI) p-value ^a
Allele A	0.43	0.42	1.03 (0.64-1.64) 0.9124	1.08 (0.67-1.75) 0.7395	0.45	0.44	1.03 (0.65-1.64) 0.901	1.02 (0.64-1.64) 0.9263
Allele C	0.57	0.58	*	*	0.55	0.56	*	*
AA	18 (0.19)	67 (0.22)	0.97 (0.51-1.87) 0.9365	1.09 (0.56-2.13) 0.8014	17 (0.19)	67 (0.19)	1.04 (0.53-2.07) 0.9013	1.04 (0.52-2.09) 0.9088
CA	45 (0.47)	123 (0.40)	1.33 (0.79-2.23) 0.2867	1.31 (0.77-2.23) 0.3118	47 (0.52)	175 (0.50)	1.11 (0.65-1.89) 0.7144	1.05 (0.61-1.81) 0.8655
CC	32 (0.34)	116 (0.38)	*	*	26 (0.29)	107 (0.31)	*	*
A Carrier			1.20 (0.74-1.95) 0.4564	1.24 (0.76-2.04) 0.3923			1.09 (0.65-1.81) 0.7446	1.05 (0.62-1.76) 0.8638

Abbreviation: OR - odds ratio; CI - confidence interval of 95%.

^aOR e p-value were adjusted for covariates sex and ethnicity.

*Indicates the baseline for comparison.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Opromolla DVA. Noções de Hansenologia. 2000.
2. Opromolla DVA. História. Noções de Hansenologia. 2000. p. 1–5.
3. Agricola E. A Lepra no Brasil. Manual de Leprologia. Rio de Janeiro; 1960. p. 11–29.
4. Opromolla PA, Martelli ACC. A terminologia relativa à hanseníase - [Terminology related to Hansen' s disease]. An Bras Dermatol. 2005;80(3):293–4.
5. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. Saúde e Soc [Internet]. Saúde e Sociedade; 2004 Aug [cited 2014 Jul 2];13(2):76–88. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902004000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
6. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. Science [Internet]. 2005 May 13 [cited 2014 Sep 12];308(5724):1040–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894530>
7. Monteiro YN. Hanseníase: História e poder no Estado de São Paulo. Hansenol Int. 1987;12(1):1–7.
8. Prevedello FC, Mira MT. Leprosy: a genetic disease? An Bras Dermatol. 2007;82(5):451–9.
9. Lockwood DNJ. Leprosy elimination-a virtual phenomenon or a reality? BMJ [Internet]. 2002 Jun 22 [cited 2015 Aug 24];324(7352):1516–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1123450&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Silva Sobrinho RA Da, Mathias TADF. Perspectivas de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública no Estado do Paraná, Brasil. Cad Saude Publica. 2008;24(2):303–14.

11. Santos AS dos, Castro DS de, Falqueto A. Fatores de risco para transmissão da Hanseníase. Rev Bras Enferm [Internet]. Associação Brasileira de Enfermagem; 2008 Nov [cited 2014 Jul 11];61(spe):738–43. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000700014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
12. World Health Organization (WHO). Global leprosy update, 2014: need for early case detection. Weekly epidemiological record. 2015;90(36):461–76.
13. World Health Organization (WHO). Global leprosy: update on the 2012 situation. Weekly epidemiological record. 2013;88(35):365–80.
14. World Health Organization (WHO). Global leprosy update, 2013: reducing disease burden. Weekly epidemiological record. 2014;89(36):389–400.
15. Penna MLF, de Oliveira MLVDR, Penna GO. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. Lepr Rev. 2009;80(3):332–44.
16. Brasil. Ministério da Saúde/SVS Sistema de Informação de Agravos de Notificação SINAN. Indicadores de Morbidade. Prevalência de Hanseníase por região Brasil 2013.
17. Opromolla, Diltor Vladimir Araujo, Dias Baptista IMF. Micobactérias. Noções de Hansenologia. 2000. p. 7–11.
18. Brenner, JD; Krieg, RN; Staley T. Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria: introductory essays. 2nd ed. New York; 2005.
19. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from Mycobacterium leprae and use in serodiagnosis of leprosy. Infect Immun [Internet]. 1983 Sep [cited 2015 Aug 27];41(3):1077–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=264610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Nogueira, MES, Moreno, FRV, Silva, EA, Arruda M. Imunologia. Noções de Hansenologia. 2000. p. 27–42.

21. Foss NT, Callera F, Alberto FL. Anti-PGL1 levels in leprosy patients and their contacts. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 1993 Jan [cited 2015 Aug 27];26(1):43–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8220267>
22. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2013 Sep;104(7):554–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870850>
23. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409:1007–11.
24. Schuenemann VJ, Singh P, Mendum T a, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science* [Internet]. 2013;341(6142):179–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765279>
25. Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in foot-pad of the mouse. *Int J Lepr*. 1962;3:291–306.
26. Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome*. 2011;22:19–31.
27. Cardoso, Cynthia Chester; Pereira, Ana Carla; Marques, Carolinne de Sales; Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Futur microbiol*. 2011;6:533–49.
28. Jones, L; Moszer, I; Cole S. Lepromona: a *Mycobacterium leprae* genome browser. *Lepr Rev*. 2001;72:470–7.
29. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009;41(12):1282–9.
30. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2006 Apr;19(2):338–

81. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1471987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
31. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol* [Internet]. 2001 Jan [cited 2015 Apr 27];2(8):REVIEWS1023. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=138955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Ura, Somei, Opromolla DVA. *Epidemiologia. Noções de Hansenologia*. 2000. p. 101–7.
33. Turankar RP, Lavania M, Chaitanya VS, Sengupta U, Darlong J, Darlong F, et al. Single nucleotide polymorphism-based molecular typing of *M. leprae* from multicase families of leprosy patients and their surroundings to understand the transmission of leprosy. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Jul 2];20(3):O142–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520878>
34. Ghorpade A. Clinicopathologic challenge What is your diagnosis ? 2009;11–3.
35. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP V, Martelli CMT, et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(11):1400–8.
36. Beiguelman B. *Genética e Hanseníase*. *Cien Saude Colet*. 2002;7(1):117–28.
37. Castro I. *Classificação. Manual de Leprologia*. Rio de Janeiro; 1960. p. 77–83.
38. Quagliato R. Critério Clínico. *Rev Bras Leprol*. 1958;27(1):17–32.
39. Ridley, D. S. e Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity - A five-group System. *Int J os Lepr*. 1966;34(3):225–73.
40. World Healthy Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ Tech Rep Ser* [Internet]. 1982 Jan [cited 2015 Jun 9];675:1–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6806990>

41. Souza CS. Hanseníase : formas clínicas e diagnóstico diferencial. Medicina (B Aires). 1997;30:325–34.
42. Opromolla DVA. Classificação. Noções de Hansenologia. 2000. p. 47–50.
43. No Title. World Health Organ Tech Rep Ser. 1982;675:1–33.
44. Opromolla DVA. Diagnóstico da hanseníase. Noções de Hansenologia. 2000. p. 59–61.
45. Beiguelman B. Sobre a reação de Mitsuda. Rev Bras Leprol. 1964;39–46.
46. Bühner-Sékula S. Sorologia PGL-I na hanseníase. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(SUPPL. 2):3–5.
47. Duthie MS, Balagon MF, Maghanoy A, Orcullo FM, Cang M, Dias RF, et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. J Clin Microbiol. 2014;52(2):613–9.
48. Opromolla DVA. Manifestações clínicas e Reações. Noções de Hansenologia. 2000. p. 51–8.
49. Goulart, Isabela Maria Bernades; Penna, Gerson Oliveira; 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;365–75.
50. Andrade V. Implementação da PQT/OMS no Brasil. Hansenol Int. 2006;31(1):23–31.
51. World Health Organization. WHO Model Prescribing Information Drugs used in leprosy. Geneva; 1998. p. 4–5.
52. Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H; Pillai S. Propriedades Gerais das Respostas Imune. Imunologia Celular e Molecular. Sétima. 2011. p. 1–16.
53. Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H; Pillai S. Imunidade contra Micro-organismos. Imunologia Celular e Molecular. Sétima. 2011. p. 345–64.

54. Brito-de-Souza VN. Imunologia da hanseníase. Hanseníase Avanços e Desafios. 2014. p. 105–31.
55. Nath I, Saini C. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. Clin Dermatol [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;33(1):90–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.005>
56. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature [Internet]. 1998 Mar 19 [cited 2015 May 12];392(6673):245–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521319>
57. Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H; Pillai S. Ativação dos linfócitos T. Imunologia Celular e Molecular. Sétima. 2011. p. 203–33.
58. Yamauchi PS, Bleharski JR, Uyemura K, Kim J, Sieling P a, Miller a, et al. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. J Immunol. 2000;165(3):1506–12.
59. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. Physiol Rev. 2002;82(1):97–130.
60. Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. The functional plasticity of T cell subsets. Nat Rev Immunol [Internet]. 2009 Nov [cited 2015 Sep 19];9(11):811–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3075537&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Martiniuk F, Giovinnazzo J, Tan AU, Shahidullah R, Haslett P, Kaplan G, et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. J Drugs Dermatol [Internet]. 2012 May [cited 2015 Sep 19];11(5):626–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3412264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. PLoS Negl Trop Dis

- [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Sep 19];7(7):e2338. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3723566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Parente JNT, Talhari C, Schettini APM, Massone C. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An Bras Dermatol* [Internet]. Jan [cited 2015 Sep 19];90(1):41–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4323697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 64. Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H; Pillai S. *Citocinas. Imunologia Celular e Molecular. Sexta.* p. 267–301.
 65. Modlin RL. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. *J Invest Dermatol.* 1994;106(6):828–32.
 66. Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, Hendriks RW. GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;41(2):191–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25148023>
 67. Wang Y, Su M a., Wan YY. An Essential Role of the Transcription Factor GATA-3 for the Function of Regulatory T Cells. *Immunity.* 2011;35(3):337–48.
 68. Wang Y, Misumi I, Gu A-D, Curtis TA, Su L, Whitmire JK, et al. GATA-3 controls the maintenance and proliferation of T cells downstream of TCR and cytokine signaling. *Nat Immunol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Apr 14];14(7):714–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3688666&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 69. Vosshenrich C a J, García-Ojeda ME, Samson-Villéger SI, Pasqualetto V, Enault L, Richard-Le Goff O, et al. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol.* 2006;7(11):1217–24.

70. Hoyler T, Klose CSN, Souabni A, Turqueti-Neves A, Pfeifer D, Rawlins EL, et al. The Transcription Factor GATA-3 Controls Cell Fate and Maintenance of Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;37(4):634–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.020>
71. Walker J a, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;13(2):75–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23292121>
72. Snustad, D. Peter; Simmons MJ. *A ciência da Genética. Fundamentos de Genética*. 4^a ed. 2008. p. 1–16.
73. Casanova J-L, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2013;14(85):215–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724903>
74. Rook G a W, Raison CL, Lowry C a. Microbial “old friends”, immunoregulation and socioeconomic status. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(1):1–12.
75. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* [Internet]. 2006 Sep [cited 2015 Apr 23];77(3):189–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17171999>
76. Barnetche T, Gourraud PA, Cambon-Thomsen A. Strategies in analysis of the genetic component of multifactorial diseases; biostatistical aspects. *Transpl Immunol*. 2005;14(3-4 SPEC. ISS.):255–66.
77. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 Mar 8];27(3):173–86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3835071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. 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*

- [Internet]. 2003 Mar [cited 2014 Oct 21];33(3):412–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12577057>
79. Mira MT, Alcaí A, Moraes MO, Flumeri C Di, Thai VH, Khoa PX, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. 2004;427(February):636–40.
 80. Ali, S; Vollard, AM; Widjaja, S; Surjadi, C; Van de Rosse, E; Van Dissel J. PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. Clin Exp Immunol. 2006;144(3):425–31.
 81. Manzanillo, PS; Ayres, JS; Watson, RO; Collins, AC; Souza, G; Rae, CS; Schneider, DS; Nakamura, K; Shiloh, MU; Cox J. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. Nature. 2013;501(7468):512–6.
 82. Casanova J-L, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. Nat Rev Immunol [Internet]. 2004 Jan [cited 2015 Feb 13];4(1):55–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704768>
 83. Snustad, D. Peter; Simmons MJ. Genética de Populações. Fundamentos de Genética. 4^a ed. 2008. p. 772–95.
 84. Carlson CS, Eberle M a, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson D a. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. Am J Hum Genet. 2004;74(1):106–20.
 85. Souza, Vânia Nieto Brito, Pereira AC. Genética Humana na Susceptibilidade à Hanseníase. Hansenol Int. 2007;32(1):81–93.
 86. Snustad, D. Peter; Simmons MJ. No Title. Fundamentos de Genética. 4^o ed. 2008. p. 741.
 87. Chakravartti, M; Vogel F. A twin study on leprosy (Topics in human genetics). 1973. 1-123 p.
 88. 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. 2010;201(10):1598–605.

89. Hill AVS. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet.* 2006;40:469–86.
90. Marcos EVC. *Imunogenética. Noções de Hansenologia.* 2000. p. 43–6.
91. 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(april):439–41.
92. 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;127:337–48.
93. Wang D, Feng JQ, Li YY, Zhang DF, Li XA, Li QW, et al. Genetic variants of the MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet.* 2012;131:1251–60.
94. Zhang X, Li X, Zhang W, Wei L, Jiang T, Chen Z, et al. The novel human MRC1 gene polymorphisms are associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Chinese Uygur and Kazak populations. *Mol Biol Rep.* 2013;40(8):5073–83.
95. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2002 Sep 19 [cited 2015 Apr 25];1572(2-3):364–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223280>
96. Grant A V., Cobat A, Van Thuc N, Orlova M, Huong NT, Gaschignard J, et al. CUBN and NEBL common variants in the chromosome 10p13 linkage region are associated with multibacillary leprosy in Vietnam. *Hum Genet* [Internet]. 2014;133(7):833–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-014-1430-8>
97. Guthikonda K, Zhang H, Nolan VG, Soto-Ramírez N, Ziyab AH, Ewart S, et al. Oral contraceptives modify the effect of GATA3 polymorphisms on the risk of asthma at the age of 18 years via DNA methylation. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2014;6(1):17. Available from: <http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/6/1/17>

98. Pykäläinen M, Kinoshita R, Valkonen S, Rydman P, Kilpeläinen M, Laitinen LA, et al. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2015 Apr 14];115(1):80–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637551>
99. Perez-Andreu V, Roberts KG, Xu H, Smith C, Zhang H, Yang W, et al. A genome-wide association study of susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Blood* [Internet]. 2015 Jan 22 [cited 2015 Apr 14];125(4):680–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4304112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
100. Wang X-D, Zhang L, Duan H, She W-Y, Zhao Y, Liu S, et al. [Association of single nucleotide polymorphisms of GATA3 with allergic rhinitis phenotypes in Chinese]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* [Internet]. 2008 Jul [cited 2015 Apr 14];43(7):494–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18826115>
101. Glubb DM, Maranian MJ, Michailidou K, Pooley KA, Meyer KB, Kar S, et al. Fine-Scale Mapping of the 5q11.2 Breast Cancer Locus Reveals at Least Three Independent Risk Variants Regulating MAP3K1. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2015;96(1):5–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929714004753>
102. Cook MB, Wang Z, Yeboah ED, Tettey Y, Biritwum RB, Adjei AA, et al. A genome-wide association study of prostate cancer in West African men. *Hum Genet*. 2014;133(5):509–21.
103. Andrew AS, Hu T, Gu J, Gui J, Ye Y, Marsit CJ, et al. HSD3B and Gene-Gene Interactions in a Pathway-Based Analysis of Genetic Susceptibility to Bladder Cancer. *PLoS One*. 2012;7(12).
104. Yang F, Chen F, Gu J, Zhang W, Luo J, Guan X. Genetic variant rs1058240 at the microRNA-binding site in the GATA3 gene may regulate its mRNA expression. *Biomed Rep* [Internet]. 2014;2(3):404–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748983>

105. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect.* 2006;8(4):1124–31.
106. Miller EN, 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* [Internet]. 2004 Jan [cited 2015 Apr 27];5(1):63–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735151>
107. Yang Q, Liu H, Low H-Q, Wang H, Yu Y, Fu X, et al. Chromosome 2p14 is linked to susceptibility to leprosy. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Oct 1];7(1):e29747. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3253103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
108. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Dec 31;361(27):2609–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018961>
109. Sales-Marques C, Salomão H, Fava VM, Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Cardoso CC, et al. NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum Genet* [Internet]. 2014;133(12):1525–32. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-014-1502-9>
110. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Oct 21];6(7):e1000979. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2895660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
111. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2015 Feb 27];186(11):1687–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447749>
112. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy.

- Hum Genet [Internet]. 2005 Nov [cited 2015 Apr 14];118(2):295–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163478>
113. Cardoso CC, Pereira a C, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. Hum Genet [Internet]. 2010 Nov [cited 2014 Oct 21];128(5):481–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714752>
 114. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill a V, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. J Infect Dis. 1997;176(2):530–2.
 115. 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 [Internet]. 2011 Oct 15 [cited 2014 Oct 21];204(8):1256–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917899>
 116. Johnson CM, Lyle E a, Omuetti KO, Stepensky V a, Yegin O, Alpsoy 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.
 117. Misch E a., 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).
 118. 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.
 119. Marques CDS, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. J Infect Dis [Internet]. 2013 Jul [cited 2014 Oct 21];208(1):120–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547143>