



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA

Rodrigo Mendes de Camargo

**Estudo de Associação de Genes da Região Cromossômica
10p15 com a Forma Clínica da Hanseníase**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carla Pereira Latini

Botucatu

2018

Rodrigo Mendes de Camargo

**Estudo de Associação de Genes da Região Cromossômica
10p15 com a Forma Clínica da Hanseníase**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre (a) em Doenças Tropicais.

Orientadora: Ana Carla Pereira Latini

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Camargo, Rodrigo Mendes de.

Estudo de associação de genes da região cromossômica 10p13
com a forma clínica da hanseníase / Rodrigo Mendes de Camargo.
- Botucatu, 2018

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

Orientador: Ana Carla Pereira Latini

Capes: 20205007

1. Hanseníase. 2. Hanseníase - Aspectos genéticos. 3.
Epidemiologia. 4. Fator de crescimento transformador betal.
5. Receptores de Interleucina-2.

Palavras-chave: Epidemiologia genética; Hanseníase; *IL2RA*;
TGFB1.|

RESUMO

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae*, que infecta macrófagos e células de Schwann, gerando lesões cutâneas e comprometendo nervos periféricos. A doença se apresenta sob diferentes formas clínicas, fortemente determinadas pela resposta imune do hospedeiro, podendo ser classificada como multibacilar (MB) e paucibacilar (PB). Trata-se de uma doença complexa e estudos voltados para a relação genótipo/fenótipo têm evidenciado a participação do componente genético humano nos desfechos da doença. O gene *IL2RA* está localizado na região cromossômica 10p15, próximo à região 10p13 que foi previamente associada à forma PB da doença, sendo um candidato posicional e funcional para estudos de associação genética com a forma clínica da hanseníase. Este receptor, também denominado CD25, tem papel fundamental na atividade imunorregulatória exercida pelas células Tregs. O TGF- β 1 é uma das principais citocinas efetoras da atividade imunorregulatória das Tregs e está presente em maior quantidade na forma MB. O objetivo do presente trabalho é investigar a associação dos genes *IL2RA* e *TGFB1* com as formas clínicas da hanseníase. Para tanto, conduzimos um estudo de associação baseado em duas amostras caso-controles incluindo 885 casos de hanseníase: 406 casos de Rondonópolis-MT como população primária; 479 casos provenientes do Estado de São Paulo como população de replicação. Os dados de frequências nos grupos de pacientes MB e PB foram comparados por modelo de regressão logística univariada, com e sem ajuste para as co-variáveis sexo, etnia e procedência. O genótipo AA do polimorfismo rs2386841 no gene *IL2RA* apresentou associação com susceptibilidade para a forma PB da doença na população de Rondonópolis (OR: 4,29; IC95%: 1,57-11,6; p-valor=0,0043), mas que não foi confirmada na população do Estado de São Paulo. O alelo C do marcador rs1800470 no gene *TGFB1* foi associado à forma MB da hanseníase na população de Rondonópolis (OR: 2,36; IC95%: 1,12-4,98; p=0,0238). Esta associação foi replicada na população do Estado de São Paulo (OR: 2,10; IC95%: 1,07-4,11; p=0,0300). Em análise combinada das duas populações, com ajuste para a co-variável procedência, a associação desta variante foi confirmada (OR: 1,81; IC95%: 1,00-3,25; p=0,0475). Demonstramos assim, pela primeira vez, a associação dos genes *IL2RA* e *TGFB1* com o desfecho forma clínica da hanseníase, colocando estes genes como candidatos para estudos de validação e replicação sobre a genética da forma clínica da hanseníase.

Palavras-chave: hanseníase; epidemiologia genética; *TGFB1*; *IL2RA*; Tregs.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious chronic disease compromising skin and peripheral nerves. There is a spectrum encompassing the clinical forms of leprosy, directed by host immune response. Leprosy has been classified as multibacillary (MB) and paucibacillary (PB), in accord to number of lesions and bacillary burden. Here we have conducted a genetic association study to clinical forms of leprosy based on two case-control samples from Brazil. We have investigated the association of the *IL2RA* and *TGFB1* genes with clinical forms of leprosy. These genes codify important molecules to immunosuppressive activity of the Treg cells, and present differential expressions in accord to the clinical forms of leprosy. A total of 885 leprosy cases were included in the study: 406 cases from Rondonópolis municipality as start population, and 479 cases from the State of São Paulo as a replication population. The AA genotype of the rs2386841 polymorphism in the *IL2RA* gene was associated to PB form in the start population (OR: 4.29; p-value = 0.0043), but this was not confirmed for the replication population. The C allele of the rs1800470 marker at the *TGFB1* gene was associated to MB form in the start population (OR: 2.36; p-value = 0.0238). This association was replicated for the replication population (OR: 2.10; p-value = 0.0300). In a combined analysis joining both populations the association of the rs1800470 was confirmed (OR: 1.81; p-value = 0.0475). We have demonstrated, for the first time, an association data for the candidate region at chromosome 10 associated to PB form. In addition, we reported the association of *TGFB1* gene with the MB form. Our results place these genes as candidates for validation and replication studies and confirm the regulatory activity of Tregs as important to clinical outcome in leprosy.

Keywords: leprosy; genetic epidemiology; *TGFB1*; *IL2RA*; Tregs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes
CUBN - Cubulina
DC - Dendritic Cell (Célula Dendritica)
DD - Dimorfo-dimorfo
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DT - Dimorfo-tuberculóide
DV - Dimorfo-virchowiano
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
ENH - Eritema nodoso hansênico
FGFb - Fator de Crescimento Fibroblástico básico
FoxP3 - Fator de Transcrição Regulatório
GWA - *Genome-Wide Association*
HI - Hanseníase Indeterminada
HLA - *HumanLeukocyteAntigen* (Complexo principal de Histocompatibilidade)
IFN - Interferon
IL – Interleucina
iNOS - Óxido Nítrico Sintase
LAM - Lipoarabinomanana
LD - Desequilíbrio de ligação
MB -Multibacilar
MHC - Major Histocompatibility Complex (complexo principal de histocompatibilidade)
NEBL - Nebulete
NGF - Fator de Crescimento Nervoso
NLR – Nod-Like Receptor
OMS - Organização Mundial da Saúde
OR –*Odds ratio* (razão de chances)
PAMP -Padrões moleculares associados aos patógenos
PB -Paucibacilar
PBMC - PeripheralBlood Mononuclear Cell
PCR - *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
PGL-1 - Antígeno Glicolípídeo Fenólico-1
PQT – Poliquimioterapia
PRR - Receptores de reconhecimento de padrões
RNA -Ácido ribonucleico
RR - Reação reversa
SNP - *Single nucleotidepolymorphism* (Polimorfismo de base única)
TDT - Teste de desequilíbrio de transmissão
TGF- β –*Transforming growth factor beta*
Th - T helper
TLR - Toll-Like Receptor
TNF - Fator de necrose tumoral
Tregs- Células T regulatórias
TT – Tuberculóide
VV - Virchowiano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Aspectos gerais da doença	2
1.2. Formas clínicas da hanseníase.....	4
1.3. Imunologia.....	7
1.4. Epidemiologia Genética.....	10
1.5. Genética em hanseníase.....	12
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
REFERÊNCIAS	17
 Manuscrito.....	 26

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA

A hanseníase é uma doença infecciosa, sendo o *Mycobacterium leprae* o agente etiológico. No entanto, a doença é frequentemente confundida com outras dermatoses devido a certas similaridades nos sinais clínicos (1). Trata-se de doença que gera estigma, muitas vezes vinculada a credos religiosos, castigos e punições divinas, o que acarreta aos portadores um fator de exclusão social em decorrência da falta de conhecimento dos mecanismos de infecção e transmissão da doença (2).

Devido à falta de conhecimento dos mecanismos de transmissão da doença, a reclusão dos pacientes em leprosários era um esforço para contenção da doença. Este modelo isolacionista foi incorporado à política de saúde pública brasileira na década de 30, dando origem aos asilos-colônias que, com o tempo, mostraram-se ineficientes ao seu propósito e, por volta da década de 50, deixaram de ser uma medida recomendada (1).

A hanseníase representa uma preocupação para o Ministério da Saúde do Brasil, uma vez que o país está em segundo lugar em números de casos da doença, ficando atrás apenas da Índia, apresentando 25.218 novos casos no ano de 2016 (3). Os índices epidemiológicos no Brasil permanecem elevados, mesmo com avanços no diagnóstico e no tratamento, uma vez que o estigma causado pela doença dificulta a procura por assistência médica por parte dos acometidos, sendo um fator limitante para a sua erradicação (2).

Em 1873 o médico Gerard Henrik Armaeur Hansen identificou o *M. leprae* como o agente causador da lepra. Este bacilo pode se apresentar como reto ou ligeiramente encurvado, com as extremidades arredondadas, medindo de 1 a 8 μm de comprimento por 0,3 μm de diâmetro, e possui longo tempo de replicação, em torno de 13 dias (4). Uma característica deste bacilo é o não crescimento em meios axênicos, havendo a necessidade de cultivá-lo através da inoculação em mamíferos, como camundongos e tatus. Somadas à ausência de modelo experimental para a doença, essas peculiaridades têm representado uma dificuldade para o avanço dos estudos da doença (5).

Pertence à ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae*, classificado como álcool-ácido resistente (BAAR) devido à elevada concentração de lipídeos em sua parede celular, revelada por meio da coloração de Ziehl-Neelsen, onde a fucsina se associa fortemente aos lipídeos e não é removida pela solução de álcool-ácido (6).

O *M. leprae* infecta macrófagos e as células de Schwann, sendo um parasita intracelular obrigatório com predileção por regiões do corpo com temperaturas ligeiramente inferiores a 37°C, como nervos periféricos, mucosas e pele. Provoca o espessamento dos nervos, bem como o bloqueio da transmissão do impulso elétrico através do mesmo ao infectar as células de Schwann, constituintes da bainha de mielina que leva a parestesia no local da lesão (7).

Quando comparado com outras espécies do gênero *Mycobacterium*, como o *M. tuberculosis*, o *M. leprae* possui um genoma com variabilidade reduzida, o que pode representar uma explicação para a alta especificidade com as células do hospedeiro, bem como a dificuldade em cultivar o bacilo *in vitro*. Compreende-se que o *M. leprae* possui restrições em seu metabolismo devido à uma evolução redutiva sofrida em seu genoma. Através do sequenciamento genômico do *M. leprae* foi possível o uso da biologia molecular no diagnóstico da hanseníase, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se sequências específicas de DNA para a identificação da presença do bacilo (8). Adicionalmente, este estudo revelou a existência de variações em cepas de *M. leprae* obtidas de diversas regiões do globo terrestre, incluindo uma variedade proveniente do Brasil (9). Desdobramentos destes estudos revelaram o predomínio de cepas de acordo com a região geográfica e possibilitaram a compreensão da rota de transmissão da doença ao redor do mundo, sendo plausível a hipótese de que a hanseníase tenha se originado na Ásia e se disseminado pela Europa com as tropas de Alexandre o Grande, sendo mais tarde levada as demais áreas do planeta por meio do mercado de escravos (10). Assim, são fortes os indícios de que a doença tenha chegado às Américas com os colonizadores por volta do século XVI (1).

O exame clínico do paciente representa a ferramenta de maior relevância no diagnóstico da hanseníase, onde a análise dermatológica e neurológica tem por objetivo localizar áreas hipocrômicas com perda de sensibilidade e comprometimento de nervos periféricos, com ou sem espessamento. A baciloscopia da lesão ou de pontos índices é um exame laboratorial que auxilia no diagnóstico,

entretanto, porém um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção pelo bacilo(6).

A reação de Mitsuda é outra ferramenta auxiliar no diagnóstico que fornece informações sobre a resposta do hospedeiro frente à inoculação intradérmica de antígenos isolados do bacilo, e possui grande relevância para o prognóstico de forma clínica (11). Do ponto de vista imunológico, a reação de Mitsuda negativa reflete a susceptibilidade à hanseníase MB devido ao predomínio da resposta humoral do hospedeiro, e um teste positivo reflete a capacidade de resposta imune celular do paciente, que confere resistência ao bacilo (12).

Os níveis de anticorpos anti-PGL-1, também podem ser empregados como ferramenta auxiliar de diagnóstico atuando em conjunto com outras metodologias e como forma de avaliação da resposta terapêutica. São quantificados por meio de reação imunoenzimática (ELISA) e apresentam correlação direta com a carga bacilar, e por conta disso, é uma metodologia útil no diagnóstico da forma MB, devido ao predomínio da resposta humoral neste polo (13).

1.2. FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE

A hanseníase apresenta um espectro clínico amplo, e a classificação clínica mais utilizada atualmente por pesquisadores e centros especializados divide a doença em dois pólos, tuberculóide (TT) e virchowiano (VV), e três formas intermediárias, dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV), incluindo ainda a hanseníase indeterminada (HI), que caracteriza a fase inicial da doença. Esta classificação foi proposta em 1966 por Ridley e Jopling, abrangendo a doença de maneira completa, por levar em consideração aspectos clínicos, imunológicos, microbiológicos e histológicos (14).

A hanseníase indeterminada é a fase inicial da doença, onde a resposta imunológica ainda não é definida, podendo evoluir para a cura espontânea, desenvolver-se de maneira lenta e gradativa, ou mesmo regredir, vindo a ressurgir posteriormente. São comumente observadas áreas hipocrômicas e discretamente eritematosas delimitadas ou não, com perda de sensibilidade, e leve ressecamento quando comparadas com áreas adjacentes(12)

No polo tuberculóide existe predomínio da resposta imune celular, Th1, que leva a contenção da multiplicação bacilar. As lesões aparecem de forma mais reduzida ou mesmo isoladas. O paciente apresenta reação de Mitsuda positiva, índice baciloscópico negativo e comprometimento dos nervos periféricos (14).

A manifestação clínica oposta, polo virchowiano, é caracterizada pelo predomínio da resposta imunológica humoral, Th2, com maior proliferação do bacilo devido à ineficácia desta resposta. O paciente apresenta resultado negativo ao teste de Mitsuda e a baciloscopia é altamente positiva. As lesões são mais amplas e distribuídas simetricamente pelo corpo, envolvendo diversos troncos nervosos, áreas difusas de tegumento e até outros órgãos (14).

Na região central do espectro da doença se encontram os pacientes dimorfos sendo classificados como DT, DD ou DV, caracterizados por instabilidade imunológica, sendo utilizada como critério para a classificação a proximidade das características com as descritas para as formas polares. Pacientes DT apresentam reação de Mitsuda positiva, porém não muito pronunciada, não se observa a presença de bacilos na mucosa nasal e a baciloscopia revela índices de 1 a 3 cruces. Indivíduos DD são Mitsuda negativos, não apresentam bacilos na mucosa nasal quando comparados com DT e DV, sendo o grupo dos dimorfos com menor estabilidade imunológica, e a baciloscopia indica índices de 3 a 4 cruces. Por fim, indivíduos DV, por possuírem características mais próximas ao polo VV, são Mitsuda negativos, e, entre os dimorfos, são os que apresentam carga bacilar mais alta (índice baciloscópico de 4 a 5 cruces) e bacilos podem ser encontrados na mucosa nasal. Na ausência de tratamento estas formas são caracterizadas pela instabilidade, podendo evoluir da forma DT para DV (14).

O paciente hanseniano pode ainda apresentar reações imunológicas exacerbadas durante a evolução da doença, ao longo ou após o tratamento, sendo classificados como tipo 1 e tipo 2 (12). Na reação tipo 1, também conhecida como Reação Reversa (RR) existe um aumento abrupto da resposta imune celular com o aumento e piora das lesões, acometendo principalmente pacientes DT, DD e DV, ocorrendo entre 10 e 33% dos pacientes. Ocorre a elevação da resposta linfocitária frente aos antígenos bacilares, bem como um aumento de linfócitos TCD4+ nas lesões, em quantidade absoluta e relativa. Observa-se também a elevação de citocinas pró-inflamatórias e redução nas citocinas do perfil Th2 (15). Em pacientes VV e DV predomina a reação tipo 2, também conhecida como eritema nodoso

hansênico (ENH), caracterizada como uma reação inflamatória sistêmica, onde a resposta humoral gera nódulos inflamatórios e lesões máculo-papulares. Estas reações são as principais causas da morbidade decorrente da hanseníase já que levam a lesões e sequelas neurológicas e acomete entre 50 e 70% de indivíduos MB (15).

No decorrer dos anos, a classificação clínica da hanseníase adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para fins de tratamento passou por algumas modificações. Inicialmente em 1982, com base na classificação de Ridley e Jopling (1966) (13) os pacientes foram divididos em paucibacilares (PB), incluindo os indivíduos TT e DT com baciloscopia menor ou igual a 1+, e multibacilares (MB), composto por indivíduos DD, DV e VV, ou com baciloscopia maior ou igual a 2 +(16). Posteriormente, em 1988, o critério adotado pela OMS considerou PB os pacientes com baciloscopia negativa e MB os pacientes com baciloscopia positiva (17). Por fim, devido às dificuldades operacionais da classificação de Ridley e Jopling (1966), já que se fazem necessários exames laboratoriais, a OMS propôs a classificação levando em conta o número de lesões, onde pacientes com até cinco lesões são classificados como PB, e pacientes com mais de cinco lesões como MB (18). O Ministério da Saúde do Brasil (portaria conjunta 125: 26.03.2015) segue a classificação proposta pela OMS, incluindo no diagnóstico a baciloscopia quando disponível. Nessa classificação pacientes PB são aqueles que apresentam baciloscopia negativa, enquanto os MB os que apresentam baciloscopia positiva (19).

O esquema de tratamento é constituído de poliquimioterapia (PQT) composta por rifampicina, dapsona e clofazimina, e depende da classificação clínica proposta pela OMS. Os pacientes PB recebem dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina e 100 mg de dapsona, e dose diária de 100 mg de dapsona auto administrada durante seis meses. Os casos MB são tratados com estas doses de rifampicina e dapsona por um ano, com acréscimo da clofazimina administrada em dose mensal supervisionada de 300mg e dose diária de 50 mg (20).

1.3. IMUNOLOGIA

A manifestação da doença e suas formas clínicas possui relação direta com a resposta imunológica do hospedeiro frente ao patógeno. Sendo o *M. leprae* um parasita intracelular obrigatório, a resposta imunológica celular do tipo Th1 é a eficaz na eliminação do bacilo (15).

Acredita-se que a maior parte da população seja naturalmente resistente ao *M. leprae*, sendo que, uma imunidade inata efetiva associada a baixa virulência do *M. leprae* resultaria na contenção do bacilo. A linha inicial de interação entre o bacilo e o hospedeiro é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), sendo os mais importantes: receptores do tipo Toll (TLRs), tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo lectina C como DC-SIGN e Dectina 1, que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), ativando macrófagos e células dendríticas (DCs) para o reconhecimento e fagocitose destes microrganismos (21).

As DCs, principais células apresentadoras de antígenos, após fagocitarem os bacilos migram para os linfonodos, onde fazem a apresentação dos antígenos processados ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Durante a migração sofrem processo de maturação e, chegando aos linfonodos, ativam linfócitos TCD4+ e estimulam sua diferenciação para os diferentes perfis de resposta (22)

A interleucina 12 (IL-12) produzida pelas DCs desencadeia o perfil Th1, com subsequente produção de IL-2 e interferon gama (IFN- γ), culminando na ativação de macrófagos. Na ausência de IL-2, ou na presença de interleucina 4 (IL-4), a polarização da resposta resulta no perfil Th2, onde ocorre a produção de interleucina 10 (IL-10), estimulando a produção de anticorpos e inibindo a função macrofágica (23).

Inicialmente, o conceito predominante era o de que apenas os perfis Th1 e Th2 exerciam influencia na diferenciação das formas clínicas da hanseníase. Atualmente, sabe-se que outros perfis atuam neste processo. Tem sido demonstrado que linfócitos Th9 produzem citocinas como IL-9 e IL-10 que alteram o padrão da resposta imune. No entanto, este tipo celular comporta-se de maneira distinta nas formas polares da doença. No polo tuberculoide a IL-9 induz o desenvolvimento da resposta microbicida dos macrófagos através do sinergismo da resposta entre IFN- γ , IL-6 e IL-12 e regula negativamente a produção de IL-10,

mostrando um perfil pro-inflamatório. Já no polo virchowiano, os linfócitos Th9 tem a produção de IL-4, IFN- γ e TNF- α inibida, enquanto a função imunossupressora da IL-10 é preservada com inativação da resposta microbicida dos macrófagos através da regulação positiva de TGF- β (24).

Linfócitos Th17 tem atividade pró-inflamatória, e a resposta associada a este tipo celular está associada a processos inflamatórios consistentes com reações reversas (25). Um aumento na expressão de IL-17 foi encontrado na forma TT, que contribui para o recrutamento de células inflamatórias, ativação de células endoteliais e manutenção do processo inflamatório crônico (26). Nas formas de maior persistência do bacilo, a IL-17 potencializa a resposta pró-inflamatória, onde em nível de envolvimento neural, a resposta dos linfócitos Th17 tem sido associada a um processo de desmielinização inflamatória causado por danos nos tecidos, sendo assim, quando o processo inflamatório é estabelecido, a IL-17 regula negativamente a produção do fator de crescimento nervoso (NGF) e seu receptor nas formas TT e VV, contribuindo assim para a aparição de lesões neurais mais graves (24).

Linfócitos Th22 fazem parte de um grupo de células que secretam citocinas como IL-22, TNF, IL-13 e IL-26, mas não produzem IL-17 ou IFN- γ . Entre as citocinas secretadas por estas células, a IL-22 tem destaque na hanseníase uma vez que na forma VV, esta citocina participa nos mecanismos de maturação do fagolisossoma. Em detrimento do desenvolvimento de uma resposta de macrófagos, a IL-22 induz a produção de STAT3, bem como óxido nítrico sintase (iNOS) que destroem o bacilo (27). *In situ*, a resposta dos linfócitos Th22 ganhou importância fundamental na forma VV da doença, pois o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) pode regular diferentes funções celulares que podem interferir nos processos de cicatrização, migração, divisão celular, proliferação, diferenciação e angiogênese. Nessas circunstâncias, o aumento do FGFb na forma VV da doença reforça o papel crucial desse fator de crescimento no desenvolvimento da resposta reparadora, uma vez que esta forma clínica está associada a maior disseminação bacilar e maior dano tecidual (28).

Células T regulatórias (Treg) representam subpopulações de linfócitos com o fenótipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, que também estão envolvidos na hanseníase. TGF- β 1 e IL-10 são as principais citocinas envolvidas na diferenciação celular, sob controle do fator de transcrição regulatório FoxP3. Na hanseníase, células Treg

foram descritas como as células que mantêm o equilíbrio da resposta entre os linfócitos Th1 e Th2. O aumento da FoxP3 foi relatado na forma VV da doença, que está associada à natureza anti-inflamatória deste tipo de célula (29). No desenvolvimento da resposta imunossupressora, as células Treg que produzem TGF- β 1 e IL-10 contribuem para a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como para o desenvolvimento da resposta dos linfócitos Th1 e Th17 na forma VV da doença (30). Desta forma, Tregs participam da manutenção e indução da resposta imunossupressora, tendo um importante papel na homeostasia da resposta imune, mas contribuindo com a sobrevivência do bacilo nas lesões (31).

O TGF- β , é uma citocina pleiotrópica que atua na proliferação e diferenciação celular, morfogênese, homeostase e regeneração tecidual, e produzida e liberada principalmente por células T regulatórias (Tregs). Também possui função imunoregulatória, inibindo os mecanismos microbicidas dos macrófagos, direcionando a resposta imunológica para o perfil Th2 (33). Tem importante papel em doenças causadas por microorganismos intracelulares, como *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Lacazia loboi*, e micobactérias, uma vez que suprime a ativação de macrófagos (30). Dentre as suas três isoformas, a mais abundante é o TGF- β 1. Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado um aumento desta citocina em pacientes MB, uma vez que a inibição da função macrofágica favorece a multiplicação do bacilo (30) (34) (35) (36).

As micobactérias possuem mecanismos específicos de sobrevivência no interior das células que parasitam, liberando mediadores que modulam o maquinário celular. Como exemplo, o *M. tuberculosis* inibe a apoptose celular e previne a maturação do fagossomo através da secreção de lipoarabinomanana (LAM) e fosfatidilinositol. Nessa mesma linha, o *M. leprae* interfere na modulação de genes envolvidos na apoptose, regulando negativamente genes pró-apoptóticos e induzindo genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 (37). Oglicolípido fenólico 1 (PGL-1) é componente estrutural específico da parede celular do *M. leprae*, facilita a fagocitose do bacilo por macrófagos e DCs, e concomitantemente inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de marcadores de maturação em DCs (38). Uma vez fagocitado, o bacilo libera mediadores que inibem a junção dos lisossomos com o fagossomo em que se encontra, evitando que as enzimas do macrófago o degradem, além de ser capaz de deixar o fagossomo e viver no citosol (38).

1.4. EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA

Atualmente a hanseníase é compreendida como uma doença complexa, onde diversas variáveis atuam em conjunto para o desenvolvimento da doença, desde a hanseníase *per se* até suas formas clínicas e complicações. Fatores pertinentes ao bacilo, ao ambiente e ao indivíduo determinam o curso da doença. Partindo desta premissa, as pesquisas científicas se voltaram para a investigação dos genomas do paciente e do bacilo, onde a relação genótipo/fenótipo passou a ser mais estudada, confirmando a idéia de que o contato com o bacilo é indispensável para a ocorrência da doença, porém não é suficiente. Sob a perspectiva da genética, não se aplica o padrão de herança mendeliano, monogênico com alta penetrância do genótipo. Como um traço complexo, diversos genes atuam para o desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas, aliados ainda aos fatores relacionados ao patógeno e ao ambiente (2).

A hipótese de participação da genética no desenvolvimento de uma doença parte de evidências que sugerem esta correlação. As abordagens iniciais para testar essa hipótese vêm de estudos epidemiológicos que comprovam agregação familiar da doença, comparações de concordâncias de fenótipos entre gêmeos mono e dizigóticos, estudos de adoção e análises de segregação complexa. Todavia, tais estudos não são suficientes para a elucidação de genes e marcadores moleculares, fazendo-se necessário para tanto o uso de metodologias que envolvam a genética molecular, que englobam os estudos de ligação e de associação(2)

Estudos de ligação objetivam identificar intervalos cromossômicos associados à doença utilizando marcadores moleculares conhecidos. Estes estudos são conduzidos a partir de *pedigrees* que contenham indivíduos afetados e de análises de cossegregação entre marcadores de regiões conhecidas e os *lócus* da doença. O resultado fornecido nessas análises é o *LOD score*, que acima de três indica uma região cromossômica que pode conter um *lócus* de susceptibilidade (39).

As análises de associação baseiam-se principalmente no modelo populacional caso-controle, onde se compara as frequências de determinado marcador em indivíduos afetados (casos) e não afetados (controles). No caso do marcador apresentar-se em maior frequência no grupo de pacientes, o mesmo está associado com susceptibilidade à doença, e quando se apresenta em maior frequência no grupo controle, está associado com a resistência (40).

Outra forma de estruturar os estudos de associação é tomar por base o modelo familiar, onde se elimina a influência da estratificação populacional, sendo possível um controle genético interno. Para este tipo de estudo utiliza-se o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), onde é avaliado o desvio da transmissão alélica aos filhos afetados em relação ao esperado, tendo como controle o alelo não transmitido. Para tanto é necessária a formação do trio informativo, que se constitui de pelo menos um filho afetado e pais heterozigotos para o marcador em estudo. Uma dificuldade para este modelo de estudo, e que se aplica amplamente na hanseníase, é a manifestação tardia do fenótipo, que pode dificultar a recuperação de material genético dos pais (41).

Os estudos de associação são frequentemente utilizados como desdobramento dos estudos de ligação uma vez que, a partir da investigação de marcadores em regiões candidatas, é possível o refinamento do dado desvendando os genes e marcadores responsáveis pelo desfecho alvo do estudo.

Quanto à distribuição dos marcadores a serem investigados, duas estratégias são amplamente empregadas: a investigação de marcadores em genes candidatos, que são aqueles presentes em regiões previamente ligadas à doença ou aqueles funcionalmente relevantes para o desfecho; a distribuição sem nenhuma premissa, onde se faz uso de grande quantidade de marcadores distribuídos por todo o genoma. Este segundo modelo de estudo é conhecido como *genomewide* (GW) e considerado uma estratégia geradora de hipóteses(2).

Nas últimas décadas as ferramentas moleculares e de bioinformática foram aprimoradas, de modo a se tornarem importantes aliadas em pesquisas que envolvam variabilidade genética. Entre os marcadores moleculares de variabilidade mais utilizados, encontram-se os polimorfismos de base única (SNPs – *single nucleotide polymorphism*) (15). Estas variantes caracterizam-se pela substituição de apenas uma base nucleotídica que ocorrem na população em frequência maior do que 1%. O efeito que decorre desta alteração está diretamente relacionado com a sua localização no genoma. Ocorrendo dentro de um exon, pode ser classificado como SNP não sinônimo, onde se observa a substituição de aminoácidos na tradução do RNAm. As substituições de aminoácidos podem ainda ser conservativas, quando não se observa alteração funcional da proteína sintetizada, ou não conservativas, onde a proteína alterada representa mudança de desempenho. Os SNPs podem ocorrer ainda em regiões regulatórias, como regiões

promotoras e 3'UTR, afetando a ligação de fatores de transcrição ou a estabilidade do transcrito, gerando alterações quantitativas na expressão da proteína. Quando presente no *intron* o SNP também podem ter efeito funcional, interferindo no *splicing* do RNA que pode afetar a estrutura da proteína (42), ou na codificação de microRNAs que tem importante papel regulatório, ou podem apenas refletir o efeito associado à outro polimorfismo que se encontre em desequilíbrio de ligação (LD) com o mesmo, mantendo assim a sua utilidade como marcador na elucidação de associações de genes com as características alvo da pesquisa, além de (43). Assim, os SNPs são marcadores altamente úteis para estudos de epidemiologia genética, mesmo porque são os maiores responsáveis pela variação genética interindividual (44).

1.5 GENÉTICA EM HANSENÍASE

Análises de segregação complexa demonstraram que a hanseníase sofre a interferência de fatores genéticos e segue o modelo de herança *major gene*, ou seja, embora um determinado gene possua um papel de destaque em determinado processo, ele atua em conjunto com outros genes (45).

Estudos de ligação com varredura do genoma, isto é, *genomewide*, apontaram picos de ligação nas regiões cromossômicas 10p13 (46),(47), 6p21 (47), (48), 6q25-26 (47) e 17q22 (48) para a hanseníase. Assim, estas regiões devem abrigar possíveis genes candidatos envolvidos no desenvolvimento da doença. Em estudo subsequente ao publicado em 2003, que descreveu o pico de ligação da região 6q25-26, Mira et al. (2004) investigaram a associação de marcadores em 43 genes desta região e encontraram resultados positivos para o gene *PARK2*, até então envolvido apenas com a doença de Parkinson, evidenciando assim a importância desta estratégia de busca de marcadores genéticos para a doença (49).

Localizado na região 6p21 encontram-se os genes do complexo HLA, que controlam os perfis de resposta imunológica Th1 e Th2, diretamente envolvidos nas formas clínicas da hanseníase (50) (51). Dentre eles, os genes *TNF* e *LTA*, HLA de classe III, possuem marcadores inequivocamente associados à hanseníase em diferentes populações (52), (48), (53), (54), (55), (56), (57), (58). Localizado na região promotora do *TNF* encontra-se o polimorfismo mais bem estudado deste gene, o -308A>G que, apesar da associação confirmada com a hanseníase e suas formas clínicas em diversos estudos, tem a questão susceptibilidade/resistência

ainda controversa, uma vez que na população brasileira o alelo -308A está associado à resistência, e em outras populações com susceptibilidade (52), (55). Quanto ao *LTA*, o polimorfismo *LTA*+80 foi associado com a hanseníase, mas de forma dependente da idade de manifestação da doença, nas populações vietnamita, indiana e brasileira (54). Os genes do HLA de classe II, DR e DQ, também apresentam forte associação com susceptibilidade à hanseníase e suas formas clínicas, que foi confirmada em estudos de estratégia GW em populações distintas (59), (60).

Um estudo do tipo *genomewide* de associação (GWAS), realizado em 2009 com uma grande população da China, encontrou marcadores associados à hanseníase nos seguintes genes: *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR*, *RIPK2* e *LRRK2* (59). A partir de então, a validação da associação do gene *NOD2*, envolvido na codificação de receptores que reconhecem componentes da parede micobacteriana, com a hanseníase, já foi feita por diversos estudos, como no trabalho realizado no Nepal que confirmou associação do gene *NOD2* com a hanseníase *per se* e estados reacionais (55), e no Brasil onde tal associação foi replicada em cinco amostras populacionais distintas (40). Os genes *CCDC122* e *LACC1* tiveram associação replicada em estudos com populações da África, Índia (61) e do Brasil (40). Na população vietnamita, um estudo de associação confirmou os dados do GWAS para os genes *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *HLA-DR* e *RIPK2* (62). A partir destes estudos foi possível observar o compartilhamento de fatores de risco genéticos entre a hanseníase e a doença de Chron localizados no cromossomo 13, corroborando com a hipótese de que micobactérias podem estar envolvidas na patogenia das doenças inflamatórias intestinais (62).

Polimorfismos no gene *TLR1* possuem efeito na produção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) estimuladas com *M. leprae* (63). O SNP 602S (T1805G) foi associado com resistência a hanseníase em diferentes populações (64), (65), com dados replicados em um estudo do tipo *genomewide* (60). Este mesmo polimorfismo está associado com proteção a reação tipo 1 (66). Neste mesmo gene, outro marcador, o N248S, foi associado com a hanseníase *per se* e com estados reacionais da doença em uma população de Bangladesh (67).

Estudos também apontaram associação de SNPs presentes na região promotora do gene *IL10* com a hanseníase em população do Vietnã (47), do Brasil

(68), e da Índia (69), (56), sendo este gene codificante da citocina IL-10, com importante papel anti-inflamatório, cujas altas concentrações estão ligadas à progressão da hanseníase (70).

Embora diversos estudos demonstrem a participação do componente genético do hospedeiro no desenvolvimento da hanseníase *per se*, poucos trabalhos têm focado na busca de marcadores associados às formas clínicas da doença, que em seus polos, possuem características muito distintas (71). Variações nos desenhos dos estudos, características intrínsecas de cada população alvo, bem como problemas de classificação podem gerar discordâncias entre os dados obtidos. Este aspecto está bem representado nos trabalhos de Siddiqui (2001) e Mira et al. (2003). No trabalho de Siddiqui et al. (2001), realizado com a população da Índia, foi demonstrada ligação da região cromossômica 10p13 com a hanseníase *per se* (46). Posteriormente Mira et al. (2003) encontraram associação desta mesma região com a forma PB da doença em população vietnamita, e ao reavaliar os dados de Siddiqui et al. (2001) demonstraram que, na verdade, os dados apontavam ligação da região 10p13 com a forma PB da doença, explicado pela grande quantidade de casos dessa forma na população estudada (47). Ainda nesta região, os genes *CUBN* (cubulina) e *NEBL* (nebulina) e *MRC1* foram associados com a forma MB da doença, não explicando os dados reportados por Mira et. (2003) (47) (71) (73).

Dentre os genes com marcadores associados às formas clínicas da hanseníase com dados replicados encontram-se o *TNF*, associado à forma MB em população indiana (52) e na população tailandesa (72), o *MCR1*, associado à forma MB em população do Brasil e Vietnã (73), o *MBL2* associado à forma MB em população do Brasil (74) e do Nepal (55), e o *TLR2* associado a forma PB da doença em população Malawi (75).

O gene *IL2RA*, responsável pela síntese da cadeia alpha do receptor de IL2, também conhecido como CD25, está localizado na região cromossômica 10p15, e próximo da região 10p13 previamente ligada à forma PB da hanseníase (46), (47) apresentando-se como candidato posicional para estudos de associação com formas clínicas da hanseníase. Além disso, o papel imunológico que este receptor de IL-2 desempenha o torna também um candidato funcional para este estudo, já que a IL-2 polariza a resposta imune para o perfil Th1(23). No entanto, este receptor pode estar associado a um quadro de supressão dos macrófagos quando presentes nas Tregs, consumindo a IL-2 no sítio da resposta imune, dificultando a ativação e

proliferação dos linfócitos T efetores, o que por consequência impede a ativação dos macrófagos (76). Estudos demonstram que células que apresentam o CD25 aparecem em maior quantidade em pacientes do polo virchowiano, estando associadas a um quadro de proliferação do bacilo (77), (78), (36). Para o presente trabalho, escolhemos onze *tags* SNPs do banco de dados do Projeto Internacional *HapMap* do gene *IL2RA*, fazendo assim a sua cobertura genética total. Entre os marcadores escolhidos, encontra-se o polimorfismo rs2386841, já associado ao câncer de intestino (79) ao câncer de mama (80), bem como com doenças intestinais inflamatórias associadas à helmintos e protozoários (81). Embora este polimorfismo já possua dados de associação com outras doenças, não existem trabalhos que apontem associação deste SNP com a hanseníase e suas formas clínicas.

Outro gene candidato alvo do presente trabalho é o *TGFB1*, um candidato funcional que possui polimorfismos associados a diferentes tipos de doenças, como câncer de pulmão e mama, infarto do miocárdio, doenças vasculares e doenças inflamatórias (82), (43). A citocina TGF- β 1 possui dados funcionais associados à forma clínica da hanseníase, estando significativamente aumentada em pacientes do polo virchowiano (35), (36). Um estudo avaliando cultura de macrófagos estimulados com *M. leprae* demonstrou que pacientes VV produzem maior quantidade de TGF- β 1 quando comparados ao grupo TT, evidenciando a importância desta citocina nas diferentes formas clínicas (53). Em trabalho similar, Venturini et al.(2011) não encontraram diferença na produção de TGF- β 1 *in vitro*, porém a análise *in situ* das lesões dos pacientes, demonstrou uma maior expressão de TGF- β 1 em pacientes DV (35). Estudos demonstram também um importante papel do TGF- β 1 no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn (83). Entre os polimorfismos funcionais do *TGFB1*, encontra-se o rs1800470, associado com maior produção de TGF- β 1 e com diversos tipos de câncer, doenças cardíacas e coronárias, doenças pulmonares, complicações em transplantes (“doença do enxerto contra o hospedeiro”), miopia e doenças inflamatórias (82). Como citado, é conhecido que o *TGFB1* encontra-se mais expresso em pacientes MB (36) e que o rs1800470 tem papel sobre a secreção desta citocina (82), entretanto, ainda não existem trabalhos abordando a associação deste polimorfismo com a hanseníase, fundamentando a escolha deste SNP como alvo do presente trabalho.

Gaschignard et al.(2016) consideram que do ponto de vista genético, poucos são os trabalhos que focam a pesquisa de marcadores associados às formas clínicas da hanseníase, uma vez que na literatura existem 39 associações de marcadores em 28 genes para o desfecho forma clínica, enquanto que estudos sobre a hanseníase *per se* apresentam 82 associações em 50 genes (84). Os autores usam o termo “polarização” para definir o processo de progressão da doença no indivíduo infectado, tendo como desfecho as formas PB e MB, considerando que estas duas formas, independente da classificação clínica considerada, abrangem todos os subtipos de manifestação da doença (84). Desta forma, o presente trabalho, segue o modelo de estudo proposto por Gaschignard et al, 2016, tendo por objetivo realizar um estudo de associação genética onde será investigado a associação de marcadores em genes candidatos com as formas clínicas da hanseníase (84).

2.OBJETIVO GERAL

Investigar a associação de marcadores nos genes *IL2RA* e *TGFB1* com as formas clínicas da hanseníase por meio de estudo de associação baseado em populações de casos de hanseníase provenientes de Rondonópolis-MT e do Estado de São Paulo.

2.1.OBJETIVOS ESPECIFICOS

Investigar a associação dos seguintes marcadores com as formas clínicas da hanseníase:

- rs7910961, rs11256497, rs12722561, rs2245675, rs2386841, rs3134883, rs4749926, rs6602392, rs706778, rs942201 e rs9663421 do gene *IL2RA*;
- rs1800470 do gene *TGFB1*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.* 2004;13(2):76–88.
2. Prevedello FC, Mira MT. Leprosy : a genetic disease ? *. 82(5).
3. WHO. Leprosy: weekly epidemiological record, Setembro 2016. *World Heal Organ Wkly Epidemiol Rec.* 2016;91(35):405–20.
4. Rees RFW, Yong DB. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC. *Leprosy*. 2th Edinbuhg: Churchil Livingstone; 1994. p. 49-83.
5. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001;69(1):1–12.
6. Fontes ANB, Gomes HM, de Araujo MI, de Albuquerque ECA, Baptista IMFD, Moura MM da F, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(SUPPL.1):143–9.
7. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Vol. 19, *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. p. 338–81.
8. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001;409(6823):1007–11.
9. Monot M, Honore 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.
10. Monot M. On the Origin of Leprosy. *Science* (80-). 2005;308(5724):1040–2.
11. Goulart IMB, Goulart LR. Leprosy: Diagnostic and control challenges for a worldwide disease. Vol. 300, *Archives of Dermatological Research*. 2008. p.

269–90.

12. Souza CS. Hanseníase : Formas Clínicas E Diagnóstico. Rev Med Ribeirão Preto. 1997;325–34.
13. De Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: Revisão sistemática. Vol. 41, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008. p. 11–8.
14. Ridley DS& JW. Classification of Leprosy According to Immunity A Five-group System. Nature [Internet]. 1966;33(3):1215. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348338>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765279>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X14002296>
<http://link.springer.com/10.1007/s00439-014-1502-9>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii>
15. Mendonça VA, Costa RD, De Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia da hanseníase. An Bras Dermatol. 2008;83(4):343–50.
16. WHO. Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes. World Health Organization. 1982. p. 1–32.
17. Bloom BR, Grosset JH, Lechat MF, Due LK, Nkinda SJ, Rao CK, et al. Who Expert Committee on Leprosy. World Health Organization - Technical Report Series. 1988. p. 7–50.
18. WHO. WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Leprosy: Introduction. Essential Medicines and Health Products Information Portal. 1998. p. 28.
19. Brasil. Guia para o controle da hanseníase. Brasil. Ministério da Saúde. 2002. 2-89 p.
20. Ministério da Saúde. Diretrizes para a vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Ministério da Saúde. 2016. 58 p.
21. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.

- Vol. 21, International Immunology. 2009. p. 317–37.
22. Sieling P a, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol* [Internet]. 1999;162(3):1851–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973451>
 23. Machado PRL, Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol*. 2004;79(6):647–64.
 24. De Sousa JR, Pagliari C, De Almeida DSM, Barros LFL, Carneiro FRO, Dias LB, et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J Clin Pathol*. 2017;70(6):521–7.
 25. Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4).
 26. 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*. 2013;7(7).
 27. de Sousa JR, de Sousa RPM, de Souza Aarão TL, Dias LB, Oliveira Carneiro FR, Simões Quaresma JA. Response of iNOS and its relationship with IL-22 and STAT3 in macrophage activity in the polar forms of leprosy. *Acta Trop*. 2017;171:74–9.
 28. de Sousa JR, de Sousa RPM, de Souza Aarão TL, Dias LB, Carneiro FRO, Fuzii HT, et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop*. 2016;157:108–14.
 29. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4+CD25+T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol*. 2013;56(4):513–20.
 30. de Souza Aarão TL, Esteves NR, Esteves N, de Miranda Soares LP, da Silva Pinto D, Fuzii HT, et al. Relationship between growth factors and its implication

- in the pathogenesis of leprosy. *Microb Pathog*. 2014;77:66–72.
31. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1).
 32. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Med (Ribeirão Preto Online)*. 1997;30(3):335–9.
 33. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;13(10):616–30. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm3434>
 34. Petito RB, Amadeu TP, Pascarelli BMO, Jardim MR, Vital RT, Antunes SL, et al. Transforming growth factor- β 1 may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2013;72(4):351–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481710>
 35. Venturini J, Soares CT, Belone ADFF, Barreto JA, Ura S, Lauris JRP, et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. *Lepr Rev*. 2011;82(1):25–35.
 36. Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF-B1 Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):23.
 37. Nigou J, Gilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: From structure to biosynthesis. Vol. 85, *Biochimie*. 2003. p. 153–66.
 38. Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, Ray A, et al. *Mycobacterium leprae* Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog*. 2010;6(10).
 39. Cruz RM, Oliveira SF De. Análise genética de problemas craniofaciais – revisão da literatura e diretrizes para. 2007;(parte 2):141–50.

40. 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.* 2014;133(12):1525–32.
41. Bochud P, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations. *Hum Genet.* 1998;63(44):935–41.
42. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: Disruption of the splicing code and the decoding machinery. Vol. 8, *Nature Reviews Genetics.* 2007. p. 749–61.
43. 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>
44. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: A decade of biological, computational and technological advances. Vol. 37, *Nucleic Acids Research.* 2009. p. 4181–93.
45. 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.
46. 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(4):439–41.
47. 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;33(3):412–5. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng1096>
48. 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.* 2004;5(1):63–7.

49. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Moraes MO, Di Flumeri C, Hong Thai V, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004;427(6975):636–40.
50. Klein J, Sato A. The HLA System. *New Engl Jourunal Med*. 2000;343(10):0–7.
51. Naik S. THE HUMAN HLA SYSTEM. *J Indian Rheumatol Assoc*. 2003;11:79–83.
52. 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.
53. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G, Foss NT, Fitness J, Floyd S, et al. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;8(3):209–28.
54. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet*. 2007;39(4):517–22.
55. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit C, Siddiqui MR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol*. 2010;71(10):992–8.
56. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):1–9.
57. Cardoso CC, Pereira AC, De Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol*. 2011;6(5):533–49.
58. Ali S, Chopra R, Aggarwal S, Srivastava AK, Kalaiarasan P, Malhotra D, et al. Association of variants in BAT1-LTA-TNF-BTNL2 genes within 6p21.3 region show graded risk to leprosy in unrelated cohorts of Indian population. *Hum Genet*. 2012;131(5):703–16.
59. 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*. 2009;361(27):2609–18.
60. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000979.
 61. Wong SH, Hill AVS, Vannberg FO. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1446–8.
 62. Grant A V, Alter A, Huong NT, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the Vietnamese population. *J Infect Dis* [Internet]. 2012;206(11):1763–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984114>
 63. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, 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* [Internet]. 2007;178(12):7520–4. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.12.7520>
 64. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, 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.
 65. Bochud P, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-Like Receptor 2 (*TLR2*) Polymorphisms Are Associated with Reversal Reaction in Leprosy. *J Infect Dis*. 2008;197(2):253–61.
 66. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(5).
 67. 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.

68. Pereira a C, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IMF, Parelli FPC, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009;10(2):174–80.
69. Phetsuksiri B, Srisungngam S, Rudeeaneksin J, Bunchoo S, Lukebua A, Wongtrungkapun R, et al. SNP genotypes of *Mycobacterium leprae* isolates in Thailand and their combination with *rpoT* and *TTC* genotyping for analysis of leprosy distribution and transmission. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(1):52–6.
70. Kerr-Pontes LRS, Montenegro ACD, Barreto ML, Werneck GL, Feldmeier H. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: An ecological study. *Int J Epidemiol.* 2004;33(2):262–9.
71. 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.* 2014;133(7):883–93.
72. Vejbaesya S, Mahaisavariya P, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. TNF α and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thail.* 2007;90(6):1188–92.
73. Alter A, De Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet.* 2010;127(3):337–48.
74. de Messias-Reason IJ, Boldt ABW, Moraes Braga AC, Von Rosen Seeling Stahlke E, Dornelles L, Pereira-Ferrari L, et al. The Association between Mannan-Binding Lectin Gene Polymorphism and Clinical Leprosy: New Insight into an Old Paradigm. *J Infect Dis [Internet].* 2007;196(9):1379–85. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/521627>
75. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(3):330–40.

76. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(11):1322–33. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.3540>
77. Tarique M, Saini C, Naqvi RA, Khanna N, Sharma A, Rao DN. IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3⁺ regulatory T cells in human Leprosy. *Mol Immunol*. 2017;83:72–81.
78. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg- van Schip JJ, et al. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4).
79. Slattery ML, Lundgreen A. The influence of the CHIEF pathway on colorectal cancer-specific mortality. *PLoS One*. 2014;9(12).
80. Slattery ML, Herrick JS, Torres-Mejia G, John EM, Giuliano AR, Hines LM, et al. Genetic variants in interleukin genes are associated with breast cancer risk and survival in a genetically admixed population: The breast cancer health disparities study. *Carcinogenesis*. 2014;35(8).
81. Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Riva S, Clerici M, et al. Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *J Exp Med*. 2009;206(6):1395–408.
82. Martellosi Cebinelli GC, Paiva Trugilo K, Badaró Garcia S, Brajão de Oliveira K. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review. *Eur Cytokine Netw*. 2016;27(4):81–9.
83. Laudisi F, Dinallo V, Di Fusco D, Monteleone G. Smad7 and its potential as therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Curr Drug Metab*. 2016;17(3):303–6.
84. Gaschignard J, Grant AV, Thuc N Van, Orlova M, Cobat A, Huong NT, et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):1–20.

Polymorphisms at the *TGFB1* and *IL2RA* genes are Associated to Clinical Forms of Leprosy in Brazilian Population

Rodrigo Mendes de Camargo, Msc; Weber Laurentino da Silva, Msc; Priscila Medeiros, Msc; Andrea de Faria Fernandes Belone, PhD; Ana Carla Pereira Latini, PhD

Corresponding Author: Ana Carla Pereira Latini, PhD. Research Division, Lauro de Souza Lima Institute. Rod. Comte. João Ribeiro de Barros, km 225/226, 17039-800. Bauru, São Paulo, Brazil. Phone: 55-14-31035896. E-mail: anacarlap@gmail.com

Financial support: FAPESP (2009/16873-8).

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious chronic disease compromising skin and peripheral nerves. There is a spectrum encompassing the clinical forms of leprosy, directed by host immune response. Leprosy has been classified as multibacillary (MB) and paucibacillary (PB), in accord to number of lesions and bacillary burden. Here we have conducted a genetic association study to clinical forms of leprosy based on two case-control samples from Brazil. We have investigated the association of the *IL2RA* and *TGFB1* genes with clinical forms of leprosy. These genes codify important molecules to immunosuppressive activity of the Treg cells, and present differential expressions in accord to the clinical forms of leprosy. A total of 885 leprosy cases were included in the study: 406 cases from Rondonópolis municipality as start population, and 479 cases from the State of São Paulo as a replication population. The AA genotype of the rs2386841 polymorphism in the *IL2RA* gene was associated to PB form in the start population (OR: 4.29; p-value = 0.0043), but this was not confirmed for the replication population. The C allele of the rs1800470 marker at the *TGFB1* gene was associated to MB form in the start population (OR: 2.36; p-value = 0.0238). This association was replicated for the replication population (OR: 2.10; p-value = 0.0300). In a combined analysis joining both populations the association of the rs1800470 was confirmed (OR: 1.81; p-value = 0.0475). We have demonstrated, for the first time, an association data for the candidate region at chromosome 10 associated to PB form. In addition, we reported the association of *TGFB1* gene with the MB form. Our results place these genes as candidates for validation and replication studies and confirm the regulatory activity of Tregs as important to clinical outcome in leprosy.

Keywords: leprosy; genetic epidemiology; *TGFB1*; *IL2RA*; Tregs.

1. Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the *Mycobacterium leprae*, an intracellular pathogen with predilection for skin macrophages and Schwann cells, causing skin lesions and compromising peripheral nerves. It represents a public health problem, with approximately 210,000 new cases per year in the world, while Brazil ranks second in the number of patients in the world (WHO, 2016).

The disease presents a broad clinical spectrum, where there are two poles, tuberculoid (TT) and lepromatous (LL) with predominance of the Th1 and Th2 immune response respectively. The TT pole represents the localized form of the disease with the highest bacillus containment, and the LL pole represents the disseminated form with the highest bacillary spread. There are also three intermediate forms, borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB), and borderline lepromatous (BL). This classification, proposed by Ridley and Jopling (1966), is widely used in research centers and covers clinical, immunological, microbiological and histopathological aspects (Ridley and Jopling, 1966). For treatment purposes, since 1982 WHO has divided patients into paucibacillary (PB) and multibacillary (MB), considering Ridley and Jopling classification, microbiological indexes and, more recent, the number of lesions (WHO, 1998).

The genomic sequence of *M. leprae* presents low variability, so it is believed that host genetics plays an important role in the development of the disease *per se* and its clinical forms (Cole et al., 2001). However, the polarization phenotype is neglected by studies on genetic epidemiology of leprosy. The number of genes already associated to leprosy subtypes or its polarization (39 associations in 28 genes) is shorter than for leprosy *per se* (82 associations in 50 genes) (Gaschignard et al., 2016).

Genome-wide linkage studies unveiled peaks at the chromosomal regions 10p13 (Mira et al., 2003; Siddiqui et al., 2001), 6p21 (Miller et al., 2004; Mira et al., 2003), 6q25-26 (Mira et al., 2003) and 17q22 (Jamieson et al., 2004) for leprosy. Genes well-associated with leprosy *per se* are *PARK2* (Mira et al., 2004), *TNF*, *LTA* (Roy et al., 1997; Shaw et al., 2001; Fitness et al., 2004; Alcais et al., 2007; Sapkota et al., 2010; Wong et al., 2010; Cardoso et al., 2011; Ali et al., 2012), *HLA-DR*, *RIPK2*, (Zhang et al., 2009), *CCDC122*, *LACCI* (Wong et al., 2010; Zhang et al., 2009) *LRRK2*, *TNFSF15* (Zhang et al., 2009; Grant et al., 2012) *NOD2* (Zhang et al., 2009; Berrington et al., 2010; Sales-Marques et al., 2014) *TLR1* (Bochud et al., 2008; De Sales Marques et al., 2013; Johnson et al., 2007; Misch et al., 2008; Schuring et al., 2009; S H Wong et al., 2010), *IL10* (Santos et al., 2002; Pereira et al., 2009; Franceschi et al., 2009).

Although several studies have demonstrated the participation of the host genetic component in the development of leprosy *per se*, few studies have focused on the search for markers associated with the clinical forms of the disease (Gaschinard et al., 2016). Besides, a two-stage model has been proposed do leprosy genetic susceptibility, with a set of genes to risk of leprosy *per se* and another set for leprosy clinical forms (Alter et al., 2011). Some genes with markers associated to clinical forms of leprosy with replicate data are *TNF*, associated with MB form in Indian (Roy et al., 1997) and Thai populations (Vejbaesya et al., 2007), *MCR1* (Alter et al., 2010) and *MBL2* associated to the MB form in Brazil (Messias-Reason et al., 2007) and Nepal (Sapkota et al., 2006), *TLR2* associated with the PB form of the disease in Ethiopia (Bochud et al., 2008) and Malawi (Fitness et al., 2004).

The *IL2RA* gene is located at the chromosomal region 10p15, near from the linkage peak for leprosy (Mira et al., 2003; Siddiqui et al., 2001). It codes the alpha subunit of the IL-2 receptor, and is also named CD25. It plays a role in leprosy since IL-2 polarizes the immune response to the Th1 profile acting on the macrophages activation. However, this molecule is also associated to an immunosuppressive profile, being present at regulatory T cells (Tregs). Tregs use this receptor to consume IL-2 at the site of the immune response, hindering the activation and proliferation of the effector T lymphocytes, and preventing the activation of macrophages (Chinen et al., 2016). Studies have shown that CD25⁺ cells are in a greater number of patients in the lepromatous pole and are associated with a proliferation of bacillus (Tarique et al., 2017; Bobosha et al., 2014).

Another candidate gene for association studies in leprosy polarization is *TGFBI*. It is a pleiotropic cytokine with important function in the immunoregulatory activity of Tregs (Massagué, 2012). TGF- β has an important role in diseases caused by intracellular microorganisms such as *Leishmania*, *Trypanosomacruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Lacazialoboi*, and mycobacteria, since it suppresses the activation of macrophages (de Souza Aarão et al., 2014). *In vitro* and *in situ* studies confirm higher TGF- β production in lepromatous patients, which participates in the anti-inflammatory *milieu* and bacillary persistence observed at this pole (de Souza Aarão et al., 2014; Petito et al., 2013; Saini et al., 2014; Venturini et al., 2011).

Herein, we investigated the association of markers at the *IL2RA* and *TGFBI* genes with leprosy polarization, using a stepwise strategy enrolling two population samples from Brazil.

2. Methods

2.1. Subjects and study design

We adopted a step-wise design to investigate markers in the *IL2RA* and *TGFB1* genes. Our start population is from Rondonópolis county, located at Mato Grosso State, an hyperendemic region of Brazil for leprosy. In order to test the replication of the data, we investigated a second case-control sample from State of São Paulo (replication population), where the epidemiological indexes of leprosy are more controlled (Brazil Ministry of Health, 2015).

In order to classify patients in PB and MB, we adopted the WHO classification criterion of 1982. Taking into account the Ridley and Jopling (1966) spectrum, TT and BT patients with bacilloscopy index $\leq 1+$ were classified as PB, while MB patients had bacilloscopy index $\geq 2+$ (WHO, 1982).

Patients from Rondonópolis encompassed 406 individuals, of which 90 were PB and 310 MB. Leprosy diagnosis were confirmed by clinical-laboratory tests in the out patient service of the local family health clinics. The sample of patients from São Paulo State were composed by 479 cases, diagnosed at the Lauro de Souza Lima Institute (Bauru-SP), and 99 were PB and 380 MB. The description of the general characteristics of these groups are detailed in the **Table1**.

Table 1. Characteristics of MB and PB groups in the start and replication populations.

Variable	Category	Start Population (n=406)	Replication Population (n=479)
Clinical form (WHO, 1982)	Paucibacillary	96 (24%)	99 (21%)
	Multibacillary	310 (76%)	380 (79%)
Clinical form (Ridley & Jopling, 1966)	LL	21 (5,1%)	102 (21,2%)
	BL	63 (15,3%)	131 (27,3%)
	BB	79 (19,2%)	132 (27,5%)
	BT	156 (38,7%)	49 (10,2%)
	TT	60 (14,6%)	62 (12,9%)
	IL	27 (6,6%)	3 (0,6%)
Age (mean$\pm$SD) MB		42,9 $\pm$ 16,1	37,9 $\pm$ 18,01
Age (mean$\pm$SD) PB		39,1 $\pm$ 16,1	40,2 $\pm$ 18,01
Ethnicity MB	Caucasian	116 (37%)	299 (78%)
	Black	10 (3%)	17 (5%)
	Mestizo	184 (60%)	49 (13%)
	Without classification	-	15 (4%)
Ethnicity PB	Caucasian	29 (30%)	82 (83%)
	Black	6 (6%)	7 (7%)
	Mestizo	61 (64%)	9 (9%)
	Without classification	-	1 (1%)

Gender MB	Male	201 (65%)	271 (71%)
	Female	109 (35%)	109(29%)
Gender PB	Male	45 (47%)	63 (64%)
	Female	51 (53%)	36 (36%)

MB – multibacillary leprosy; PB – paucibacillary leprosy; SD – standard deviation; LL – Polar lepromatous leprosy; BL – Borderline lepromatous leprosy; BB – Bordeline bordeline leprosy; BT – Borderline tuberculoid leprosy; TT – Polar tuberculoid leprosy; IL – Indeterminate leprosy.

2.2. DNA extraction and SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes samples by salting-out method. Genotyping were performed by allelic discrimination method based on TaqMan® technology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and were conducted on Step One Plus real-time PCR equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.3. Markers selection

The rs1800470 polymorphism of *TGFBI* was selected from literature data reporting functional effects of this variant (Shin et al., 2005; Wei et al., 2007; Li et al., 2004; Fan et al., 2014; Zhang et al., 2015; Langdahl et al., 2008; Sandhya et al., 2011; Jonth et al., 2007; Martelossi Cebinelli et al., 2016). This is a missense polymorphism that promotes the substitution of proline by leucine.

For *IL2RA* gene we picked eleven tag SNPs from International HapMap Project database considering a minimum minor allele frequency of 0.1 and a r^2 cutoff of 0.8 in Yoruba population. Following SNPs were selected: rs7910961, rs11256497, rs12722561, rs2245675, rs2386841, rs3134883, rs4749926, rs6602392, rs706778, rs942201 and rs9663421.

2.7. Statistical analyses

The comparisons of alleles, genotypes and carriers frequencies were performed using a univariate logistic regression model, with and without adjustment for the covariates gender and ethnicity, using statistical software R for Windows, version 2.5.1, and the packages "genetics", "desing", "hmisc" and "haplo.states". P-value <0.05 was adopted as cutoff for statistical significance. In order to avoid the multiple comparisons effect, Bonferroni correction was adopted before testing the replication of data for *IL2RA* markers.

To confirm the independent signals of the markers at *IL2RA* we measured the linkage disequilibrium (LD) through r^2 statistics using the Haploview software, version 4.2.

3. Results

3.1 *IL2RA*

Among the eleven markers tested in the *IL2RA* gene (Supplementary Table 1), three showed a significant association with clinical forms of leprosy for the start population (rs2386841, rs7910961 and rs6602392), as described in Table 2. However, after Bonferroni correction only the association of AA genotype of the rs2386841 with the PB form remained significant (OR=4.29; *p*-value= 0.0043) and was tested in the replication population, according to the step-wise strategy. However, this association was not replicated for the replication population, as described in Table 2.

The linkage disequilibrium analysis including the eleven markers showed that rs2386841 has an independent signal (Fig. 1).

Table 2: Frequency data in PB and MB groups and association data for markers rs2386841, rs7910961 and rs6602392 at the *IL2RA* gene.

Population /Marker	Alelles or Genotypes	PB	MB	OR (95%CI) <i>p</i> -value	OR (95%CI) <i>p</i> -value ^a
Start Population rs2386841	A	0,23	0,16	1,57 (0,89-2,75) 0,1150	1,71 (0,96-3,05) 0,0682
	C	0,76	0,82	*	*
	CC	59 (0,62)	214 (0,70)	*	*
	AC	27 (0,28)	83 (0,27)	1,17 (1,37 -9,54) 0,5338	1,27 (0,74-2,18) 0,3752
	AA	9 (0,09)	9 (0,03)	3,62 (1,37-9,54) 0,0091	4,29 (1,57-11,6) 0,0043
	Carrier A			1,42 (0,88-2,29) 0,1505	1,56 (0,95-2,56) 0,0769
		n= 95	n= 306		
Start Population rs7910961	A	0,44	0,35	1,41(0,88-2,25)0,1487	1,50(0,93-2,43)0,0940
	G	0,56	0,65	*	*
	GG	32(0,34)	134(0,44)	*	*
	AG	43(0,45)	127(0,42)	1,41(0,84-2,38)0,1865	1,51(0,88-2,56)0,1266
	AA	20(0,21)	45(0,15)	1,86(0,96-3,75)0,0622	2,09(1,07-4,09)0,0308
	Carrier A			1,53(0,94-2,48)0,0818	1,66(1,01-271)0,0443
		n=95	n=306		
Start Population rs6602392	C	0,89	0,82	*	*
	A	0,11	0,18	0,57(0,28-1,17)0,13	0,50(0,24-1,03)0,0628
	CC	74(0,78)	209(68)	*	*
	AC	21(0,22)	86(28)	0,68 (0,39-1,19)0,1821	0,59(0,34-1,05)0,0743
	AA	0	11(0,04)	-	-
	Carrier A			0,61(0,35-1,05)0,0748	0,52(0,30-0,91)0,0230
		n=95	n=306		
Replication population rs2386841	A	0,24	0,26	1,09 (0,60-1,97) 0,7683	1,08 (0,59-1,97) 0,7894
	C	0,76	0,74	*	*
	CC	44 (0,59)	175 (0,58)	*	*
	AC	24 (0,32)	97 (0,32)	1,01 (0,58-1,77) 0,9548	1,00 (0,56-1,76) 0,9924
	AA	6 (0,08)	30 (0,10)	1,25 (0,49-3,20) 0,6321	1,24 (0,48-3,20) 0,6446
	Carrier A			1,06 (0,63-1,78) 0,8131	1,05 (0,62-1,78) 0,8479
		n= 74	n= 302		

Bold values denote statistically significant results.

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

*Indicates the baseline for comparison.

^a OR e *p*-value adjusted for covariates sex and ethnicity.

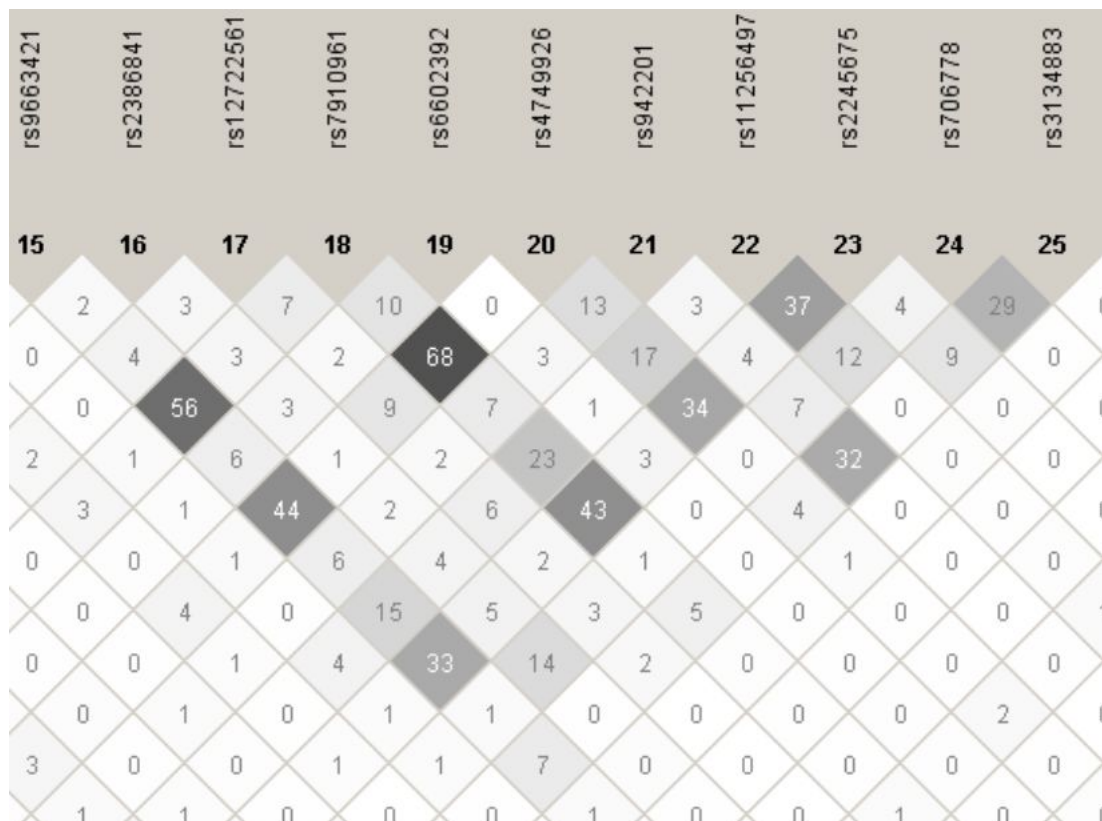


Fig.1. Linkage disequilibrium (LD) map for tag SNPs at the *IL2RA* gene. The number within boxes represents r^2 values calculated by Haploview software (4.2).

3.2 *TGFB1*

When we tested the rs1800470 marker in the *TGFB1* gene for the start population we found an association of the AA genotype with the MB form of the disease, and this data was replicated for the replication population. Besides, the AG genotype and carriers of A allele also showed association with the MB form for the replication population, as described in Table 3.

Then, we conducted a combined analysis joining both populations and adjusting the association data for gender, ethnicity and origin covariates, in order to evaluate a possible interference of the different populations on the data. From this analysis, the AA genotype association remained associated to MB form ($OR=2.23$; $p\text{-value}=0.0016$). In addition, the AG genotype, A allele and carriers of A were also associated to MB form, as described in Table 3.

Table3: Frequency data in PB and MB groups and association data for markers rs1800470 at the *TGFB1* gene.

Population	Alelles or Genotypes	PB	MB	OR (95%CI) <i>p</i> -value	OR (95%CI) <i>p</i> -value ^a
Start population	A	0,45	0,55	1,50 (1,86-3,60) 0,0944	1,47 (0,90-2,40) 0,1201
	G	0,55	0,45	*	*
	GG	24 (0,27)	54 (0,19)	*	*
	AG	50 (0,56)	146 (0,52)	1,29 (0,72 -2,31) 0,3770	1,27 (0,70-2,30) 0,4201
	AA	15 (0,17)	83 (0,29)	2,45 (1,18-5,10) 0,0158	2,36 (1,12-4,98) 0,0238
	Carrier A			1,56 (0,89-2,72) 0,1127	1,52 (0,86-2,69) 0,1452
		n= 89	n= 283		
replication population	A	0,47	0,55	1,40 (0,87-2,26) 0,1650	1,40 (0,89-2,36) 0,1313
	G	0,53	0,45	*	*
	GG	25 (0,30)	68 (0,20)	*	*
	AG	39 (0,46)	174 (0,50)	1,64 (0,92-2,91) 0,0917	1,81 (1,00-3,25) 0,0475
	AA	20 (0,24)	106 (0,30)	1,94 (1,00-3,77) 0,0483	2,10 (1,07-4,11) 0,0300
	Carrier A			1,74 (1,01-2,98) 0,0424	1,91 (1,10-3,30) 0,0205
		n= 84	n= 348		
Combined populations	A	0,46	0,55	1,45 (1,03-2,04) 0,0294	1,47 (1,04-2,07) 0,0270
	G	0,54	0,45	*	*
	GG	49 (0,28)	122 (0,19)	*	*
	AG	89 (0,51)	320 (0,51)	1,44 (0,96-2,16) 0,0763	1,52 (1,00-2,31) 0,0448
	AA	53 (0,20)	189 (0,30)	2,16 (1,32-3,53) 0,0020	2,23 (1,35-3,66) 0,0016
	Carrier A			1,64 (1,12-2,42) 0,0110	1,72 (1,16-2,55) 0,0063
		n=191	n=631		

Bold values denote statistically significant results.

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

*Indicates the baseline for comparison.

^a OR e *p*-value were adjusted for covariates sex, ethnicity and origin.

4. Discussion

In this study we intentioned to apply the strategy proposed by Gaschignard et al. (2016), focusing on the phenotype of "leprosy polarization", referring to the process involved in the differentiation of the clinical forms of leprosy. From the genetic perspective, the leprosy polarization phenotype can be considered as neglected, given the lack of studies for this purpose. In most cases, the studies that deal with the clinical forms of the disease do this as secondary analysis of studies about leprosy *per se*, comparing clinical forms groups with healthy controls. For Gaschignard et al., (2016) this is not valid, since these designs consider PB and MB forms of leprosy as "distinct diseases", and the mechanisms involved in the disease *per se*, will not necessarily be involved in the clinical form determination (Gaschignard et al., 2016). They also described the benefits of using the correct method for study clinical forms outcome. Here we conducted an association study focusing on the leprosy polarization phenotype respecting those criterions pointed by Gaschignard et al. (2016), for two genes associated to the regulatory process of the immune response, *IL2RA* and *TGFB1*.

After test eleven polymorphisms covering the *IL2RA* gene, we found an association signal for AA genotype of the rs2386841 with the PB form of leprosy in the start population from Rondonópolis. This association cannot be confirmed in the replication population, probably reflecting genetic background differences between these populations, which are from two distant regions in Brazil. However, this is the first *loci* at 10p13 region associated to PB form, in accord to described by Mira et al. (2003), since other associations data for this region, at *MRC1*, *NEBL* and *CUBN* genes, are related to MB form (Grant et al., 2014; Alter et al., 2010). Thus, our data evidences *IL2RA* gene as a candidate for validation and replication studies on leprosy polarization. As expected, the linkage disequilibrium analysis showed that rs2386841 has an independent effect, being an interesting marker for association studies of this gene.

When testing *TGFB1* gene we found association of the AA genotype of the polymorphism rs1800470 to the risk of MB form of leprosy in both populations. The combined analysis reinforced these association data. These findings conflict with functional data pointing the G allele associated with higher production of TGF- β 1 (Martelossi Cebinelli et al., 2016), since MB patients has a greater amount of this cytokine (Saini et al., 2014; Venturini et al., 2011). This variant, also known as +29C>T, is located at the hydrophobic core of the signal peptide sequence, however both alleles encode apolar amino acids (Martelossi Cebinelli et al., 2016). Thus, in spite of missense, this marker cannot be the causative of the functional effect and it can reflect the effect of other variants. Besides, a specific effect for *M. leprae* stimulus should be investigated.

Treg cells CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ are important regulator of the Th1 and Th2 immune responses, which contribute to clinical presentation of leprosy. FoxP3 is the key transcription factor of this cell population and TGF- β 1 and IL-10 are the main effector cytokines involved in Treg cell activities. These cells participate in the induction and maintenance of the immunosuppressive profile seen in lepromatous leprosy contributing to the high bacillary burden (Sadhu et al., 2016). The nature of the FOXP3 activity, if suppressor or activator, seems to be different when comparing the leprosy poles (Kumar et al., 2013). Besides, the miR155 is involved in the higher proliferation and longevity of Tregs in BL/LL patients (Kumar et al., 2013). Considering these aspects, we decided to explore for the first time the genetic association of CD25 and TGF- β 1 with the leprosy polarization. It is important to mention that we have already investigated this association for IL10, which is only associated to leprosy per se in our population (Pereira et al., 2009).

Classical covariates determining clinical forms of leprosy include sex, age, endemicity, geography, BCG vaccination (Gaschinard et al., 2016). To assemble a case-control sample to genetic association studies is indispensable consider these covariates. Here we adopted selection criteria and analysis parameters to control the effect of these covariates in order to avoid biases.

Data from the literature indicate a higher incidence of the MB form in men than in women, with a ratio of 1.5-2 times (reviewed by Gaschignard et al., 2016). The number of MB individuals is also increased in Brazilian men than women (WHO, 2017). Our population samples follow this observation since the male:female ratios are 1.84 for the start population and 2.48 for replication population, respectively. In spite of ethnicity not to be a classical risk factor influencing leprosy clinical forms, we considered this in our analysis since Brazilian people suffers of an intense admixture of races. When adjusting the analysis using sex and ethnicity as covariates, we observed differences to *IL2RA* results, since rs7910961 and rs6602392 markers presented positive association after the adjustment. However, for the rs2386841 and rs1800470 there were no interferences of these covariates.

A higher mean of age among MB than in PB patients has been also reported, probably due to the long incubation time of the bacillus (de Vries and Perry, 1985; Guerra-Silveira and Abad-Franch, 2013; WHO 2017). Although the influence of age is higher in men than in women, the effect of these covariates (age and sex) are independent on the polarization of leprosy (Guerra-Silveira and Abad-Franch, 2013). In our study the mean age of illness for both populations is in agreement with the observed for the Brazilian population with a predominance of cases in adults (WHO, 2017).

The geography and endemicity covariates are highly influenced by human genetic factors. Thus, populations with different genetic background present intense epidemiological differences interfering with the outcomes of genetic studies. For example, in a meta-analysis the A allele of -308A>G at the TNF gene was associated with leprosy resistance only in Brazilian population, in spite of to be associated with susceptibility in other populations (Cardoso et al., 2011). According to WHO data, Brazil has a predominance of MB cases in its population, with 72% of MB, while in India the proportion of MB among the new cases in 2016 was 49% (WHO, 2017). The proportions of MB form in our population samples reflect what is observed in Brazil (76% for start population and 76,1% for replication population).

Finally, we could not find reliable data on BCG vaccination for these populations.

Leprosy is a complex trait and factors related to host, environment and pathogen act in the development of the disease *per se* and its clinical forms (Alter et al., 2011). However,

there is no evidence that different strains of *M. leprae* interfere in the outcome, and studies point to a low genetic variability of the bacillus as well (Monot et al., 2009). Thus, considering the broad clinical aspect of leprosy, the human genetic component seems to play a more relevant role in the outcome of the disease (Alter et al., 2011). From the epidemiological perspective, the elucidation of the mechanisms involved in the leprosy polarization may help to predict clinical forms with higher potential in transmitting the disease, helping to interrupt the transmission chain (Job et al., 2008). Thus, our data helps to construct the genetic architecture of leprosy clinical forms. Also *in vitro* functional studies using different ratios *M. leprae* cells (MOI) may be an interesting strategy for the validation of genetic epidemiology data on leprosy polarization.

References

- 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. <https://doi.org/10.1038/ng2000>
- Ali, S., Chopra, R., Aggarwal, S., Srivastava, A.K., Kalaiarasan, P., Malhotra, D., Gochhait, S., Garg, V.K., Bhattacharya, S.N., Bamezai, R.N.K., 2012. Association of variants in BAT1-LTA-TNF-BTNL2 genes within 6p21.3 region show graded risk to leprosy in unrelated cohorts of Indian population. *Hum. Genet.* 131, 703–716. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1114-6>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0775-x>
- Arnoldi, J., Gerdes, J., Flad, H.D., 1990. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am. J. Pathol.* 137, 749–53.
- Awad, M.R., El-Gamel, a, Hasleton, P., Turner, D.M., Sinnott, P.J., Hutchinson, I. V, 1998. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 66, 1014–20. [https://doi.org/10.1016/S1053-2498\(98\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S1053-2498(98)00024-2)
- Berrington, W.R., Macdonald, M., Khadge, S., Sapkota, B.R., Janer, M., Hagge, D.A., Kaplan, G., Hawn, T.R., 2010. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J. Infect. Dis.* 201, 1422–35. <https://doi.org/10.1086/651559>
- Bochud, P., Hawn, T.R., Siddiqui, M.R., Saunderson, P., Britton, S., Abraham, I., Argaw, A.T., Janer, M., Zhao, L.P., Kaplan, G., Aderem, A., 2008. Toll• Like Receptor 2 (*TLR2*) Polymorphisms Are Associated with Reversal Reaction in Leprosy. *J. Infect. Dis.* 197, 253–261. <https://doi.org/10.1086/524688>
- Cardoso, C.C., Pereira, A.C., De Sales Marques, C., Moraes, M.O., 2011. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol.* 6, 533–549. <https://doi.org/10.2217/FMB.11.39>
- Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SM, Ribeiro-Alves M, Nery JA. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis.* 2011 Oct 15; 204(8):1256-1263.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., Barrell, B.G., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007–1011. <https://doi.org/10.1038/35059006>
- De Sales Marques, C., Brito-De-Souza, V.N., Guerreiro, L.T.A., Martins, J.H., Amaral, E.P., Cardoso, C.C., Dias-Batista, I.M.F., Da Silva, W.L., 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, 120–129. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit133>
- de Souza Aarão, T.L., Esteves, N.R., Esteves, N., de Miranda Soares, L.P., da Silva Pinto, D., Fuzii, H.T., Quaresma, J.A.S., 2014. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. *Microb. Pathog.* 77, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.005>
- de Vries, J.L., Perry, B.H., 1985. Leprosy case detection rates by age, sex, and polar type under leprosy control conditions. *Am.J.Epidemiol.* 121, 403–413.
- Dunning, A.M., Ellis, P.D., McBride, S., Kirschenlohr, H.L., Healey, C.S., Kemp, P.R., Luben, R.N., Chang-Claude, J., Mannermaa, A., Kataja, V., Pharoah, P.D., Easton, D.F., Ponder, B.A., Metcalfe, J.C., 2003. A transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res* 63, 2610–2615.
- Fan, H., Yu, H., Deng, H., Chen, X., 2014. Transforming growth factor- β 1 rs1800470 polymorphism is associated with lung cancer risk: a meta-analysis. *Med. Sci. Monit.* 20, 2358–62. <https://doi.org/10.12659/MSM.891122>
- Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Mwaungulu, L., Crampin, A.C., Fine, P.E.M., Hill, A.V.S., 2004. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 330–340. <https://doi.org/10.1186/1528-7566-71-330> [pii]
- Gaschignard, J., Grant, A.V., Thuc, N., Van, Orlova, M., Cobat, A., Huong, N.T., Ba, N.N., Thai, V.H., Abel, L., Schurr, E., Alcaïs, A., 2016. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004345>
- 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. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis588>
- 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.* 2014;133(7):883–93.
- Guerra-Silveira, F., Abad-Franch, F., 2013. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062390>
- Jamieson, S.E., Miller, E.N., Black, G.F., Peacock, C.S., Cordell, H.J., Howson, J.M.M., Shaw, M.A., Burgner, D., Xu, W., Lins-Lainson, Z., Shaw, J.J., Ramos, F., Silveira, F., Blackwell, J.M., 2004. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun.* 5, 46–57. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364029>
- Job, C.K., Jayakumar, J., Kearney, M., Gillis, T.P., 2008. Transmission of leprosy: A study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 518–521.
- Johnson, C.M., Lyle, E.A., Omueti, K.O., Stepensky, V.A., Yegin, O., Alpsoy, E., Hamann, L., Schumann, R.R., Tapping, R.I., 2007. Cutting Edge: A Common Polymorphism Impairs Cell Surface Trafficking and Functional Responses of TLR1 but Protects against Leprosy. *J. Immunol.* 178, 7520–7524. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7520>
- Jonth, A.C., Silveira, L., Fingerlin, T.E., Sato, H., Luby, J.C., Welsh, K.I., Rose, C.S., Newman, L.S., du Bois, R.M., Maier, L.A., 2007. TGF- β 1 variants in chronic beryllium disease and sarcoidosis. *J Immunol* 179, 4255–4262. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.4255>

- Kumar, S., Naqvi, R.A., Ali, R., Rani, R., Khanna, N., Rao, D.N., 2013. CD4+CD25+T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol. Immunol.* 56, 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.04.015>
- Langdahl, B.L., Uitterlinden, A.G., Ralston, S.H., Trikalinos, T.A., Balcells, S., Brandi, M.L., Scollen, S., Lips, P., Lorenc, R., Obermayer-Pietsch, B., Reid, D.M., Armas, J.B., Arp, P.P., Bassiti, A., Bustamante, M., Husted, L.B., Carey, A.H., Pérez Cano, R., Dobnig, H., Dunning, A.M., Fahrleitner-Pammer, A., Falchetti, A., Karczmarewicz, E., Kruk, M., van Leeuwen, J.P.T.M., Masi, L., van Meurs, J.B.J., Mangion, J., McGuigan, F.E.A., Mellibovsky, L., Mosekilde, L., Nogués, X., Pols, H.A.P., Reeve, J., Renner, W., Rivadeneira, F., van Schoor, N.M., Ioannidis, J.P.A., 2008. Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: The GENOMOS study. *Bone* 42. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.11.007>
- Lastória, J.C., de Abreu, M.A.M.M., 2014. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An. Bras. Dermatol.* 89, 205–218. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>
- Li, Z., Habuchi, T., Tsuchiya, N., Mitsumori, K., Wang, L., Ohyama, C., Sato, K., Kamoto, T., Ogawa, O., Kato, T., 2004. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism at codon10. *Carcinogenesis* 25, 237–240. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg197>
- Martelossi Cebinelli, G.C., Paiva Trugilo, K., Badaró Garcia, S., Brajão de Oliveira, K., 2016. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review. *Eur. Cytokine Netw.* 27, 81–89. <https://doi.org/10.1684/ecn.2016.0382>
- Massagué, J., 2012. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Miller, E.N., Jamieson, S.E., Joberty, C., Fakiola, M., Hudson, D., Peacock, C.S., Cordell, H.J., Shaw, M., Lins-Lainson, Z., Shaw, J.J., Ramos, F., Silveira, F., Blackwell, J.M., 2004. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 5, 63–67. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364031>
- Mira, M.T., Alcaïs, 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, 412–415. <https://doi.org/10.1038/ng1096>
- Mira, M.T., Alcaïs, A., Van Thuc, N., Moraes, M.O., Di Flumeri, C., Hong Thai, V., Chi Phuong, M., Thu Huong, N., Ngoc Ba, N., Xuan Khoa, P., Sarno, E.N., Alter, A., Montpetit, A., Moraes, M.E., Moraes, J.R., Doré, C., Gallant, C.J., Lepage, P., Verner, A., van de Vosse, E., Hudson, T.J., Abel, L., Schurr, E., 2004. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427, 636–640. <https://doi.org/10.1038/nature02326>
- Mira, M.T., Alcaïs, 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, 412–415. <https://doi.org/10.1038/ng1096>
- Misch, E.A., Macdonald, M., Ranjit, C., Sapkota, B.R., Wells, R.D., Siddiqui, M.R., Kaplan, G., Hawn, T.R., 2008. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000231>
- Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., Matsuoka, M., Taylor, G.M., Donoghue, H.D., Bouwman, A., Mays, S., Watson, C., Lockwood, D., Khamispour, A., Dowlati, Y., Jianping, S., Rea, T.H., Vera-Cabrera, L., Stefani, M.M., Banu, S.,

- Macdonald, M., Sapkota, B.R., Spencer, J.S., Thomas, J., Harshman, K., Singh, P., Busso, P., Gattiker, A., Rougemont, J., Brennan, P.J., Cole, S.T., 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat. Genet.* 41, 1282–1289. <https://doi.org/10.1038/ng.477>
- Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IMF, Parelli FPC, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009;10 (2):174–80.
- Petito, R.B., Amadeu, T.P., Pascarelli, B.M.O., Jardim, M.R., Vital, R.T., Antunes, S.L., Sarno, E.N., 2013. Transforming growth factor- β 1 may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 351–66. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31828bfc60>
- Pinto, P., Salgado, C., Santos, N.P.C., Santos, S., Ribeiro-dos-Santos, Â., 2015. Influence of Genetic Ancestry on INDEL Markers of NFK β 1, CASP8, PAR1, IL4 and CYP19A1 Genes in Leprosy Patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004050>
- 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.
- Sadhu, S., Khaitan, B.K., Joshi, B., Sengupta, U., Nautiyal, A.K., Mitra, D.K., 2016. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004338>
- Saini, C., Ramesh, V., Nath, I., 2014. Increase in TGF- β 1 Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002639>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1502-9>
- Sandhya, A., Bindu, C.H., Reddy, K.P., Vishnupriya, S., 2011. TGFB1 codon 10 polymorphism and its association with the development of myopia: A case-control study. *Biol. Med.* 3, 18–24.
- Schuring, R.P., Hamann, L., Faber, W.R., Pahan, D., Richardus, J.H., Schumann, R.R., Oskam, L., 2009. Polymorphism N248S in the Human Toll• Like Receptor 1 Gene Is Related to Leprosy and Leprosy Reactions. *J. Infect. Dis.* 199, 1816–1819. <https://doi.org/10.1086/599121>
- Shin, A., Shu, X.O., Cai, Q., Gao, Y.T., Zheng, W., 2005. Genetic polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene and breast cancer risk: a possible dual role at different cancer stages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1567–1570. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0078>
- Siddiqui, M.R., Meisner, S., Tosh, K., Balakrishnan, K., Ghei, S., Fisher, S.E., Golding, M., Shanker Narayan, N.P., Sitaraman, T., Sengupta, U., Pitchappan, R., Hill, a V, 2001. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat. Genet.* 27, 439–441. <https://doi.org/10.1038/86958>
- Tarique, M., Saini, C., Naqvi, R.A., Khanna, N., Sharma, A., Rao, D.N., 2017. IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3+ regulatory T cells in human Leprosy. *Mol. Immunol.* 83, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.008>

- Taubenschuss, E., Marton, E., Mogg, M., Frech, B., Ehart, L., Muin, D., Schreiber, M., 2013. The L10P polymorphism and serum levels of transforming growth factor beta1 in human breast cancer. *Int J Mol Sci* 14, 15376–15385. <https://doi.org/10.3390/ijms140815376>
- Venturini, J., Soares, C.T., Belone, A.D.F.F., Barreto, J.A., Ura, S., Lauris, J.R.P., Vilani-Moreno, F.R., 2011. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. *Lepr. Rev.* 82, 25–35.
- Wei, Y., Zhu, Y., Du, B., Yang, Z., Liang, W., Lv, M., Kuang, X., Tai, S., Zhao, Y., Zhang, L., 2007. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Chim. Acta.* 380, 165–9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.02.008>
- WHO, 2017. Weekly epidemiological record, Septembre 2017. 25 Oct 2017. Weekly Epidemiological Record, 6 October 2017, vol. 92, 40 (pp. 589–608)
- WHO, 2016. Leprosy: weekly epidemiological record, Septembre 2016. *World Heal. Organ. Wkly. Epidemiol. Rec.* 91, 405–420. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-2-15.Voir>
- WHO, 1998. WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Leprosy: Introduction [WWW Document]. *Essent. Med. Heal. Prod. Inf. Portal.*
- WHO, 1982. Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes. *World Heal. Organ.*
- Wong, S.H., Gochhait, S., Malhotra, D., Pettersson, F.H., Teo, Y.Y., Khor, C.C., Rautanen, A., Chapman, S.J., Mills, T.C., Srivastava, A., Rudko, A., Freidin, M.B., Puzyrev, V.P., Ali, S., Aggarwal, S., Chopra, R., Reddy, B.S., Garg, V.K., Roy, S., Meisner, S., Hazra, S.K., Saha, B., Floyd, S., Keating, B.J., Kim, C., Fairfax, B.P., Knight, J.C., Hill, P.C., Adegbola, R.A., Hakonarson, H., Fine, P.E., Pitchappan, R.M., Bamezai, R.N., Hill, A. V., Vannberg, F.O., 2010. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* 6, e1000979. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000979>
- Wong, S.H., Gochhait, S., Malhotra, D., Pettersson, F.H., Teo, Y.Y., Khor, C.C., Rautanen, A., Chapman, S.J., Mills, T.C., Srivastava, A., Rudko, A., Freidin, M.B., Puzyrev, V.P., Ali, S., Aggarwal, S., Chopra, R., Reddy, B.S.N., Garg, V.K., Roy, S., Meisner, S., Hazra, S.K., Saha, B., Floyd, S., Keating, B.J., Kim, C., Fairfax, B.P., Knight, J.C., Hill, P.C., Adegbola, R.A., Hakonarson, H., Fine, P.E.M., Pitchappan, R.M., Bamezai, R.N.K., Hill, A.V.S., Vannberg, F.O., 2010. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000979>
- Wong, S.H., Hill, A.V.S., Vannberg, F.O., 2010. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 362, 1446–1448. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1001451>
- Yokota, M., Ichihara, S., Lin, T.-L., Nakashima, N., Yamada, Y., 2000. Association of a T29-&C Polymorphism of the Transforming Growth Factor- 1 Gene With Genetic Susceptibility to Myocardial Infarction in Japanese. *Circulation* 101, 2783–2787. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.24.2783>
- Zhang, F.-R., Huang, W., Chen, S.-M., Sun, L.-D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X.-X., Yang, H.-T., Rong-De Yang, 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–

2618. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903753>

Zhang, L., Mao, L., Xu, J., 2015. Transforming growth factor- β 1 polymorphisms and graft-versus-host disease risk: a meta-analysis. *Oncotarget* 7, 2455–61. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6289>