

Fabiana Covolo de Souza¹
 Elaine Valim Camarinha Marcos¹
 Somei Ura²
 Maria Esther Sales Nogueira¹

IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS HLA-DQB1*01 EM PACIENTES HANSENIANOS MITSUDA NEGATIVOS

*Identification of HLA-DQB1*01 alleles in mitsuda negative leprosy patients*

RESUMO

A proposta deste estudo foi identificar os alelos que codificam o HLA-DQ1 envolvidos na ausência de resposta imune celular em 60 pacientes hanseianos (50LL e 10BL) Mitsuda negativos. Os resultados obtidos mostraram a presença do alelo HLA-DQB1*0501 em 48.30% dos pacientes, seguido do HLA-DQB1*0602 em 31.66%, ambos subtipos do fenótipo HLA-DQB1*01. Apesar do predomínio destes alelos, não se pode afirmar que eles sejam os responsáveis pela ausência de resposta ao teste de Mitsuda. Sugerimos mais estudos neste segmento para a confirmação dos resultados.

Palavras-chaves: Hanseníase. HLA. Antígeno de Mitsuda. *Mycobacterium leprae*.

INTRODUÇÃO

A Hanseníase se manifesta em diferentes formas clínicas, as quais expressam o grau de imunidade celular específica do hospedeiro contra o *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da doença¹. Esta variação na resposta imune pode ser avaliada através do teste intradérmico de Mitsuda, oficialmente aceito como critério de classificação e prognóstico da doença²⁻⁴.

Segundo a classificação proposta por Ridley & Jopling⁵, pacientes tuberculóides (TT) são definidos como Mitsuda positivos; virchovianos (LL), como Mitsuda negativos. Os grupos interpolares – dimorfo-tuberculóide (BT), dimorfo-dimorfo (BB), dimorfo-virchoviano (BL) –

Souza FC, Marcos EVC, Ura S, Nogueira MES. Identificação dos alelos HLA-DQB1*01 em pacientes hanseianos mitsuda negativos. *Hansen Int.* 2010; 35(1), p. 37-40.

apresentam reações variáveis de acordo com o grau de imunidade do paciente⁶.

A partir de 1982, a OMS⁷ estabeleceu uma classificação adequada a poliquimioterapia (PQT), na qual as formas clínicas foram divididas em paucibacilares (PB), nos casos com até cinco lesões cutâneas, e multibacilares (MB), com mais de cinco⁸. Sob o ponto de vista operacional, portanto, os PB passaram a abranger pacientes com as formas TT e BT – Mitsuda positivos – enquanto os pacientes MB englobariam as formas LL, BB e BL – Mitsuda negativos ou fracamente positivos.

A reação de Mitsuda positiva pode ser encontrada na grande maioria dos contatos de pacientes doentes e em indivíduos que nunca foram expostos ao *M. leprae*^{4,9}.

Para explicar a influência genética da resposta ao antígeno de Mitsuda, Rotberg, em 1937¹⁰, sugeriu a existência de um fator natural de resistência à Hanseníase. Segundo o autor, noventa por cento (90%) da população demonstraria resistência à infecção pelo *M. leprae* e somente dez por cento (10%) dos indivíduos seriam geneticamente incapazes de montar uma

Recebido em 12/02/2010.

Última correção em 10/07/2010.

Aceito em: 20/10/2010.

1 Pesquisador Científico- ILSL- Bauru- SP.

2 Pesquisador Científico e Diretor da Divisão de Pesquisa e Ensino – ILSL-Bauru-SP.

resposta imunológica ao bacilo, razão pelo qual seriam, permanentemente, Mitsuda negativos.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta celular dos pacientes Mitsuda negativos ainda permanecem obscuros, todavia estudos revelam que essa anergia é específica ao *M. leprae*, permanecendo inalterada ou levemente diminuída em relação a outros antígenos^{11, 12, 13}.

O complexo de histocompatibilidade principal (HLA), codificado no braço curto do cromossomo 6 (6p.21.3), é o responsável pela apresentação antigênica do macrófago ao linfócito T, desencadeando a resposta imune específica¹⁴. Extremamente polimórfico, origina uma grande variedade de respostas, as quais variam de um indivíduo para o outro, tornando este complexo um grande atrativo para estudos de doenças.

Devido à dicotomia imunológica entre o hospedeiro e o *Mycobacterium leprae* e à variedade de respostas imunológicas originadas, estudos^{15, 16, 17} têm sugerido que a participação do HLA ocorra na modulação e na manifestação das diferentes formas clínicas da hanseníase e não na suscetibilidade para a infecção propriamente dita.

A frequência dos antígenos e dos haplótipos HLA varia consideravelmente entre os diferentes grupos étnicos. Existem ainda diferenças nas frequências, quando se consideram diferentes populações em um mesmo grupo racial¹⁸.

Na hanseníase, o complexo HLA começou a ser estudado na tentativa de elucidar os mecanismos de suscetibilidade ou de resistência para a doença, devido à sua participação na resposta imune. Associações positivas entre TT e alelos HLA-DR2, HLA-DR3 e entre LL e o alelo HLA-DQ1 – subtipos DQB1*05 e DQB1*06 – têm sido descritas em diferentes populações do mundo¹⁹⁻²⁴.

Como a reação de Mitsuda positiva indica presença de resposta imune celular específica ao bacilo, direcionando a manifestação clínica da doença para a forma TT e a reação negativa, para a forma LL, da mesma forma, os alelos HLA-DR2, HLA-DR3 e o alelo HLA-DQ1 também sugerem, respectivamente, prognóstico da doença para a forma TT ou LL.

Dessa forma, Souza e cols²⁵ analisaram a concordância entre os resultados da reação de Mitsuda, comparados aos alelos HLA de classe II (loci DRB1* e DQB1*) nas diferentes formas clínicas da hanseníase.

Os resultados obtidos não revelaram associação entre reação de Mitsuda, alelos HLA e as formas clínicas TT, BB e LL; no entanto, quando os pacientes foram selecionados de acordo com a resposta ao teste de Mitsuda, independentemente da forma clínica que manifestaram, associação significativa foi encontrada entre os Mitsuda negativos e HLA-DQ1 ($p=0,002$).

O fenótipo HLA-DQ1 é constituído pelos subtipos HLA-DQB1*05 e HLA-DQB1*06 e estes são codificados por diferentes alelos. Até o momento estão descritos 44

genótipos diferentes que codificam o mesmo fenótipo²⁶.

Considerados estes achados, teve o presente estudo o propósito de identificar os alelos HLA-DQ1 em alta resolução e suas respectivas frequências no mesmo grupo de pacientes do estudo supracitado, visando verificar a distribuição destes alelos naquela população específica.

MATERIAL E MÉTODOS

Casística: Participaram do estudo 60 pacientes hansenianos caucasoídes, não aparentados, da região de Bauru (interior do Estado de São Paulo), classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS⁷ como multibacilares, Mitsuda negativos e portadores do HLA-DQ1, diagnosticados no Serviço de Dermatologia do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) de Bauru-SP.

Aspectos éticos: Todos os participantes foram informados sobre o propósito do estudo e somente participaram aqueles que concordaram, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pela Comissão Científica e Comitê de Ética em Pesquisa do ILSL, sob parecer nº 040/2007.

Tipificação do alelo HLA-DQ1: HLA de classe II locus DQB1* (DQB1* 02:01/02:02/03:01/03:02/03:03/03:08/04:02/05:01/05:02/05:03/06:01/06:02/06:03/ 06:04/06:09) foi realizada através da extração de DNA a partir de sangue venoso periférico pela técnica de *Salting out*²⁷ e pelo método de PCR-SSP, alta resolução, utilizando-se o kit *Micro SSP™ Allele Specific HLA Class II DNA Typing Tray-DQB1*, da marca One-Lambda/USA.

Análise Estatística: A frequência dos alelos foi obtida através da contagem direta. A análise da distribuição das frequências dos genótipos foi avaliada através do software Arlequin, versão 3.1²⁸.

RESULTADOS

A distribuição da frequência dos alelos HLA-DQB1* está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 Distribuição das frequências dos alelos encontrados nos 60 pacientes hansenianos HLA-DQB1*01 positivo e reação de Mitsuda negativos.

HLA-DQB1*	Número do antígeno	Frequência (%)
02:01	6	10,00
02:02	7	11,67
03:01	16	26,67
03:02	2	3,33
03:03	5	8,33
03:08	1	1,67
04:02	4	6,67
05:01	29	48,33
05:02	9	15,00
05:03	2	3,33
06:01	3	5,00
06:02	19	31,66
06:03	7	11,67
06:04	4	6,67
06:09	6	10,00

Na Tabela 2 estão apresentadas as frequências dos alelos HLA-DQB1*05 e HLA-DQB1*06. O alelo mais frequente encontrado na amostra estudada foi o HLA-DQB1*05:01(48.30%), seguido do HLA-DQB1*06:02 (31,66%). Ambos os alelos são subtipos do fenótipo HLA-DQB1*01, conforme o esperado. As frequências de distribuição dos genótipos encontrados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2 Frequência dos alelos HLA-DQB1*05:01 e HLA-DQB1*06:02 nos 60 pacientes hansenianos Mitsuda negativos.

HLA-DQB1*	Número do antígeno	Frequência (%)
05:01	29	48,33
06:02	19	31,66

DISCUSSÃO

Considerando que antígenos iguais são reconhecidos tanto por indivíduos doentes quanto por indivíduos que nunca irão adoecer e que existem diferenças na resposta desses indivíduos aos mesmos antígenos, é possível inferir-se que o peptídeo antigênico apresentado pela molécula HLA seja o responsável pela ausência de imunidade celular em pacientes Mitsuda negativos²³.

Embora a literatura descreva associação do HLA-DQB1*01 como fator de predisposição a forma LL da doença, Souza e cols em trabalho anterior observaram, na amostra estudada, que a associação ocorre com os

pacientes MB (LL/BL), com reação de Mitsuda negativa, o que sugere que esta associação esteja relacionada com a reação de Mitsuda e não com a forma clínica propriamente dita.

O presente estudo obedece ao modelo genético-epidemiológico descritivo; através dele foram identificados os genótipos do grupo alélico HLA-DQB1*01 (HLA-DQB1*05 e HLA-DQB1*06) em 60 pacientes hansenianos MB e reação de Mitsuda negativa.

Atualmente são descritos pelo Comitê de Nomenclatura para fatores do sistema HLA, cinco (5) alelos distintos que codificam o DQB1*05 (05:01/05:02/05:03/05:04/05:05) e trinta e três (39) alelos distintos que codificam o DQB1*06 (06:01-06:39)²⁶. Na amostra estudada foram identificados três (3) alelos DQB1*05 (05:01/05:02/05:03) e cinco (5) alelos DQB1*06 (06:01/06:02/06:03/06:04/06:09).

Dos alelos identificados, os mais frequentes foram HLA-DQB1*05:01(48.30%) e HLA-DQB1*06:02 (31,66%), conforme esperado, uma vez que a amostra era constituída por pacientes HLA-DQB1*01 positivo (DQB1*05 e DQB1*06).

A distribuição das frequências alélicas encontra-se em equilíbrio na população, visto através da análise de Hardy-Weinberg, comportando-se de maneira análoga aos dados publicados em população caucasiana do sudeste do Brasil²⁹.

Apesar do predomínio dos alelos HLA-DQB1*05:01 e HLA-DQB1*06:02, não se pode afirmar que eles sejam os alelos responsáveis pela ausência de resposta ao teste de Mitsuda e, conseqüentemente, ao direcionamento para o espectro multibacilar da hanseníase.

Todavia, evidenciaram-se as frequências dos alelos (genótipos) HLA-DQB1*01 que predominam nos pacientes hansenianos multibacilares da região geográfica de Bauru, no interior do Estado de São Paulo. A informação do perfil polimórfico do HLA nas diferentes populações contribui significativamente para o melhor entendimento do curso natural das infecções e, por conseqüência, direciona as formas de intervenção na prevenção e no tratamento das doenças.

Sendo assim, estudos neste segmento devem ser realizados, com o objetivo de replicar e confirmar os resultados obtidos.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Paulista contra a Hanseníase pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações. In: Noções de Hansenologia. 2ª edição, Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato". Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, p.51-58, 2000.
- 2 Beiguelman B. A reação de Mitsuda oitenta anos depois. *Hansenologia Internationalis* 24(2): 144-161, 1999.
- 3 Memória Association Internacional de la Lepra. In: Congresso Internacional de Leprologia 6, Madrid p.1344, 1953.
- 4 Mitsuda K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprous nodules. *International Journal of Leprosy* 21:347-58, 1953.
- 5 Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. A five- group system. *Int J Leprosy* 1966; 34(3): 255-73.
- 6 Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Guia para Utilização de Medicamentos e Imunobiológicos na área de Hanseníase. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, Brasília, 2000.
- 7 Brasil. Ministério da Saúde. Guia para controle da Hanseníase. 2ed. Brasília, 1984.
- 8 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para controle da Hanseníase. Ministério da Saúde. 1 ed. 2002. Brasília.
- 9 Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL et al. *Leprosy*. *Clin Microbiol Rev*, 1988; 1: 330-348
- 10 Rotberg, A. Some aspects of immunity on leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis and classification of forms of the disease. Based on 1529 lepromin-tested cases. *Rev. Brás. Lepr.* 1937; 5:45-97.
- 11 Convit J, Pinaridi ME, Rojas FA. **Some considerations regarding the immunology of leprosy**. *Int J Leprosy* 1971; 39(2):556-64.
- 12 Rea TH, Quismorio FP, Harding B, Nies KM, Di Saia PJ, Levan NE, et al. Immunologic responses in patients with lepromatous leprosy. *Arch Dermatol*. 1976; 112(6): 791-800.
- 13 Nogueira MES, Vilani-Moreno FR, Silva EA, Arruda MSP. *Imunologia*. In: Noções de Hansenologia. 2ed. Bauru: Centro de Estudos "Dr Reynaldo Quagliato". Instituto Lauro de Souza Lima, 2000. p. 27-42.
- 14 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 4ª edição, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000.
- 15 Roy S, MC Guire W, Mascie-Taylor CG. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *Journal of Infections and Diseases* 176:530-2,1997.
- 16 Ottenhoff THM. Immunology of leprosy. New developments. *Tropical and geographical medicine* 46(2):72-80,1994.
- 17 Petzel-Erler ML. Genetics of the immune response and disease susceptibility. *Cienc Cult (São Paulo)* 1999; 51: 199-211.
- 18 Strachan T. Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *Br Med Bull* 1987; 43(1):1-14.
- 19 Izumi S, Sugiyama K, Matsumoto Y, Ohkawa S. Analysis of the immunogenetic background of Japanese leprosy patients by the HLA system. *Vox sang* 42(5): 243-247, 1982.
- 20 Marcos EVC, Souza FC, Ura S, Opromolla DVA. Estudo de associação entre antígenos HLA e reação hansênica tipo 1 ulcerada. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 75(3): 283-290, 2000.
- 21 Ottenhoff THM, Gonzalez NM, De Vries RR, Convit J, Van Rood JJ. Association of HLA specificity LB-E12 (MB1, DC1, MT1) with lepromatous leprosy in a Venezuelan population. *Tissue antigens* 24 (1): 25-29,1984.
- 22 Van Eden W, de Vries RR, D'Amaro J, Schreuder I, Leiker DL, Van Rood JJ. HLA-DR associated genetic control of the type of leprosy in a population from Surinam. *Human immunology* 4(4):343-50,1982.
- 23 Van Eden W, Mehra NK, Vaidya MC, D'Amarco J, Schreuder GMTh, Van Rood JJ. HLA and sporadic tuberculoid leprosy: a population study in Maharashtra, India. *Tissue antigens* 18(3): 189-94,1981.
- 24 Visentainer JEL, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzel-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Brazilian journal of medical and biological research* 30(1): 51-9, 1997.
- 25 Souza FC, Marcos EVC, Ura S, Opromolla PA, Nogueira MES. Estudo comparativo entre reação de Mitsuda e antígenos leucocitários humanos em pacientes hansenianos. *Rev Soc Bras Med Trop* 40 (2):188-191, 2007.
- 26 Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop B, Dupont H, Erlich HA, et. Al. Nomenclature for the factors of HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 75, 291-455, 2010.
- 27 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**. *Nucleic acids res* 16:1215, 1988.
- 28 Excoffier L, Laval G, Schneider S: Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005, 1:47-50.
- 29 Allele * Frequencies in Worldwide Populations. Disponível em: <http://www.allelefreqencies.net/default.asp>. Acesso em 16 de setembro de 2009.