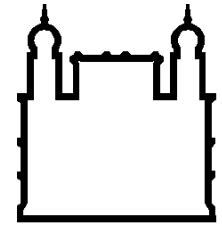




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS DO BACILO
Mycobacterium tuberculosis CANDIDATOS A UMA NOVA VACINA
CONTRA TUBERCULOSE**

ALICE SARNO MARTINS DOS SANTOS

Salvador-Bahia

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS DO BACILO
Mycobacterium tuberculosis **CANDIDATOS A UMA NOVA VACINA**
CONTRA TUBERCULOSE

ALICE SARNO MARTINS DOS SANTOS

Orientadora: Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau de
Mestre.

Salvador-Bahia

2017


**"IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS DE PROTEINAS DO BACILO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
CANDIDATOS A UMA NOVA VACINA CONTRA TUBERCULOSE"**

ALICE SARNO MARTINS DOS SANTOS


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 15 de janeiro de 2018


COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Artur Trancoso Lopo de Queiroz
Pesquisador
IGM



Dr. Pablo Ivan Pereira Ramos
Pesquisador
IGM



Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa
Pesquisadora
IGM

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Theolis Barbosa, pela confiança, auxílio e incentivo, durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Dr. Maurício Cardeal e Dra. Aline Cristina Miranda, pelas colaborações imprescindíveis para realização da revisão sistemática, metanálise e predição dos epítomos.

À MSc. Cleidiane Borges pela contribuição fundamental ao trabalho.

Aos professores e colegas do PgPAT, pelo entusiasmo na troca de conhecimento e experiências.

À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do Instituto Gonçalo Moniz.

Aos colegas e amigos de Fiocruz, em especial ao Grupo TB, por toda a ajuda, companheirismo e amizade tão importantes nessa jornada.

À minha família e amigos, pontos de partida e chegada, pelo amor, carinho e apoio incondicionais.

A todos que, de alguma forma, participaram deste momento.

SANTOS, Alice Sarno Martins dos. Identificação de epítomos de proteínas do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* candidatos a uma nova vacina contra tuberculose. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tuberculose é uma das principais causas de morte, por doenças infecciosas, no mundo, apesar da vacina atualmente disponível, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), ter ampla cobertura. Novas estratégias contra a tuberculose vêm sendo propostas, portanto, mas até o momento nenhum dos novos candidatos vacinais foi capaz de aumentar a proteção conferida pela vacina BCG. Em Salvador, nosso grupo pôde demonstrar a heterogeneidade na resposta imune, após a revacinação, potencialmente associada à eficácia moderada da vacina, nesta cidade. Foram ainda identificados um grupo de voluntários que apresentaram aumento expressivo (de pelo menos 3.3 vezes) na produção *in vitro* de interferon-gama (IFN- γ), citocina-chave para a resposta do hospedeiro contra o *Mycobacterium tuberculosis*, após a revacinação com BCG. Estes voluntários também reconheceram proteínas do *M. tuberculosis*, que não foram reconhecidas pelos demais grupos do estudo. Estas proteínas constituem candidatos a serem avaliados quanto à capacidade de produzirem uma resposta protetora contra a tuberculose. **OBJETIVO:** Neste sentido, buscamos avaliar que epítomos das mesmas poderiam estimular uma resposta de linfócitos T CD4⁺ nas populações humanas mais afetadas pela doença. Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (BRICS) respondem por mais de metade dos casos de tuberculose no mundo. **MATERIAL E MÉTODOS:** Realizamos uma revisão sistemática da literatura, seguida de metanálise, para obtenção das frequências alélicas do gene HLA-DRB1 – envolvido diretamente na apresentação de antígenos do *M. tuberculosis* a linfócitos T CD4⁺ nas populações do BRICS. Em seguida, foram preditos epítomos das proteínas do *M. tuberculosis*, de acordo com a afinidade de ligação de cada um deles aos alelos mais frequentes, nos países estudados. **RESULTADOS:** Foram acessados 1734 artigos, durante a revisão sistemática, e incluídos 57 artigos, na metanálise, de todos os países. Os alelos HLA-DRB1*04, *07, *11, *13 e *15 estiveram entre os mais frequentes nas cinco populações. Identificamos 32 subtipos alélicos mais frequentes, para os quais foram preditos 21 peptídeos. Estes resultados foram submetidos a análise interna de viabilidade patentária pela Fundação Oswaldo Cruz. **CONCLUSÃO:** Proteínas do bacilo *M. tuberculosis* apresentam, em suas sequências, 5 ou 6 regiões peptídicas com alta afinidade de ligação para os subtipos alélicos mais frequentes do gene HLA-DRB1, com cobertura de cerca de 80% das populações de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul.

Palavras-chave: Tuberculose, Epítomos HLA-DRB1, Vacina.

SANTOS, Alice Sarno Martins dos. A. Identification of epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* proteins candidates for a new vaccine against tuberculosis. Dissertation (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis is one of the leading causes of death due to infectious diseases in the world, despite the currently available vaccine, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), have wide coverage. New strategies against tuberculosis have therefore been proposed, but so far none of the new vaccine candidates have been able to increase the protection conferred by the BCG vaccine. In Salvador, our group was able to demonstrate the heterogeneity in the immune response after revaccination, potentially associated with the moderate efficacy of the vaccine in this city. We also identified a group of volunteers who presented an expressive increase (at least 3.3-fold) in the *in vitro* production of interferon-gamma (IFN- γ), a key cytokine for host response against *Mycobacterium tuberculosis* after BCG revaccination. These volunteers also recognized *M. tuberculosis* proteins, which were not recognized by the other study groups. These proteins are candidates for evaluation of their ability to produce a protective response against tuberculosis. **AIM:** Thereby we tried to evaluate which epitopes could stimulate a CD4⁺ T lymphocytes response in the human populations most affected by the disease. Brazil, Russia, India, China and South Africa (BRICS) account for more than half of all tuberculosis cases in the world. **MATERIALS AND METHODS:** We performed a systematic review of the literature, followed by meta-analysis, to obtain the allelic frequencies of the HLA-DRB1 gene - directly involved in the presentation of antigens of *M. tuberculosis* to CD4⁺ T lymphocytes in the BRICS populations. Next, epitopes of *M. tuberculosis* proteins were predicted, according to the binding affinity of each of them to the most frequent alleles in the studied countries. **RESULTS:** A total of 1734 articles were accessed during the systematic review, and 57 articles were included in the meta-analysis. The HLA-DRB1 * 04, * 07, * 11, * 13 and * 15 alleles were among the most frequent in all five populations. We identified 32 more frequent allelic subtypes, for which 21 peptides were predicted. These results were submitted to an internal feasibility analysis by the Oswaldo Cruz Foundation. **CONCLUSION:** *M. tuberculosis* proteins present in their sequences 5 or 6 peptide regions with high binding affinity for the most common allelic subtypes of the HLA-DRB1 gene, covering about 80% of the populations from Brazil, Russia, India, China and South Africa.

Keywords: Tuberculose, HLA-DRB1 Epitopes, Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa de incidência de tuberculose em 2016.....	15
Figura 2. Representação dos genes e das estruturas proteicas de MHC/HLA classes I e II.....	18
Figura 3. Apresentação de antígenos micobacterianos às células TCD4 ⁺	19
Figura 4. Representação esquemática do estudo.....	24
Figura 5. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (Brasil).....	31
Figura 6. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (Rússia).....	32
Figura 7. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (Índia).....	33
Figura 8. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (China).....	34
Figura 9. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (África do Sul).....	35
Figura 10. Pontuação dos artigos selecionados para metanálise.....	38
Figura 11. Distribuição geográfica dos artigos de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, selecionados para metanálise.....	39
Figura 12. Interface da ferramenta <i>online</i> IEDB para predição de epítomos (definição de parâmetros).....	43
Figura 13. Interface da ferramenta <i>online</i> IEDB para predição de epítomos (resultados).....	43
Figura suplementar 1. <i>Funnel plots</i> dos artigos selecionados para a metanálise, no Brasil, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	62
Figura suplementar 2. <i>Funnel plots</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na Rússia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	67
Figura suplementar 3. <i>Funnel plots</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na Índia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	72
Figura suplementar 4. <i>Funnel plots</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na China, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	77
Figura suplementar 5. <i>Funnel plots</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na África do Sul, para os alelos HLA-DRB1 utilizados.....	82
Figura suplementar 6. <i>Forest plot</i> dos artigos selecionados para a metanálise, no Brasil, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	87
Figura suplementar 7. <i>Forest plot</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na Rússia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	92
Figura suplementar 8. <i>Forest plot</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na Índia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	95

Figura suplementar 9. <i>Forest plot</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na China, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	98
Figura suplementar 10. <i>Forest plot</i> dos artigos selecionados para a metanálise, na África do Sul, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Novos candidatos vacinais contra tuberculose em ensaio clínico.....	17
Tabela 2. Artigos selecionados de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, após revisão sistemática de literatura.....	36
Tabela 3. Frequência média dos alelos HLA-DRB1 de voluntários saudáveis recrutados em estudos realizados no BRICS.....	41
Tabela 4. Epítomos das proteínas 1 a 4 preditos como adequados aos subtipos alélicos do gene HLA-DRB1 mais frequentes.....	44
Tabela suplementar 1. <i>Percentile rank</i> da predição de epítomos aos subtipos alélicos HLA-DRB1*01 a *04 do mais frequentes.....	106
Tabela suplementar 2. <i>Percentile rank</i> da predição de epítomos aos subtipos alélicos HLA-DRB1*07 a *15 do mais frequentes.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CCL2	Proteína quimioatraente de monócitos-1
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
KIR	Receptores Semelhantes às Imunoglobulinas de Células NK
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MTb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NIAID	<i>Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
TB	Tuberculose
TNF	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE URL

Projeto R

www.R-project.org

Allele Frequencies

www.allelefreqencies.net

IEDB

www.iedb.org

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	TUBERCULOSE: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGIA	14
1.2	BCG E NOVOS CANDIDATOS VACINAIS.....	15
1.3	ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) E VACINA <i>IMMUNOSENSE</i>	17
2	JUSTIFICATIVA	22
3	HIPÓTESE	22
4	OBJETIVOS	23
4.1	OBJETIVO GERAL	23
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5	DESENHO EXPERIMENTAL	24
6	MATERIAIS E MÉTODOS	25
6.1	TIPO DE ESTUDO	25
6.2	REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA	25
6.2.1	Estratégia de busca	25
6.2.2	Critérios de inclusão	25
6.2.3	Critérios de exclusão	25
6.2.4	Avaliação da qualidade metodológica.....	26
6.3	METANÁLISE	26
6.3.1	Cálculo do peso relativo (<i>relative weight</i>).....	26
6.3.2	Avaliação da heterogeneidade	26
6.4	PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES	27
6.4.1	Identificação de subtipos alélicos do gene HLA-DRB1.....	27
6.4.2	Busca por seqüências de epítomos lineares	28
6.4.3	Predição de epítomos lineares.....	28
7	RESULTADOS	30
7.1	REVISÃO SITEMÁTICA DE LITERATURA.....	30
7.1.1	SELEÇÃO DE ARTIGOS.....	30
7.1.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ARTIGOS SELECIONADOS	37
7.2	METANÁLISE.....	40
7.3	PREDIÇÃO DE EPÍTPOS LINEARES	42
7.3.1	Seleção de Subtipos Alélicos de HLA-DRB1	42
7.3.2	Predição de epítomos lineares.....	42

8	DISCUSSÃO	46
9	CONCLUSÕES	50
10	REFERÊNCIAS	51
11	APÊNDICES	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa cujo agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), alcança os alvéolos pulmonares pela inalação de gotas de saliva provenientes de tosse, espirro ou fala de indivíduos infectados (LONG; SCHWARTZMAN, 2014; DANNENBERG, 1991). Os principais sinais e sintomas causados pela tuberculose pulmonar são: tosse persistente, febre, perda de apetite e peso, fadiga e hiperidrose noturna. Apenas 10% dos indivíduos infectados, entretanto, apresentam tais sintomas, sendo 5% destes nos primeiros dois anos após a infecção. Os 90% restantes progridem para a forma latente da doença e, apesar de reservatórios naturais do patógeno, não apresentam sintomas clínicos, alterações radiológicas ou evidências microbiológicas (DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2016; FRIEDEN et al., 2003). Uma pequena porcentagem dos casos latentes pode sofrer reativação e disseminação dos bacilos, assim sendo capazes de infectar outros indivíduos (NUNES-ALVES et al., 2014).

A TB está entre as 10 principais causas de morte, no mundo, e é a principal doença infecciosa causada por um único patógeno, acometendo principalmente adultos entre 15 e 59 anos (90% dos casos). Os homens são mais afetados que as mulheres, em uma proporção de 1,7:1 (WHO, 2017; LONG; SCHWARTZMAN, 2014). Segundo estimativas, em 2016, foram 10,4 milhões de novos casos e 1,4 milhão de mortes, sendo 400 mil casos de coinfeção em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS-HIV), mostrando que a tuberculose é também a causa mais comum de morte entre estes indivíduos (MARCY et al., 2014; LAUREILLARD et al., 2013; PEAN et al., 2012; GODREUIL et al., 2007).

Apesar de metade das mortes causadas por TB registradas historicamente terem ocorrido na América do Norte e Europa, atualmente os países emergentes Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, integrantes do bloco econômico BRICS, apresentam mais casos de tuberculose que qualquer outro país de suas respectivas regiões. Esses países contabilizam cerca de 50% de todos os casos de tuberculose, no mundo, e 38% de toda mortalidade associada à doença. Em especial, Índia e África do Sul apresentam as maiores incidências, sendo o último com mais de 300 casos a cada 100.000 habitantes (Figura 1) (WHO, 2017).

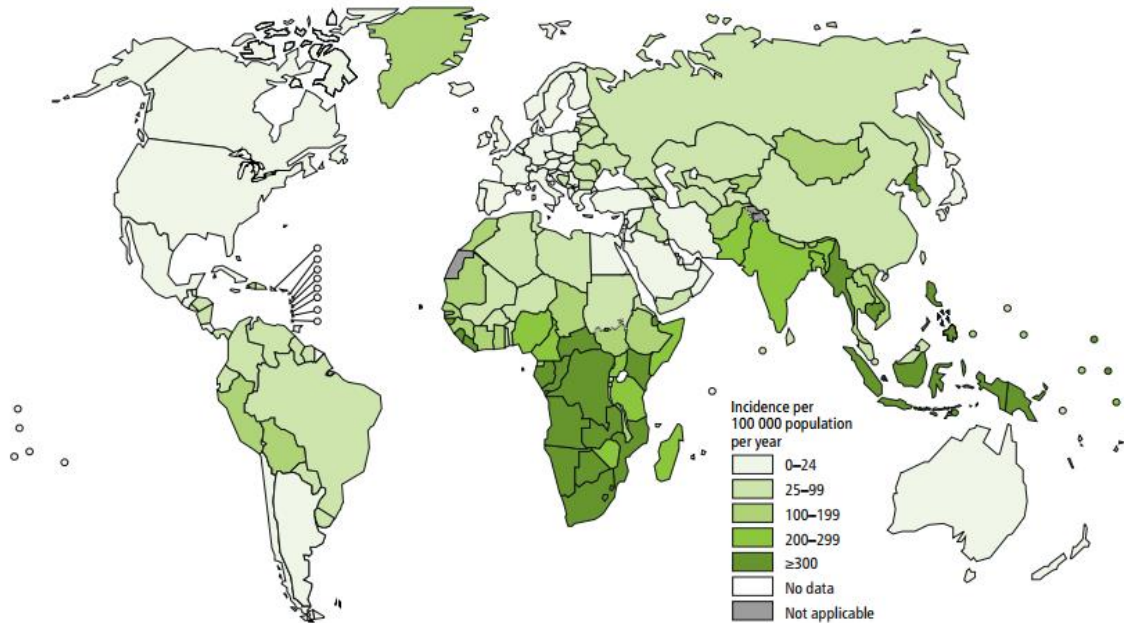


Figura 1. Estimativa de incidência de tuberculose em 2016 (WHO, 2017).

O Brasil é o único país da América Latina, na lista de 30 países responsáveis por 87% dos novos casos de TB, no mundo. Entre 2005 e 2014, foram estimados cerca de 73 mil casos novos por ano (WHO, 2017), com maior incidência na região Norte, seguida pelas regiões Sudeste e Nordeste (BRASIL, 2017). Em 2016, foram diagnosticados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento. Os dados apontam uma redução da incidência na sequência histórica, porém o país está longe de atingir a meta de <math><10</math> casos por 100 mil habitantes preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Para atingir esta redução, em todo o mundo, a OMS lançou o programa *End TB*, objetivando o fim da epidemia da doença até 2035. Para isso, a OMS aponta a necessidade de novas iniciativas em saúde, alicerçadas sobre três pilares principais que incluem políticas de tratamento, prevenção e estímulo a pesquisa e inovação. Dentre essas iniciativas, além das ações já disponíveis, estão os estudos e desenvolvimento de novos candidatos vacinais que permitam melhor prevenção contra a tuberculose (WHO, 2016).

1.2 BCG E NOVOS CANDIDATOS VACINAIS

A vacina atualmente disponível contra a tuberculose, a *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), composta pela cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, é indicada pela OMS a recém-nascidos, em todos os países com alta prevalência de tuberculose (WHO, 2017). No Brasil, por exemplo, a cobertura vacinal é de 100% (QUEIROZ et al., 2013), sendo a BCG incluída no calendário

básico de imunizações, com a primeira dose administrada até as três primeiras semanas de vida (BRASIL, 2017).

Mesmo com ampla cobertura vacinal, a eficácia da BCG apresenta grande variabilidade, de acordo com a idade e as formas clínicas da tuberculose. A vacina se mostra eficaz em crianças, com quadro de meningite tuberculosa e tuberculose miliar (60-80%), mas pode variar de 80% a zero – sem alteração clínica significativa – em casos de tuberculose pulmonar (MANGTANI et al., 2014), dificultando o controle da doença (KAUFMANN; HUSSEY; LAMBERT, 2010; TRUNZ; FINE; DYE, 2006). Apesar disso, metanálises mostram que a BCG é capaz de proteger contra a infecção, pelo MTb, quando comparadas crianças vacinadas e não-vacinadas, bem como protege contra a conversão da infecção em doença (CASEY, 2016; ROY et al., 2014). Em Salvador, por exemplo, mesmo com a cobertura é próxima de 100%, a eficácia da vacina é estimada em 52% (BARRETO et al., 2005).

A BCG estimula o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, com elevada produção de Interferon (IFN)- γ , associada a uma resposta pró-inflamatória com proliferação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), nas populações em que sua eficácia é maior. Em indivíduos do Reino Unido, por exemplo, onde a eficácia da vacina é superior a 80%, observa-se alta produção de citocinas do perfil Th1, principalmente IFN- γ e TNF (Fator de Necrose Tumoral) até um ano após a vacinação. Já no Malawi, população em que a vacina não possui eficácia, os indivíduos avaliados apresentam resposta pró-inflamatória de perfil misto (LALOR et al., 2011). Apesar destes achados, ainda não se sabe ao certo quais componentes da resposta estão associados à proteção (EVANS et al., 2013).

Novos candidatos a vacinas contra a TB vêm sendo propostos, com o intuito de prevenir a doença ativa e sua transmissão, frequentemente utilizando estratégias profiláticas que deverão manter a BCG como primo-vacinação (BESSA et al., 2017). Desta forma, minimiza-se o risco de se oferecer aos indivíduos vacinados uma proteção inferior àquela já conferida pela BCG (OTTENHOFF; KAUFMANN, 2012).

De forma geral, estes novos candidatos vacinais têm como alvo recém-nascidos e crianças, quando administrados antes da infecção, e adolescentes e adultos com a forma latente da TB, quando administrados após a infecção. Além destes modelos profiláticos, também vêm sendo estudados candidatos para casos de pacientes com TB ativa, extensivamente multidroga resistente ou totalmente multidroga resistente, como forma terapêutica (Tabela 1) (BESSA et al., 2017).

Tabela 1. Novos candidatos vacinais contra tuberculose em ensaio clínico (BESSA et al., 2017).

Candidate	Type	Sponsors/partners	Phase
Ad5 Ag85A	Viral vector	McMaster University (Canada); CanSino (China)	I
ID93 + GLA-SE	Adjuvanted subunit	<i>Infectious Disease Research Institute—IDRI</i> (USA); <i>Aeras</i> (USA)	I
Crucell Ad35/MVA85A	Viral vector	Crucell Holland B.V (Netherlands); University of Oxford (UK); <i>Aeras</i> (USA)	I
Dar-901	<i>M. obuense</i> whole cell	Dartmouth-Hitchcock Medical Center (USA); <i>Aeras</i> (USA)	I
TB/FLU-04L	Viral vector	Research Institute for Biological Safety Problems-RIBSP (Kazakhstan)	I
MVA85A	Viral vector	Oxford University (UK)	I
ChAdOx1-85A/MVA85A	Viral vectors	Oxford University (UK)	I
MVA85A-IMX313	Viral vector	Oxford University (UK); Imaxio (France)	I
MTBVAC	Live genetically attenuated MTB	<i>Tuberculosis Vaccine Institute—TBVI</i> (Netherlands); University of Zaragoza (Spain); Biofabri (Spain)	IIa
VPM 1002	Live rBCG	Max Planck Institute; Vakzine Projekt Management GmbH (Germany); <i>TBVI</i> (Netherlands); Serum Institute of India (India)	IIa
H1(Ag85B/ESAT) + IC31	Adjuvanted subunit	Statens Serum Institute—SSI (Denmark); <i>TBVI</i> (Netherlands); Valneva SE (France)	IIa
RUTI (Tb lysate)	Fragmented MTB	Archivel Farma (Spain)	IIa
H4(Ag85B/TB10.4) + IC31	Adjuvanted subunit	Statens Serum Institute—SSI (Denmark); Sanofi-Pasteur (France); <i>Aeras</i> (USA); Valneva SE (France)	IIa
H56(Ag85B/ESAT-6/Rv2660) + IC31	Adjuvanted subunit	Statens Serum Institute—SSI (Denmark); <i>Aeras</i> (USA); Valneva SE (France)	IIa
M72 + AS01E	Adjuvanted subunit	GSK (UK); <i>Aeras</i> (USA)	IIb
<i>M. vaccae</i>	<i>M. vaccae</i> whole cell	Anhui Zhifei Longcom Biologic Pharmacy Co. Ltd. (China)	III

1.3 ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) E VACINA *IMMUNOSENSE*

A imunopatogênese da tuberculose inicia-se após inalação de gotículas contendo bacilos de *M. tuberculosis*. Ao alcançarem os alvéolos pulmonares, o patógeno é englobado por macrófagos, que se aderem ao epitélio alveolar. A passagem dos bacilos para o interstício promove o influxo de células inflamatórias da corrente sanguínea e do parênquima pulmonar (ORME, 2014). Com o estabelecimento da infecção, células dendríticas e macrófagos

circulantes, após internalizarem os bacilos, migram para os linfonodos do pulmão, por ação da quimiocina CCL2 (CAMBIER et al., 2014, REILEY et al., 2008).

Os antígenos bacterianos são, então, apresentados aos linfócitos T $CD4^+$ no contexto de moléculas do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) de classe II, em específico HLA-DRB1, também denominadas de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (Figura 2). Estas proteínas são codificadas por um conjunto de genes altamente polimórficos, localizado no braço curto do cromossomo 6, e expressas na membrana de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) (MATZARAKI et al., 2017). A apresentação dos antígenos, aos linfócitos, permite a consequente ativação e proliferação dessas células. A partir desta exposição, há recrutamento e aumento no número de linfócitos antígeno-específicos e diferenciação dos mesmos, para a produção de citocinas do tipo Th1, que amplificam a ação bactericida dos macrófagos infectados (Figura 3) (ORME; ROBINSON; COOPER, 2015; KOBAYASHI; VAN DEN ELSEN, 2012).

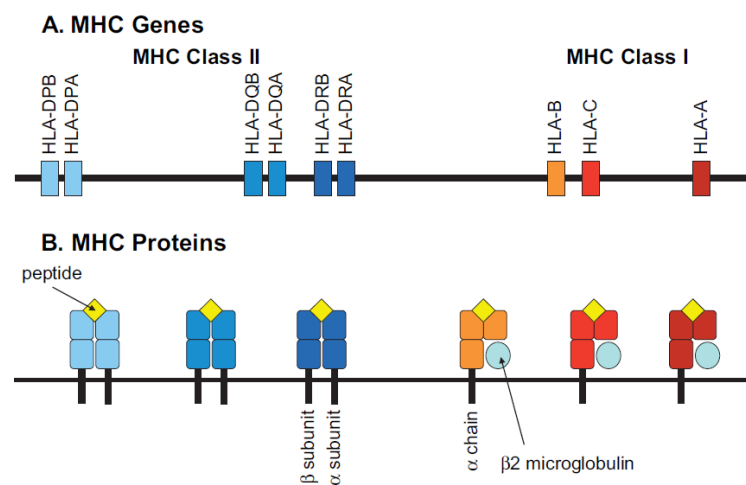


Figura 2. Representação dos genes e das estruturas proteicas de MHC/HLA classes I e II. Os genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6, divididos em classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e classe II (HLA-DPA, HLA-DPB, HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DRA e HLA-DRB). As proteínas do HLA classe I, reconhecidas por receptores de linfócitos T $CD8^+$, são compostas por uma cadeia α polimórfica e uma cadeia β_2 não-polimórfica. As proteínas do HLA classe II, reconhecidas por receptores de linfócitos T $CD4^+$, são compostas por uma cadeia α polimórfica e uma cadeia β polimórfica. HLA Antígeno Leucocitário Humano. MHC Complexo de Histocompatibilidade (CATCHPOLE et al., 2008).

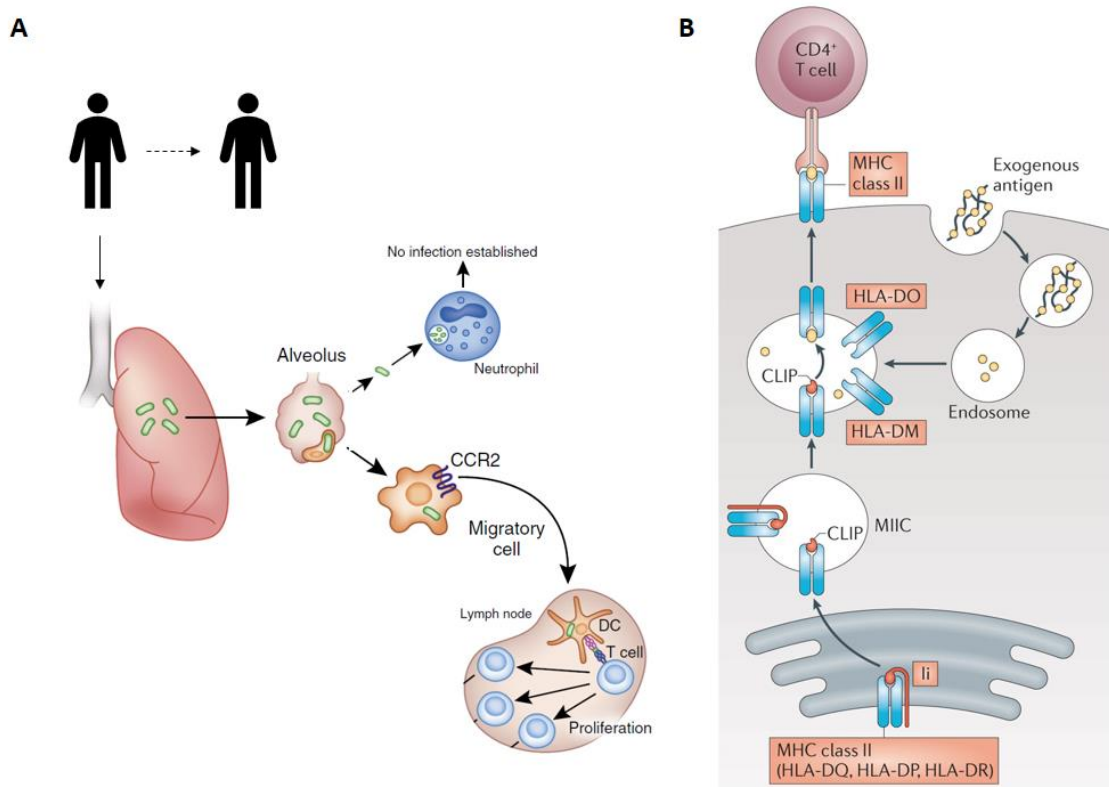


Figura 3. Apresentação de antígenos micobacterianos às células TCD4⁺. **A.** A infecção é iniciada pela inalação de aerossóis contendo a micobactéria. Um número alto de neutrófilos, na corrente sanguínea, já foi relacionado com menor possibilidade de sucesso da infecção. Se a infecção for estabelecida, no alvéolo pulmonar, inicia-se uma resposta imune celular inata, com migração de células inflamatórias para os linfonodos, por ação da quimiocina CCL2 (ORME; ROBINSON; COOPER, 2015 - adaptada). **B.** Antígenos micobacterianos endocitados, pelas células inflamatórias, são processados, por enzimas lisossômicas, em peptídeos. Estes peptídeos se ligam ao HLA de classe II (MIIC) substituindo a cadeia peptídica invariante associada à proteína (CLIP), derivada da cadeia invariante (Ii), em processo regulado pelas proteínas HLA-DO e HLA-DM (KOBAYASHI; VAN DEN ELSEN, 2012 - adaptada).

Uma vez que os linfócitos T CD4⁺ reconhecem o *M. tuberculosis*, a partir da apresentação de peptídeos antigênicos, novos candidatos vacinais contra a tuberculose podem ser estudados no sentido de identificar regiões proteicas altamente conservadas e imunogênicas (epítomos), capazes de interagir com domínios específicos das moléculas de HLA-DRB1 do hospedeiro (O'SHEA; MCSHANE, 2016). Esta estratégia vacinal, denominada *immunosense*, é uma alternativa promissora de imunização, quando comparada às vacinas tradicionais constituídas de proteínas inteiras, já que pode conferir melhor proteção contra patógenos de alta variabilidade genética (ZHAO et al., 2013).

Esse modelo vacinal já é estudado para outras doenças infectocontagiosas, como a toxoplasmose. Nesses casos, os estudos buscam identificar sequências de 15 a 25 aminoácidos de proteínas do *Toxoplasma gondii* capazes de se ligar, com alta afinidade, aos domínios das proteínas HLA de interesse e, assim, estimular resposta de linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) e produção de IFN- γ (EL BISSATI et al., 2016; CONG et al., 2011). As vacinas

immunosense também são estudadas para estimulação de linfócitos B (AHMAD; EWEIDA; SHEWEITA, 2016) e para ação profilática ou terapêutica em alguns tipos de câncer (KUMAI et al., 2017).

A afinidade de ligação entre o epítipo imunogênico e o domínio de HLA é pré-requisito fundamental para predição e construção de uma vacina *immunosense*. Tal afinidade é variável de acordo com a diversidade alélica do gene, traço muito comum ao *locus* HLA, que inclui mais de 17.000 alelos de classes I e II (ROBINSON et al., 2015). O alto número de polimorfismos limitam, entretanto, a utilização de técnicas experimentais para determinação das melhores ligações epítipo-HLA. Por isso, foram desenvolvidos métodos capazes de identificar padrões nas afinidades de ligação, a partir de resultados determinados experimentalmente e, posteriormente, expandí-los às novas combinações epítipo-HLA, por *machine learning* (FLERI et al., 2017; BACKERT; KOHLBACHER, 2015). Além da identificação de novos candidatos vacinais, esses antígenos potencialmente imunogênicos também são utilizados, para a tuberculose, no melhor entendimento da imunopatogênese e no desenvolvimento de testes imunodiagnósticos (IVANYI, 2014).

A concepção de uma vacina *immunosense* contra a tuberculose deve ser entendida no sentido de identificar epítopos proteicos promíscuos, capazes de interagir, com alta afinidade de ligação e forte antigenicidade, aos alelos HLA mais relevantes à patogênese da doença (GASEITSIWE et al., 2010). Neste sentido, o HLA-DRB1 é um dos alelos mais estudados, por conta de seu papel fundamental na resposta imune, além de apresentar maior variabilidade genética que todos os outros tipos de HLA de classe II, com mais de 2.000 alelos já descritos (ROBINSON et al., 2015). Apesar de muitos epítopos de *M. tuberculosis* já terem sido descritos quanto seu papel na estimulação de células T CD4⁺, a maioria dos artigos foram realizados em populações pouco representativas. Faz-se necessário, portanto, estudos com candidatos mais abrangentes, em populações onde a incidência da tuberculose é alta (LIU et al., 2016).

Em estudo realizado previamente pelo grupo, em Salvador, foram coletadas amostras de sangue periférico, de crianças em idade escolar (7 a 15 anos), com o objetivo de avaliar a eficácia da administração de uma segunda dose de BCG. A estimulação das células sanguíneas com antígenos micobacterianos (derivado proteico purificado de micobactérias, PPD) permitiu, então, observar padrões de resposta distintos desses indivíduos. Enquanto parte das crianças apresentaram nenhum aumento ou aumento não-significativo dos níveis de IFN- γ , um terceiro grupo apresentou, por sua vez, aumento de até 3,3 vezes, na produção desta citocina, sendo assim chamados de alto respondedores (BARBOSA et al., 2003).

Este grupo de alto respondedores também se mostraram capazes de manter tal resposta, dois meses e um ano após a revacinação, assim como também apresentaram expansão mais pronunciada de linfócitos T produtores de IFN- γ , quando comparados aos demais grupos (OLIVEIRA; MARINHO; BARBOSA, 2013). Esses resultados, apesar de não indicarem vantagens na revacinação, corroboram com as diferenças já observadas, na literatura, quanto ao padrão de resposta estimulado pela BCG, onde apenas parte dos indivíduos é capaz de desenvolver resposta Th1 duradoura, associada à maior eficácia da vacina. Esta heterogeneidade no perfil de resposta à revacinação não foi associada à variabilidade genética, entre os grupos (CONCEIÇÃO, 2013), apesar de o aumento da produção de IFN- γ já ter sido associado a polimorfismos no *locus* IFNG +874 (TIAN et al., 2011; VALLINOTO et al., 2010).

Ao comparar, por *western-blot* bidimensional, o perfil imunoproteômico da resposta humoral (IgG-específico), dos três grupos de estudo, foi observado que os soros dos alto respondedores reconhecem diferencialmente proteínas do *M. bovis* (cepa BCG Moreau), similares em *M. tuberculosis*, que não são reconhecidas pelos demais indivíduos (PEREIRA et al, dados não publicados). Os resultados foram observados dois meses, após a revacinação, e perduraram por até um ano.

No presente trabalho, pretendemos aprofundar nossos resultados preliminares para consolidar a busca de epítomos imunogênicos, dessas proteínas de *M. tuberculosis* de reconhecimento heterogêneo, com o intuito de identificar possíveis candidatos vacinais.

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma das doenças infecciosas que mais mata, no mundo, e também é a primeira causa de óbitos entre pacientes com AIDS-HIV. No Brasil, apesar dos avanços já alcançados, políticas públicas ainda vêm sendo empregadas com o intuito de reduzir os números de novos casos da doença. A única vacina disponível atualmente contra a tuberculose é a BCG, indicada a recém-nascidos e populações em risco. Apesar de bem estabelecida, a BCG tem eficácia variáveis (entre 80% à nenhuma alteração clínica observada) de acordo com a idade dos indivíduos e forma da doença. Na tentativa de melhorar o controle da tuberculose a nível mundial, novos candidatos vacinais vêm sendo desenvolvidos, com o objetivo de melhorar a resposta imune do hospedeiro.

Em trabalhos anteriores do grupo, foi identificado um grupo de proteínas do *M. tuberculosis* reconhecido por produtores de altos níveis de IFN- γ , após revacinação com BCG. A diferença de reconhecimento não foi explicada pela variabilidade genética, o que permite aprofundar o estudo dessas proteínas quanto novos candidatos vacinais. Esta resposta diferencial já observada, em humanos, pode significar uma vantagem no estudo dessas proteínas, já que o maior desafio dos candidatos vacinais atualmente estudados é repetir *in vivo* o sucesso observado *in vitro*.

Com o estudo da frequência alélica, em populações distintas, bem como predição e seleção de epítomos imunogênicos, dessas proteínas, é possível delinear o desenvolvimento de uma vacina do tipo *immunosense*. Com os resultados obtidos, pretende-se, então, refinar as análises já realizadas, para notificação interna de invenção, pela Fundação Oswaldo Cruz (parecer SG 053/13 do Sistema VPPLR/GESTEC/NIT).

3. HIPÓTESE

Epítomos de proteínas do *Mycobacterium tuberculosis* altamente imunogênicos podem ser candidatos a uma vacina contra a tuberculose, se suas afinidades de ligação à alelos do HLA-DRB1 forem elevadas para as populações dos BRICS.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar epítomos de proteínas do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* com alta afinidade de ligação aos subtipos alélicos de HLA-DRB1 mais frequentes, nas populações de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, endêmicas para a tuberculose.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Realizar revisão sistemática da literatura de estudos de avaliação da frequência alélica do gene HLA-DRB1, nas populações de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul.

4.2.2 Identificar os alelos de HLA-DRB1 mais frequentes, nas populações de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul.

4.2.3 Realizar a predição de epítomos lineares *in silico*, nas sequências de proteínas do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, capazes de se ligar a moléculas dos alelos de HLA-DRB1 identificados durante a revisão sistemática de literatura e metanálise.

5. DESENHO EXPERIMENTAL

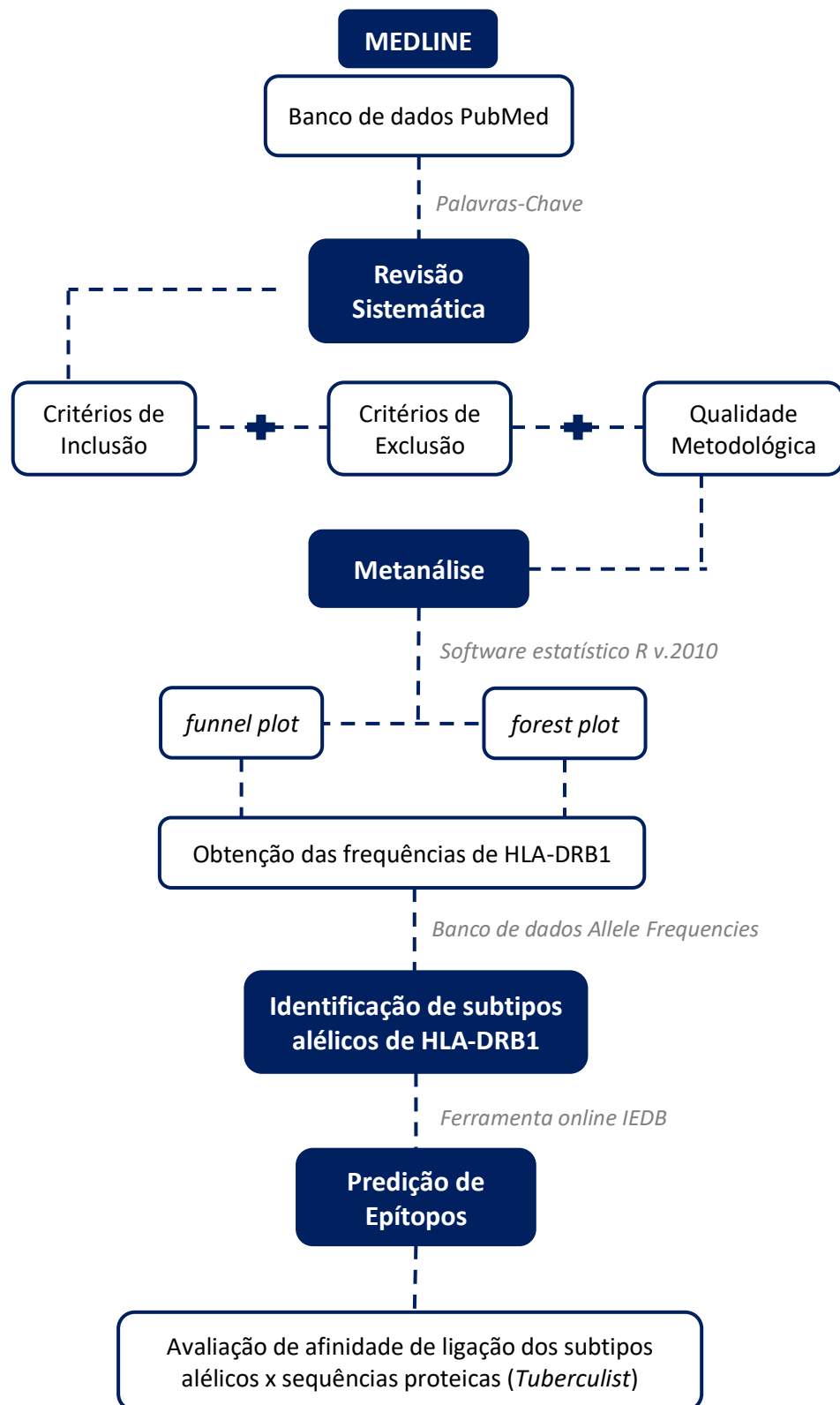


Figura 4. Representação esquemática do estudo.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizada uma revisão sistemática seguida de metanálise, de acordo com os critérios PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) (MOHER et al., 2015).

6.2 REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA

6.2.1 Estratégia de busca

A busca por artigos foi conduzida de forma independente por dois avaliadores, entre os anos de 2013 e 2016. Como estratégia de busca, foram empregadas as palavras-chave “HLA[All fields] AND frequency[All fields] AND Brazil”, “HLA[All fields] AND frequency[All fields] AND Russia”, “HLA[All fields] AND frequency[All fields] AND India”, “HLA[All fields] AND frequency[All fields] AND China” e “HLA[All fields] AND frequency[All fields] AND South Africa”, na base de dados eletrônica PubMed (MEDLINE v2.6), em países endêmicos para tuberculose: Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul.

6.2.2 Critérios de inclusão

Para inclusão dos artigos, foram acessados título e resumo dos resultados de cada palavra-chave, tomando como critérios de inclusão: artigos com resultados da frequência alélica de HLA classe II (exceto revisões de literatura), em português, inglês e espanhol e de acesso gratuito ou disponibilizados pelo Portal de Periódicos Capes.

6.2.3 Critérios de exclusão

Após a leitura completa dos artigos, foram excluídos todos aqueles que apresentaram resultados restritos a pessoas doentes ou infectadas por algum patógeno e análises incompletas para os treze subtipos não homólogos de HLA-DRB1 (HLA-DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15 e *16). Também foram excluídos estudos sobre a frequência alélica de populações muito restritas, como indivíduos da mesma família e/ou membros de tribos, aldeias ou castas com ocorrência de casamentos consanguíneos, além de estudos que informaram apenas as frequências de HLA-DQ e/ou HLA-DP.

6.2.4 Avaliação da qualidade metodológica

A qualidade metodológica dos artigos foi avaliada a partir da Escala de Avaliação *Newcastle-Ottawa* (WELLS, 2011), adaptada para estudos do tipo corte transversal (apêndice 1). De acordo com esta Escala, os estudos avaliados devem atingir pontuação mínima de 4 pontos e máxima de 9 pontos, para serem considerados de qualidade apropriada. A Escala de Avaliação *Newcastle-Ottawa* foi adaptada, para esta metanálise, já que foram coletadas apenas as frequências alélicas dos grupos controles (indivíduos saudáveis) de cada estudo. Pretendeu-se, com isso, evitar um possível viés de seleção, em que os alelos mais frequentes teriam correlação com o tipo de doença estudada nos casos. Os resultados da qualidade metodológica foram obtidos de maneira independente por dois leitores e, em seguida, comparados e validados por consenso.

6.3 METANÁLISE

As análises estatísticas da metanálise foram realizadas utilizando o software estatístico R, v3.3.3 (disponível no endereço www.R-project.org/). As médias da frequência de cada alelo e os intervalos de confiança (IC) de 95% foram calculadas, seguidos do peso relativo (*relative weight*) e heterogeneidade de cada artigo.

6.3.1 Cálculo do peso relativo (*relative weight*)

O peso relativo, de cada artigo, é representado, no *forest plot*, pela área dos quadrados desenhados sobre os intervalos de confiança. Quanto maior a área, maior a relevância do trabalho, para a metanálise, de acordo com o tamanho do n amostral e do n de eventos. Dessa forma, artigos com um maior número de dados têm mais peso no cálculo da média ponderada dos efeitos, que, neste caso, são as frequências dos alelos de HLA-DRB1.

6.3.2 Avaliação da heterogeneidade

O primeiro parâmetro de avaliação da heterogeneidade entre os artigos e presença de viés de publicação foi a inspeção visual do *funnel plot*. Foram avaliados o tamanho e a precisão de cada artigo, com os maiores e mais precisos localizados no topo do gráfico. Quanto menor a heterogeneidade entre os estudos incluídos, na metanálise, mais próximo a um triângulo invertido o *funnel plot* é representado (STERNE et al., 2011).

A partir dos resultados obtidos pelo *forest plot*, a heterogeneidade entre os artigos também foi avaliada pelo Teste Q de Cochran, seguido pela medida de Inconsistência (I^2). A combinação das frequências alélicas obtidas, em cada artigo, foi combinado utilizando os cálculos do efeito fixo e do efeito aleatório. O efeito fixo (*fixed effect*) é um cálculo conservador, que admite que todos os trabalhos medem os mesmos efeitos e utilizam metodologias idênticas de seleção e análise das amostras, diferindo apenas quanto ao resultado final obtido. O efeito aleatório (*random effect*), por sua vez, admite, em seus cálculos, que os artigos apresentam diferenças metodológicas, que apresentam um padrão de distribuição normal.

Nesta metanálise, o valor de I^2 foi utilizado como parâmetro para escolha entre os resultados obtidos pelos efeitos fixo e aleatório. Para $I^2 \leq 50\%$ e $p > 0,05$, foram considerados os valores do efeito fixo. Para $I^2 > 50\%$ e $p < 0,05$, foram considerados os valores do efeito aleatório, que admite uma variação de distribuição normal entre os artigos, de acordo com as diferentes populações estudadas e técnicas utilizadas, por exemplo (HIGGINS et al., 2003). O *forest plot* também foi utilizado para comparação entre as frequências de cada alelo não homólogo do gene HLA-DRB1, por país estudado.

6.4 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES

6.4.1 Identificação de subtipos alélicos do gene HLA-DRB1

De posse das sequências de quatro proteínas do bacilo *M. tuberculosis* – editadas e caracterizadas previamente, pelo grupo, na plataforma *Tuberculist* (v2.6 disponível no endereço <http://svitsrv8.epfl.ch/tuberculist/>) – e da lista dos alelos HLA-DRB1 mais frequentes, obtidas a partir da metanálise, foi feita uma busca *in silico* pelos subtipos específicos de cada alelo HLA-DRB1 selecionado. Essa busca foi realizada através do *Allele Frequencies* (disponível no endereço <http://www.allelefrequencies.net/>), um banco mundial de frequências alélicas.

Essa ferramenta centraliza informações provenientes de artigos publicados, sobre as frequências de diferentes polimorfismos de genes relacionados à resposta imune. Em 2014, já haviam sido coletadas informações de mais de 1400 populações saudáveis, ao redor do mundo, representando pouco mais de 10 milhões de indivíduos. Dentre os polimorfismos armazenados, no *Allele Frequencies*, o gene HLA é o mais relevante, com cerca de 120 mil frequências, seguido das frequências polimórficas dos genes KIR (Receptores Semelhantes às Imunoglobulinas de Células NK), de citocinas e dos genes MHC (GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2015).

6.4.2 Busca por sequências de epítomos lineares

A busca por sequências de epítomos imunogênicos, nas proteínas de *M. tuberculosis*, foi realizada utilizando o banco de dados público IEDB (*Immune Epitope Database*) (disponível no endereço www.iedb.org). Esta ferramenta é uma iniciativa do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) e fornece um catálogo de epítomos, caracterizados experimentalmente, com informações sobre estrutura, origem, afinidade de ligação às moléculas de HLA e capacidade de induzir resposta de células T e B. O IEDB já foi utilizado em mais de 95% dos trabalhos publicados sobre mapeamento de epítomos de agentes infecciosos (VITA et al., 2015).

6.4.3 Predição de epítomos lineares

Para predição de epítomos lineares, o IEDB busca, em toda a sequência da proteína, regiões que possam ter afinidade à molécula HLA de interesse. O resultado do cruzamento dessas informações é a predição de um *score* de afinidade de ligação entre epítopo e alelo. Este *score* baseia-se no valor de IC_{50} , em nanomolar (nM), medido em ensaios experimentais disponíveis na literatura. Nestes ensaios, moléculas purificadas de HLA são primeiro incubadas com peptídeos-controle marcados com fluorescência, para quantificação dos complexos peptídeo-HLA formados, após 48 horas. A partir destes resultados, realiza-se uma nova incubação, incluindo o peptídeo a ser testado, para avaliar a capacidade deste de inibir a ligação peptídeo-controle-HLA. Assim, são obtidos valores de IC_{50} que traduzem a concentração mínima de peptídeos-teste necessária para inibir 50% das ligações entre peptídeos-controle e moléculas de HLA. Portanto, ligações com valor de $IC_{50}(nM) < 50$ são consideradas de alta afinidade (WANG et al., 2008).

A partir do *score* de afinidade de ligação, o IEDB classifica os resultados obtidos em um *percentile rank*. Este valor é obtido pela comparação entre os valores de IC_{50} resultantes de diferentes métodos de predição. No presente trabalho, foi utilizado o método *Consensus*, desenvolvido pela própria plataforma, que combina os resultados de três algoritmos de predição: *NN-align*, *SMM-align* e *Combinatorial Library* ou Sturniolo. Esses valores de IC_{50} são então comparados com as afinidades de ligação de peptídeos aleatórios do banco de proteínas SWISSPROT à mesma molécula de HLA de interesse (WANG et al., 2010).

Para a análise no presente trabalho, os valores de IC_{50} foram exportadas para uma planilha Excel, e os dados foram analisados e ordenados de forma crescente, na tentativa de selecionar os epítomos que preenchiam os seguintes critérios:

- Pertencer a regiões com bons perfis físico-químicos, de acordo com as análises de hidrofobicidade, hidrofilidade, flexibilidade e antigenicidade (definidas previamente);
- Não apresentar sítios de glicosilação (definidos previamente);
- Possuir *score* de ligação (IC_{50}) ≤ 25 nM, de acordo com *cut-off* determinado para o método *Consensus* (PAUL et al., 2015);
- Possuir afinidade de ligação com preferencialmente 80% dos alelos investigados.

7. RESULTADOS

7.1. REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA

7.1.1. Seleção dos artigos

A revisão sistemática foi conduzida, na base de dados eletrônica PubMed (MEDLINE). Durante a etapa de identificação, com busca das palavras-chave determinadas, foram localizados 2655 artigos, dos cinco países selecionados para o estudo. Destes artigos, estavam disponíveis 337 artigos do Brasil, 147 artigos da Rússia, 306 artigos da Índia, 744 artigos da China (após estabelecido um *cut-off* de 50% dos artigos mais recentes) e 200 artigos da África do Sul, totalizando 1734 artigos analisados quanto aos critérios de elegibilidade preconizados para esta revisão.

De acordo com os títulos e resumos de cada artigo, 232 artigos do Brasil, 120 artigos da Rússia, 232 artigos da Índia, 620 artigos da China e 176 artigos da África do Sul não atendiam claramente os critérios de inclusão estabelecidos. Para Brasil, Índia, China e África do Sul, boa parte desses artigos não incluídos não abordavam o tema de interesse da revisão. Os artigos da Rússia, por sua vez, não foram incluídos, em sua maioria, por apresentarem apenas as frequências alélicas de genes HLA de classe I.

Após a etapa de *screening*, foram incluídos 105 artigos do Brasil, 27 artigos da Rússia, 74 artigos da Índia, 124 artigos da China e 24 artigos da África do Sul. Esses artigos foram, então, avaliados em sua íntegra, na etapa de elegibilidade, de acordo com os critérios de exclusão. No total, 297 artigos foram excluídos, sendo 90 do Brasil, 19 da Rússia, 65 da Índia, 105 da China e 18 da África do Sul. Os critérios que levaram à exclusão dos artigos variaram entre os países; os mais comuns foram: estudos realizados em populações restritas ou famílias, estudos sobre um alelo HLA-DRB1 específico e dados insuficientes sobre as frequências alélicas. A frequência alélica do estudo de Favorova e colaboradores (2006) foi obtida a partir de contato direto com o autor, por e-mail.

Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 15 artigos do Brasil, 8 artigos da Rússia, 9 artigos da Índia, 19 artigos da China e 6 artigos da África do Sul, realizados entre os anos de 1997 e 2016, tiveram sua qualidade metodológica avaliada, de acordo com a Escala de Avaliação *Newcastle-Ottawa* (Wells, 2011) adaptada para estudos do tipo corte transversal. Todos os artigos foram considerados de boa qualidade – atingiram entre 4 e 9 pontos, na escala –, sendo, portanto, incluídos na metanálise. O fluxograma para seleção dos artigos está apresentado nas figuras 5-9, de acordo com o país de origem dos estudos.

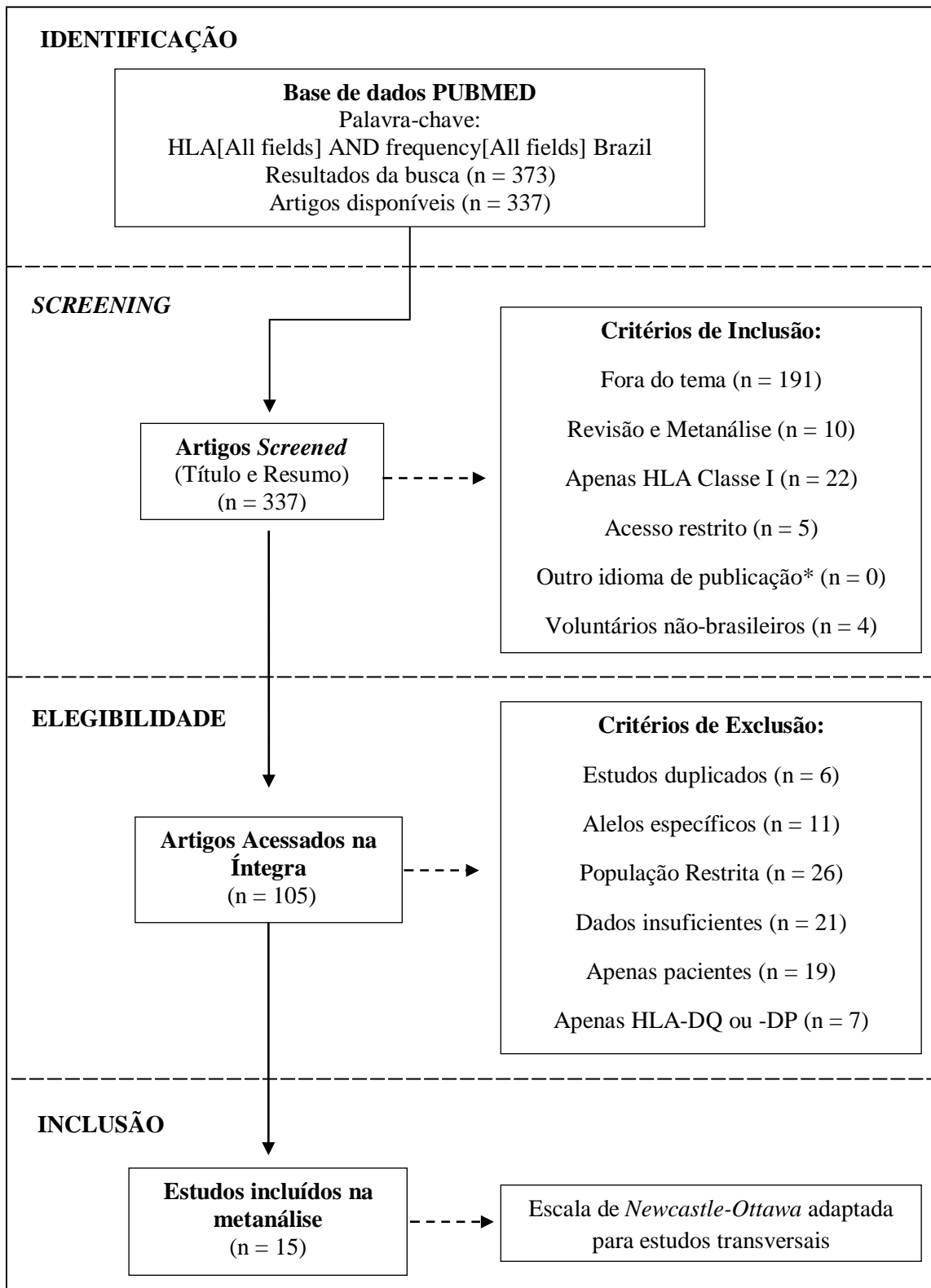


Figura 5. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (Brasil). Representação sistemática dos estudos do Brasil incluídos na revisão sistemática. *Idiomas permitidos de acordo com o critério de inclusão: Português, Inglês e Espanhol.

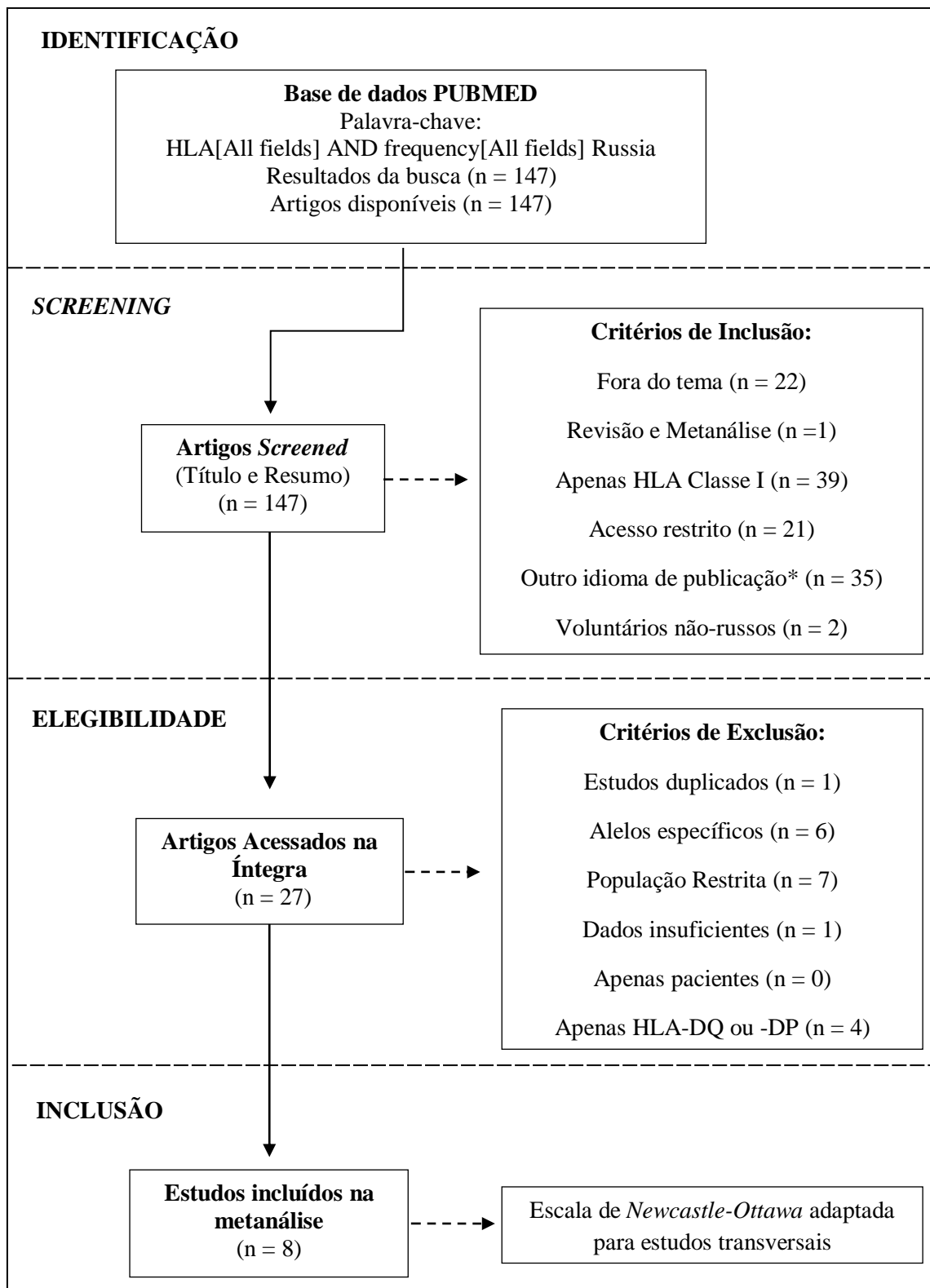


Figura 6. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (Rússia). Representação sistemática dos estudos da Rússia incluídos na revisão sistemática. *Idiomas permitidos de acordo com o critério de inclusão: Português, Inglês e Espanhol.

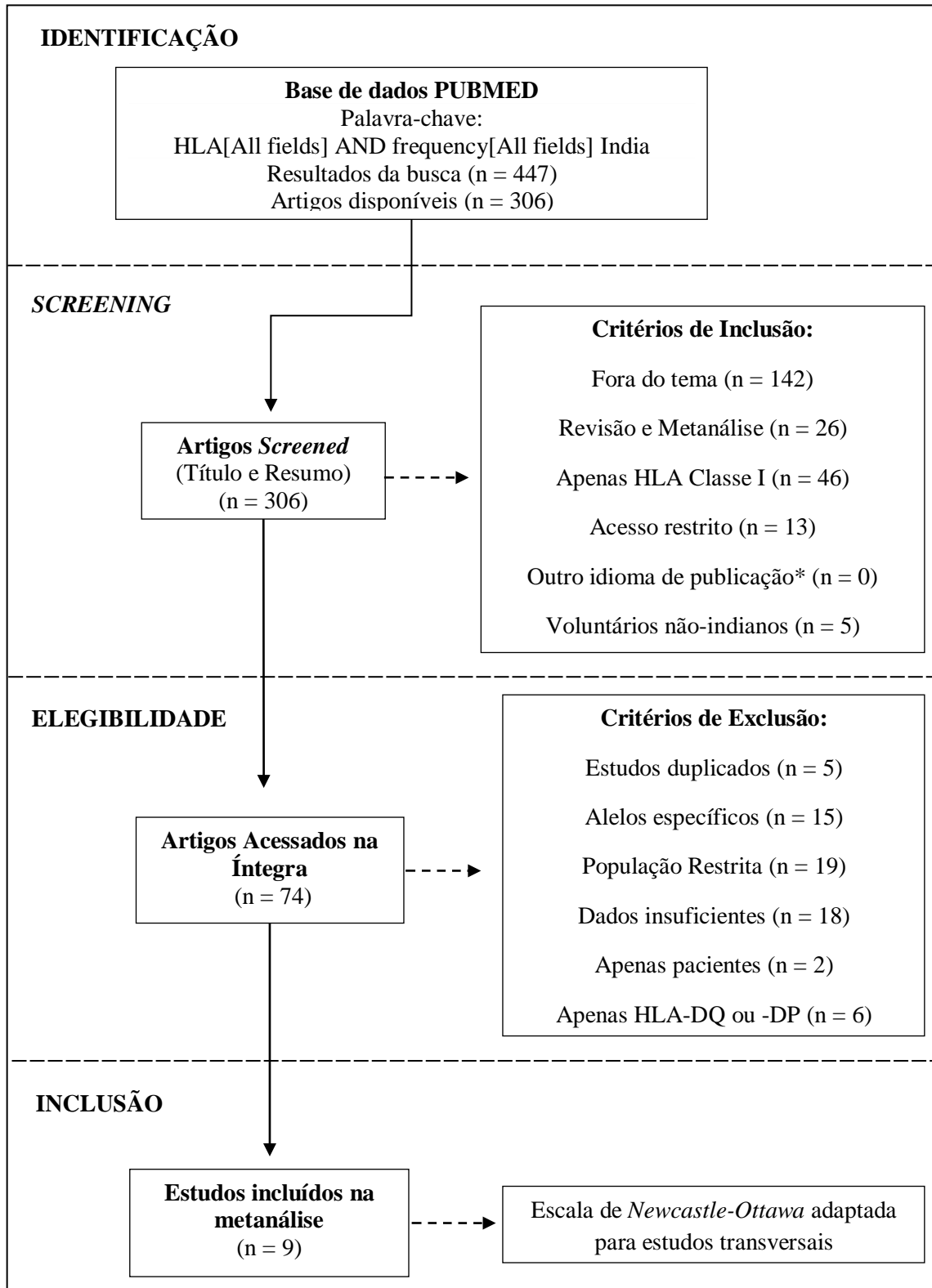


Figura 7. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (Índia). Representação sistemática dos estudos da Índia incluídos na revisão sistemática. *Idiomas permitidos de acordo com o critério de inclusão: Português, Inglês e Espanhol.

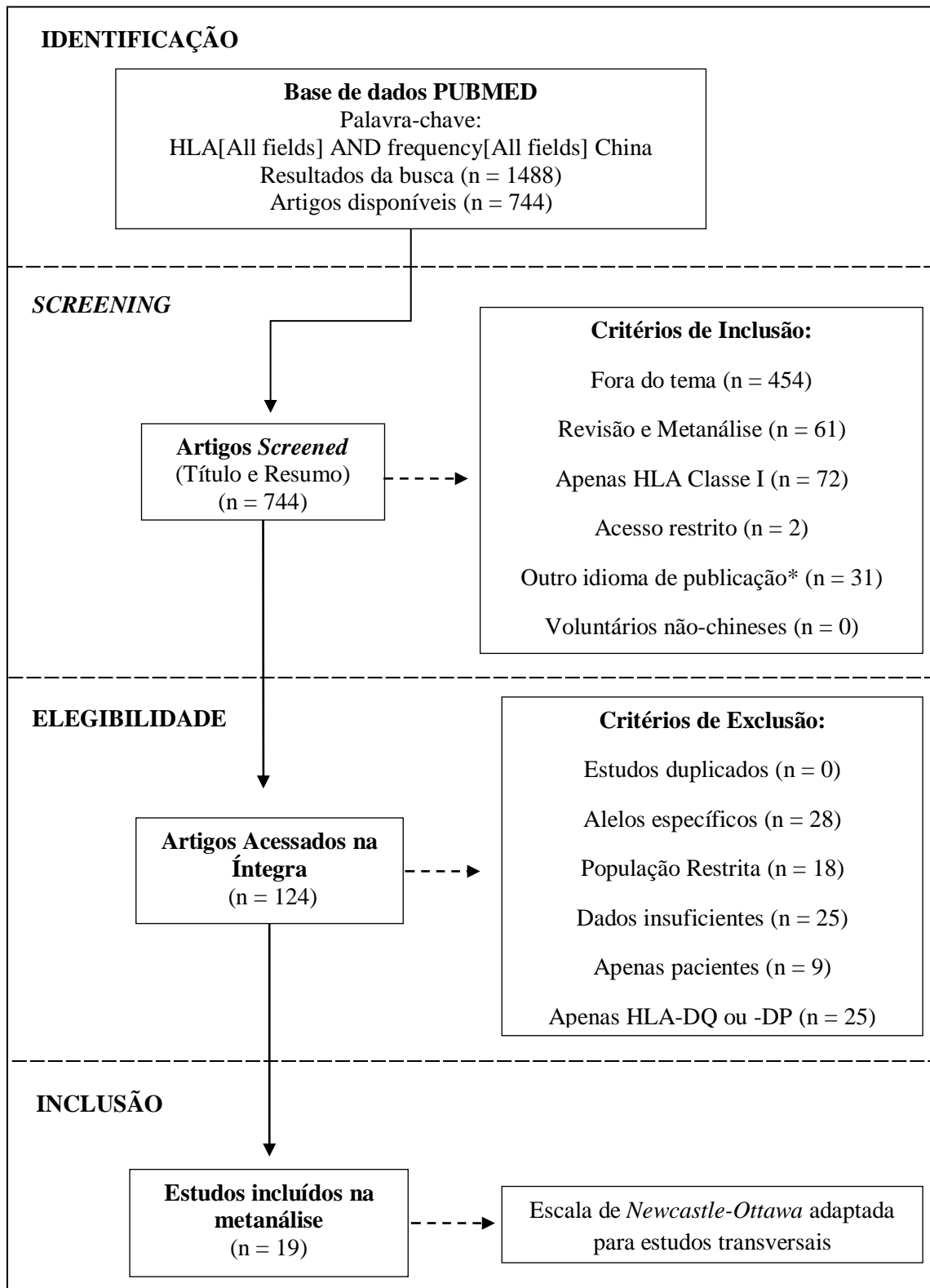


Figura 8. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (China). Representação sistemática dos estudos da China incluídos na revisão sistemática. *Idiomas permitidos de acordo com o critério de inclusão: Português, Inglês e Espanhol.

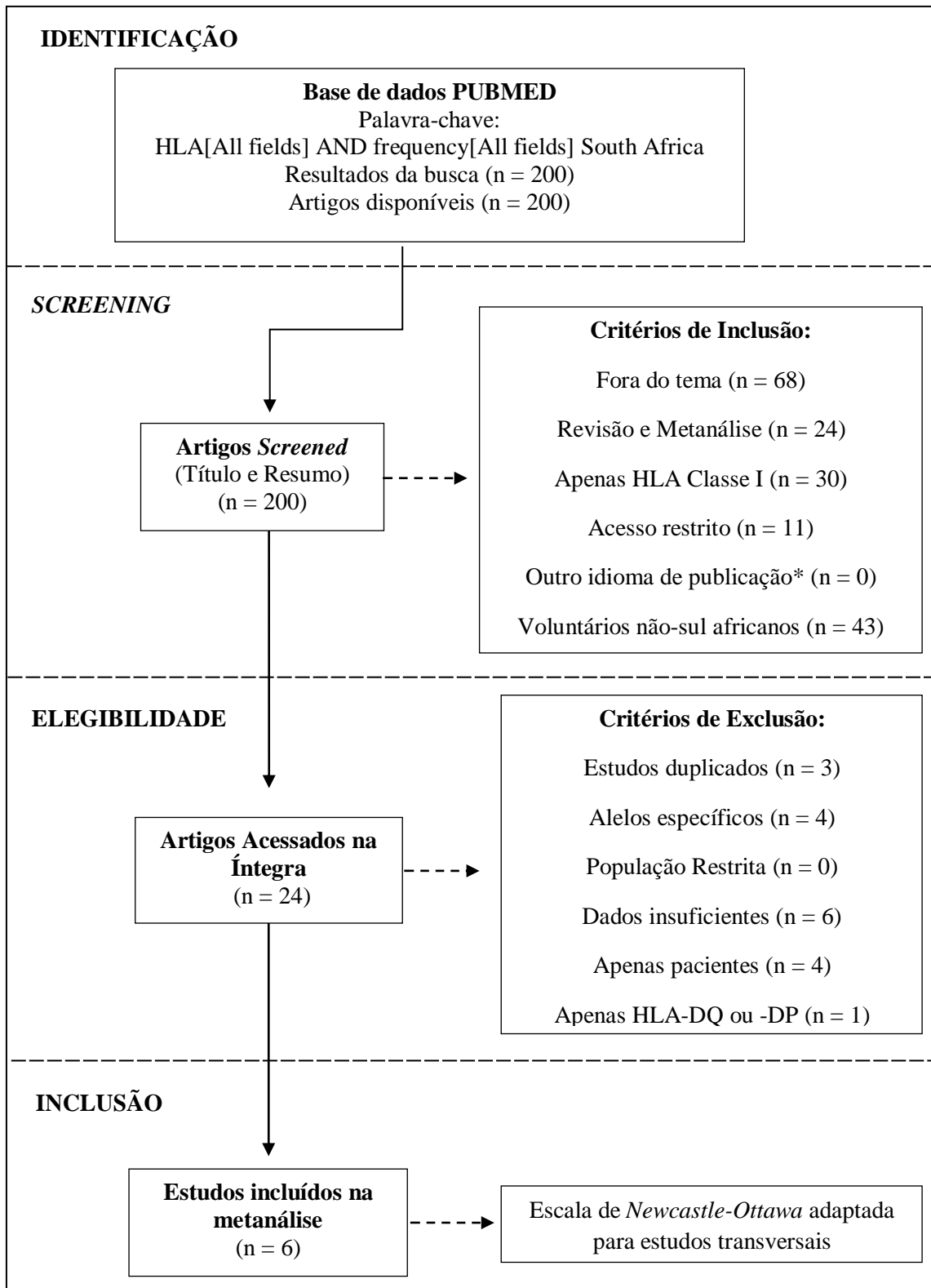


Figura 9. Fluxograma de seleção dos artigos para metanálise (África do Sul). Representação sistemática dos estudos da África do Sul incluídos na revisão sistemática. *Idiomas permitidos de acordo com o critério de inclusão: Português, Inglês e Espanhol.

Os artigos selecionados para a metanálise, depois de aplicados os critérios de inclusão e exclusão, estão listados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Artigos selecionados de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, após revisão sistemática de literatura.

Autor	Ano	<i>n</i> <i>amostral</i>	Periódico
Brasil			
Ferreira	2014	506	PloS One
Baleotti	2014	2016	Transfusion
Carvalho	2013	43878	Human Immunology
Costa	2013	252	Human Immunology
Ribas-Silva	2013	520	BMC Infectious Diseases
Corrêa	2012	170	Memorias do Instituto Oswaldo Cruz
Gonzaga	2013	1052	Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology
Souza	2012	408	Tissue Antigens
Usnayo	2011	432	Revista Brasileira de Reumatologia
da Silva	2009	434	BMC Infectious Diseases
Rassi	2006	240	Annals of the New York Academy of Sciences
Cardoso	2005	190	European Journal of Dermatology
Pavoni	2003	769	Genes and Immunity
Freitas	2004	333	Lupus
Fernandes	2002	361	Annals of the New York Academy of Sciences
Total		51.561	
Rússia			
Artem'eva	2013	878	Advances in Gerontology
Suslova	2012	395	International Journal of Immunogenetics
Smagina	2012	200	Neuroscience and Behavioral Physiology
Golovanova	2009	210	Russian Journal of Genetics
Favorova	2006	447	BMC Medical Genetics
Boiko	2002	654	Neurology
Kapustin	2001	200	Annals of Hematology
Kapustin	1997	398	Pathology Oncology Research
Total		3.382	
Índia			
Prasannavar	2014	180	Rheumatology International
Patel	2013	550	Indian Journal of Human Genetics
Negi	2012	199	Journal of Molecular and Cellular Immunology
Chhaya	2010	170	International Journal of Immunogenetics
Tiercy	2010	224	Molecular Vision
Agrawal	2007	404	International Journal of Immunogenetics
Selvaraj	2007	116	Tuberculosis
Gulati	2007	404	Pediatric Nephrology
Amarapurpar	2003	201	Journal of the Association of Physicians of India
Total		2.448	

Tabela 2. Artigos selecionados de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, após revisão sistemática de literatura.

Autor	Ano	<i>n</i> <i>amostral</i>	Periódico
China			
Shao	2016	29058	International Journal of Immunogenetics
Wang	2014	12768	International Journal of Immunogenetics
Zhao	2014	2027	Biomedical Reports
He	2014	916	PloS One
Li	2014	40929	PloS One
Liu	2012	416	Human Immunology
He	2012	6591	Human Immunology
Qin	2011	6476	International Journal of Immunogenetics
Li	2012	410	Virus Research
Sun	2012	1434	PloS One
Wang	2011	174	Journal of Neuroimmunology
Jiang	2011	1000	International Journal of Infectious Diseases
Xie	2011	320	Journal of Clinical Neuroscience
Lu	2010	508	Tissue Antigens
Shen	2010	20000	Human Immunology
Wu	2009	182	Multiple Sclerosis Journal
Hei	2009	1436	International Journal of Immunogenetics
Zhang	2009	1054	BMC Medical Genetics
Huang	2009	4957	BMC Infectious Diseases
Total		130.656	
África do Sul			
Paximadis	2012	568	Human Immunology
Lombard	2006	234	Human Immunology
Bhimma	2002	897	Kidney International
Patel	2002	166	Clinical and Laboratory Haematology
Pirie	2001	1180	Tissue Antigens
Schipper	1997	915	Human Immunology
Total		3.960	

7.1.2. Caracterização dos artigos selecionados

Todos os artigos selecionados passaram por análise da qualidade metodológica, realizada por dois avaliadores independentes, utilizando a Escala de Avaliação *Newcastle-Ottawa* adaptada para estudos do tipo corte transversal, como barema. Os resultados obtidos por cada um dos artigos foram comparados e discordâncias encontradas foram solucionadas por consenso.

De forma geral, as notas obtidas variaram entre 4 pontos (valor mínimo para inclusão na metanálise) e 9 pontos (valor máximo possível alcançado pela Escala). Artigos com pontuação entre 4 e 6 pontos (33%) foram considerados de qualidade apropriada, enquanto os artigos com pontuação entre 7 e 9 pontos (67%) foram considerados de alta qualidade. Brasil,

Rússia e China tiveram trabalhos classificados em ambos os grupos (qualidade apropriada e alta qualidade), enquanto a Índia foi o único país em que todos os artigos foram classificados como de alta qualidade (Figura 10).

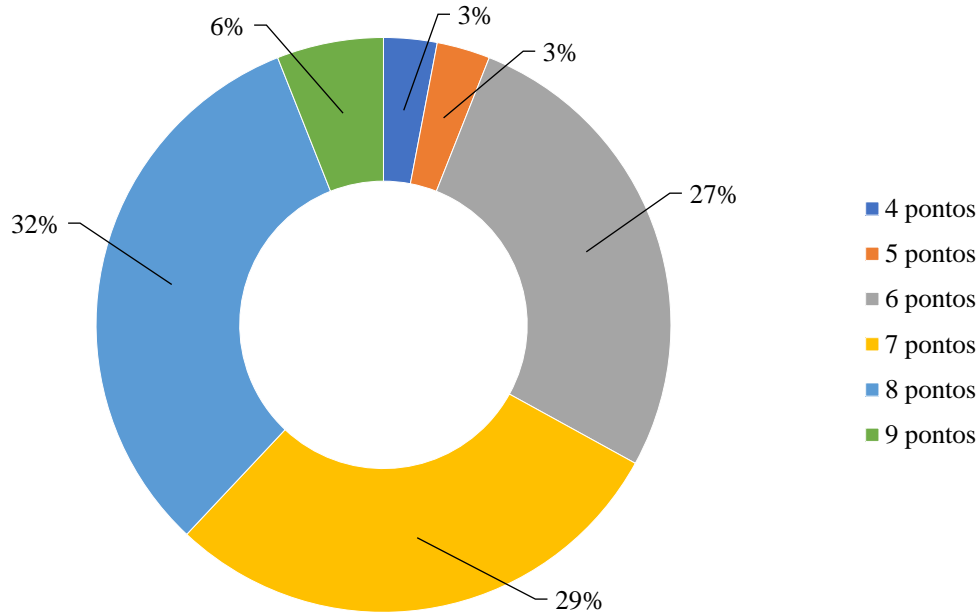


Figura 10. Pontuação dos artigos selecionados para metanálise. A avaliação da qualidade metodológica foi feita seguindo os critérios da Escala de Avaliação *Newcastle-Ottawa*, adaptada para estudos do tipo Corte Transversal, em todos os artigos incluídos, na metanálise, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão pré-definidos.

No quesito seleção, primeiro parâmetro avaliado pela Escala, foi medida a qualidade e representatividade do processo de seleção de amostras de cada artigo. Dentre os estudos, 46% analisaram todos os indivíduos dos grupos controles propostos, não sendo necessário, portanto, a aleatorização dessas amostras. Em contrapartida, 54% analisaram apenas parte das amostras, sem descrever os critérios estatísticos utilizados para definição do número de indivíduos que seriam ou não testados. Mesmo assim, as perdas foram pequenas e o n amostral permaneceu representativo da população inicialmente proposta. Além disso, grande parte dos artigos (89%) definiu claramente quais os critérios de inclusão e exclusão dos indivíduos que fizeram parte da pesquisa.

Todos dos artigos selecionados, através da revisão sistemática de literatura, tinham como objetivo principal avaliar a frequência dos alelos dos genes HLA-DRB1 e descreveram todas as frequências alélicas, confirmando que este critério de exclusão foi bem empregado, durante a fase de elegibilidade. É importante ressaltar, entretanto, que, em alguns artigos, nem todas as amostras foram testadas para todos os alelos: 24% dos estudos apresentaram perda, mesmo que não significativa, neste sentido.

A principal metodologia utilizada, pelos estudos, foi o PCR-SSP (*sequence-specific amplification*), baseado no desenho de dois *primers* para amplificação das regiões de interesse, considerado como padrão-ouro para tipagem de genes HLA (DE SPIEGELAERE et al., 2015). Seis artigos, 1 da Índia e 5 da China, utilizaram, além do PCR-SSP, outros métodos de tipagem, como PCR-SSO (*sequence-specific oligonucleotide*) e PCR-SBT (*sequence-based typing*).

Quanto à distribuição geográfica, a maioria dos estudos, no Brasil, foram realizados nas regiões Sul (4) e Sudeste (7), com pouca representação de estudos das regiões Norte (1), Nordeste (2) e Centro-Oeste (1). Os artigos da Índia, por sua vez, descreveram artigos do Oeste (3), Norte (3), Sul (2) e Centro-Oeste (1) do país. Os artigos da Rússia incluíram indivíduos das regiões Sul (2), Leste (1) e Noroeste (5). Além de ter o maior número de estudos esta última região inclui as duas cidades mais populosas do país: Moscou e São Petersburgo, com aproximadamente 12 e 5 milhões de habitantes, respectivamente.

Dentre os artigos da China, 6 eram da região Leste, 5 da região Sul e 5 da região Nordeste, com menos artigos das regiões Norte (2), Sudeste (2) e Central (1). Já os artigos da África do Sul, apesar de serem originados das regiões Central (1), Leste (2) e Nordeste (1) do país (Figura 11). Alguns artigos desses dois últimos países utilizaram amostras que não se restringiram às suas regiões, por terem sido retiradas de um banco nacional de frequências alélicas, com indivíduos doadores de medula óssea.



Figura 11. Distribuição geográfica dos artigos de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, selecionados para metanálise. Número de artigos por região. Verde: 1 ou 2 artigos, amarelo: 3 ou 4 artigos e vermelho: 5 artigos.

7.2 METANÁLISE

Foram realizadas metanálises para avaliar cada uma das frequências alélicas dos 16 subtipos de HLA-DRB1, nos cinco países integrantes do BRICS. As distribuições alélicas se assemelham, de um país para o outro, e os alelos mais frequentes apresentam cobertura de, no mínimo, 80% dos indivíduos saudáveis dessas populações.

Dentre os alelos de HLA-DRB1 mais frequentes nas populações avaliadas, os alelos *04, *07, *11, *13 e *15 estavam incluídos nas análises realizadas para todos os países desta metanálise. O alelo *15, em particular, está presente em 23% [21-24] da população indiana e em ao menos 10% da população dos demais países do BRICS. Brasil e Rússia apresentaram frequências semelhantes em boa parte dos alelos analisados, principalmente HLA-DRB1*04, *07, *11 e *13. Isso também se repetiu para o alelo *01, presente em 9% [9-9] e 11% [10-13] das populações brasileira e russa, respectivamente, sendo menos frequente na Índia e na China (2% [1-3]).

Na África do Sul, o alelo HLA-DRB1*03 tem frequência de 21% [15-27], consideravelmente maior que nos demais países, onde este alelo está presente em, no máximo, 10% da população. Na China, por sua vez, chamam atenção as frequências dos alelos HLA-DRB1*09 e *12, presentes em 15% [14-16] e 12% [12-13] da população, respectivamente, quando, nos demais países, essas frequências estão em 1% (alelo *09) e entre 1% e 3% (alelo *12). A população chinesa também é a única que apresenta o alelo HLA-DRB1*03 entre os mais frequentes.

A heterogeneidade dos artigos foi avaliada pelos *forest plot* e *funnel plot* (figuras suplementares 1-10). Na China, as diferenças entre os artigos foram consideradas significantes ($p < 0,1$ e $I^2 > 50\%$) para todos os alelos analisados, sendo, então, aplicado o efeito aleatório, como resultado de todas as metanálises. Considerando a heterogeneidade, em todos os países, as frequências de 20 alelos foram analisadas utilizando o efeito fixo ($p > 0,1$ e $I^2 \leq 50\%$), enquanto a frequência dos 45 alelos restantes, incluindo todos os 13 alelos da China, foram analisados pelo efeito aleatório. Os alelos HLADRB1*11 e *14 foram os únicos avaliados apenas de acordo com o efeito aleatório, enquanto os demais alelos alternaram entre os dois efeitos. Nenhuma heterogeneidade foi observada para os alelos HLADRB1*10 (Brasil), *13 e *16 (Rússia), *12 (Índia) e *09 (África do Sul).

Os resultados de todas as frequências alélicas, bem como os valores de heterogeneidade e respectivos valores de p , para cada alelo, obtidos a partir da análise dos *forest plots* produzidos dessa metanálise encontram-se sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência média dos alelos HLA-DRB1 de voluntários saudáveis recrutados em estudos realizados no BRICS.

HLA DRB1	Brasil			Rússia			Índia			China			África do Sul		
	MR (%)	IC95%	I ² % (p)	MR (%)	IC95%	I ² % (p)	MR (%)	IC95%	I ² % (p)	MR (%)	IC95%	I ² % (p)	MR (%)	IC95%	I ² % (p)
*01	9	[9-9]	70 (0,38)	11	[10-13]	97 (0,0001)	2	[1-3]	12 (0,3)	2	[2-3]	97 (0,0001)	7	[4-9]	89 (0,0001)
*03	10	[9-10]	46 (0,03)	9	[7-11]	75 (0,0001)	9	[8-10]	48 (0,05)	4	[4-5]	87 (0,0001)	21	[15-27]	96 (0,0001)
*04	11	[10-13]	78 (0,0001)	11	[10-12]	1 (0,4)	7	[5-9]	65 (0,04)	11	[11-12]	84 (0,0001)	9	[6-12]	93 (0,0001)
*07	11	[10-12]	70 (0,0001)	13	[12-14]	0 (0,8)	14	[12-16]	67 (0,02)	10	[9-11]	98 (0,0001)	9	[7-10]	70 (0,005)
*08	6	[6-7]	59 (0,002)	4	[3-4]	0 (0,8)	1	[0-2]	69 (0,01)	7	[6-8]	91 (0,0001)	2	[1-4]	91 (0,0001)
*09	1	[1-2]	81 (0,0001)	1	[0-1]	58 (0,02)	1	[0-1]	60 (0,09)	15	[14-16]	96 (0,0001)	1	[1-1]	0 (0,8)
*10	2	[2-2]	0 (0,5)	1	[0-1]	43 (0,09)	8	[6-9]	53 (0,03)	1	[1-2]	61 (0,0001)	2	[1-2]	64 (0,02)
*11	13	[11-14]	87 (0,0001)	13	[10-16]	79 (0,0001)	7	[4-10]	90 (0,0001)	6	[6-6]	83 (0,0001)	15	[13-18]	82 (0,0001)
*12	1	[1-2]	75 (0,0001)	2	[1-2]	48 (0,07)	3	[2-4]	0 (0,5)	12	[12-13]	86 (0,0001)	3	[2-5]	88 (0,0001)
*13	14	[13-14]	39 (0,06)	11	[9-13]	64 (0,006)	11	[10-13]	40 (0,1)	6	[5-6]	90 (0,0001)	16	[14-18]	65 (0,01)
*14	4	[3-5]	90 (0,0001)	3	[1-4]	87 (0,0001)	9	[7-11]	65 (0,004)	6	[6-7]	92 (0,0001)	2	[0-3]	92 (0,0001)
*15	10	[9-10]	36 (0,08)	14	[13-15]	0 (0,4)	23	[21-24]	46 (0,06)	15	[14-16]	95 (0,0001)	10	[9-11]	15 (0,3)
*16	4	[4-5]	55 (0,005)	4	[4-5]	0 (0,9)	0	[0-1]	16 (0,3)	2	[2-3]	96 (0,0001)	0	[0-1]	52 (0,08)
Total	84			82			88			88			80		

Sombreado dos alelos de gene HLA-DRB1 com frequências que representam, no mínimo, 80% das populações avaliadas. Efeito fixo ($p > 0,1$ e $I^2 \leq 50\%$). Efeito aleatório ($p < 0,1$ e $I^2 > 50\%$).

De acordo com as frequências obtidas, foram selecionados os alelos HLA-DRB1*01, *03, *04, *07, *09, *11, *12, *13 e *15 para predição de epítomos de quatro proteínas do bacilo *M. tuberculosis*, identificada e caracterizadas previamente, pelo grupo.

7.3. PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES

7.3.1. Seleção de subtipos alélicos de HLA-DRB1

Após a identificação dos alelos HLA-DRB1 mais frequentes nas populações de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, através da metanálise, foi feita a determinação dos subtipos mais frequentes desses alelos. De acordo com a busca na base mundial de frequências alélicas *Allele frequency* (disponível no endereço <http://www.allelefrequency.net/>), foram identificados 32 subtipos de maior frequência, no mundo: HLA-DRB1*0101; *0102; *0103; *0301; *0302; *0401; *0402; *0403; *0404; *0405; *0406; *0407; *0408*; *0410; *0411; *0701; *0901; *1101; *1102; *1103; *1104; *1106; *1201; *1202; *1301; *1302; *1303; *1307; *1501; *1502; *1503; *1504.

7.3.2. Predição de epítomos lineares

Com esses subtipos alélicos identificados, foram preditos trechos das sequências de cinco proteínas micobacterianas, do bacilo *M. tuberculosis*, mais promissores quanto sua capacidade imunogênica. Duas proteínas apresentaram 83% de semelhança, em suas sequências, por isso, foi realizada a predição de epítomos para uma delas.

Esta identificação foi feita com base na avaliação do *score* de afinidade de ligação dos epítomos aos subtipos alélicos, na ferramenta *online* IEDB. Para cada combinação alelo/epítomo, foi gerada uma tabela com as seguintes informações: nome do subtipo alélico para o qual foi feita a predição, delimitação de início e fim da sequência peptídica, sequência de 15 aminoácidos que compõem o epítomo, método utilizado para comparação dos resultados e o *percentile rank* (Figuras 12 e 13).

MHC-II Binding Predictions

Specify Sequence(s)

Enter protein sequence(s) in FASTA format
[\(Browse for sequences in NCBI\)](#)

```
>M. tuberculosis H37Rv|Rv3875|esxA
MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKQKWA
TATELNNALQNLARTISEAGQAMASTEgNVTGMFA
```

Or select file containing sequence(s) Escolher arquivo Nenhum arquivo selecionado

Choose sequence format auto detect format ▼

Choose a Prediction Method

Prediction Method IEDB recommended ▼ [Help on prediction method selections](#)

Specify what to make binding predictions for

Select species/locus Human, HLA-DR ▼

Figura 12. Interface da ferramenta *online* IEDB para predição de epítomos (definição de parâmetros).

MHC-II Binding Prediction Results

Input Sequences

#	Name	Sequence
1	M. tuberculosis H37Rv Rv3875 esxA	MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTEgNVTGMFA

Prediction method: IEDB recommended | Low percentile_rank = good binders

[Download result](#)

Citations

Check to expand the result:

Allele	#	Start	End	Peptide	Method used	Percentile rank
HLA-DRB1*01:01	1	5	19	QWNFAGIEAAASAIQ	Consensus (comb.lib./smm/nn)	1.43
HLA-DRB1*01:01	1	6	20	WNFAGIEAAASAIQG	Consensus (comb.lib./smm/nn)	2.46
HLA-DRB1*01:01	1	4	18	QQWNFAGIEAAASAI	Consensus (comb.lib./smm/nn)	2.64
HLA-DRB1*01:01	1	7	21	NFAGIEAAASAIQGN	Consensus (comb.lib./smm/nn)	4.99
HLA-DRB1*01:01	1	8	22	FAGIEAAASAIQGNV	Consensus (comb.lib./smm/nn)	5.65
HLA-DRB1*01:01	1	3	17	EQQWNFAGIEAAASA	Consensus (comb.lib./smm/nn)	6.03
HLA-DRB1*01:01	1	2	16	TEQQWNFAGIEAAAS	Consensus (comb.lib./smm/nn)	10.95
HLA-DRB1*01:01	1	33	47	KQSLTKLAAAWGGSG	Consensus (comb.lib./smm/nn)	15.66
HLA-DRB1*01:01	1	32	46	GKQSLTKLAAAWGGS	Consensus (comb.lib./smm/nn)	15.82

Figura 13. Interface da ferramenta *online* IEDB para predição de epítomos (resultados).

O método de predição escolhido foi o *Consensus*. Este método utiliza os resultados de outros algoritmos de predição (*NN-align*, *SMM-align*, *CombLib* e *Sturniolo*), combinando três das quatro opções disponíveis. O *Consensus*, então, obtém a mediana dos resultados encontrados e a compara aos *scores* de afinidade de outros 5 milhões de peptídeos da base de dados SWISSPROT. O resultado desta comparação é organizado em um *rank*, do menor para o maior valor calculado.

Como a ferramenta IEDB divide a proteína em todas as sequências de 15 aminoácidos possíveis, os resultados obtidos, nas predições, incluem 10 aminoácidos sobrepostos por sequência. Por isso, durante o pós-processamento dos resultados, foram retirados todos os peptídeos em *overlapping*, de acordo com suas posições de início e fim. Em seguida, foram selecionadas as regiões com *scores* de afinidade ≤ 25 nM e que se ligavam, preferencialmente, a mais de 80% dos subtipos alélicos determinados (tabelas suplementares 1 e 2). Além disso, foi dada preferência às regiões com bons perfis físico-químicos (hidrofobicidade, hidrofiliidade, flexibilidade e antigenicidade) e evitadas as regiões de glicosilação das proteínas. Estes parâmetros já haviam sido definidos anteriormente, pelo grupo. Dois epítomos que se ligavam a menos de 80% dos alelos também foram incluídos, porque correspondiam aos alelos HLA-DRB1*1201 e *1202, identificados com alta frequência, na população da China.

Os epítomos de cada proteína com afinidade de ligação a, preferencialmente, 80% dos subtipos alélicos de HLA-DRB1 mais frequentes, nas populações do BRICS, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Epítomos das proteínas 1 a 4 preditos como adequados aos subtipos alélicos do gene HLA-DRB1 mais frequentes.

Epítomos	Subtipos alélicos de HLA-DRB1 afins
Proteína 1	
Epítomo 1	100%
Epítomo 2	82%
Epítomo 3	87%
Epítomo 4	81%
Epítomo 5	94%
Proteína 2	
Epítomo 1	84%
Epítomo 2	91%
Epítomo 3	91%
Epítomo 4	78%
Epítomo 5	84%
Proteína 3	
Epítomo 1	97%
Epítomo 2	81%
Epítomo 3	85%
Epítomo 4	78%
Epítomo 5	88%

Tabela 4. Epítomos das proteínas 1 a 4 preditos como adequados aos subtipos alélicos do gene HLA-DRB1 mais frequentes.

Epítomos	Subtipos alélicos de HLA-DRB1 afins
Proteína 4	
Epítopo 1	97%
Epítopo 2	100%
Epítopo 3	100%
Epítopo 4	91%
Epítopo 5	94%
Epítopo 6	85%

As proteínas e os epítomos preditos e selecionados, para testagem *in vitro*, encontram-se sob notificação interna de invenção, pela Fundação Oswaldo Cruz (parecer SG 053/13 do Sistema VPPLR/GESTEC/NIT).

8. DISCUSSÃO

Diante da alta incidência de tuberculose, em países em desenvolvimento, associada à eficácia variável da vacina BCG (WHO, 2017; MANGTANI et al., 2014), novos candidatos vacinais têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a proteção contra a doença (BESSA et al., 2017). Neste trabalho, realizamos uma revisão sistemática de literatura, seguida de metanálise, para identificar os alelos do gene HLA-DRB1 mais frequentes nas populações do BRICS (bloco econômico formado por Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), endêmicas para a tuberculose.

A partir da determinação desses alelos, foram desenhados epítomos promíscuos de proteínas capazes de induzir resposta diferencial, em indivíduos com alta produção de IFN- γ , após revacinação com BCG, em plataforma de predição *in silico*. Esses epítomos são possíveis componentes de uma vacina *immunosense*, capazes de estimular resposta de linfócitos T CD4⁺ e citocinas Th1, no hospedeiro, a partir do contato com antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*.

A identificação de epítomos candidatos ao desenvolvimento de vacinas *immunosense*, necessita, portanto, do conhecimento sobre as genéticas do patógeno e do hospedeiro (SALIE et al., 2014). As técnicas de seleção de artigos de acordo critérios claros de elegibilidade e qualidade metodológica, e a combinação de seus resultados, já vêm sendo utilizadas para a determinação de frequências alélicas em diferentes genes e populações, já que permitem resultados mais abrangentes e precisos (LEE, 2015). Essas metanálises são mais amplamente empregadas no estudo de alelos relacionados a doenças inflamatórias e imunes, como artrite reumatoide, lupus eritematoso sistêmico e HIV/AIDS (SILVA-CARVALHO, 2016). Entretanto, essa metodologia também é utilizada em polimorfismos de genes relacionados a alguns tipos de câncer e ao metabolismo de fármacos, ajudando a determinar variações de eficácia e segurança, nas populações (CONTI et al., 2017; ZHOU; INGELMAN-SUNDBERG; LAUSCHKE, 2017).

Para a tuberculose, as metanálises atualmente realizadas se concentram no estudo da prevalência e incidência de multidroga resistência (MDR), ou seja, quando não há resposta ao tratamento com rifampicina e isoniazida, fármacos mais utilizados contra a TB (ONYEDUM; ALOBU; UKWAJA, 2017; RAMAZANZADEH et al., 2015). Além disso, alguns estudos se propõem a avaliar os índices de transmissão e mortalidade da doença (FOX et al., 2013; STRAETEMANS et al., 2011). Já a relação entre tuberculose e HLA-DRB1 são estudadas

principalmente quanto a identificação de alelos que possam ser utilizados como biomarcadores associados à susceptibilidade ou proteção (CHEN et al., 2015; LI et al., 2015).

Esta metanálise determinou nove alelos frequentes em, no mínimo, 80% das populações estudadas: HLA-DRB1*01, *03, *04, *07, *09, *11, *12, *13 e *15. Dentre esses, o alelo HLA-DRB1*15, presente em ao menos 10% das populações de todos os países, está associado com o aumento na incidência de tuberculose pulmonar ativa e é cogitado como possível marcador de risco para o desenvolvimento da doença (LI et al., 2015). Da mesma maneira, os alelos HLA-DRB1*09 e *12, com frequências até 15 e 12 vezes maior, na população chinesa, em comparação aos demais países, também já foram associados à susceptibilidade, principalmente em populações do leste asiático (TONG et al., 2015). Já os alelos HLA-DRB1*03, *07 e *13 por sua vez, estão associados com proteção a TB, em algumas populações (CHEN et al., 2015; TONG et al., 2015).

A predição de epítomos potencialmente imunogênicos, entretanto, não deve ser limitada aos alelos de susceptibilidade, já que esses efeitos podem variar de acordo com a etnia das populações estudadas (RUGGIERO et al., 2004; VEJBAESYA et al., 2002). Fatores ambientais, como carga bacilar, cepa infectante do *M. tuberculosis*, imunossupressão e consumo de álcool também podem influenciar o efeito dos polimorfismos do gene HLA-DRB1 sobre o desenvolvimento da doença (LI et al., 2015). Além disso, de acordo com estudo de Smith e colaboradores (2016), que avaliou fatores relacionados ao desenvolvimento da tuberculose e capacidade de proteção da BCG, em linhagens de camundongos, não há relação entre susceptibilidade à doença e eficácia da vacina. Assim, o desenho de epítomos a partir dos alelos não-homólogos mais frequentes de HLA-DRB1, independente de seus efeitos protetores ou não, em populações com *backgrounds* genéticos e condições socioambientais distintas, permitiu a identificação de possíveis candidatos vacinais com ampla cobertura.

Atualmente, cerca de 800 epítomos de 170 proteínas do *M. tuberculosis* foram identificados na plataforma IEDB (VITA et al., 2015), o que representa apenas 7% de todo o proteoma da bactéria (GELUK et al., 2014). Os epítomos mais descritos estão localizados no complexo Ag85 (incluindo Ag85A, Ag85B e Ag85C), responsável pela alta afinidade da bactéria à fibronectina e pela manutenção da integridade da parede celular (KARBALAEI; SOLEIMANPOUR; REZAEI, 2017). Recentemente, três novos epítomos deste complexo, apresentados pelo HLA-DRB1*09:01, foram identificados como promissores, com capacidade de induzir a produção de citocinas e proliferação de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1, em avaliações *in silico* e *in vitro*, na população chinesa (LIU et al., 2016).

Entretanto, trabalhos desse tipo, em populações do Sudeste Asiático ou da África Subsaariana, ainda são escassos. Apesar do alto número de casos de tuberculose, nessas regiões, grande parte dos epítomos disponíveis atualmente são preditos a partir da frequência alélica de HLA em populações caucasianas de países desenvolvidos (RAVIGLIONE et al., 2012; GASEITSIWE et al., 2010).

Outro desafio na predição de epítomos do *M. tuberculosis* é o fato da qualidade dos resultados obtidos para HLA de classe II ainda ser inferior aos de HLA classe I. Apesar do grande número de trabalhos de referência disponíveis, a acurácia de predição *in silico* para HLA II varia entre 0,75-0,85, contra 0,85-0,95 para HLA classe I (NIELSEN et al., 2010). Esta diferença pode ser explicada pela própria estrutura da proteína de classe II, com sítios de ligação abertos, nas extremidades, acomodando sequências maiores que nove aminoácidos (PAUL et al., 2015). Para garantir a melhor qualidade possível das predições, as metodologias escolhidas, neste trabalho, são capazes de promover o alinhamento ideal das sequências proteicas aos *grooves* de HLA, antes da predição em si ser realizada (NIELSEN, 2010). Ainda, a afinidade de ligação de cada combinação epítomo-HLA foi calculada a partir dos resultados de três algoritmos distintos, pelo método *Consensus*.

Revisões sistemáticas de literatura e metanálises são estudos retrospectivos que dependem fortemente da qualidade metodológica dos artigos incluídos (CHEN et al., 2015). Para que essa qualidade fosse garantida, um dos principais pontos de avaliação dos trabalhos foi a seleção, descrição e análise adequada de amostras representativas das populações estudadas. Além de conferir maior segurança à revisão sistemática, essas informações ajudam a garantir que os artigos da metanálise sejam menos heterogêneos.

A heterogeneidade avalia, entre artigos com o mesmo objetivo, variações nos resultados encontrados, que sejam maiores que o esperado (FLETCHER, 2007). Isso pode ser causado por diferenças nas técnicas diagnósticas empregadas, problemas na caracterização da amostra ou análises de porções muito pequenas e não representativas do *n* total previamente estabelecido (HIGGINS et al., 2003). Tal medida foi acessada após obtenção de *funnel plots*, *forest plots* e dos valores de I^2 . Em casos de heterogeneidade alta e significativa ($p < 0,1$ e $I^2 > 50\%$), é recomendado o uso dos valores das frequências e dos intervalos de confiança (IC95%) calculados pelo efeito aleatório.

Nesta metanálise, em particular, a maioria das análises de frequência apresentou alta heterogeneidade, o que pode ser explicado pelo tipo de estudos analisados. Independente de sua classificação original, todos os estudos incluídos foram considerados como do tipo corte transversal, com a seleção apenas dos resultados dos grupos controles. Alguns trabalhos

apontam que esses tipos de estudo, quando comparados entre si, apresentam heterogeneidade maior que os demais, sendo necessário o uso da medida de efeito aleatório (YANG et al., 2015). Altas heterogeneidades são mais comprometedoras, por exemplo, em uma metanálise com estudos do tipo coorte, em que se espera certa homogeneidade dos trabalhos, já que estes avaliam as mesmas causas e os mesmos desfechos (YANG et al., 2015; FLETCHER, 2007).

Mesmo assumindo que certa heterogeneidade seria observada, o uso do efeito aleatório, quando necessário, foi empregado com risco reduzido de possíveis vies, porque um grande número de artigos (entre 6 e 19 artigos), por país, foi analisado (VON HIPPEL, 2015). Assim, apesar de valores de I^2 maiores que 50%, o efeito aleatório foi capaz de equilibrar diferenças nos tamanhos amostrais e manter os intervalos de confiança similares àqueles obtidos pelo efeito fixo.

Um dos maiores desafios enfrentados pelos novos candidatos vacinais, em ensaios clínicos, atualmente, é repetir os resultados promissores observados *in vitro* e em modelos animais (TAMERIS et al., 2013). Assim, as proteínas de *M. tuberculosis* aqui estudadas, ainda pouco conhecidas quanto à capacidade imunogênica, apresentam uma vantagem sobre os demais candidatos, uma vez que sua resposta diferencial já foi descrita em humanos (PEREIRA et al, dados não publicados). Este perfil de resposta humoral heterogêneo observado pode também significar uma ativação diferencial de linfócitos T, uma vez que a Imunoglobulina (Ig)-G participa da opsonização de bactérias, aos epítomos das proteínas, antes de sua internalização pelos macrófagos (KUMAR; SINGH; SINHA, 2015).

Testes *in silico* de afinidade não são suficientes para determinar a imunogenicidade dos peptídeos identificados. Portanto, ensaios experimentais são necessários para validação desses resultados, com a identificação de células T CD4⁺ antígeno específicas.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os alelos HLA-DRB1*04, *07, *11, *13 e *15 estão entre os mais frequentes nas populações de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul.
- A população da China apresenta frequências altas para os alelos HLA-DRB1*09 e *12, ao menos quatro vezes maior que as populações dos demais países analisados.
- A população da África do Sul apresenta frequência alta para o alelo HLA-DRB1*03, ao menos duas vezes maior as populações dos demais países analisados.
- Proteínas do bacilo *M. tuberculosis* apresentam, em suas sequências, 5 ou 6 regiões peptídicas com alta afinidade de ligação para os subtipos alélicos mais frequentes do gene HLA-DRB1, com cobertura de cerca de 80% das populações de Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul.

10. REFERÊNCIAS

- AHMAD, T. A.; EWEIDA, A. E.; SHEWEITA, S. A. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. **Trials in Vaccinology**, v. 5, Suppl. C, p. 71–83, 2016.
- AMARAPURPAR, D.; PATEL, N.; KANKONKAR, S. HLA class II genotyping in chronic hepatitis B infection. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 51, p. 779–781, 2003.
- AGRAWAL, S.; KHAN, F.; BHARADWAJ, U. Human genetic variation studies and HLA class II loci. **International Journal of Immunogenetics**, v. 34, n. 4, p. 247–252, 2007.
- ARTEM'EVA, O. V.; KOSTOMAROVA, I. V.; SEROVA, L. D. Clinical and genetic characteristics of long-livers in Moscow region. **Advances in Gerontology**, v. 26, n. 3, p. 451–457, 2013.
- BACKERT, L.; KOHLBACHER, O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. **Genome Medicine**, v. 7, 2015.
- BALEOTTI, W. et al. HLA-DRB1*07:01 allele is primarily associated with the Diego a alloimmunization in a Brazilian population. **Transfusion**, v. 54, n. 10, p. 2468–2476, 2014.
- BARBOSA, T. et al. BCG (Bacille of Calmette–Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. **Vaccine**, v. 21, n. 17–18, p. 2152–2160, 2003.
- BARRETO, M. L. et al. Neonatal BCG protection against tuberculosis lasts for 20 years in Brazil [Short Communication]. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 10, p. 1171–1173, 2005.
- BESSA, T. et al. R&D in Vaccines Targeting Neglected Diseases: An Exploratory Case Study Considering Funding for Preventive Tuberculosis Vaccine Development from 2007 to 2014. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
- BHIMMA, R. et al. HLA class I and II in black children with hepatitis B virus-associated membranous nephropathy. **Kidney International**, v. 61, n. 4, p. 1510–1515, 2002.
- BOIKO, A. N. et al. Association and linkage of juvenile MS with HLA-DR2(15) in Russians. **Neurology**, v. 58, n. 4, p. 658–660, 2002.
- CAMBIER, C. J. et al. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. **Nature**, v. 505, n. 7482, p. 218–222, 2014.
- CARDOSO, C. B. et al. Association between psoriasis vulgaris and MHC-DRB, -DQB genes as a contribution to disease diagnosis. **European Journal of Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 159–163, 2005.
- CARVALHO, M. G. et al. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies in Piauí's volunteer bone marrow donors enrolled at the Brazilian registry. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1598–1602, 2013.

- CASEY, R. M. Global Routine Vaccination Coverage, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, 2016.
- CATCHPOLE, B. et al. Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2008.
- CHEN, B. F. et al. Association between HLA-DRB1 alleles and tuberculosis: a meta-analysis. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 4, p. 15859–15868, 2015.
- CHHAYA, S.; DESAI, S.; SARANATH, D. HLA polymorphisms in Sindhi community in Mumbai, India. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, n. 5, p. 373–377, 2010.
- CONCEIÇÃO, E. L. **Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-1 β e dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios revacinados com BCG 2013**. 61 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- CONG, H. et al. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: Protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A*0201. **Vaccine**, v. 29, n. 4, p. 754–762, 2011.
- CONTI, D. V. et al. Two Novel Susceptibility Loci for Prostate Cancer in Men of African Ancestry. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 109, n. 8, 2017.
- CORRÊA, R. DA G. C. F. et al. Association analysis of human leukocyte antigen class II (DRB1) alleles with leprosy in individuals from São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 150–155, 2012.
- DA SILVA, S. A. et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p. 134, 2009.
- DANNENBERG JUNIOR, A. M. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunology Today**, v. 12, n. 7, p. 228–233, 1991.
- DE SPIEGELAERE, W. et al. Comparison of Methods for In-House Screening of HLA-B*57:01 to Prevent Abacavir Hypersensitivity in HIV-1 Care. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.
- DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 387, n. 10024, p. 1211–1226, 2016.
- EL BISSATI, K. et al. Adjuvanted multi-epitope vaccines protect HLA-A*11:01 transgenic mice against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Investigation Insight**, v. 1, n. 15, 2016.
- EVANS, T. G. et al. Preventive vaccines for tuberculosis. **Vaccine**, v. 31, Suppl. 2, p. B223–B226, 2013.
- FAVOROVA, O. O. et al. Three allele combinations associated with multiple sclerosis. **BMC Medical Genetics**, v. 7, p. 63, 2006.
- FERNANDES, A. P. M. et al. HLA-DRB1, DQB1, and DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 958, p. 305–308, 2002.

- FERREIRA, A. R. et al. Evaluation of Naturally Acquired IgG Antibodies to a Chimeric and Non-Chimeric Recombinant Species of Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Protein-1: Lack of Association with HLA-DRB1*/DQB1* in Malaria Exposed Individuals from the Brazilian Amazon. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105828, 2014.
- FLERI, W. et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- FLETCHER, J. What is heterogeneity and is it important? **BMJ : British Medical Journal**, v. 334, n. 7584, p. 94–96, 2007.
- FOX, G. J. et al. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **The European Respiratory Journal**, v. 41, n. 1, p. 140–156, 2013.
- FREITAS, M. V. C. et al. Is HLA class II susceptibility to primary antiphospholipid syndrome different from susceptibility to secondary antiphospholipid syndrome? **Lupus**, v. 13, n. 2, p. 125–131, 2004.
- FRIEDEN, T. R. et al. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 362, n. 9387, p. 887–899, 2003.
- GASEITSIWE, S. et al. Peptide Microarray-Based Identification of Mycobacterium tuberculosis Epitope Binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501, and DRB1*0401. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 1, p. 168–175, 2010.
- GELUK, A. et al. Innovative Strategies to Identify M. tuberculosis Antigens and Epitopes Using Genome-Wide Analyses. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.
- GODREUIL, S. et al. Genetic diversity and population structure of Mycobacterium tuberculosis in HIV-1-infected compared with uninfected individuals in Burkina Faso. **AIDS**, v. 21, n. 2, p. 248–250, 2007.
- GOOGLE EARTH-MAPS. <http://mapas.google.com>. Consulta realizada em 20/09/2017.
- GOLOVANOVA, O. V. et al. [Frequencies of the DRB1, DQA1, DQB1 and TNFA alleles in immigrant population of West Siberia]. **Genetika**, v. 45, n. 8, p. 1118–1124, 2009.
- GONZAGA, H. F. S. et al. HLA alleles in Brazilian patients with fissured tongue. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 27, n. 2, p. e166-170, 2013.
- GONZÁLEZ-GALARZA, F. F. et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D784–D788, 2015.
- GULATI, S. et al. Is typing for HLA class II alleles beneficial in Indian children with idiopathic nephrotic syndrome? **Pediatric Nephrology**, v. 22, n. 4, p. 528–532, 2007.
- HE, D. et al. Association of the HLA-DRB1 with Scleroderma in Chinese Population. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106939, 2014.
- HE, J. et al. Common and well-documented (CWD) alleles of human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 loci for the Chinese Han population do not quite correlate with the ASHI CWD alleles. **Human Immunology**, v. 73, n. 1, p. 61–66, 2012.

- HEI, A.-L. et al. Analysis of high-resolution HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, and -DQB1 alleles and haplotypes in 718 Chinese marrow donors based on donor-recipient confirmatory typings. **International Journal of Immunogenetics**, v. 36, n. 5, p. 275–282, 2009.
- HIGGINS, J. P. T. et al. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ : British Medical Journal**, v. 327, n. 7414, p. 557–560, 2003.
- HUANG, X. et al. Association of HLA-A, B, DRB1 alleles and haplotypes with HIV-1 infection in Chongqing, China. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p. 201, 2009.
- IVANYI, J. Function and Potentials of M. tuberculosis Epitopes. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.
- JIANG, H.-W. et al. Association of the HLA-DRB1 locus with syphilis in a Chinese population. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. e342-345, 2011.
- KAPUSTIN, S. I. et al. HLA-DR4-Ala74 beta is associated with risk and poor outcome of severe aplastic anemia. **Annals of Hematology**, v. 80, n. 2, p. 66–71, 2001.
- KAPUSTIN, S. I. et al. HLA-DR2 Frequency Increase in Severe Aplastic Anemia Patients is Mainly Attributed to the Prevalence of DR15 Subtype. **Pathology Oncology Research**, v. 3, n. 2, p. 106–108, 1997.
- KARBALAEI ZADEH BABAKI, M.; SOLEIMANPOUR, S.; REZAEI, S. A. Antigen 85 complex as a powerful Mycobacterium tuberculosis immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 20–29, 2017.
- KAUFMANN, S. H.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P.-H. New vaccines for tuberculosis. **The Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2110–2119, 2010.
- KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 369–377, 2007.
- KOBAYASHI, K. S.; VAN DEN ELSEN, P. J. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 12, p. 813–820, 2012.
- KUMAI, T. et al. Peptide vaccines in cancer-old concept revisited. **Current Opinion in Immunology**, v. 45, p. 1–7, 2017.
- KUMAR, S. K.; SINGH, P.; SINHA, S. Naturally produced opsonizing antibodies restrict the survival of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages by augmenting phagosome maturation. **Open Biology**, v. 5, n. 12, 2015.
- LALOR, M. K. et al. BCG Vaccination Induces Different Cytokine Profiles Following Infant BCG Vaccination in the UK and Malawi. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1075–1085, 2011.
- LAUREILLARD, D. et al. Paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome after early initiation of antiretroviral therapy in a randomized clinical trial. **AIDS**, v. 27, n. 16, p. 2577–2586, 2013.

- LEE, Y. H. Meta-Analysis of Genetic Association Studies. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 283–287, 2015.
- LEUNG-THEUNG-LONG, S. et al. A Novel MVA-Based Multiphasic Vaccine for Prevention or Treatment of Tuberculosis Induces Broad and Multifunctional Cell-Mediated Immunity in Mice and Primates. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143552, 2015.
- LI, C.-P. et al. Relationship of HLA-DRB1 gene polymorphism with susceptibility to pulmonary tuberculosis: updated meta-analysis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 7, p. 841–849, 2015.
- LI, X.-F. et al. An Analysis of HLA-A, -B, and -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies of 21,918 Residents Living in Liaoning, China. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93082, 2014.
- LI, X. et al. The influence of HLA alleles and HBV subgenotypes on the outcomes of HBV infections in Northeast China. **Virus Research**, v. 163, n. 1, p. 328–333, 2012.
- LIU, S.-D. et al. Identification of HLA-DRB1*09:01-restricted Mycobacterium tuberculosis CD4+ T-cell epitopes. **FEBS Letters**, v. 590, n. 24, p. 4541–4549, 2016.
- LIU, B. et al. HLA-DRB1*12:02:01 plays a protective role against coronary artery disease in women of southern Han Chinese descent. **Human Immunology**, v. 73, n. 1, p. 122–126, 2012.
- LOMBARD, Z. et al. Association of HLA-DR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa. **Human Immunology**, v. 67, n. 8, p. 643–654, ago. 2006.
- LONG, R.; SCHWARTZMAN, K. Chapter 2: Pathogenesis and Transmission of Tuberculosis. In: **Canadian Tuberculosis Standards**. 7. ed. [s.l: s.n.], 2014.
- LU, W.-S. et al. Association of HLA-DRB1 alleles with keloids in Chinese Han individuals. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 4, p. 276–281, 2010.
- MANGTANI, P. et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 4, p. 470–480, 2014.
- MARCY, O. et al. Causes and Determinants of Mortality in HIV-Infected Adults With Tuberculosis: An Analysis From the CAMELIA ANRS 1295-CIPRA KH001 Randomized Trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 3, p. 435–445, 2014.
- MATZARAKI, V. et al. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. **Genome Biology**, v. 18, p. 76, 2017.
- MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, p. 1, 2015.
- NUNES-ALVES, C. et al. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014.
- NIELSEN, M. et al. MHC Class II epitope predictive algorithms. **Immunology**, v. 130, n. 3, p. 319–328, 2010.
- NEGI, R. R. et al. Investigation of the possible association between the HLA antigens and idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Immunological Investigations**, v. 41, n. 2, p. 117–128, 2012.

- OLIVEIRA, E. S.; MARINHO, J. M.; BARBOSA, T. Interferon-gamma production by mononuclear cells in Bacille Calmette-Guérin-revaccinated healthy volunteers predicted long-term antimycobacterial responses in a randomized controlled trial. **Vaccine**, v. 31, n. 37, p. 3778–3782, 2013.
- ONYEDUM, C. C.; ALOBU, I.; UKWAJA, K. N. Prevalence of drug-resistant tuberculosis in Nigeria: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0180996, 2017.
- ORME, I. M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 94, n. 1, 2014.
- ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 57–63, 2015.
- OTTENHOFF, T. H. M.; KAUFMANN, S. H. E. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002607, 2012.
- O'SHEA, M. K.; MCSHANE, H. A review of clinical models for the evaluation of human TB vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 5, p. 1177–1187, 2016.
- PAUL, S. et al. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 28–34, 2015.
- PATEL, M. et al. HLA class I and class II antigens associated with multiple myeloma in southern Africa. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 24, n. 4, p. 215–219, 2002.
- PAVONI, D. P. et al. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 2, p. 110–116, 2003.
- PAXIMADIS, M. et al. Human leukocyte antigen class I (A, B, C) and II (DRB1) diversity in the black and Caucasian South African population. **Human Immunology**, v. 73, n. 1, p. 80–92, 2012.
- PEAN, P. et al. Natural killer cell degranulation capacity predicts early onset of the immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in HIV-infected patients with tuberculosis. **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3315–3320, 2012.
- PEREIRA, M. P. **Perfil imunoproteômico da resposta humoral na revacinação com *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, a cepa vacinal brasileira contra a tuberculose**. 2009. 128 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.
- PIRIE, F. J. et al. HLA class II antigens in South African Blacks with type I diabetes. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 4, p. 348–352, 2001.
- PRASANNAVAR, D. J. et al. Distribution of HLA-DR β 1 alleles among well-characterized rheumatoid arthritis patients from Western India. **Rheumatology International**, v. 34, n. 5, p. 705–708, 2014.
- QIN, P. et al. Distribution of human leukocyte antigen-A, -B and -DR alleles and haplotypes at high resolution in the population from Jiangsu province of China. **International Journal of Immunogenetics**, v. 38, n. 6, p. 475–481, 2011.

- QUEIROZ, L. L. C. et al. Coverage of the basic immunization schedule in the first year of life in State capitals in Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 294–302, 2013.
- RAMAZANZADEH, R. et al. Prevalence and occurrence rate of Mycobacterium tuberculosis Haarlem family multi-drug resistant in the worldwide population: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 78–88, 2015.
- RASSI, D. M. et al. TNFa-e microsatellite, HLA-DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in Brazilian patients presenting recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1079, p. 300–304, 2006.
- RAVIGLIONE, M. et al. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. **Lancet**, v. 379, n. 9829, p. 1902–1913, 2012.
- REILEY, W. W. et al. ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 10961–10966, 2008.
- RIBAS-SILVA, R. C. et al. Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of Southern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 198, 2013.
- ROY, A. et al. Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 349, p. g4643, 2014.
- ROBINSON, J. et al. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database issue, p. D423–D431, 2015.
- RUGGIERO, G. et al. Allelic distribution of human leucocyte antigen in historical and recently diagnosed tuberculosis patients in Southern Italy. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 318–322, 2004.
- SALIE, M. et al. Associations Between Human Leukocyte Antigen Class I Variants and the Mycobacterium tuberculosis Subtypes Causing Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 216–223, 2014.
- SCHIPPER, R. F. et al. HLA gene haplotype frequencies in bone marrow donors worldwide registries. **Human Immunology**, v. 52, n. 1, p. 54–71, 1997.
- SELVARAJ, P. et al. Influence of HLA-DRB1 alleles on Th1 and Th2 cytokine response to Mycobacterium tuberculosis antigens in pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 87, n. 6, p. 544–550, 2007.
- SHAO, L. N. et al. HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allele and haplotype frequencies of 14,529 Chinese Han bone marrow donors living in Dalian, China. **International Journal of Immunogenetics**, v. 43, n. 2, p. 79–85, 2016.
- SHEN, C. et al. Allelic diversity and haplotype structure of HLA loci in the Chinese Han population living in the Guanzhong region of the Shaanxi province. **Human Immunology**, v. 71, n. 6, p. 627–633, 2010.
- SILVA-CARVALHO, W. H. V. et al. Frequency of the CCR5-delta32 allele in Brazilian populations: A systematic literature review and meta-analysis. **Infection, Genetics and**

Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, v. 43, p. 101–107, 2016.

SMAGINA, I. V. et al. [Genetic risk factors for multiple sclerosis in the population of Altay]. **Zhurnal Nevrologii I Psikiatrii Imeni S.S. Korsakova**, v. 111, n. 5, p. 42–45, 2011.

SMITH, C. M. et al. Tuberculosis Susceptibility and Vaccine Protection Are Independently Controlled by Host Genotype. **mBio**, v. 7, n. 5, 2016.

SOUZA, C. F. et al. HLA and MICA genes in patients with tuberculosis in Brazil. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 1, p. 58–63, 2012.

STERNE, J. A. C. et al. Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. **BMJ**, v. 343, p. d4002, 2011.

STRAETEMANS, M. et al. Assessing Tuberculosis Case Fatality Ratio: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20755, 2011.

SUN, C. et al. HLA-DRB1 alleles are associated with the susceptibility to sporadic Parkinson's disease in Chinese Han population. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e48594, 2012.

SUSLOVA, T. A. et al. HLA gene and haplotype frequencies in Russians, Bashkirs and Tatars, living in the Chelyabinsk Region (Russian South Urals). **International Journal of Immunogenetics**, v. 39, n. 5, p. 394–408, 2012.

TAMERIS, M. et al. Lessons learnt from the first efficacy trial of a new infant tuberculosis vaccine since BCG. **Tuberculosis**, v. 93, n. 2, p. 143–149, 2013.

TIAN, C. et al. The +874T/A polymorphism in the interferon- γ gene and tuberculosis risk: An update by meta-analysis. **Human Immunology**, v. 72, n. 11, p. 1137–1142, 2011.

TIERCY, J.-M. et al. A shared HLA-DRB1 epitope in the DR beta first domain is associated with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in Indian patients. **Molecular Vision**, v. 16, p. 353–358, 2010.

TONG, X. et al. Polymorphisms in HLA-DRB1 gene and the risk of tuberculosis: a meta-analysis of 31 studies. **Lung**, v. 193, n. 2, p. 309–318, 2015.

TRUNZ, B. B.; FINE, P.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. **Lancet**, v. 367, n. 9517, p. 1173–1180, 2006.

USNAYO, M. J. G. et al. Study of the frequency of HLA-DRB1 alleles in Brazilian patients with rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira De Reumatologia**, v. 51, n. 5, p. 474–483, 2011.

VALLINOTO, A. C. R. et al. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Human Immunology**, v. 71, n. 7, p. 692–696, 2010.

VEJBAESYA, S. et al. Associations of HLA class II alleles with pulmonary tuberculosis in Thais. **European Journal of Immunogenetics**, v. 29, n. 5, p. 431–434, 2002.

VITA, R. et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D405–D412, 2015.

- VON HIPPEL, P. T. The heterogeneity statistic I² can be biased in small meta-analyses. **BMC Medical Research Methodology**, v. 15, 2015.
- WANG, F. et al. HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allele and haplotype frequencies in 6384 umbilical cord blood units and transplantation matching and engraftment statistics in the Zhejiang cord blood bank of China. **International Journal of Immunogenetics**, v. 41, n. 1, p. 13–19, 2014.
- WANG, H. et al. HLA-DPB1 0501 is associated with susceptibility to anti-aquaporin-4 antibodies positive neuromyelitis optica in southern Han Chinese. **Journal of Neuroimmunology**, v. 233, n. 1–2, p. 181–184, 2011.
- WANG, P. et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 568, 2010.
- WANG, P. et al. A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach. **PLoS Computational Biology**, v. 4, n. 4, 2008.
- WELLS, George. et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of case-control studies in meta-analyses. **European Journal of Epidemiology**, 25. 603-605, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. End TB. Geneva: World Health Organization, 2016.
- WU, X.-M. et al. Association of susceptibility to multiple sclerosis in Southern Han Chinese with HLA-DRB1, -DPB1 alleles and DRB1-DPB1 haplotypes: distinct from other populations. **Multiple Sclerosis**, v. 15, n. 12, p. 1422–1430, 2009.
- XIE, Y.-C. et al. Association between HLA-DRB1 and myasthenia gravis in a northern Han Chinese population. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 18, n. 11, p. 1524–1527, 2011.
- YANG, P. et al. A Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between Hypertension and Tinnitus. **International Journal of Hypertension**, v. 2015, 2015.
- ZHAO, J.-J. et al. Association of human leukocyte antigen gene polymorphism and mesangial proliferative glomerulonephritis in a large population-based study. **Biomedical Reports**, v. 1, n. 5, p. 751–756, 2013.
- ZHANG, F. et al. Evidence for an association of HLA-DRB1*15 and DRB1*09 with leprosy and the impact of DRB1*09 on disease onset in a Chinese Han population. **BMC Medical Genetics**, v. 10, p. 133, 2009.
- ZHOU, Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; LAUSCHKE, V. M. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 102, n. 4, p. 688–700, 2017.

APÊNDICES

Apêndice 1.

Escala de Avaliação *Newcastle-Ottawa* adaptada: Estudo de Corte Transversal

Título: _____

Autores: _____

SELEÇÃO		SCORE
1	<i>Representatividade da amostra</i>	
	<input type="checkbox"/> O estudo avaliou todos os indivíduos da população determinada	1 ponto
	<input type="checkbox"/> A amostra é representativa da média da comunidade (amostragem probabilística e medida efetuada com padrão-ouro)	1 ponto
	<input type="checkbox"/> A amostra é relativamente representativa da média da comunidade (amostragem probabilística e medida efetuada com questionário não validado)	1 ponto
	<input type="checkbox"/> A amostra foi selecionada de um grupo de voluntários (sem amostragem probabilística e medida efetuada com padrão-ouro)	0
	<input type="checkbox"/> Não houve descrição da origem da amostra	0
2	<i>Os resultados de interesse não estavam previamente determinados no início do estudo</i>	
	<input type="checkbox"/> Sim	1 ponto
	<input type="checkbox"/> Não	0
3	<i>Aleatorização da amostra</i>	
	<input type="checkbox"/> Sim	1 ponto
	<input type="checkbox"/> Não	0
	<input type="checkbox"/> Não se aplica (o estudo avaliou todos os indivíduos da população determinada - item 1)	1 ponto
4	<i>Critérios de inclusão e exclusão claramente definidos</i>	
	<input type="checkbox"/> Sim	1 ponto
	<input type="checkbox"/> Não	0
METODOLGIA		SCORE
1	<i>Métodos de medição das variáveis de interesse</i>	
	<input type="checkbox"/> O estudo utilizou dois ou mais métodos para a variável de interesse, tendo como método padrão-ouro como principal (PCR-SSP)	2 pontos
	<input type="checkbox"/> O estudo utilizou apenas o método padrão-ouro (PCR-SSP) para avaliação da variável de interesse	1 ponto
	<input type="checkbox"/> O estudo não utilizou o método padrão-ouro	0
2	<i>Objetivos da pesquisa</i>	
	<input type="checkbox"/> O estudo teve como principal objetivo avaliar a frequência alélica dos sujeitos	1 ponto
	<input type="checkbox"/> O estudo teve como objetivo secundário avaliar a frequência alélica dos sujeitos	1 ponto

RESULTADOS		SCORE
1	<i>Avaliação dos resultados</i>	
	(<input type="checkbox"/>) O estudo descreveu a associação entre as variáveis (freq. alélica x diferentes indivíduos)	1 ponto
	(<input type="checkbox"/>) Descrição dos resultados sem análise estatística exposta	0
	(<input type="checkbox"/>) Não há descrição sobre a avaliação dos resultados	0
2	<i>Perdas durante a coleta, armazenamento e/ou análise das amostras</i>	
	(<input type="checkbox"/>) Todas as amostras coletadas foram analisadas	1 ponto
	(<input type="checkbox"/>) A perda das amostras é pequena e não parece introduzir vieses (<i>bias</i>)	1 ponto
	(<input type="checkbox"/>) A perda das amostras chega a 90% e não descrição das perdas	0
	(<input type="checkbox"/>) Percentual de perdas não declarado no estudo	0

Instrução: Um estudo pode apresentar no máximo um ponto para cada questão das sessões Seleção e Resultados e, no máximo, dois pontos para a sessão Metodologia. Portanto, o máximo de estrelas que poderá ser alcançado por cada estudo será 9.

Pontuação (score):

0-3 → Baixa qualidade

4-6 → Qualidade apropriada

7-9 → Alta qualidade

Apêndice 2. Figura suplementar 1. *Funnel plots* dos artigos selecionados para a metanálise, no Brasil, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

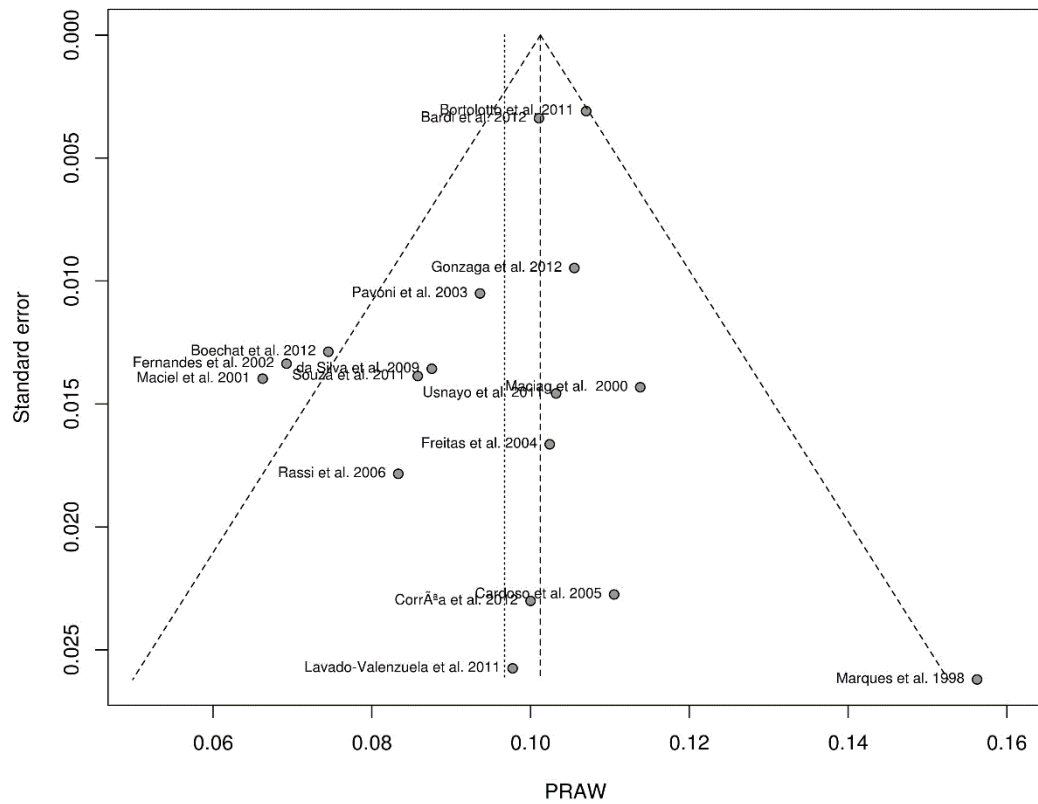


Figura suplementar 1A. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*01.

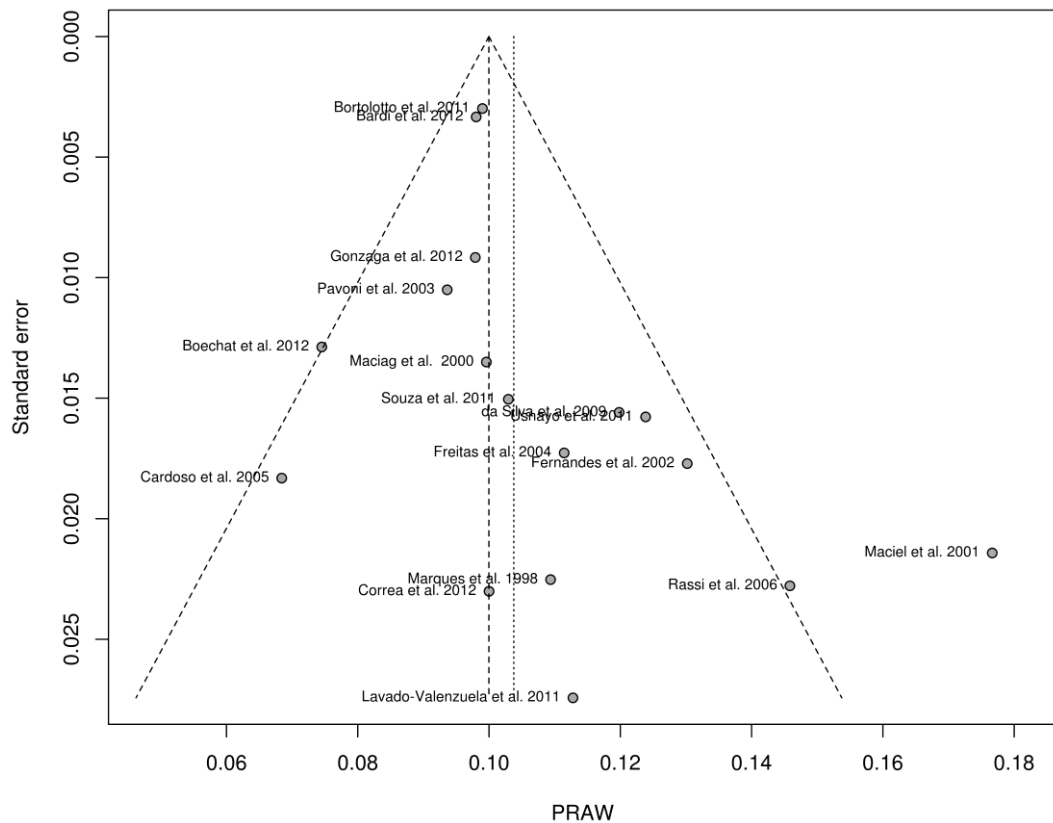


Figura suplementar 1B. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*03.

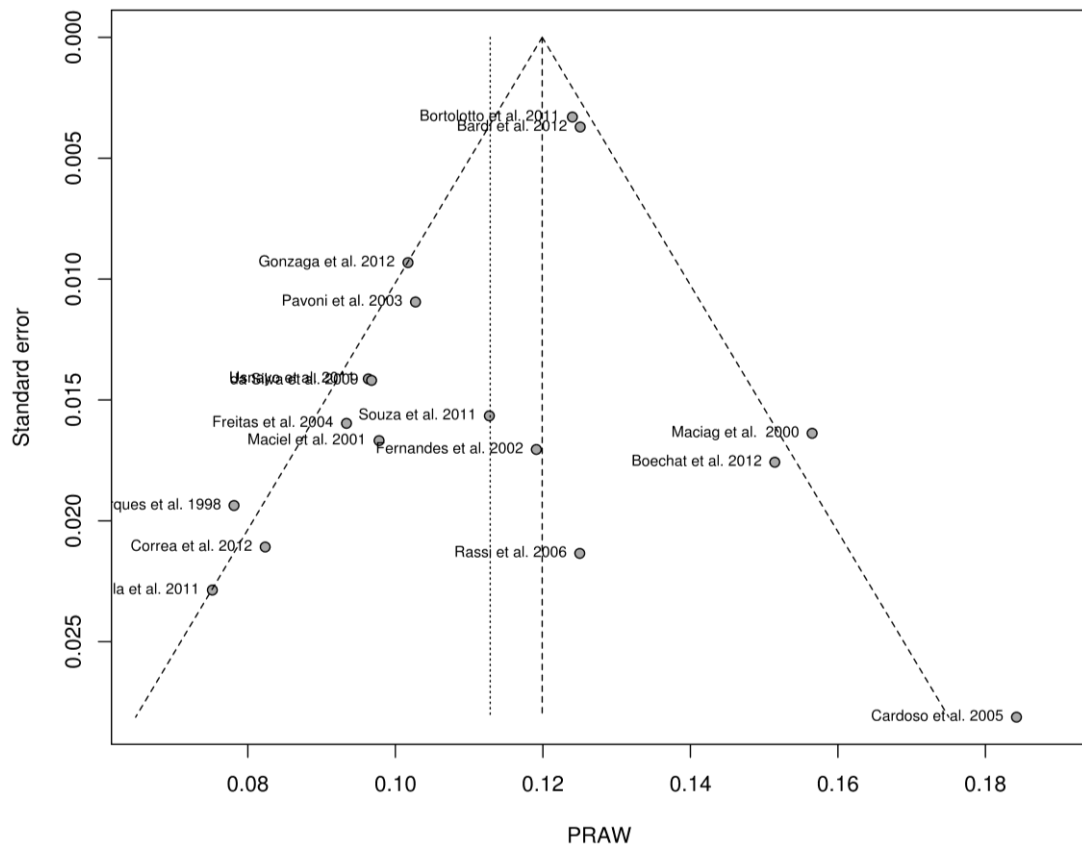


Figura suplementar 1C. Funnel plot dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*04.

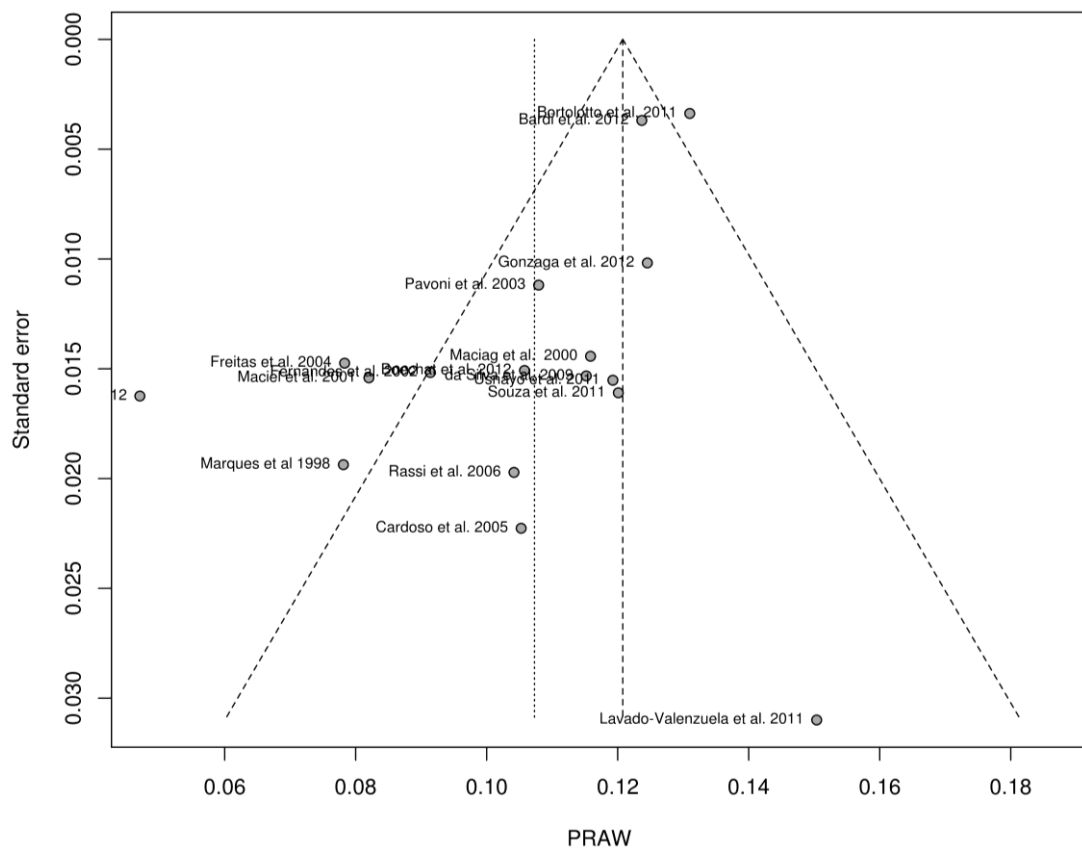


Figura suplementar 1D. Funnel plot dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*07.

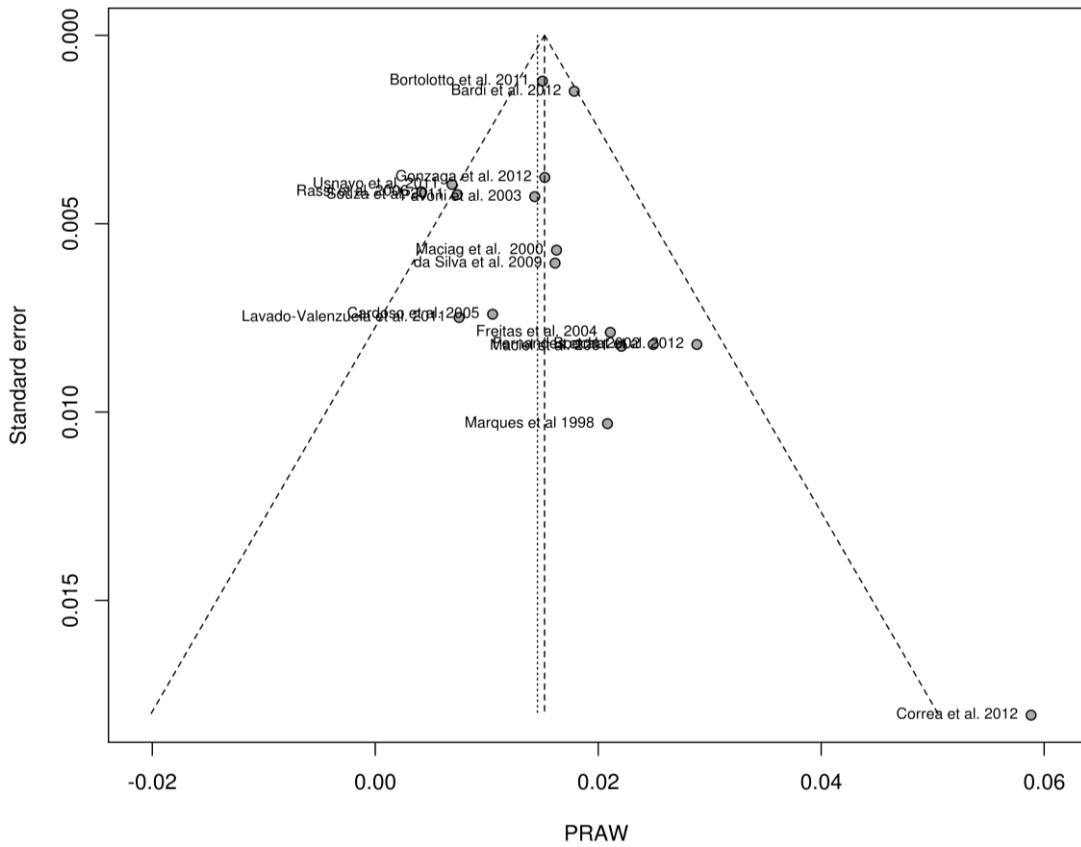


Figura suplementar 1E. Funne plot dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*09.

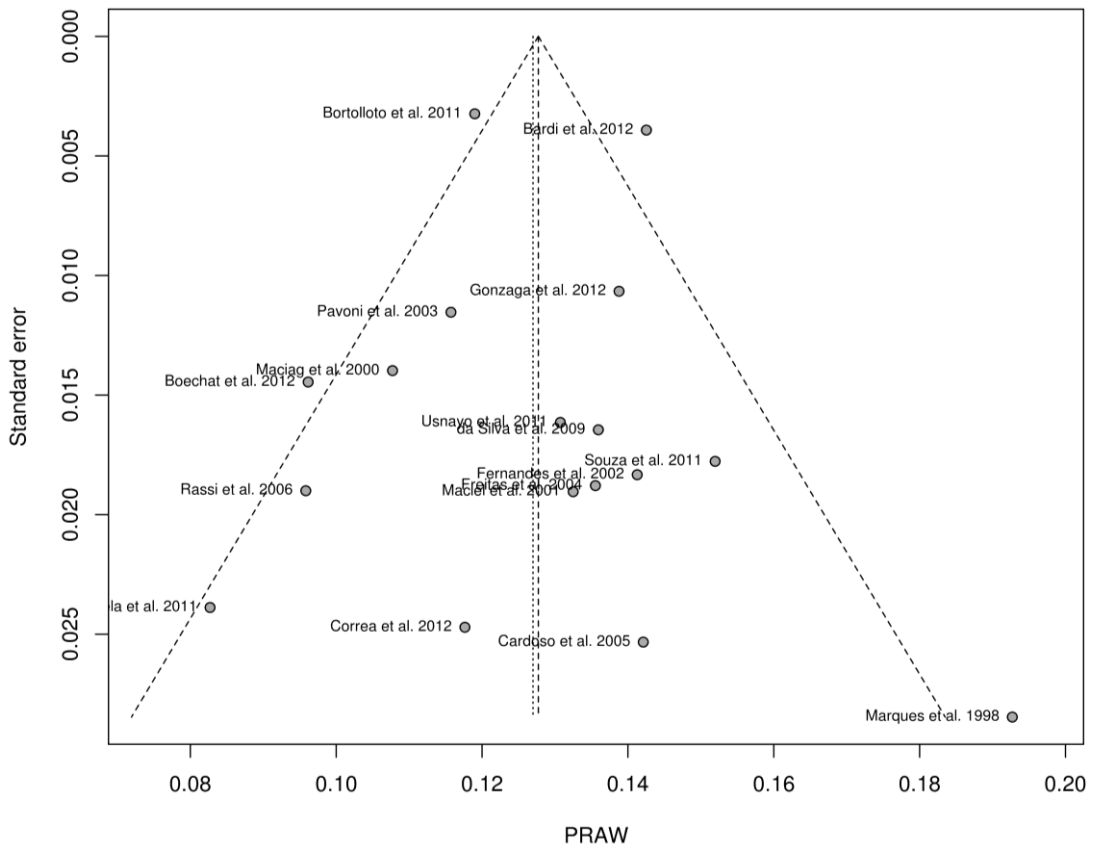


Figura suplementar 1F. Funnel plot dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*11.

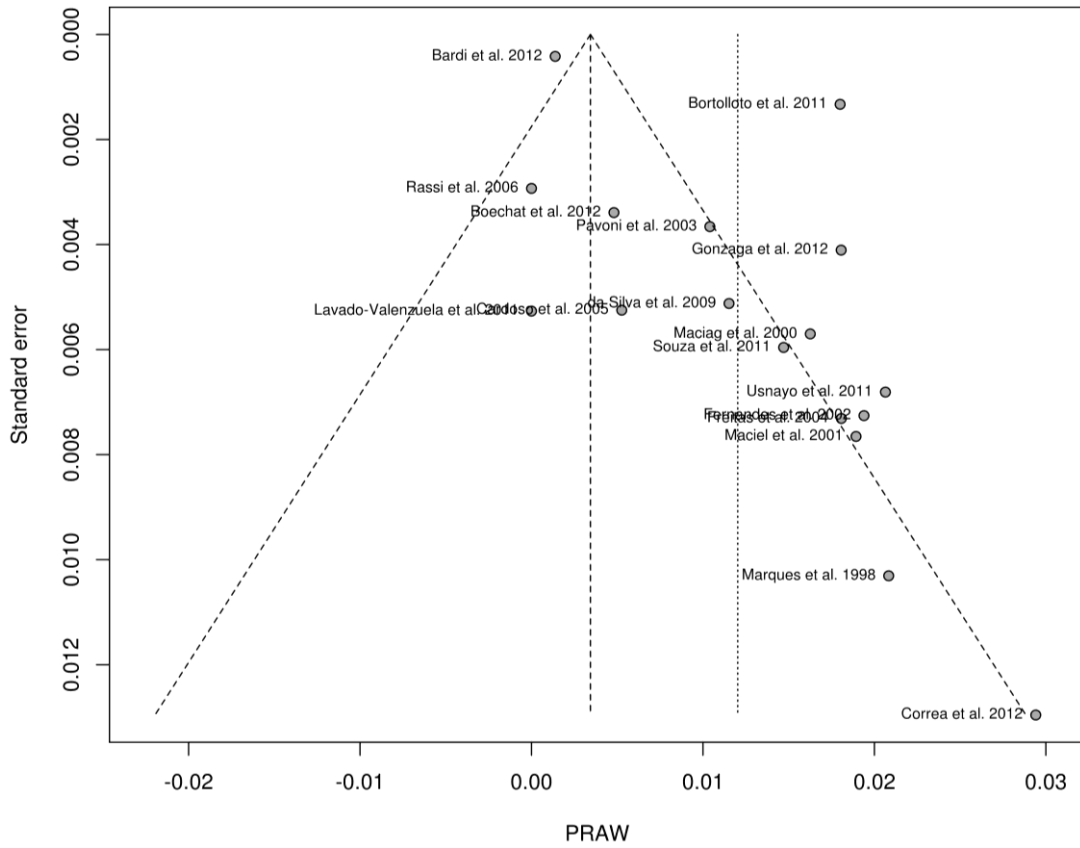


Figura suplementar 1G. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*12.

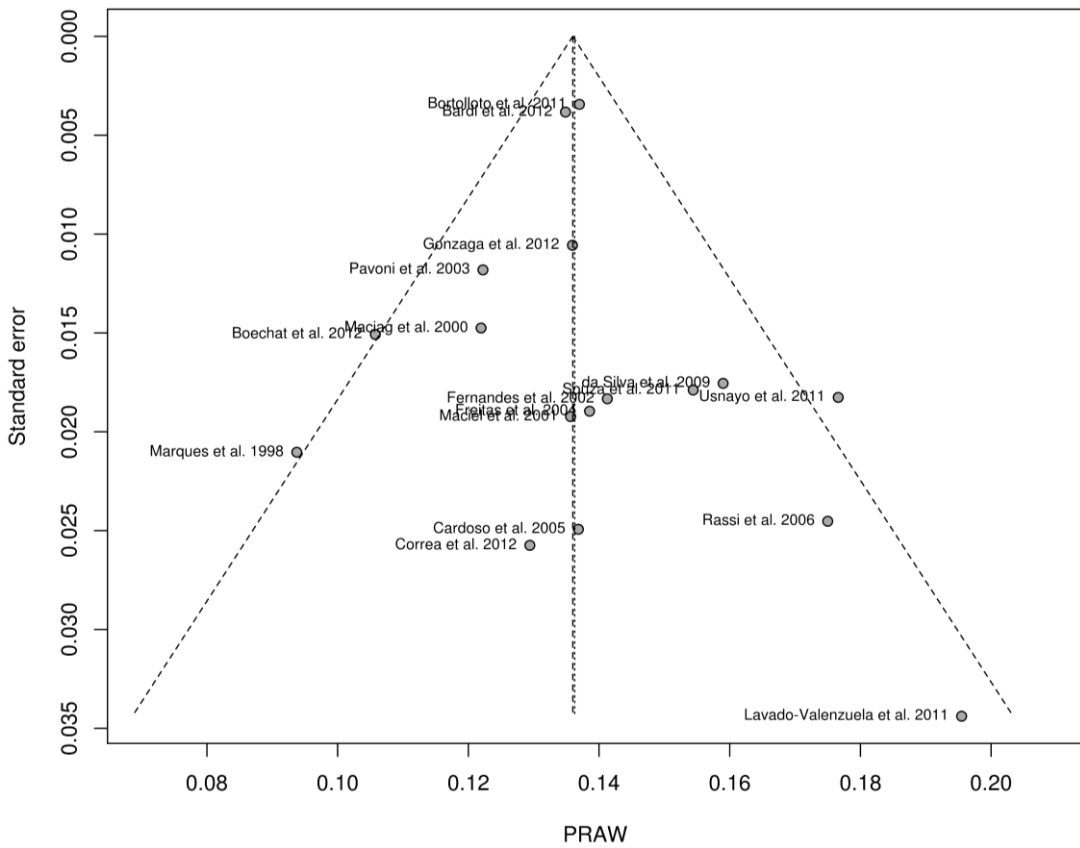


Figura suplementar 1H. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*13.

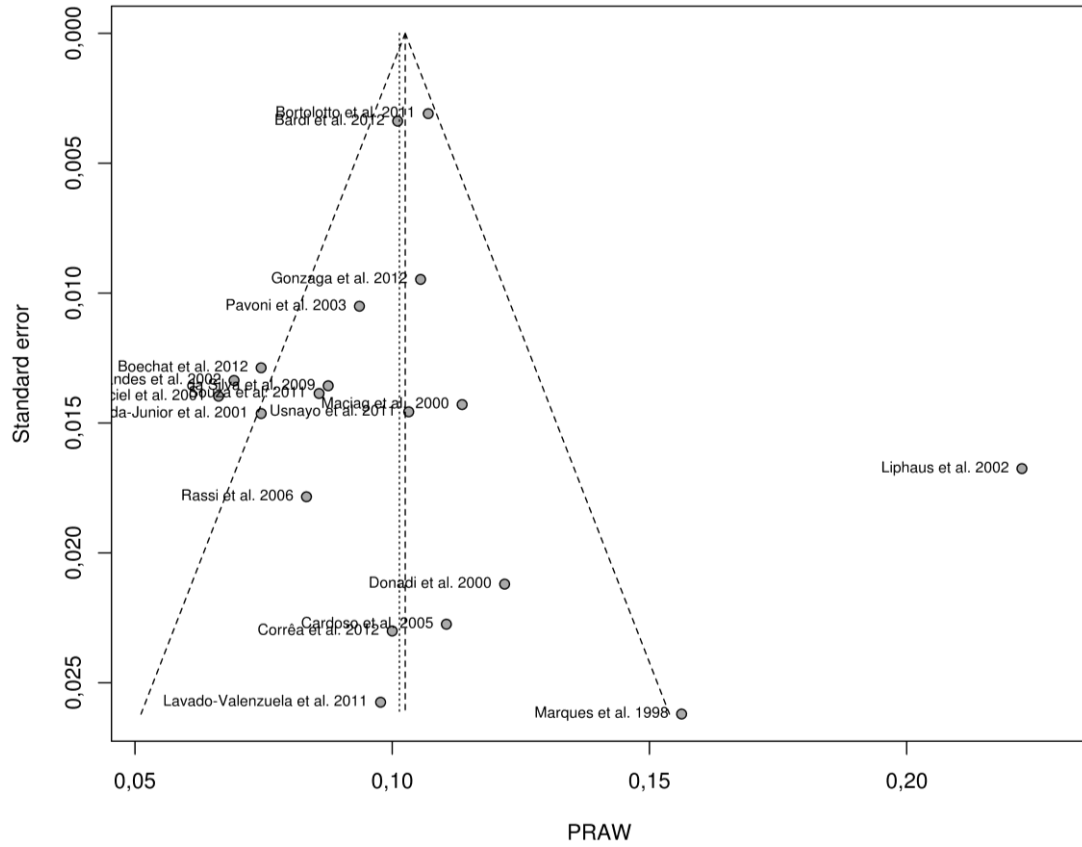


Figura suplementar 11. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*15.

Apêndice 3. Figura suplementar 2. *Funnel plots* dos artigos selecionados para a metanálise, na Rússia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

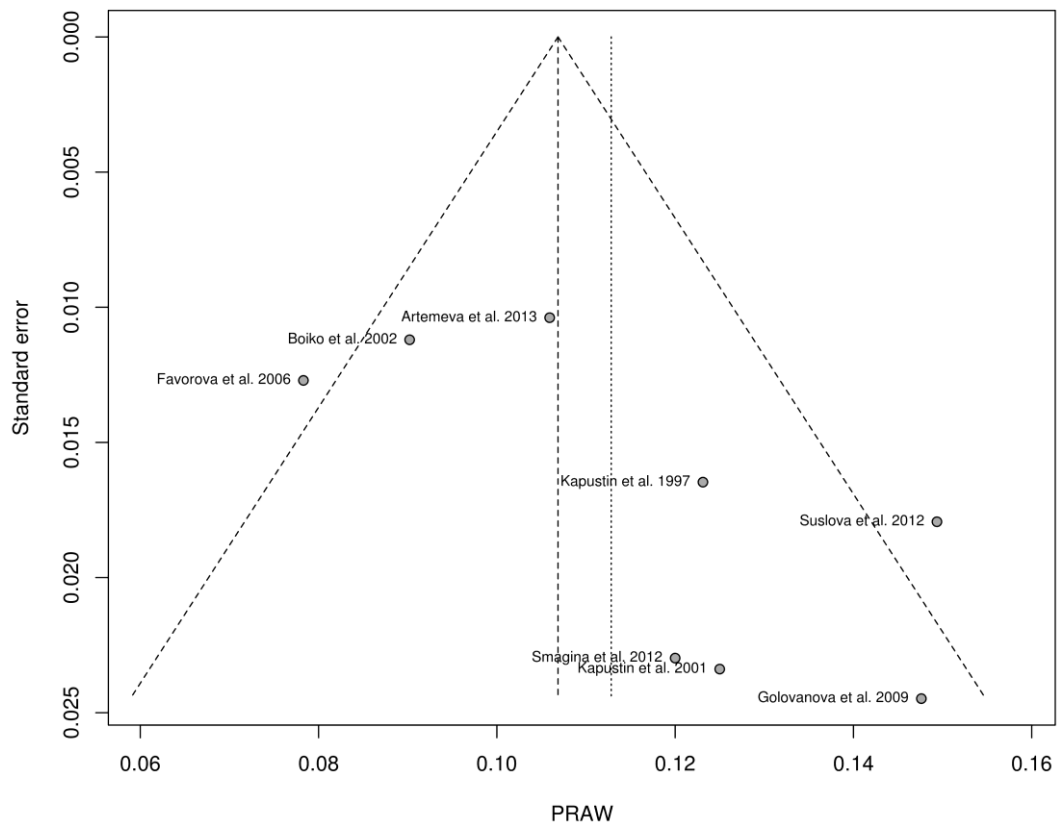


Figura suplementar 2A. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*01.

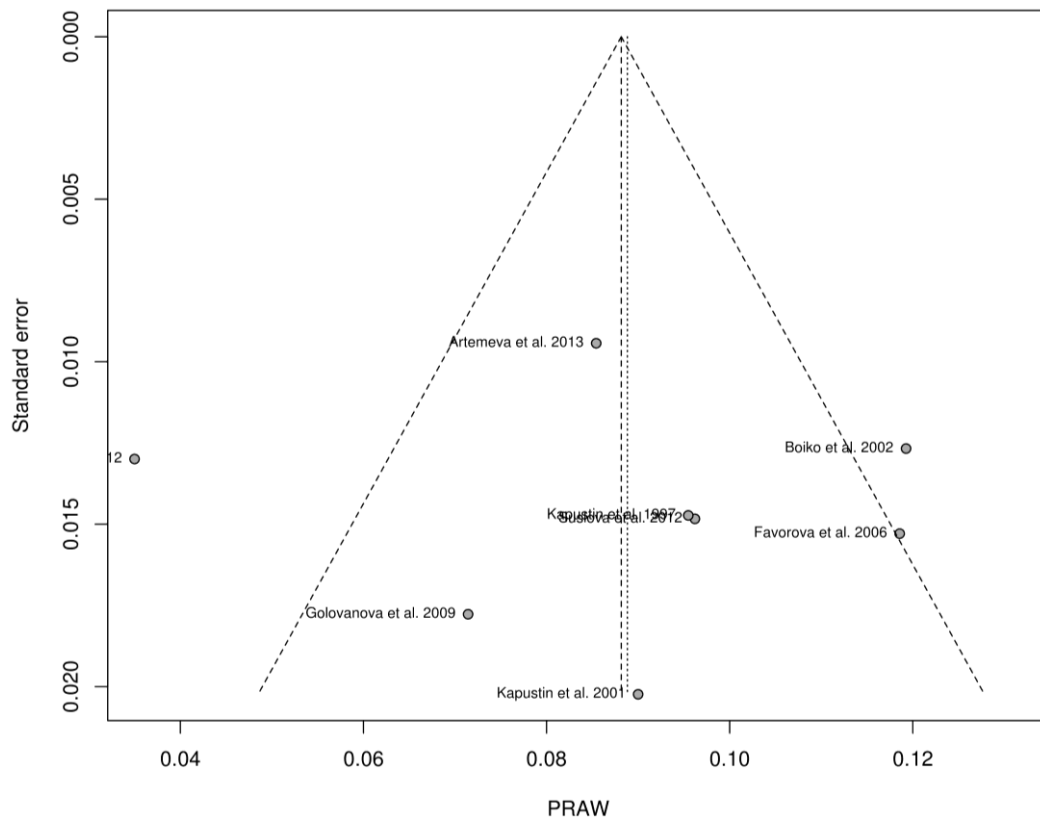


Figura suplementar 2B. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*03.

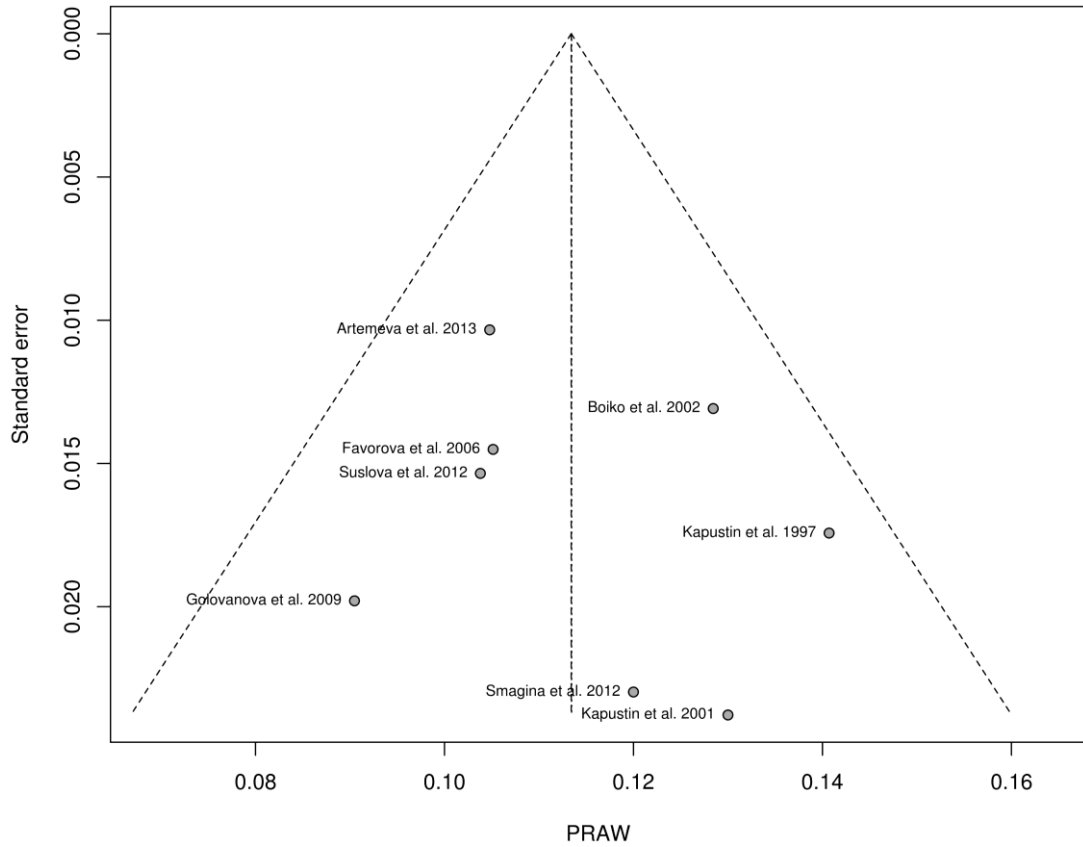


Figura suplementar 2C. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*04.

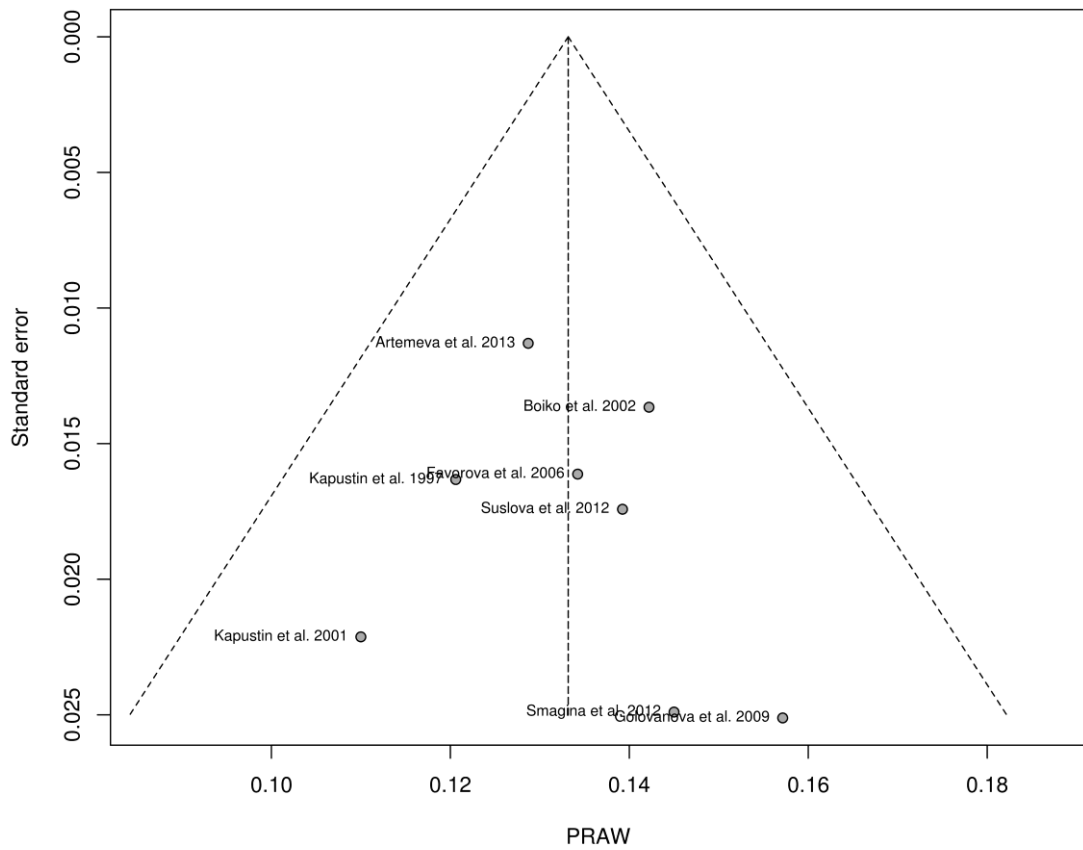


Figura suplementar 2D. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*07.

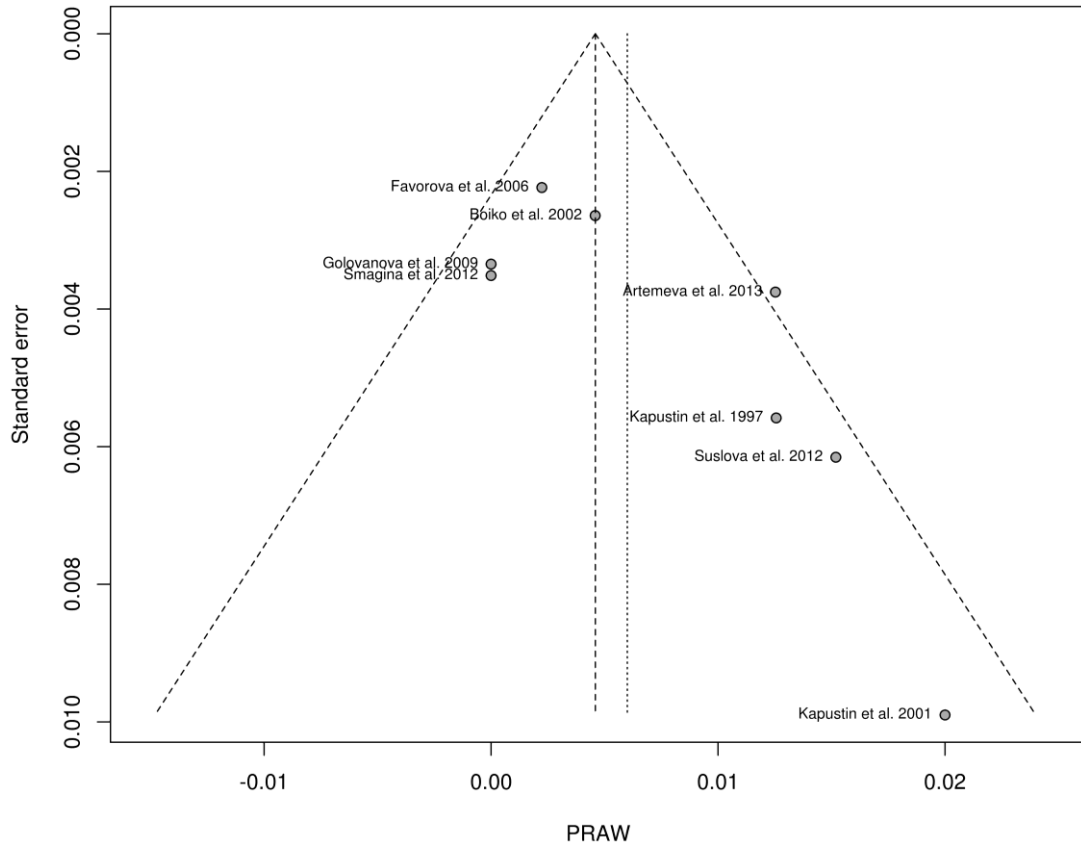


Figura suplementar 2E. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*09.

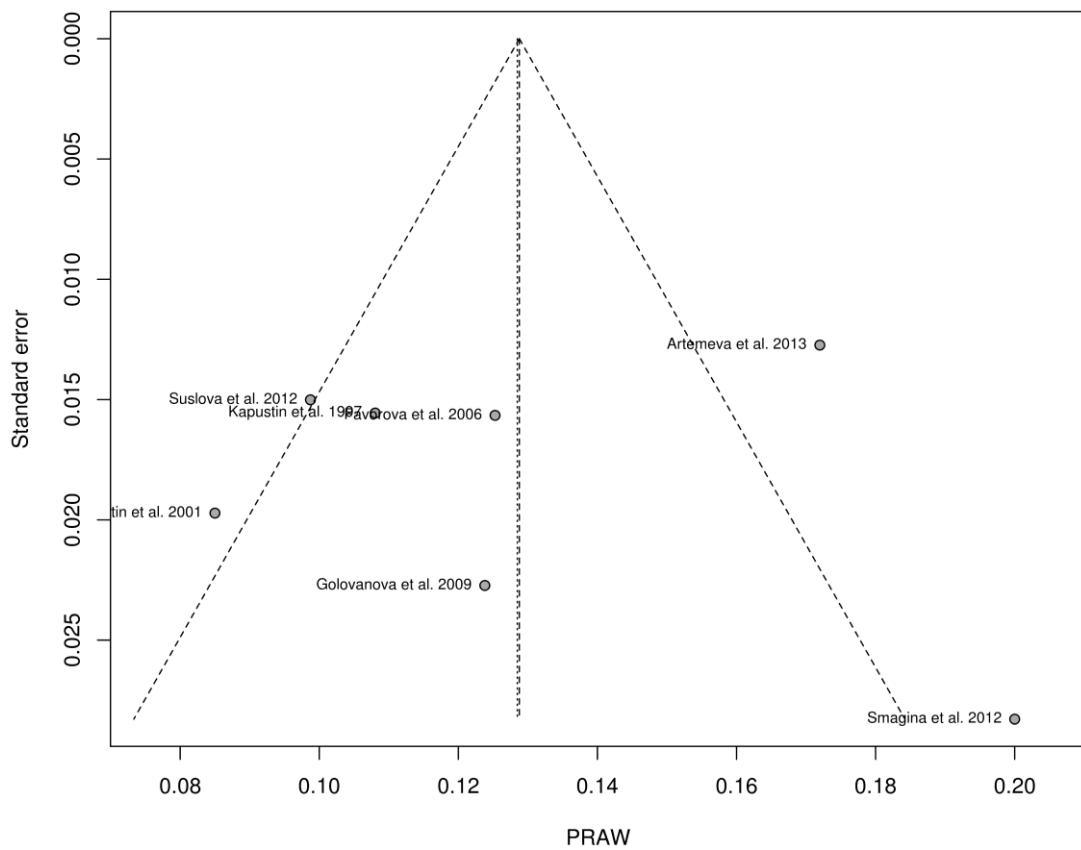


Figura suplementar 2F. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*11.

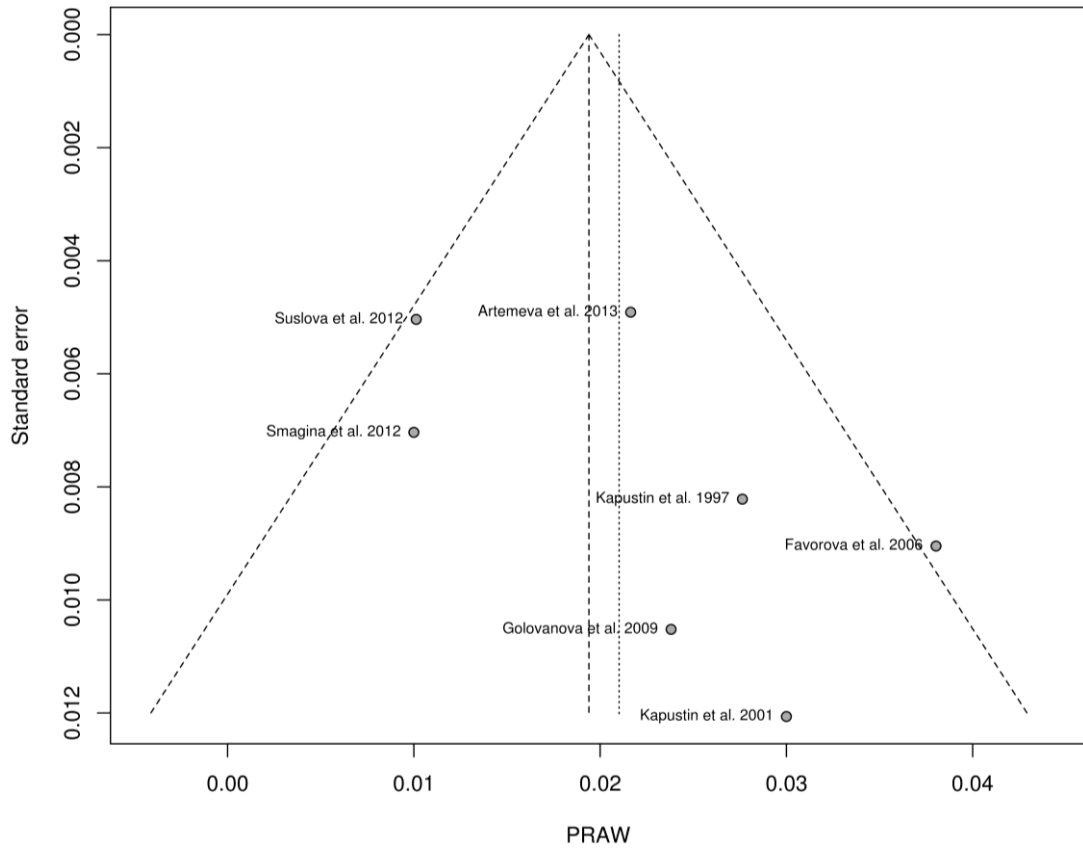


Figura suplementar 2G. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*12.

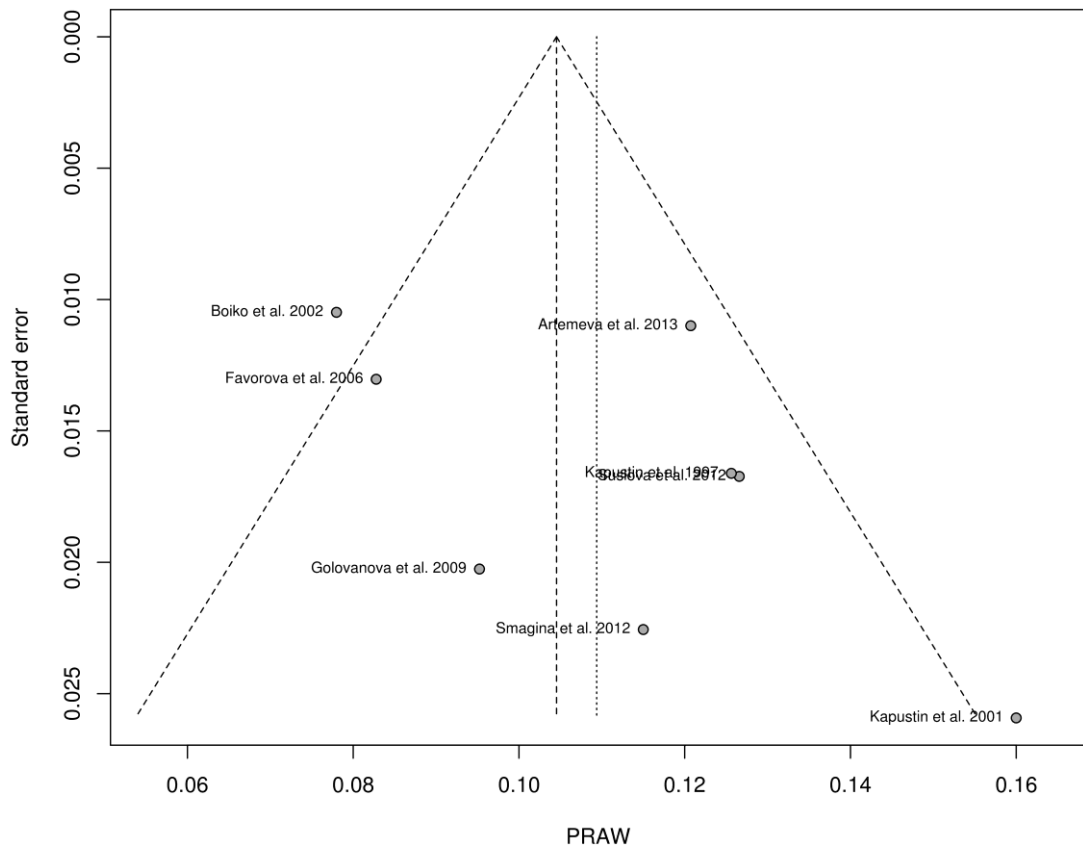


Figura suplementar 2H. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*13.

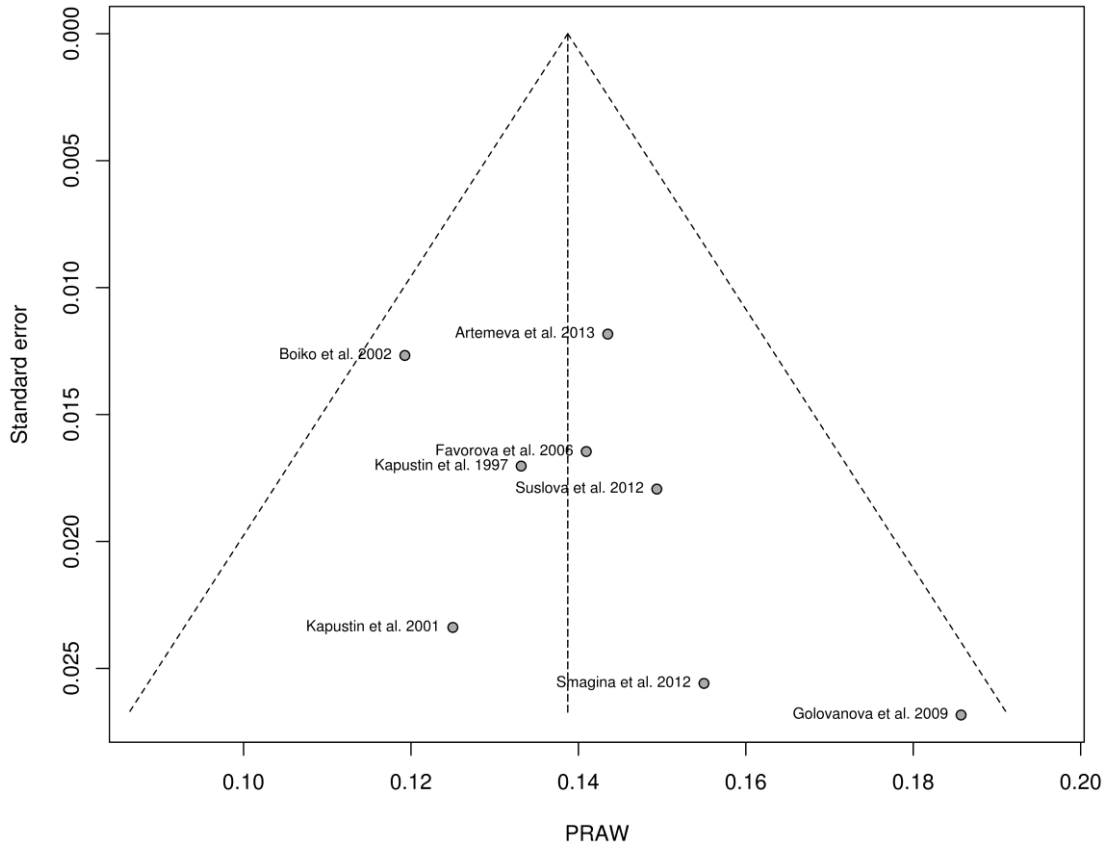


Figura suplementar 2I. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*15.

Anexo 4. Figura suplementar 3. *Funnel plots* dos artigos selecionados para a metanálise, na Índia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

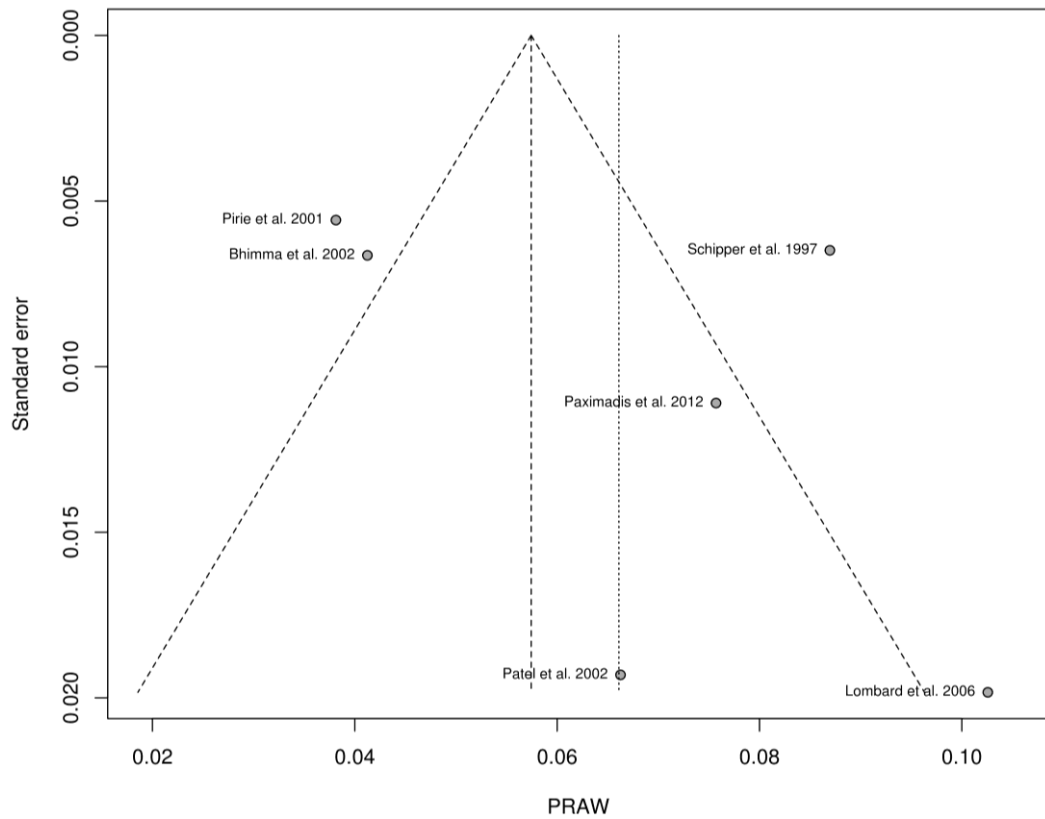


Figura suplementar 3A. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*01.

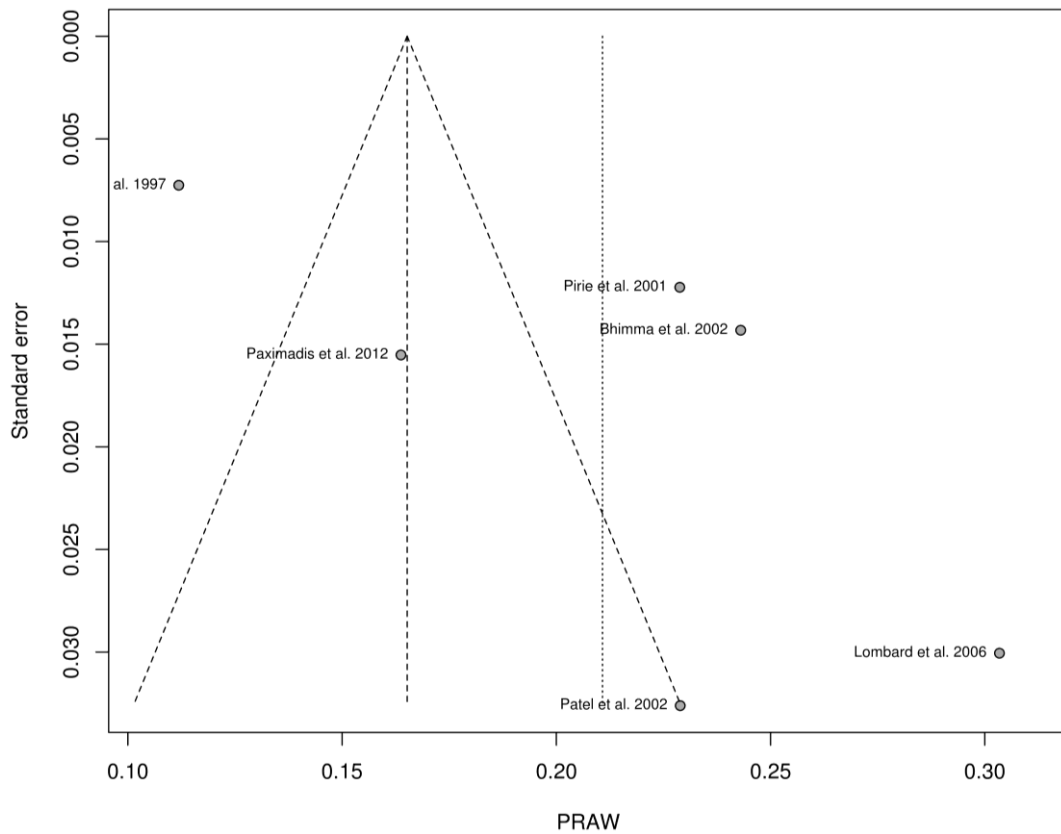


Figura suplementar 3B. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*03.

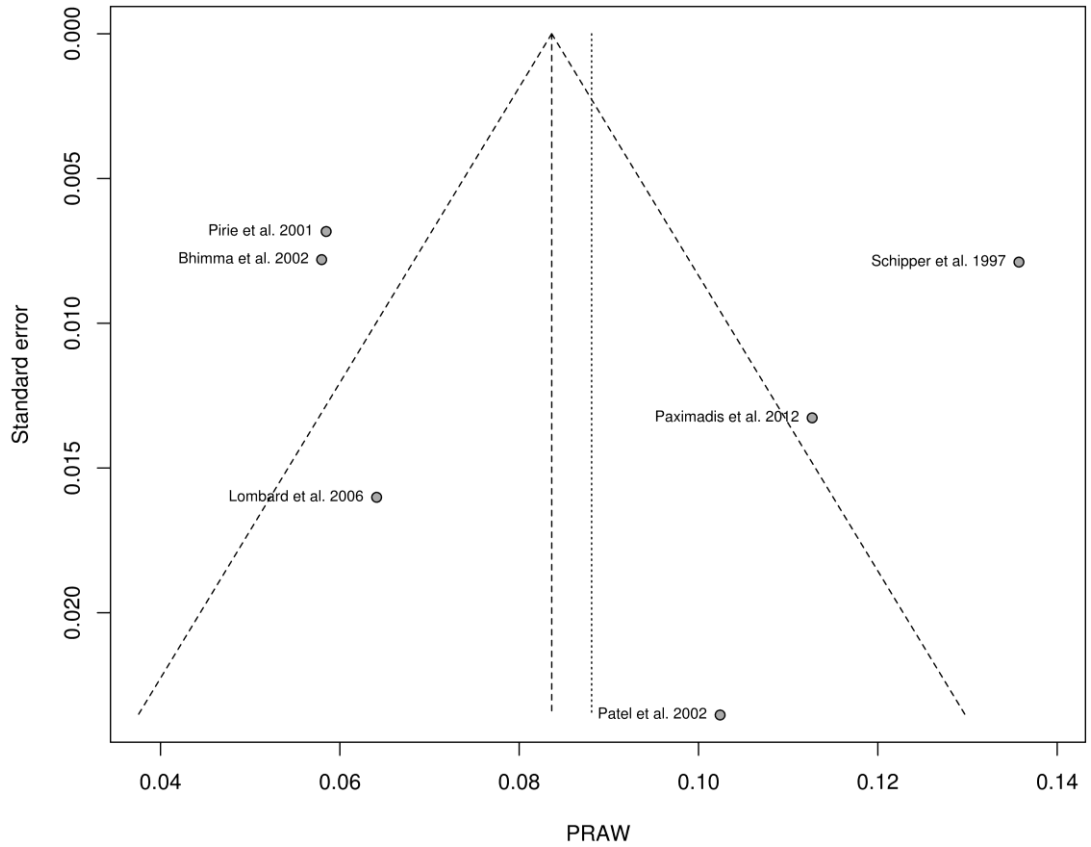


Figura suplementar 3C. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*04.

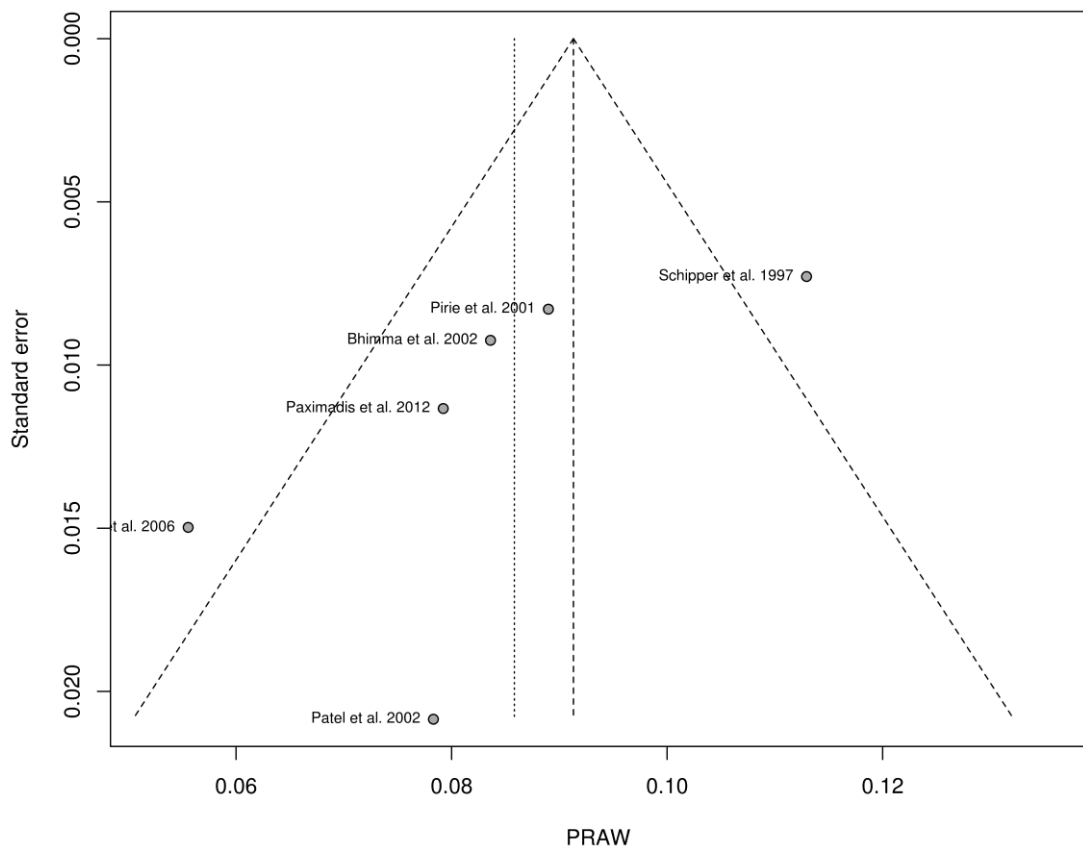


Figura suplementar 3D. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*07.

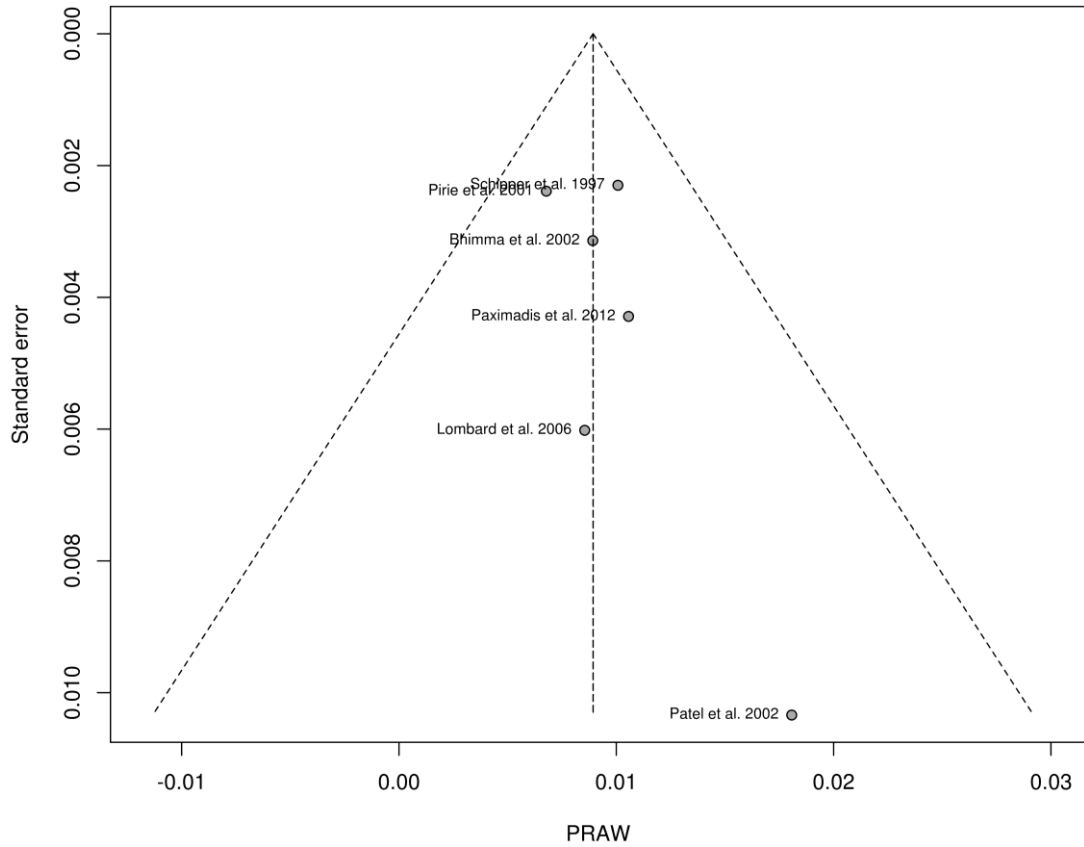


Figura suplementar 3E. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*09.

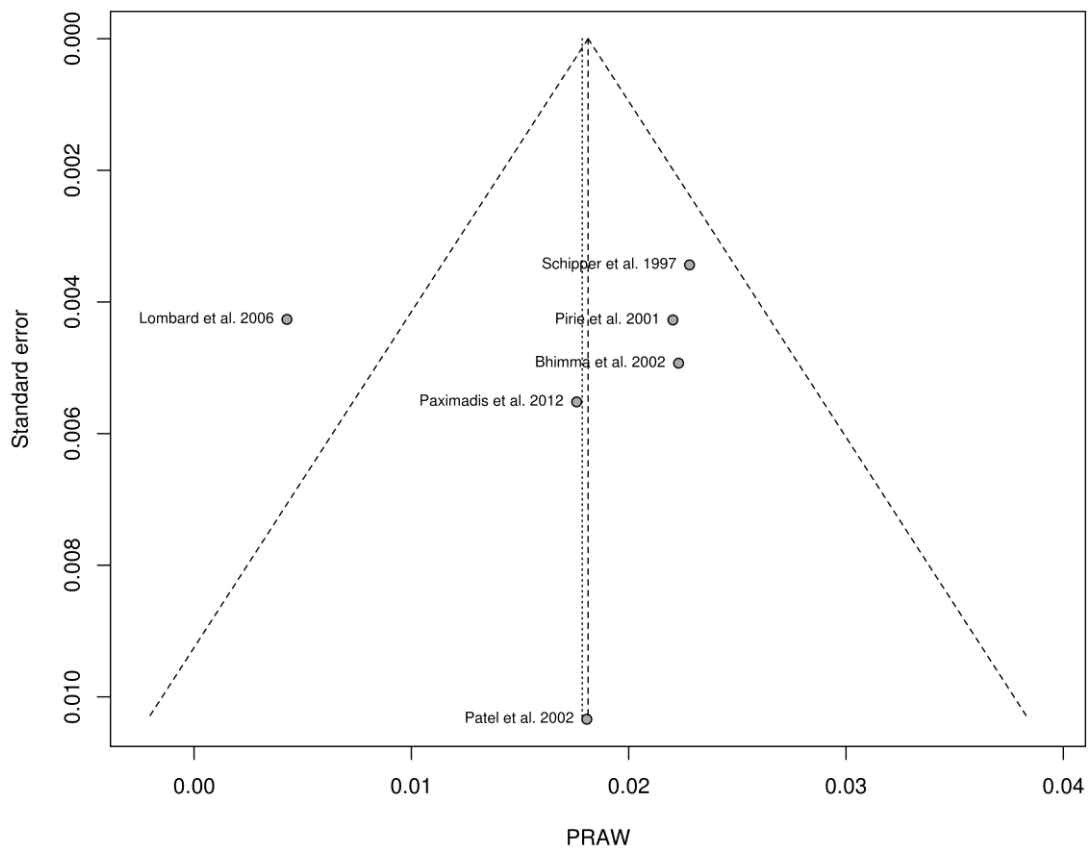


Figura suplementar 3F. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*11.

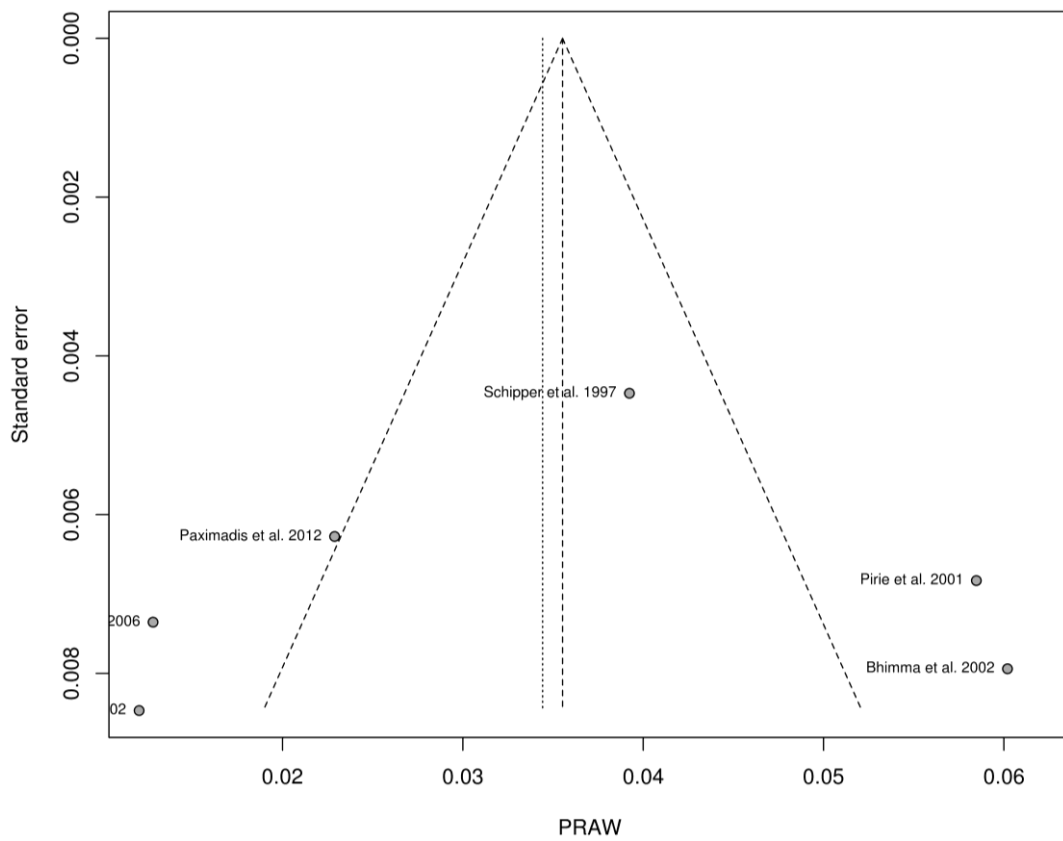


Figura suplementar 3G. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*12.

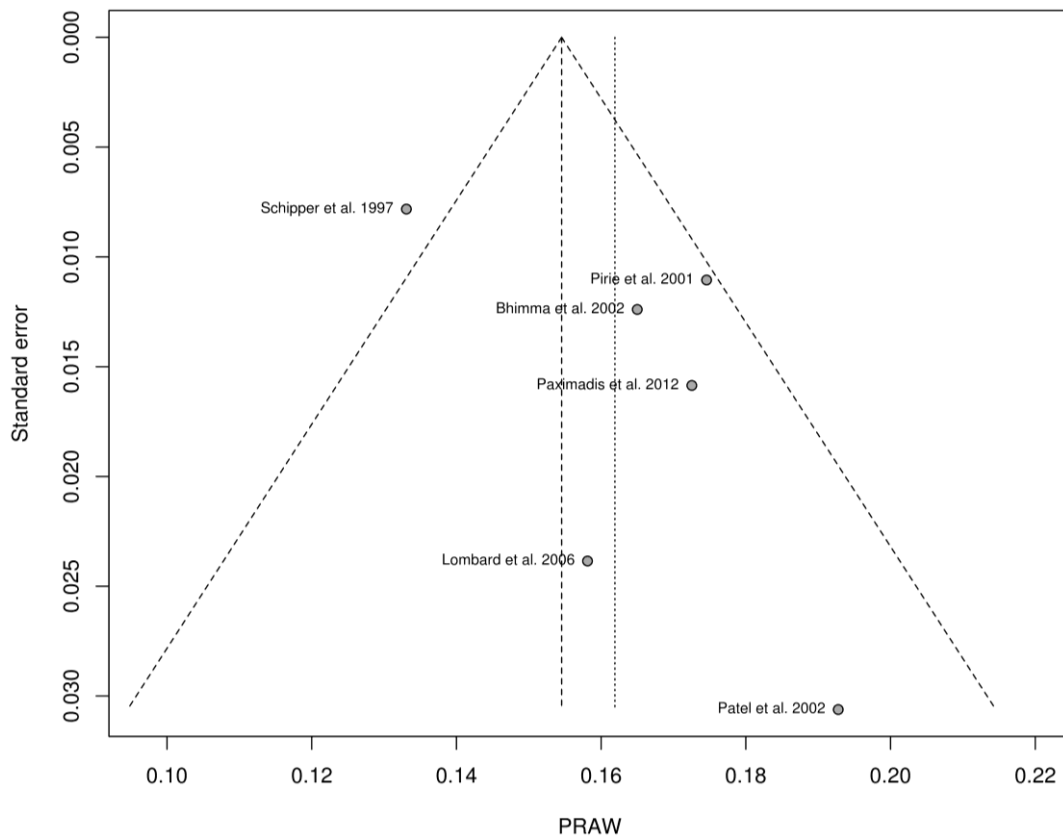


Figura suplementar 3H. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*13.

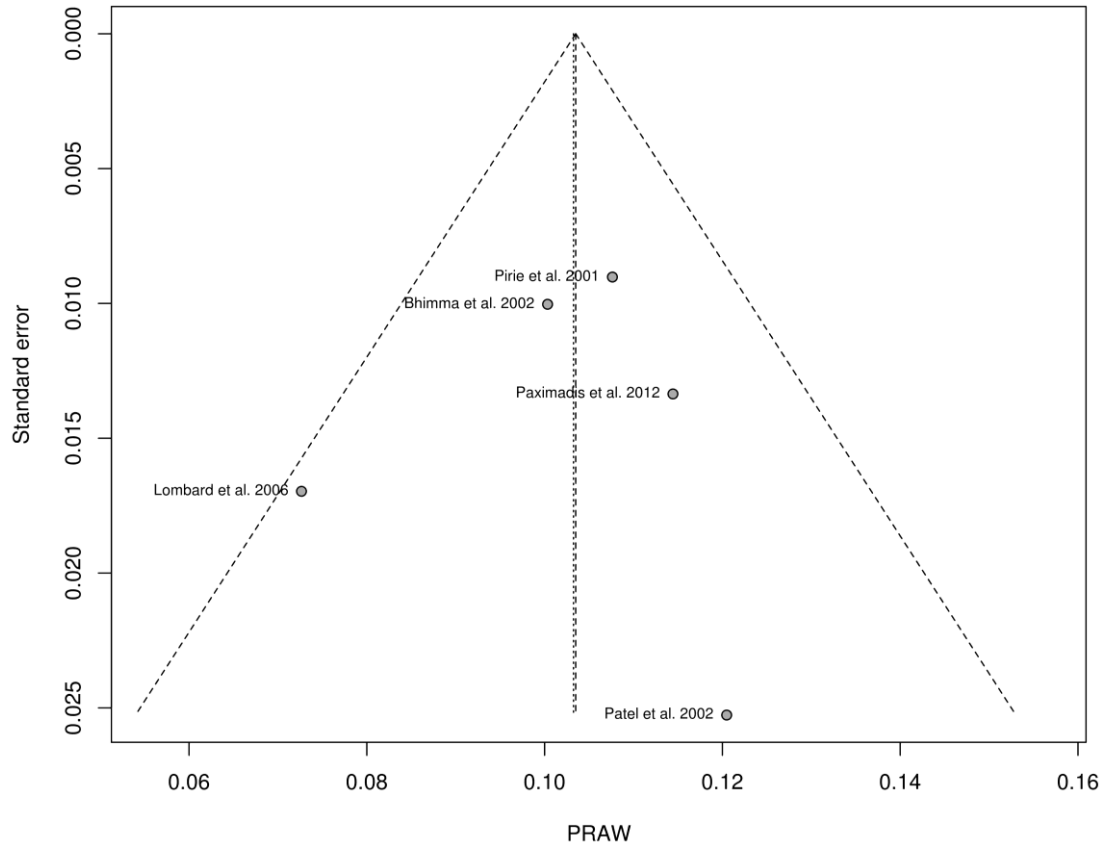


Figura suplementar 3I. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*15.

Apêndice 5. Figura suplementar 4. *Funnel plots* dos artigos selecionados para a metanálise, na China, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

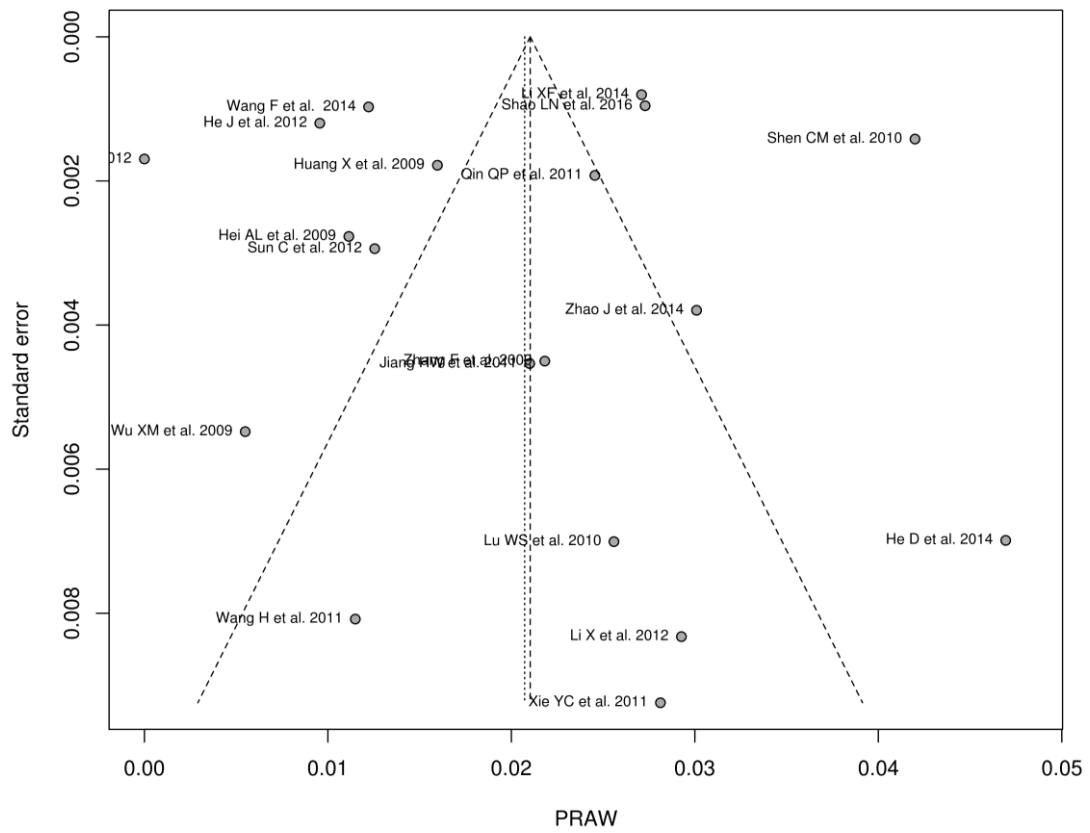


Figura suplementar 4A. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*01.

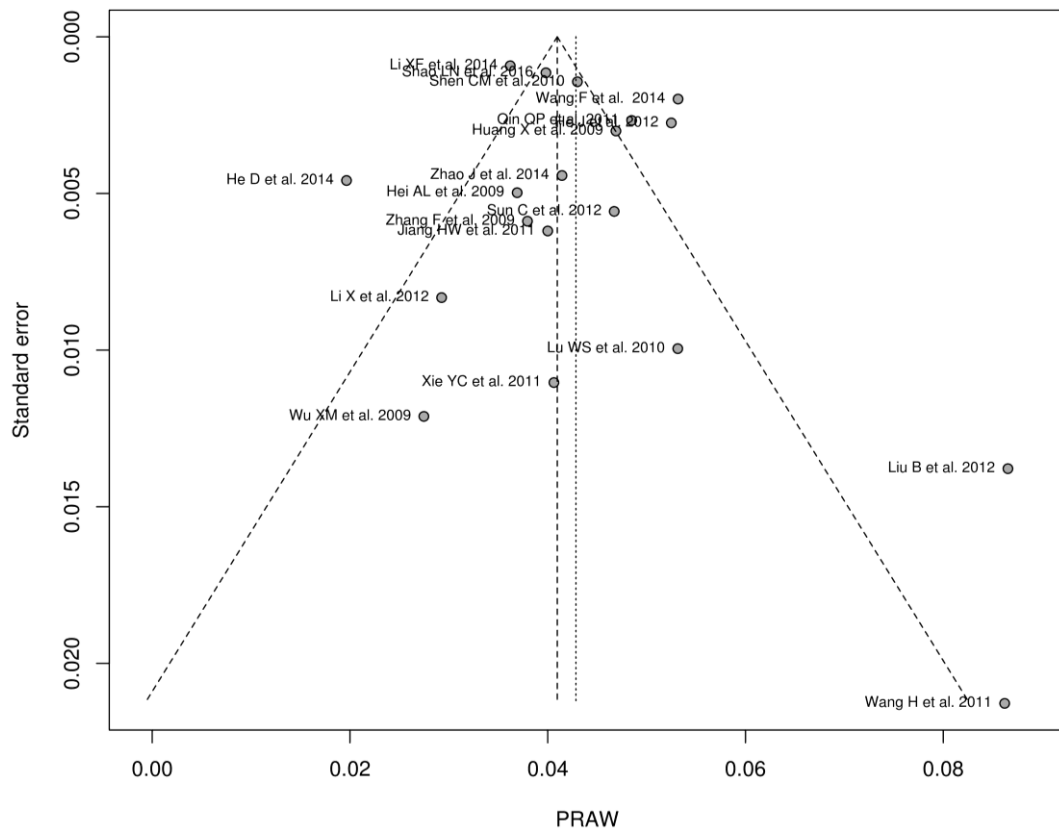


Figura suplementar 4B. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*03.

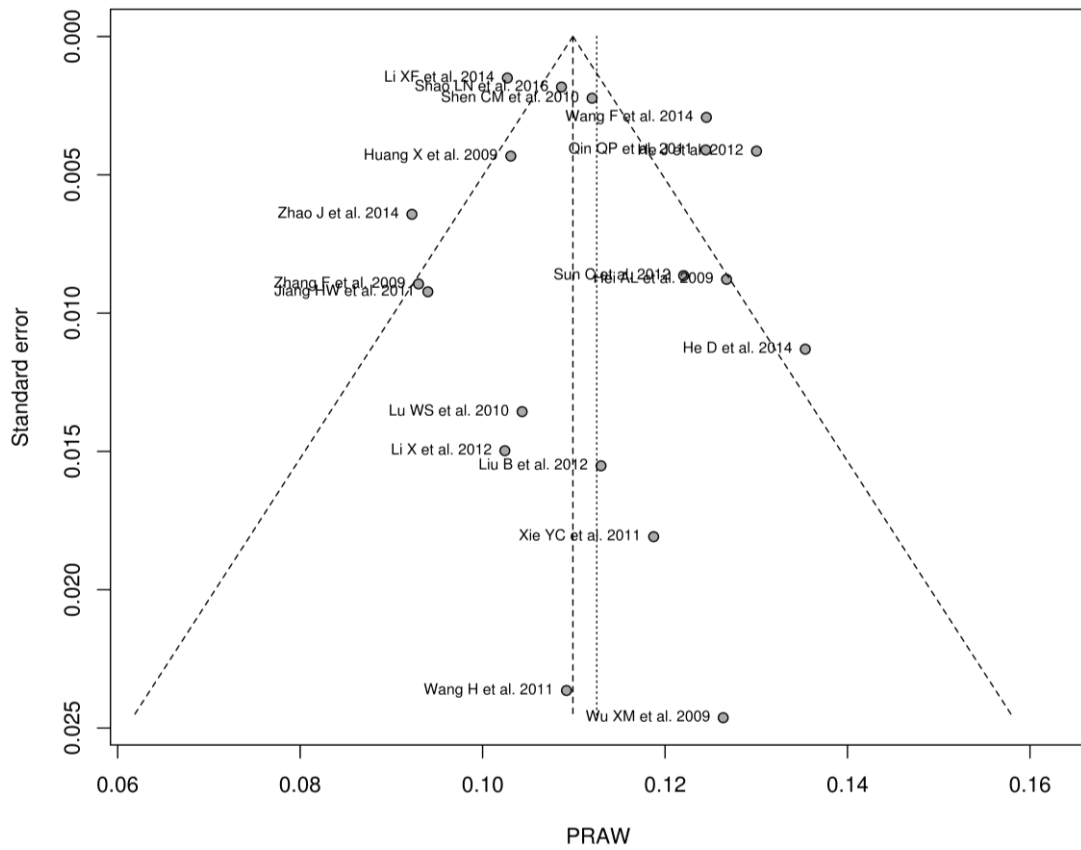


Figura suplementar 4C. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*04.

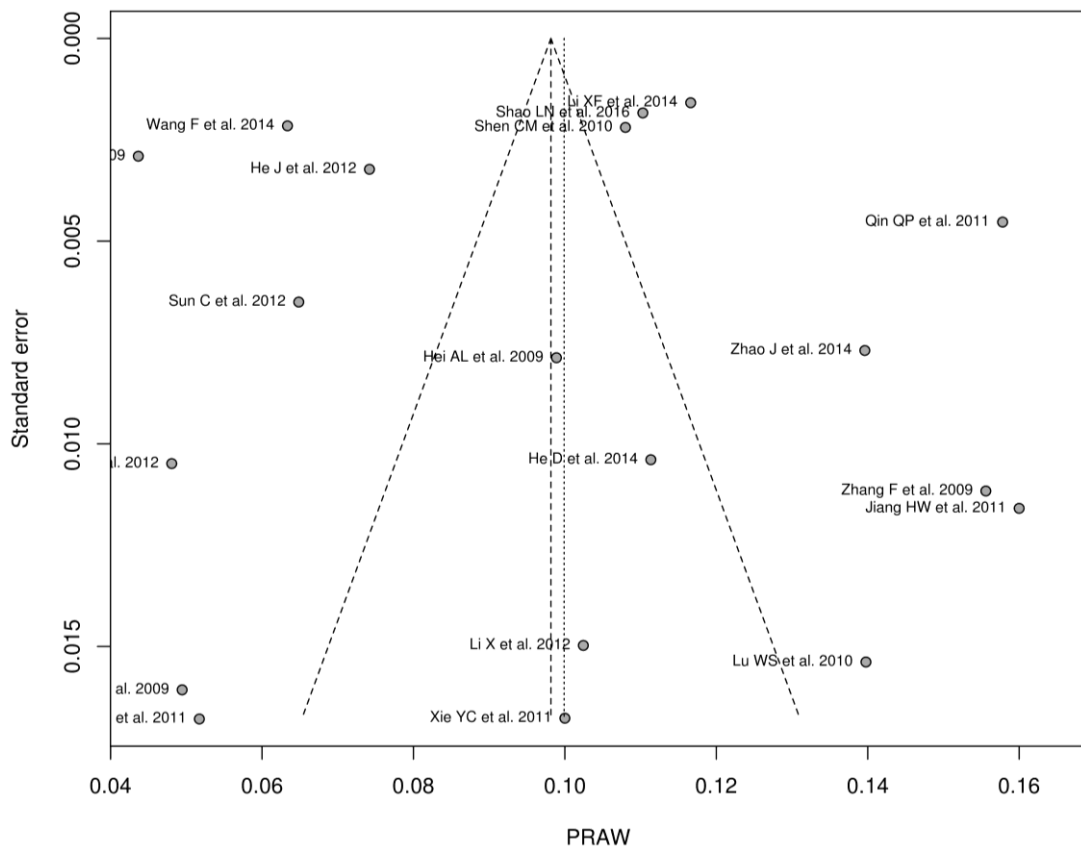


Figura suplementar 4D. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*07.

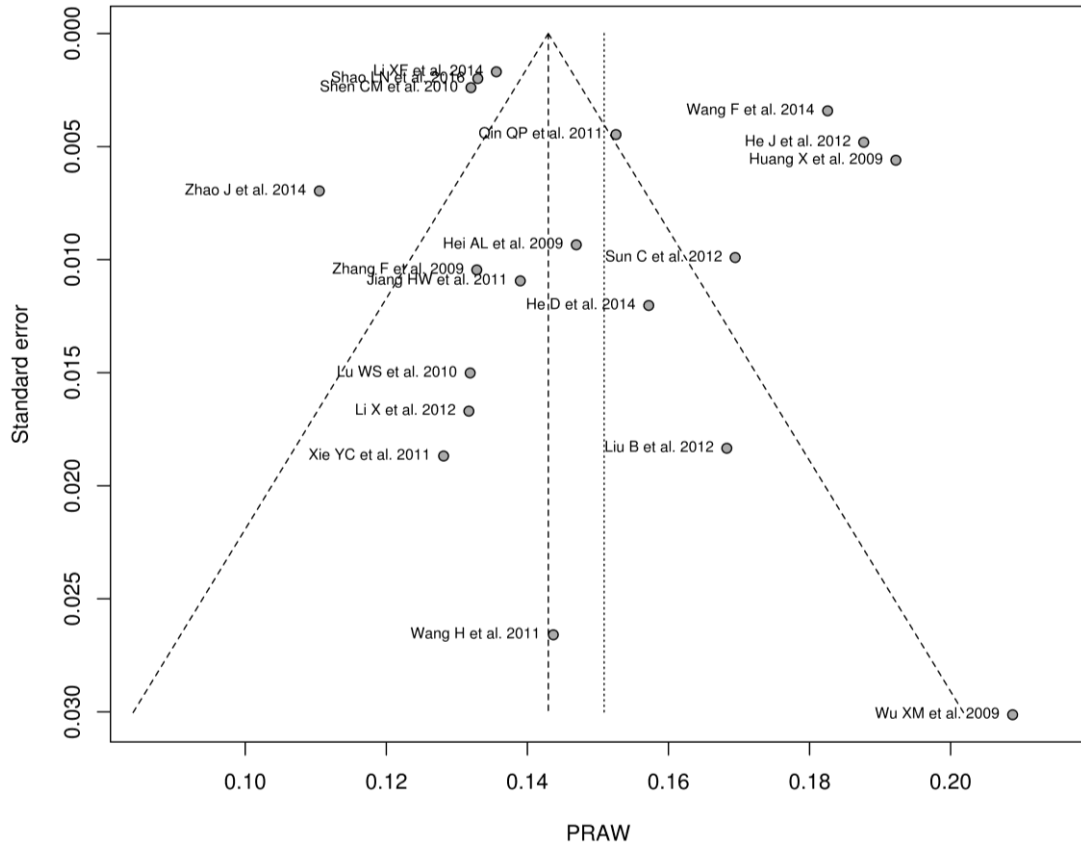


Figura suplementar 4E. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*09.

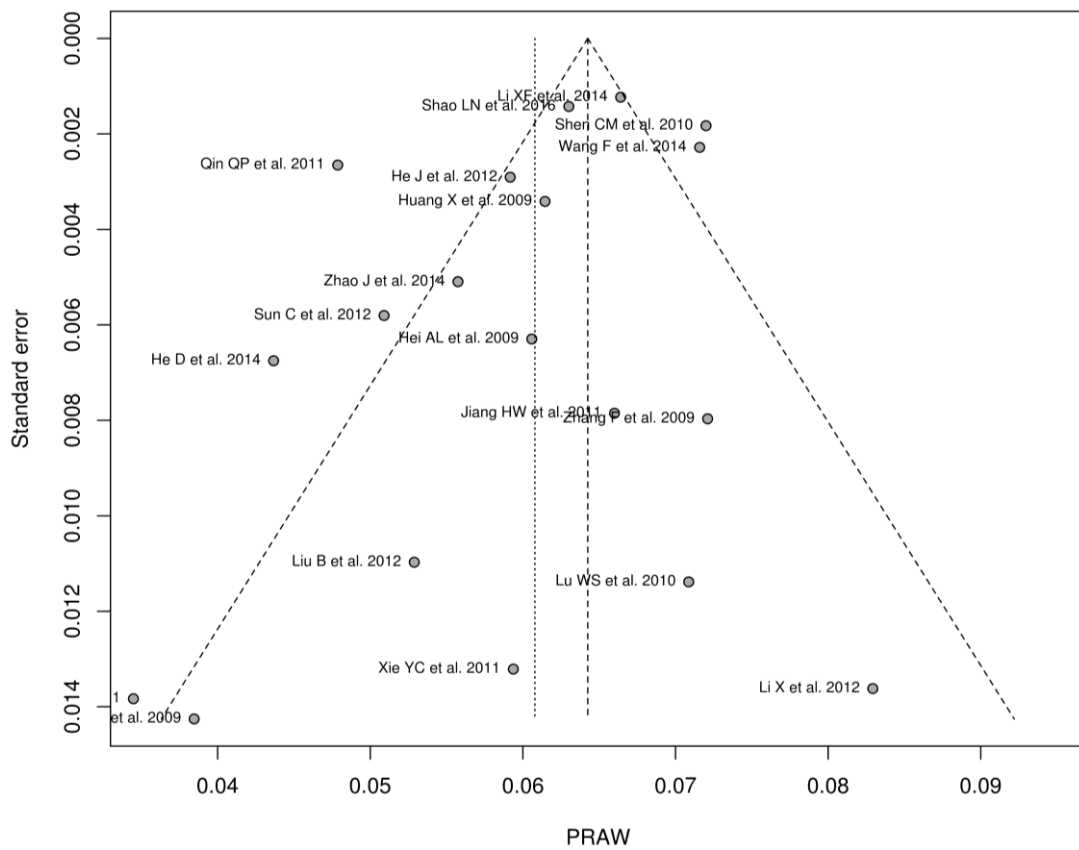


Figura suplementar 4F. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*11.

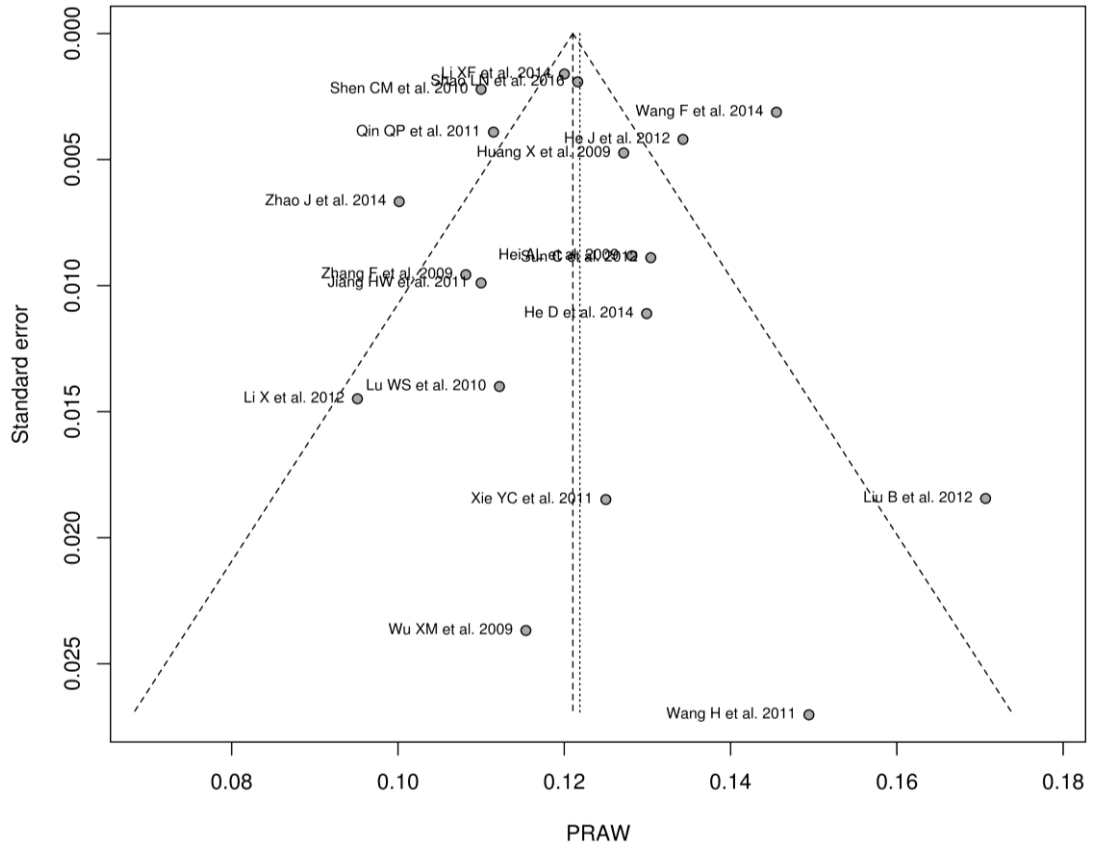


Figura suplementar 4G. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*12.

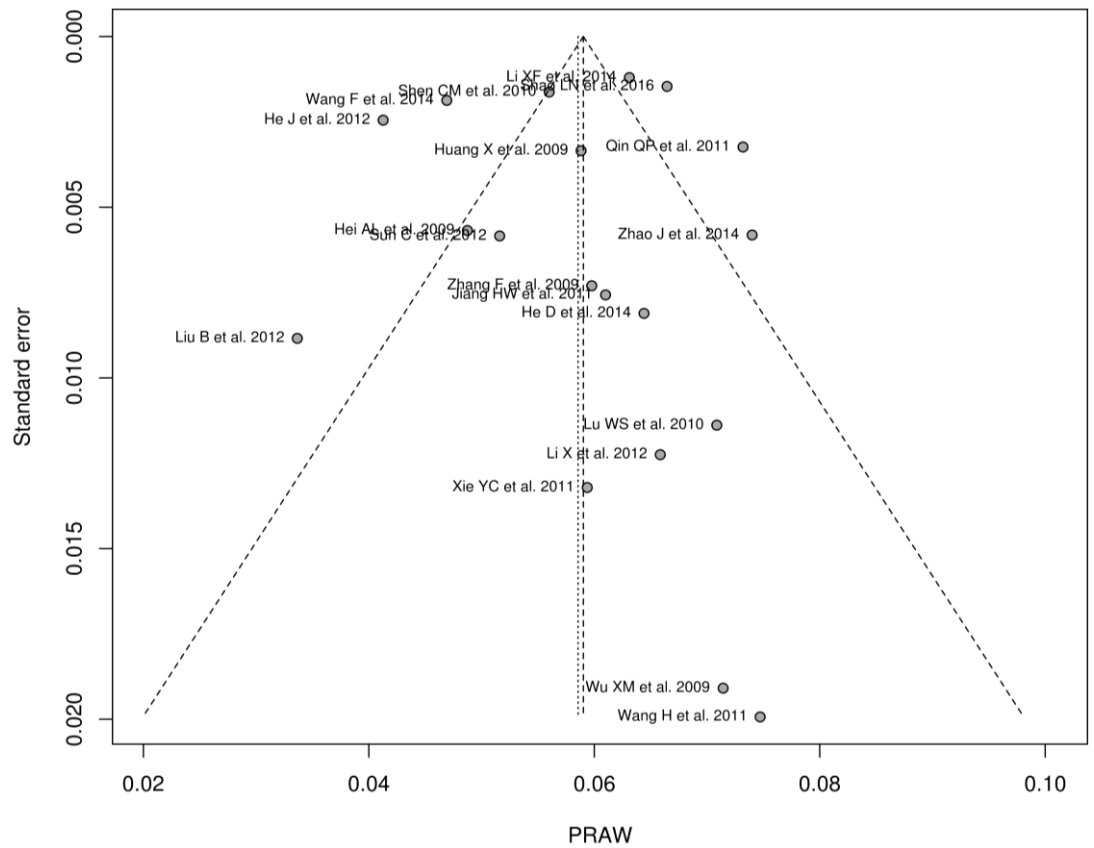


Figura suplementar 4H. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*13.

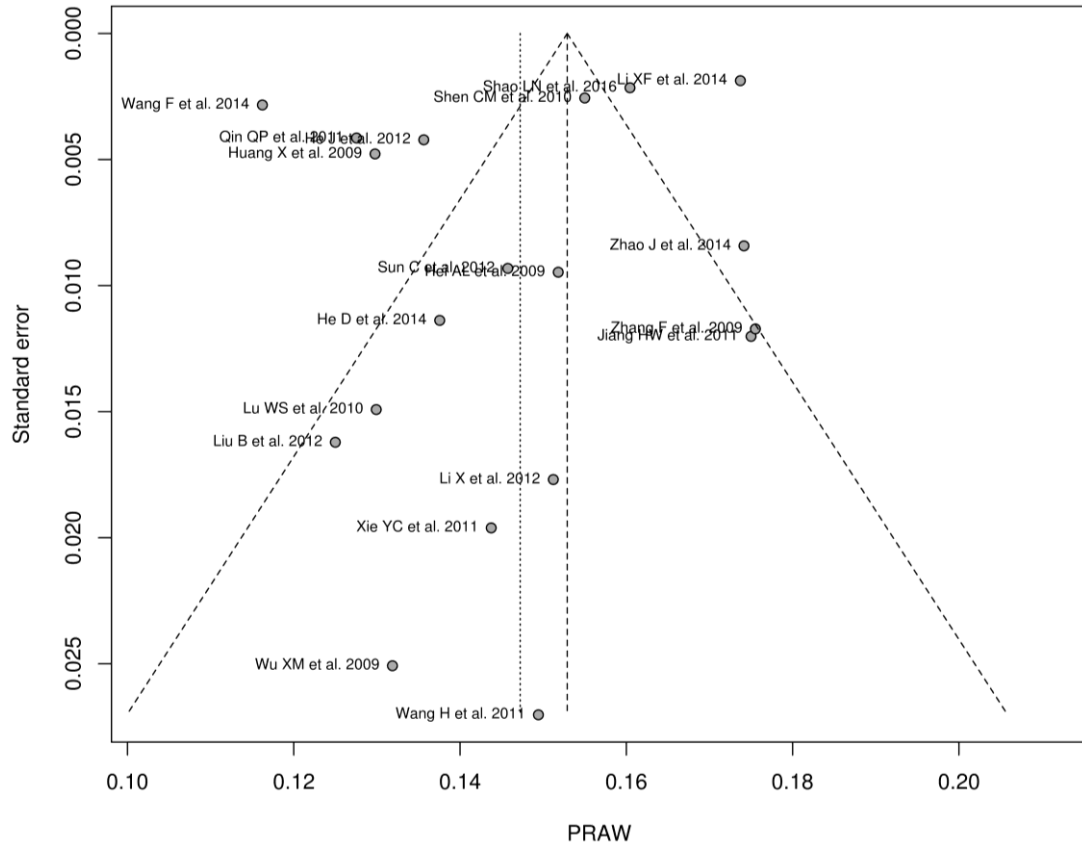


Figura suplementar 4I. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*15.

Apêndice 6. Figura suplementar 5. *Funnel plots* dos artigos selecionados para a metanálise, na África do Sul, para os alelos HLA-DRB1 utilizados.

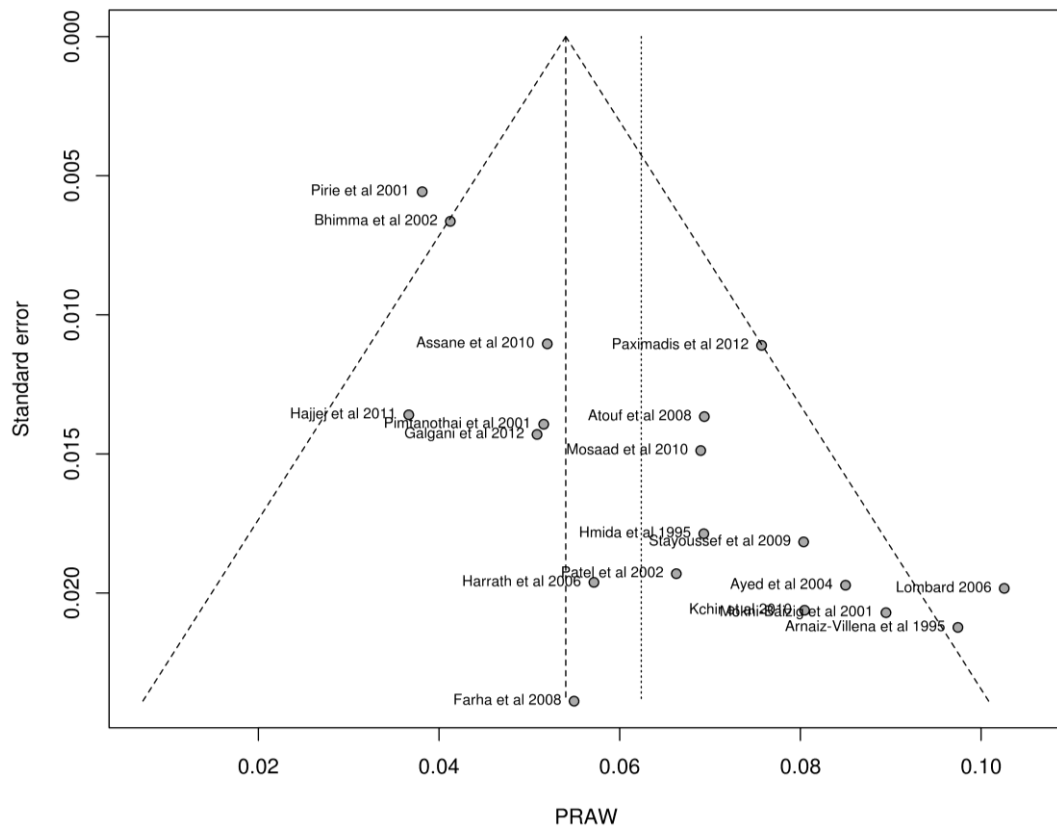


Figura suplementar 5A. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*01.

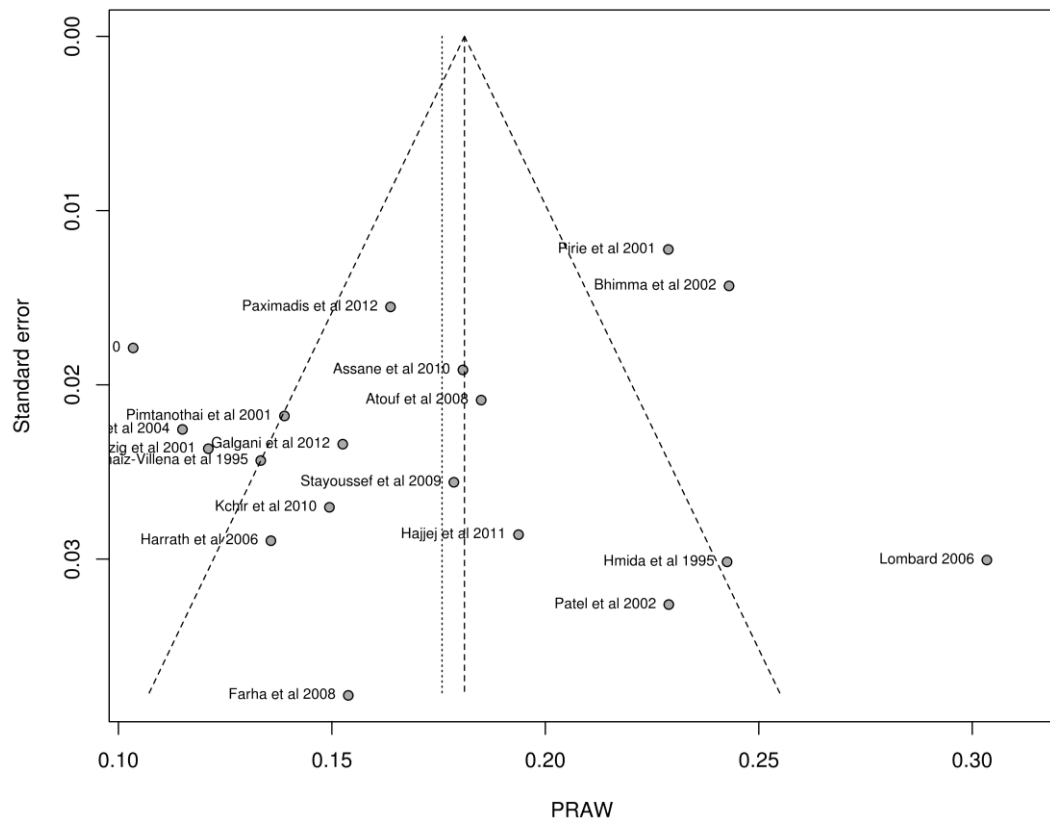


Figura suplementar 5B. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*03.

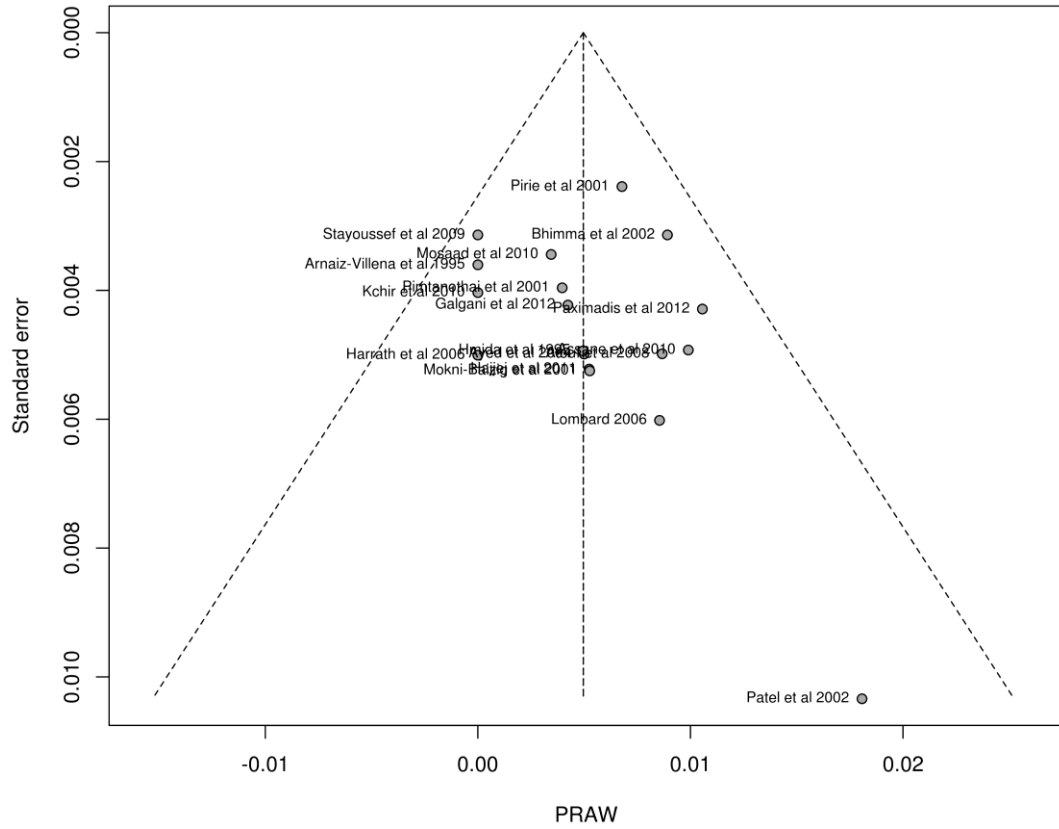


Figura suplementar 5E. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*09.

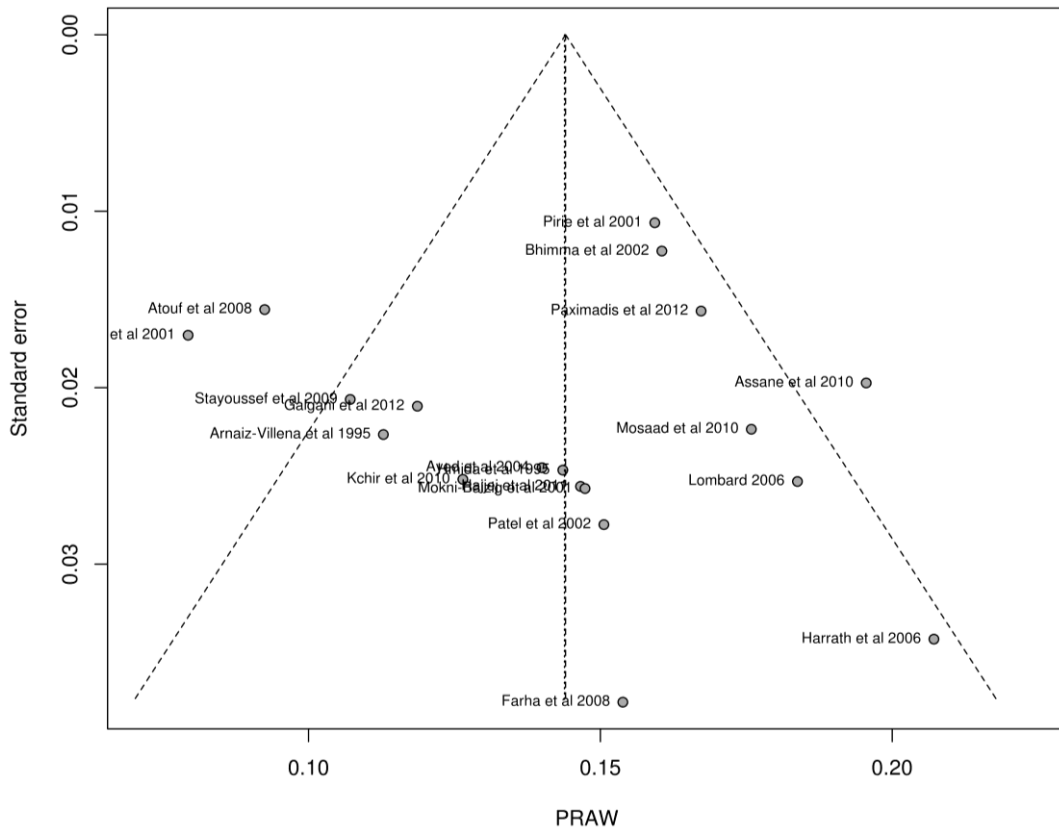


Figura suplementar 5F. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*11.

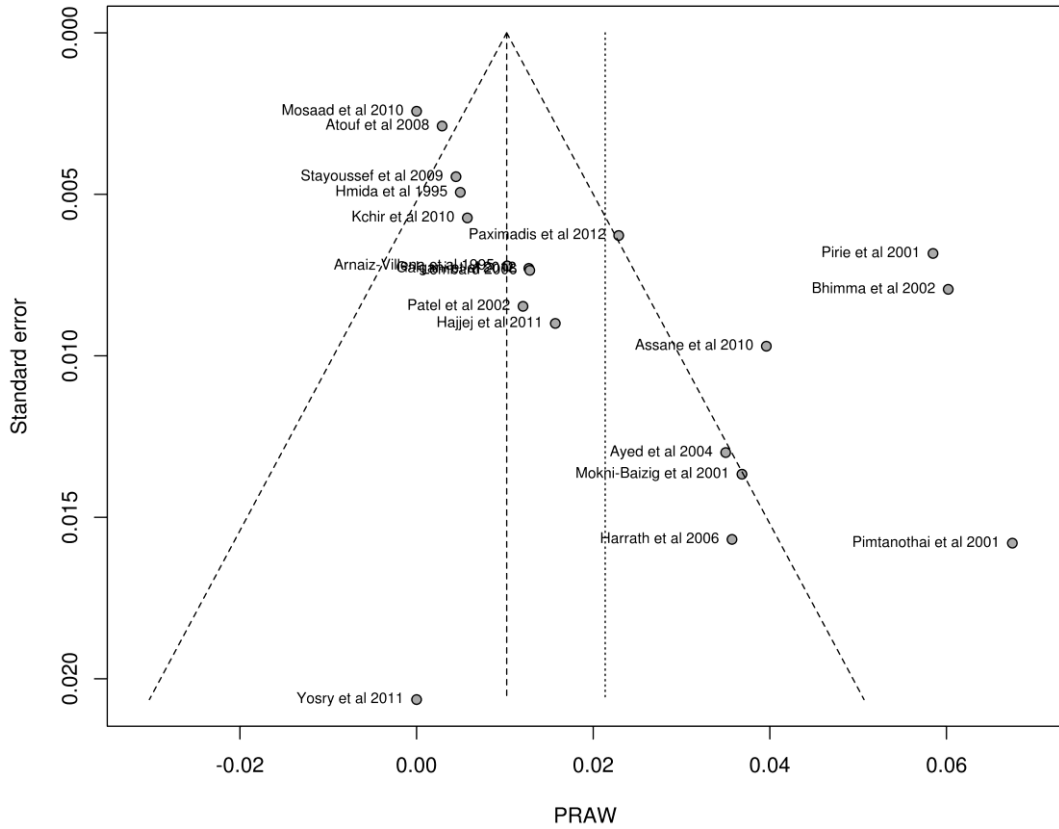


Figura suplementar 5G. Funnel plot dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*12.

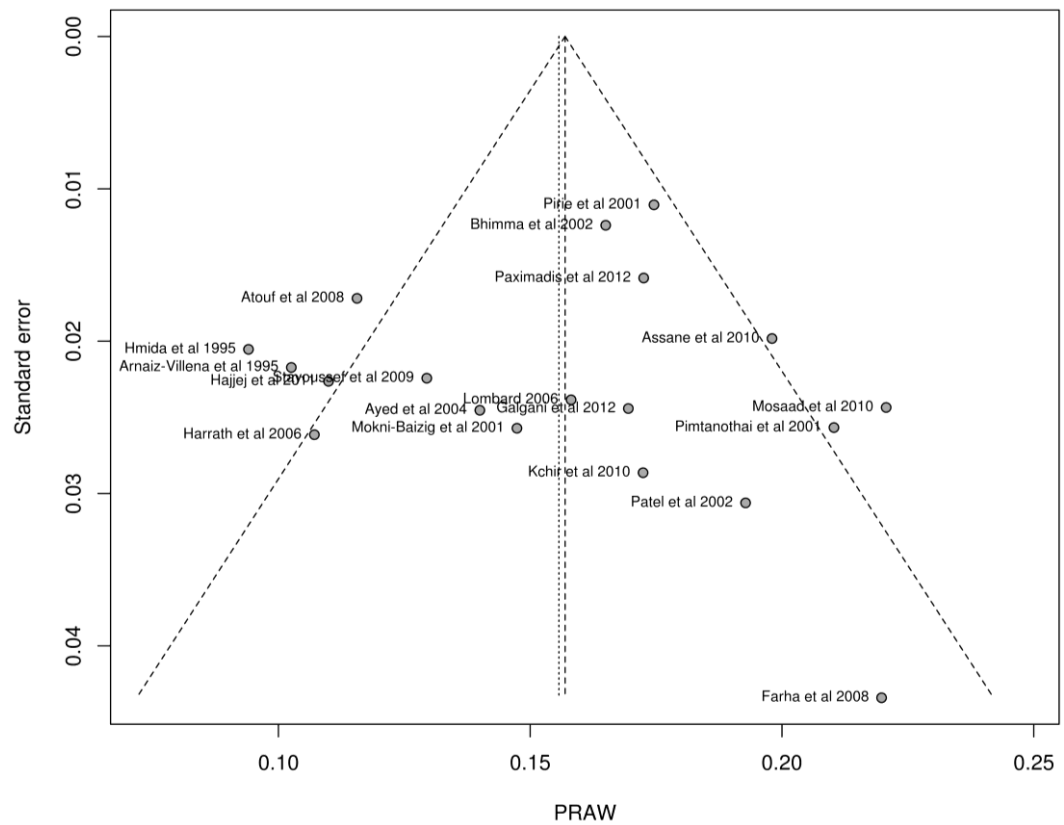


Figura suplementar 5H. Funnel plot dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*13.

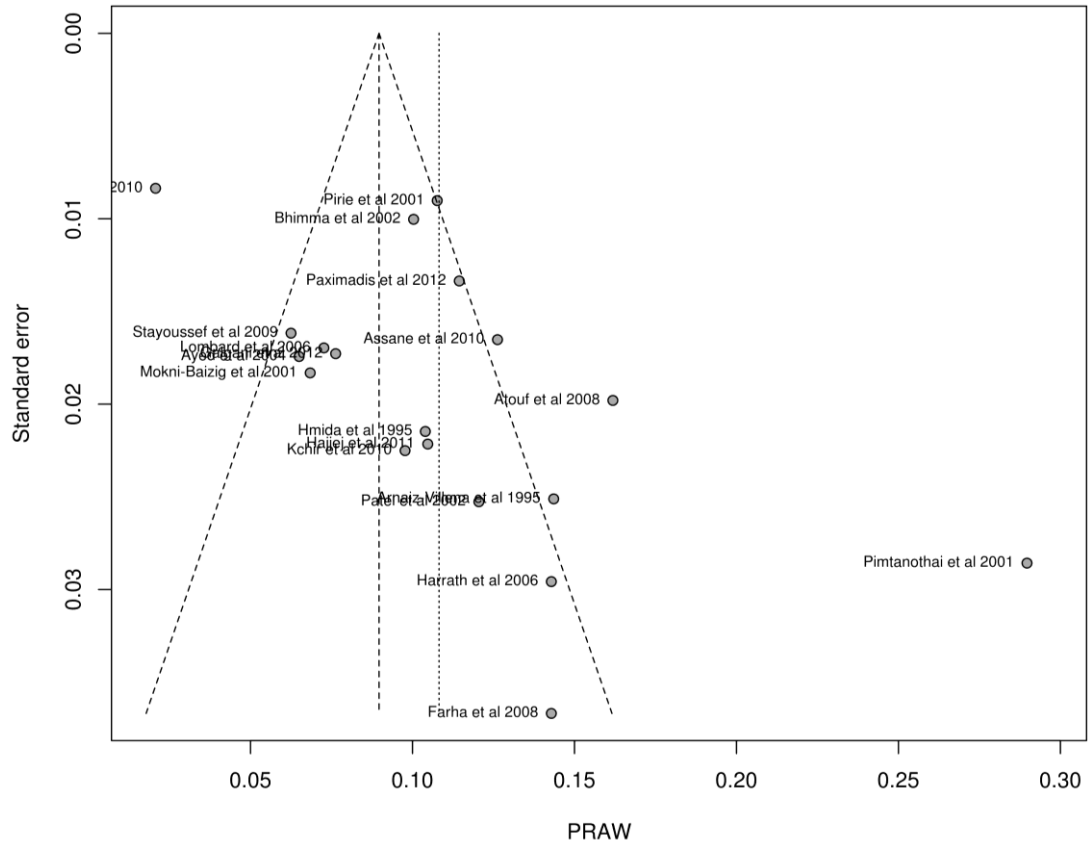


Figura suplementar 5I. *Funnel plot* dos artigos selecionados para metanálise do alelo HLA-DRB1*15.

Apêndice 7. Figura suplementar 6. *Forest plot* dos artigos selecionados para a metanálise, no Brasil, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

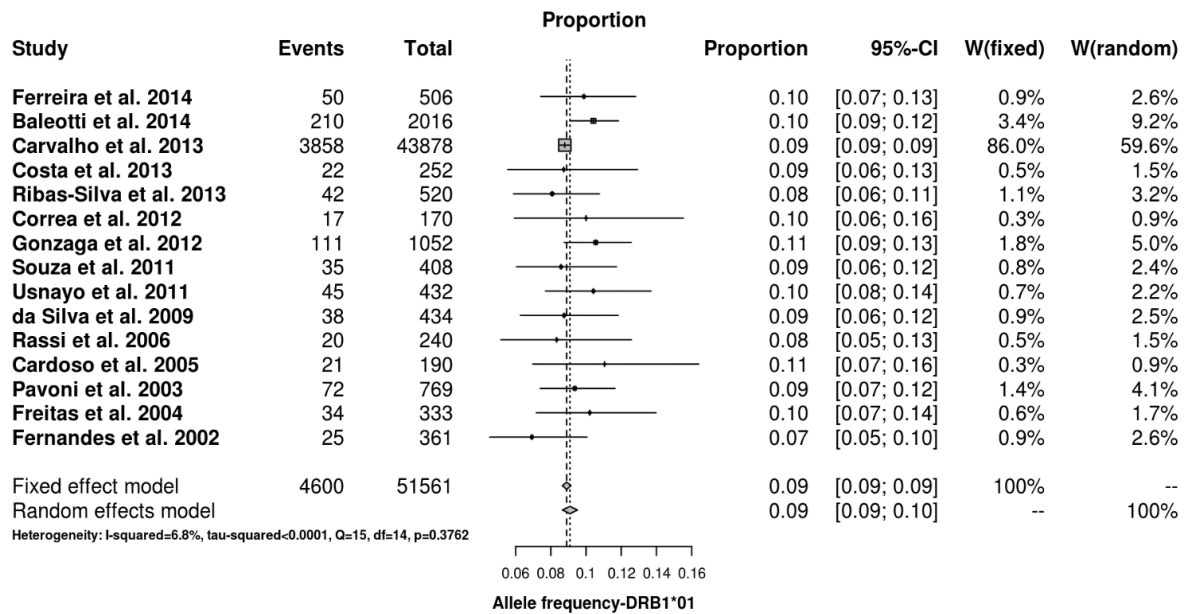


Figura suplementar 6A. Frequência do alelo HLA-DRB1*01 no Brasil.

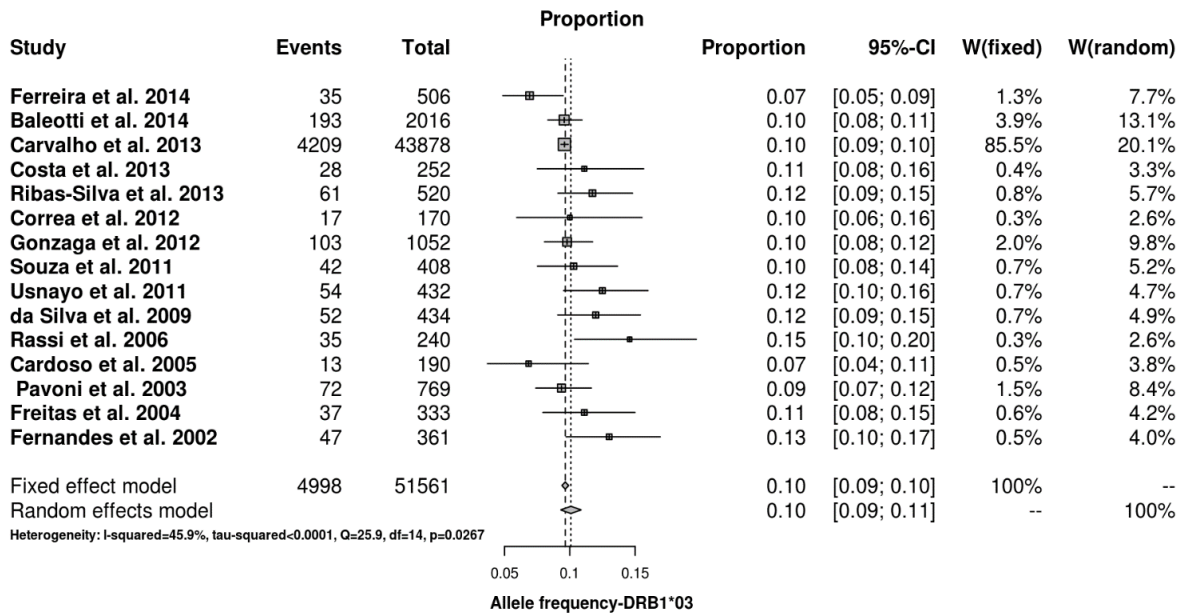


Figura suplementar 6B. Frequência do alelo HLA-DRB1*03 no Brasil.

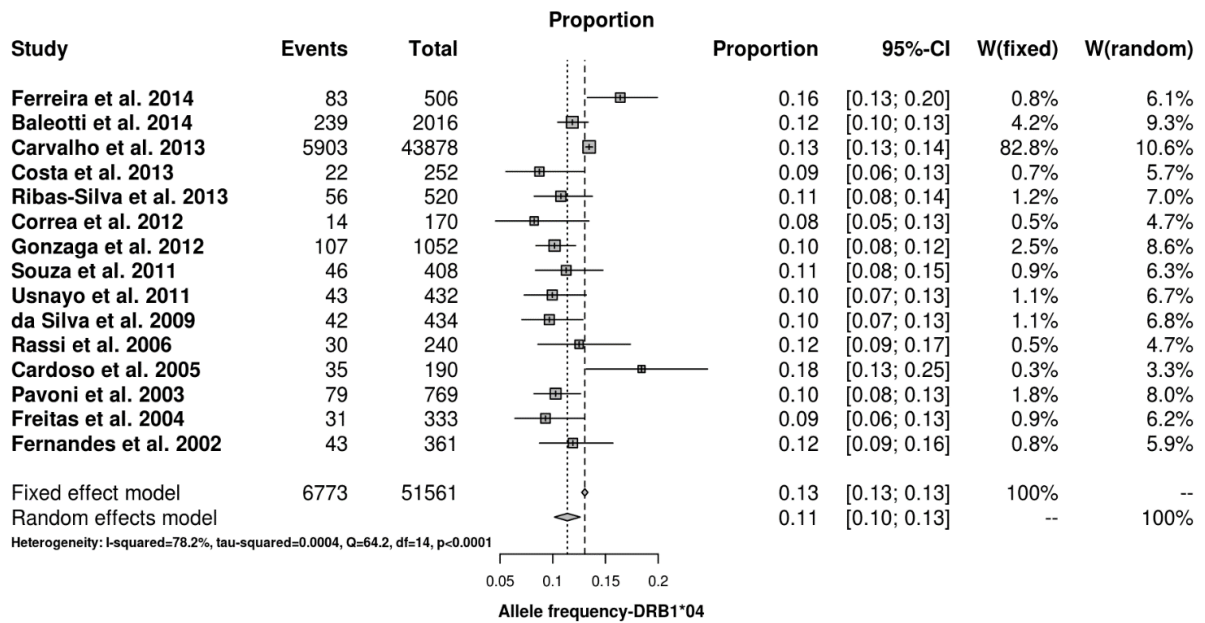


Figura suplementar 6C. Frequência do alelo HLA-DRB1*04 no Brasil.

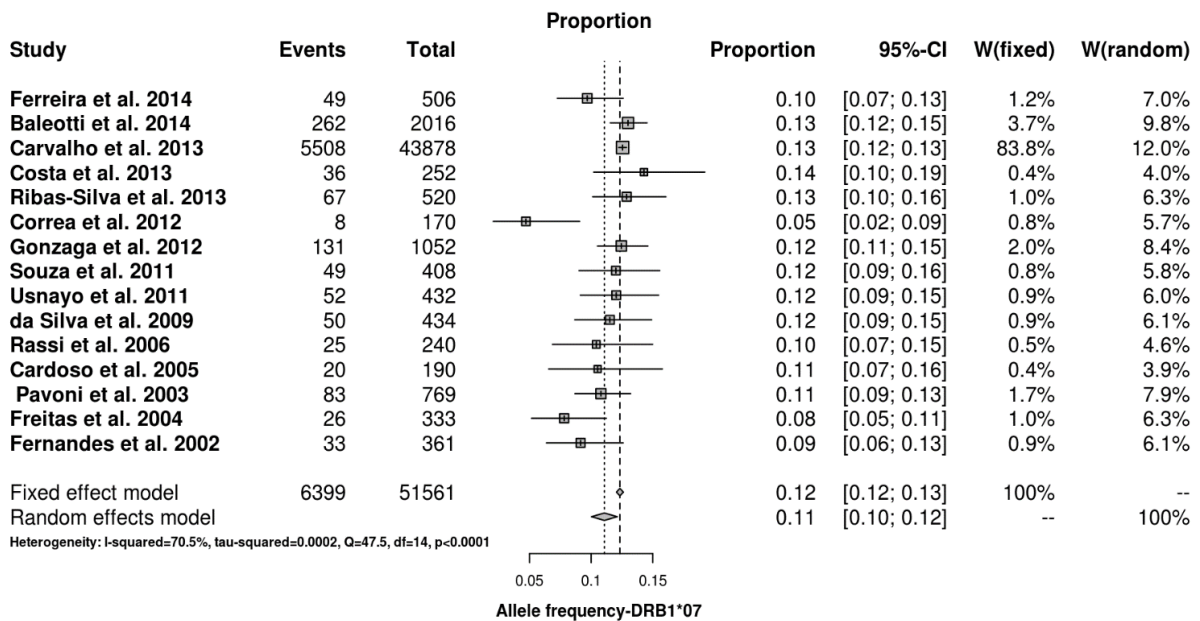


Figura suplementar 6D. Frequência do alelo HLA-DRB1*07 no Brasil.

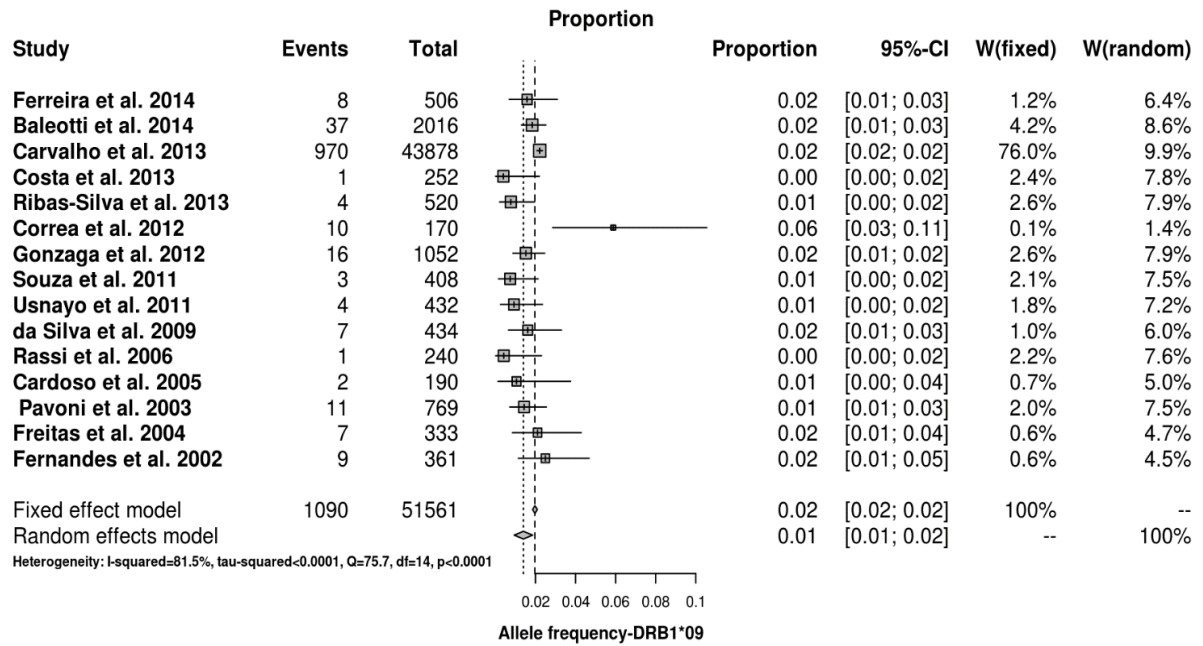


Figura suplementar 6E. Frequência do alelo HLA-DRB1*09 no Brasil.

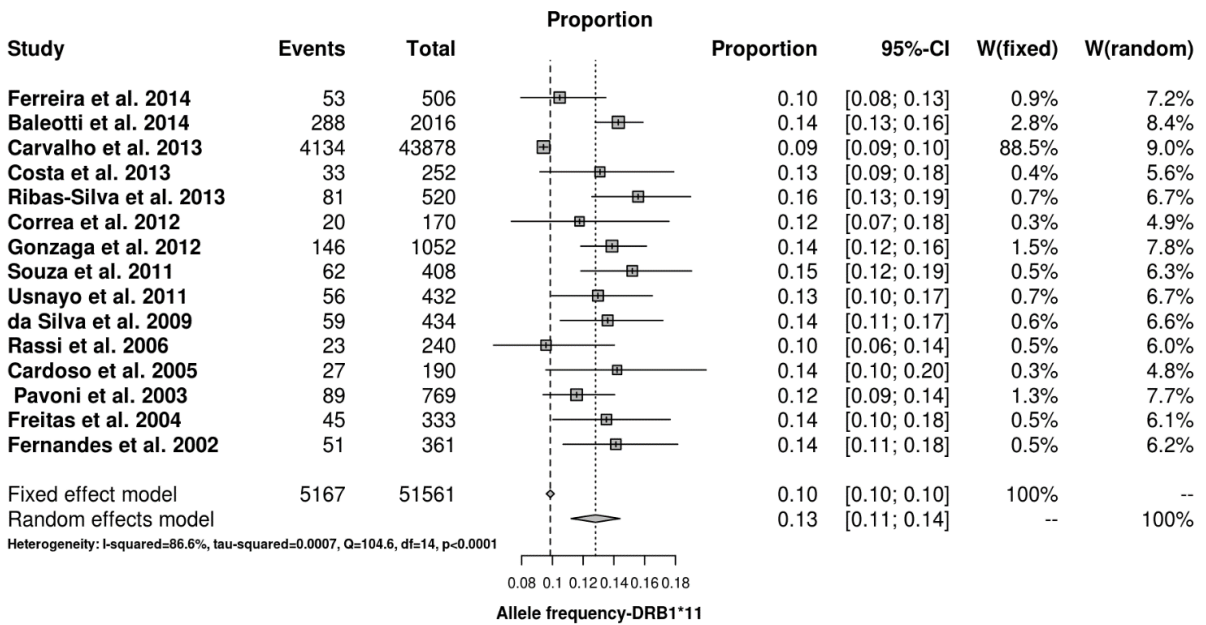


Figura suplementar 6F. Frequência do alelo HLA-DRB1*11 no Brasil.

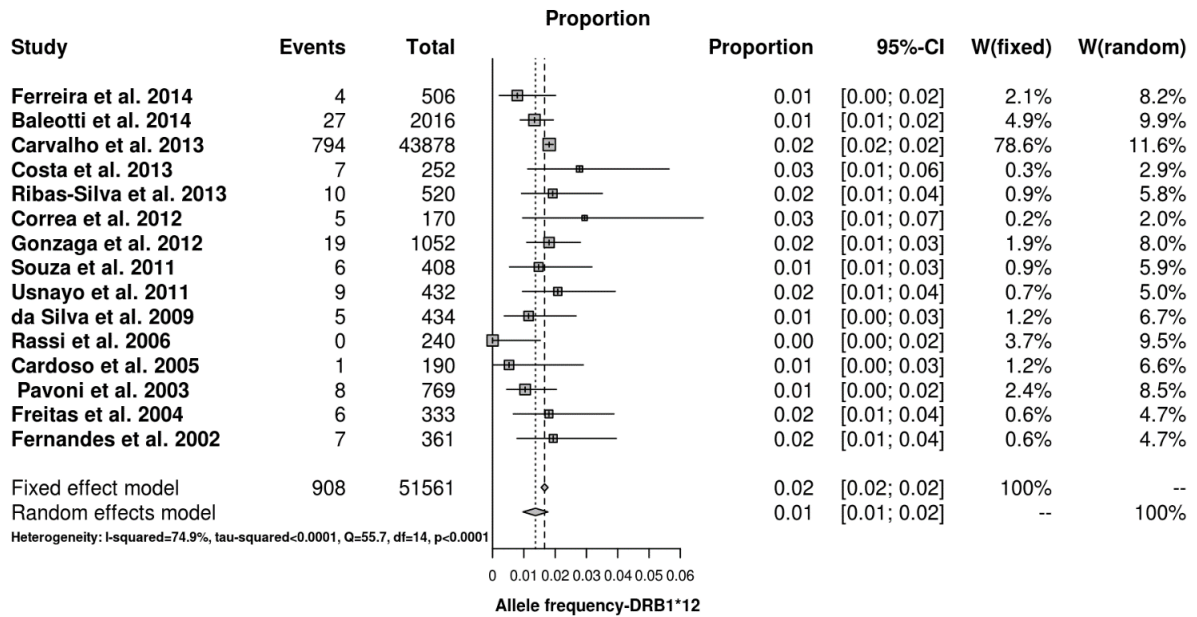


Figura suplementar 6G. Frequência do alelo HLA-DRB1*12 no Brasil.

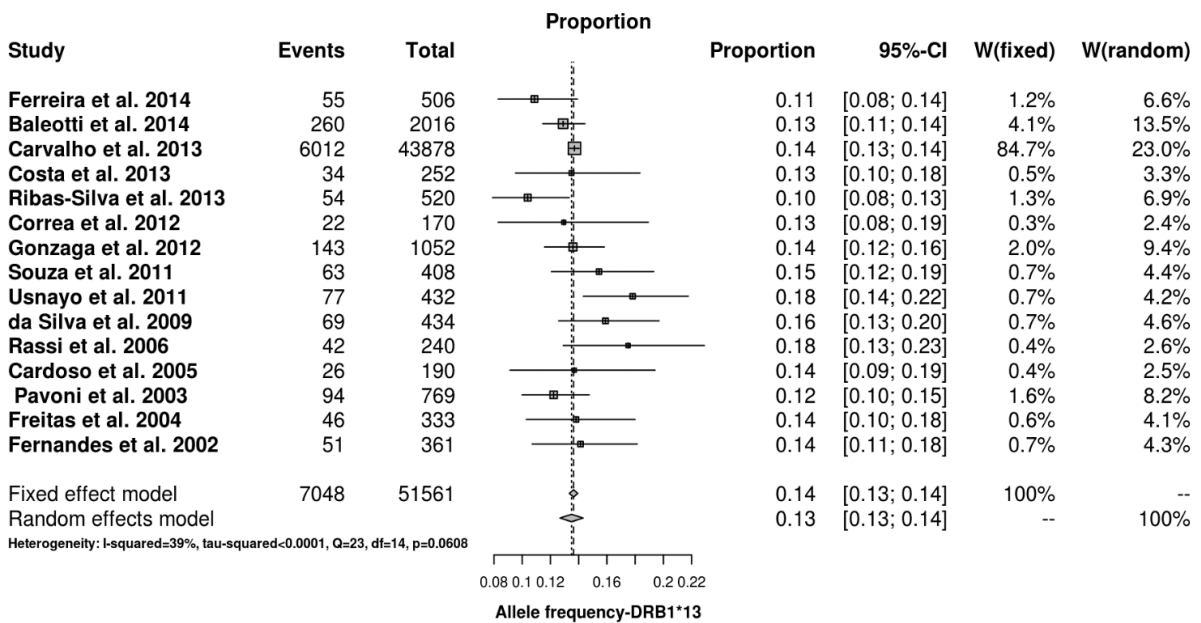


Figura suplementar 6H. Frequência do alelo HLA-DRB1*13 no Brasil.

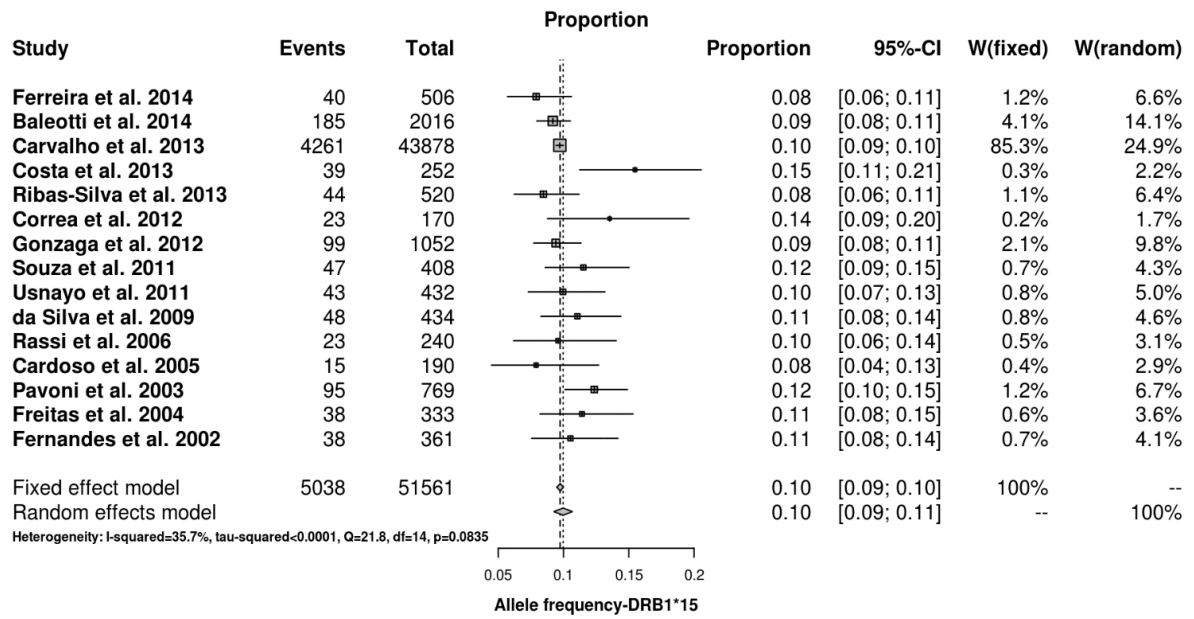


Figura suplementar 6I. Frequência do alelo HLA-DRB1*15 no Brasil.

Apêndice 8. Figura suplementar 7. Forest plot dos artigos selecionados para a metanálise, na Rússia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

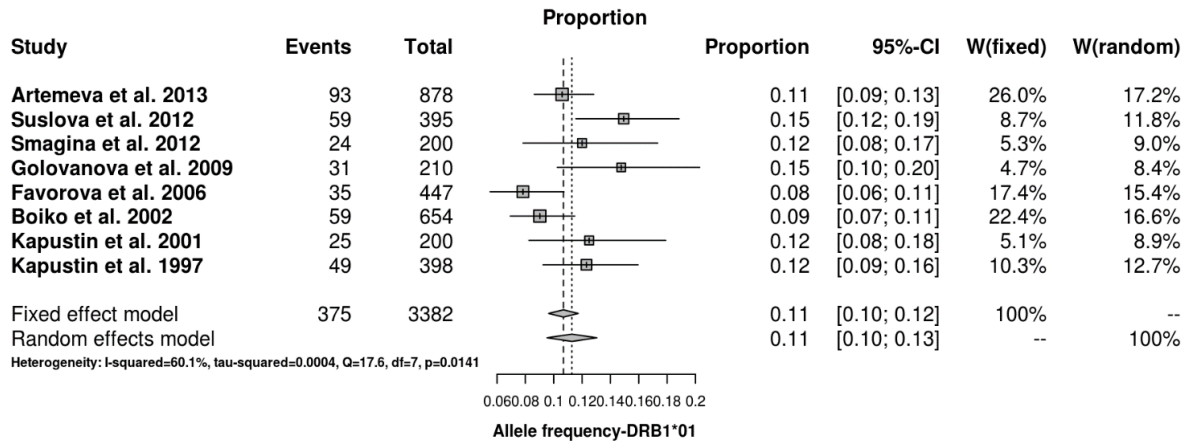


Figura suplementar 7A. Frequência do alelo HLA-DRB1*01 na Rússia.

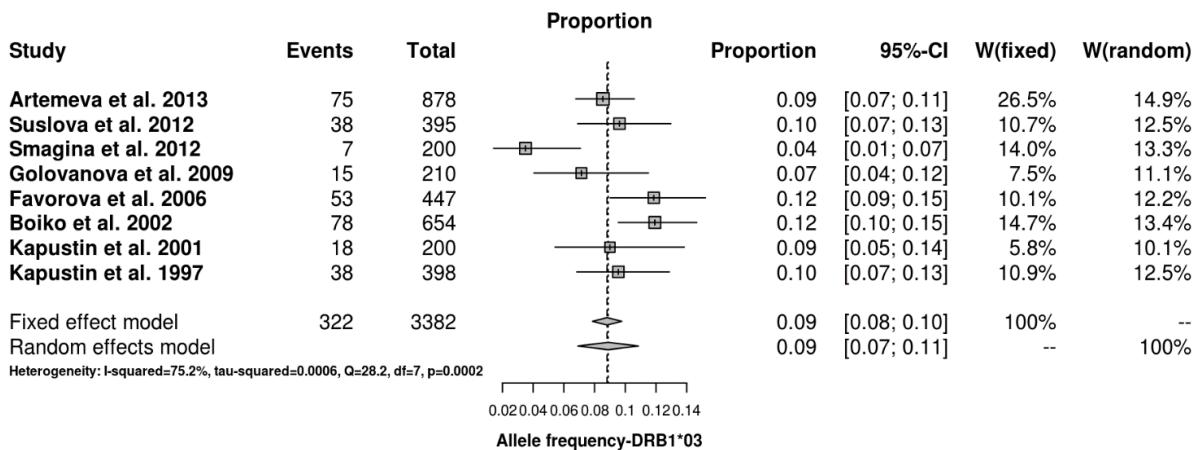


Figura suplementar 7B. Frequência do alelo HLA-DRB1*03 na Rússia.

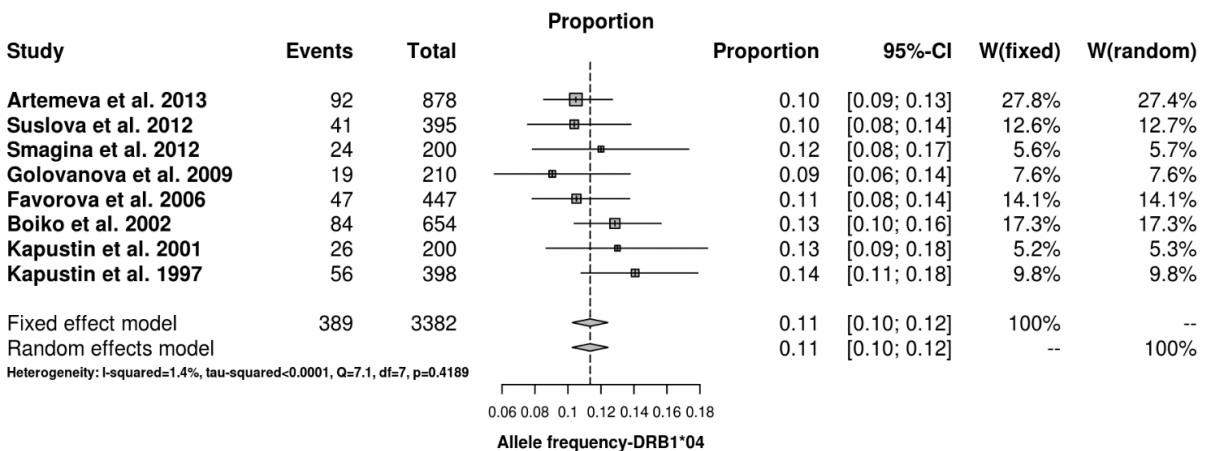


Figura suplementar 7C. Frequência do alelo HLA-DRB1*04 na Rússia.

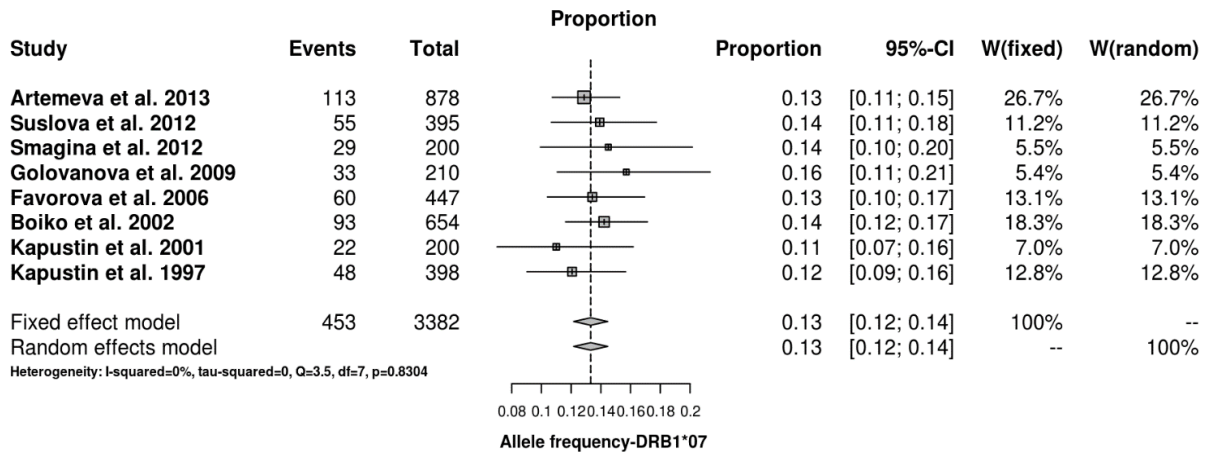


Figura suplementar 7D. Frequência do alelo HLA-DRB1*07 na Rússia.

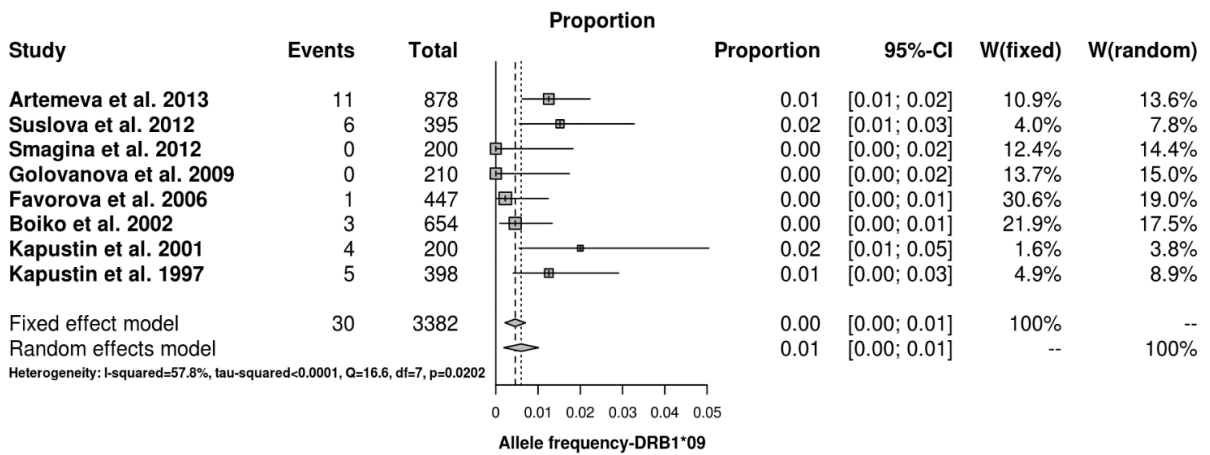


Figura suplementar 7E. Frequência do alelo HLA-DRB1*09 na Rússia.

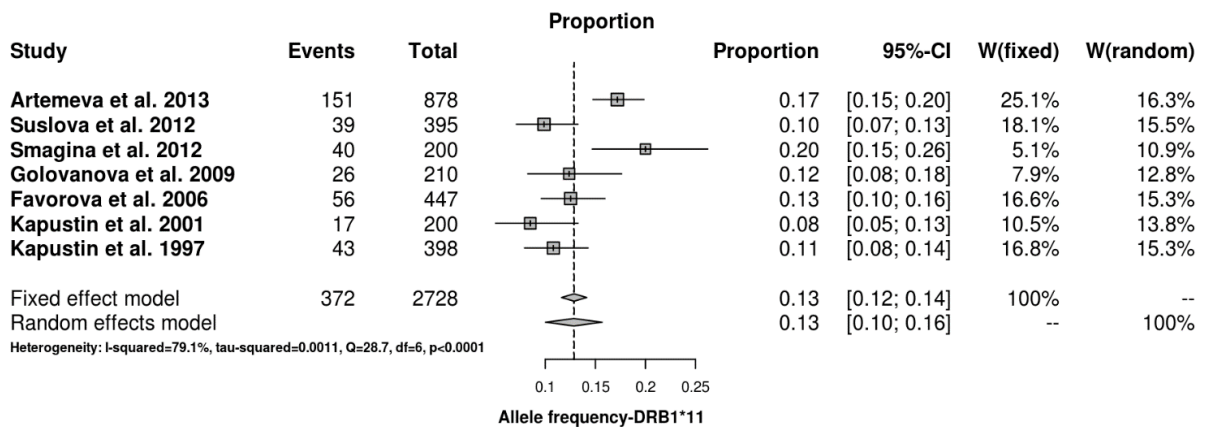


Figura suplementar 7F. Frequência do alelo HLA-DRB1*11 na Rússia.

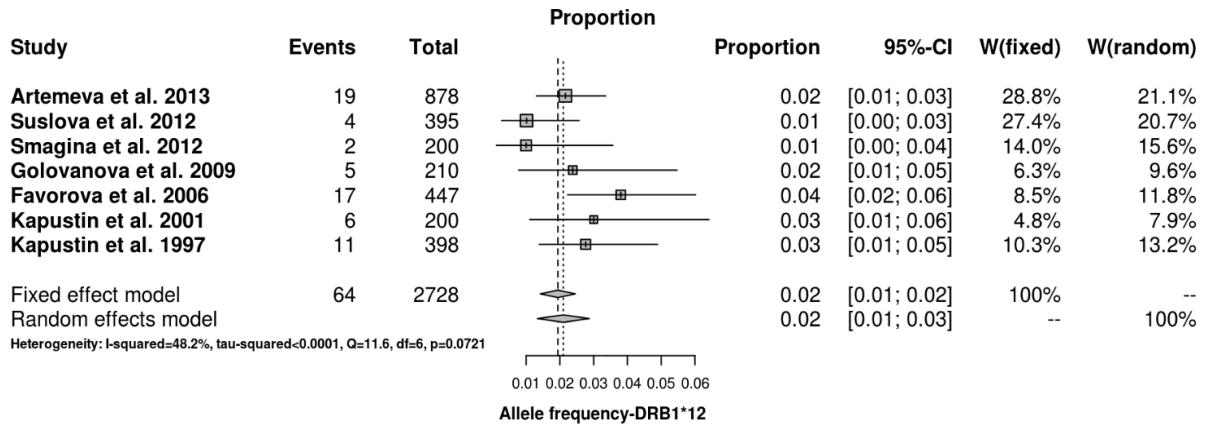


Figura suplementar 7G. Frequência do alelo HLA-DRB1*12 na Rússia.

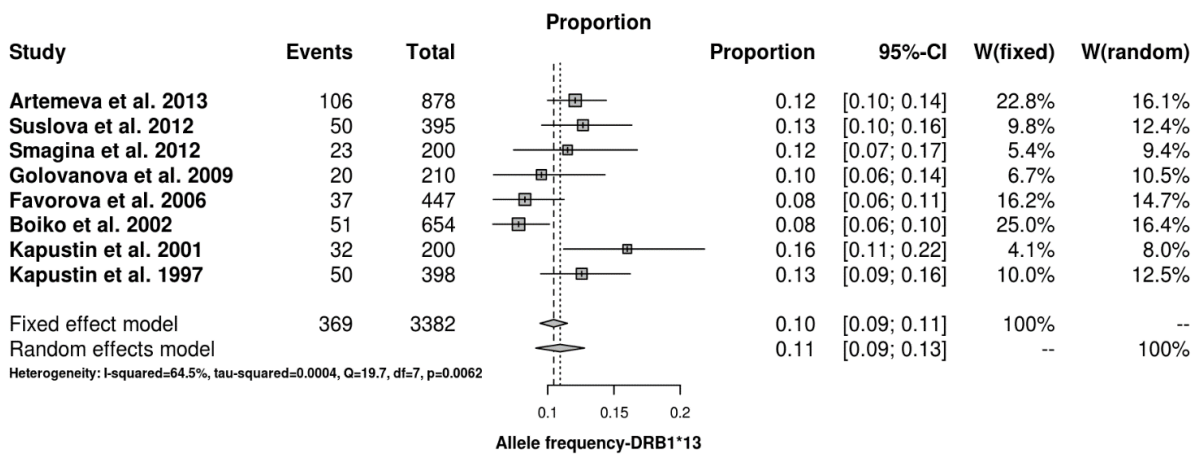


Figura suplementar 7H. Frequência do alelo HLA-DRB1*13 na Rússia.

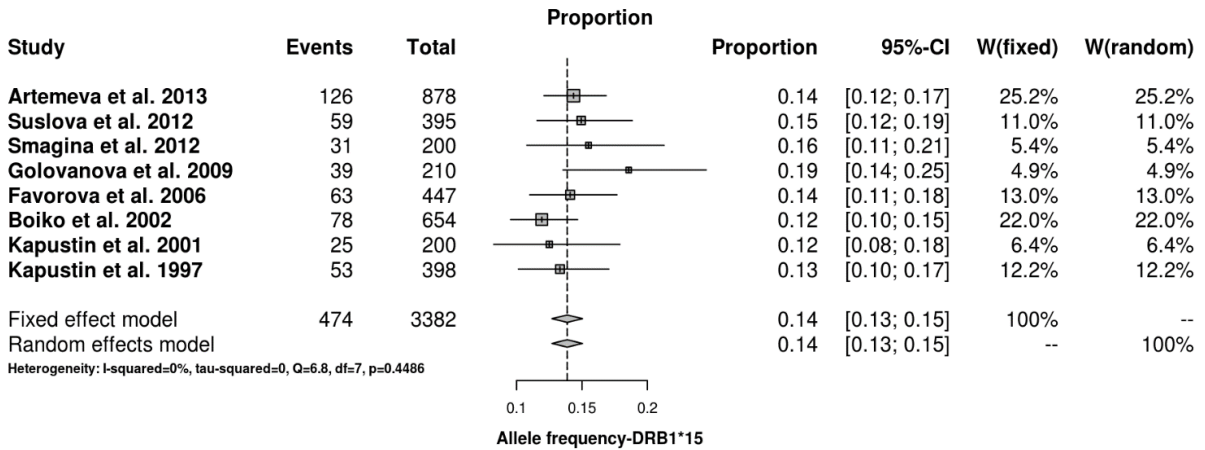


Figura suplementar 7I. Frequência do alelo HLA-DRB1*15 na Rússia.

Apêndice 9. Figura suplementar 8. *Forest plot* dos artigos selecionados para a metanálise, na Índia, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

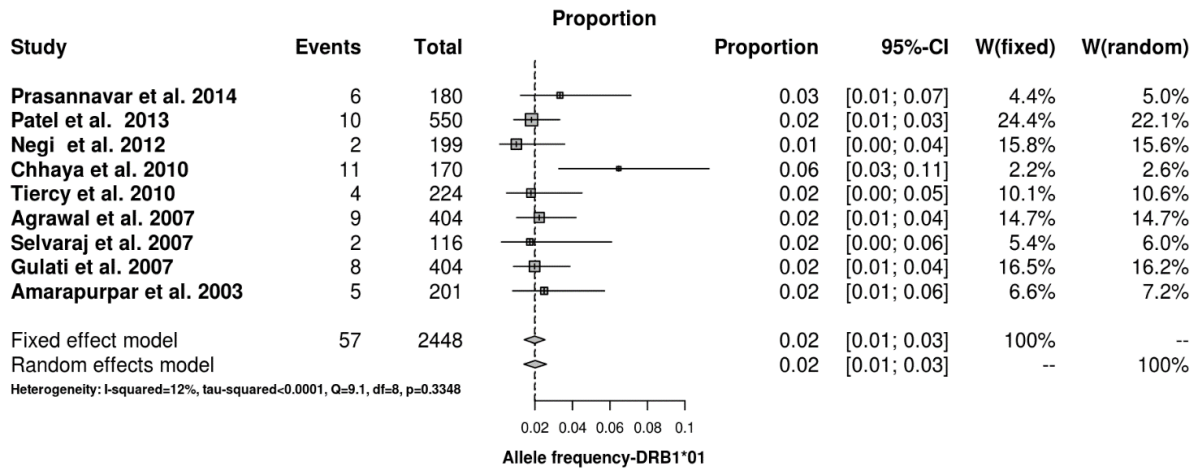


Figura suplementar 8A. Frequência do alelo HLA-DRB1*01 na Índia.

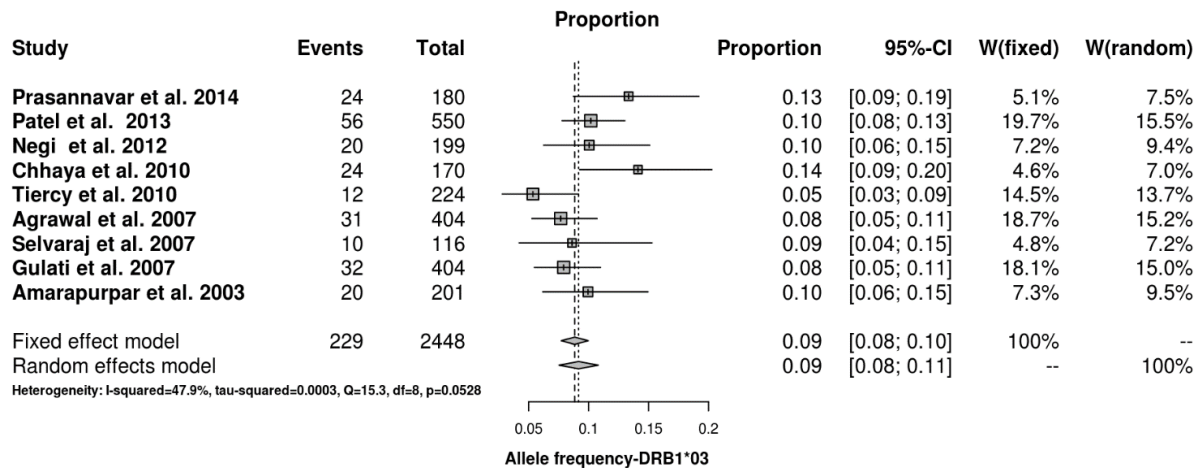


Figura suplementar 8B. Frequência do alelo HLA-DRB1*03 na Índia.

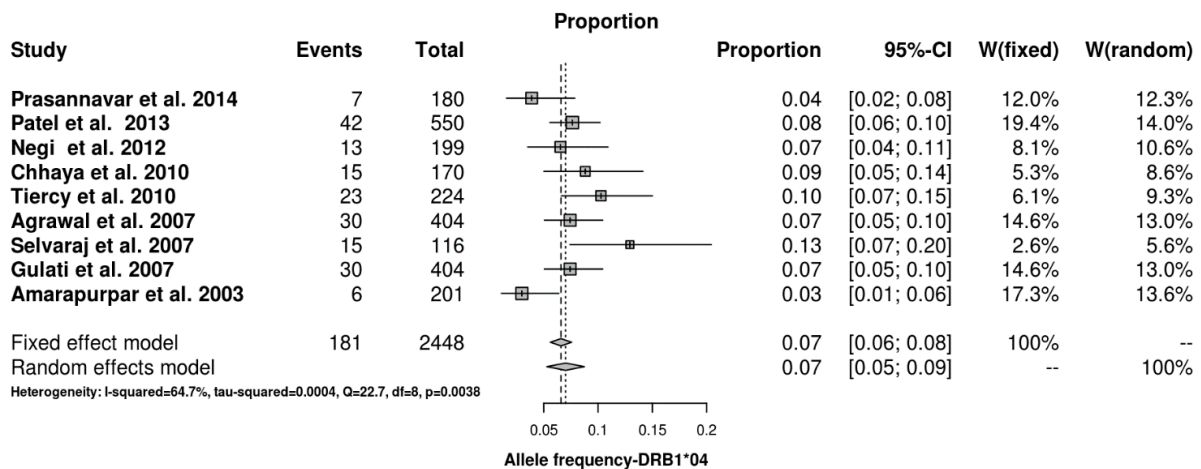


Figura suplementar 8C. Frequência do alelo HLA-DRB1*04 na Índia.

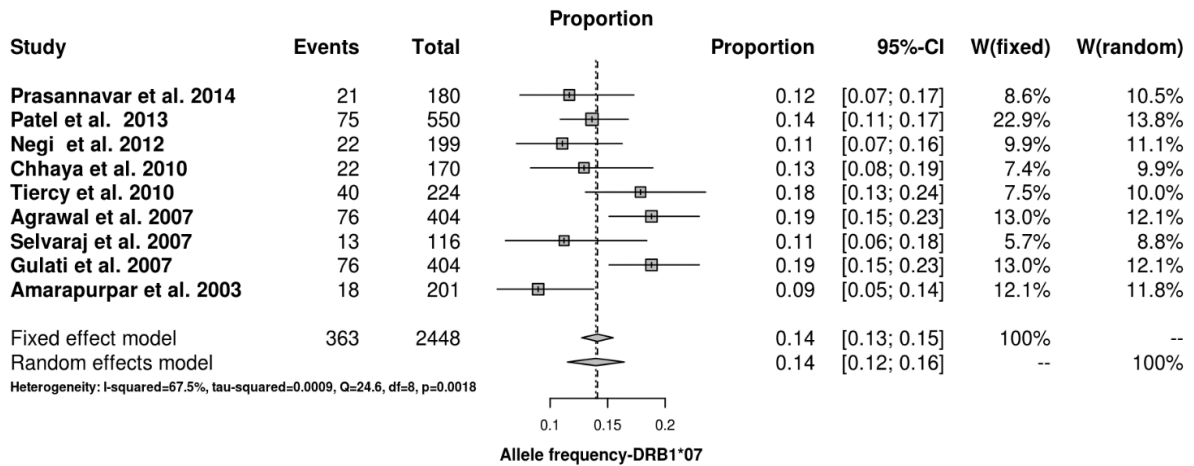


Figura suplementar 8D. Frequência do alelo HLA-DRB1*07 na Índia.

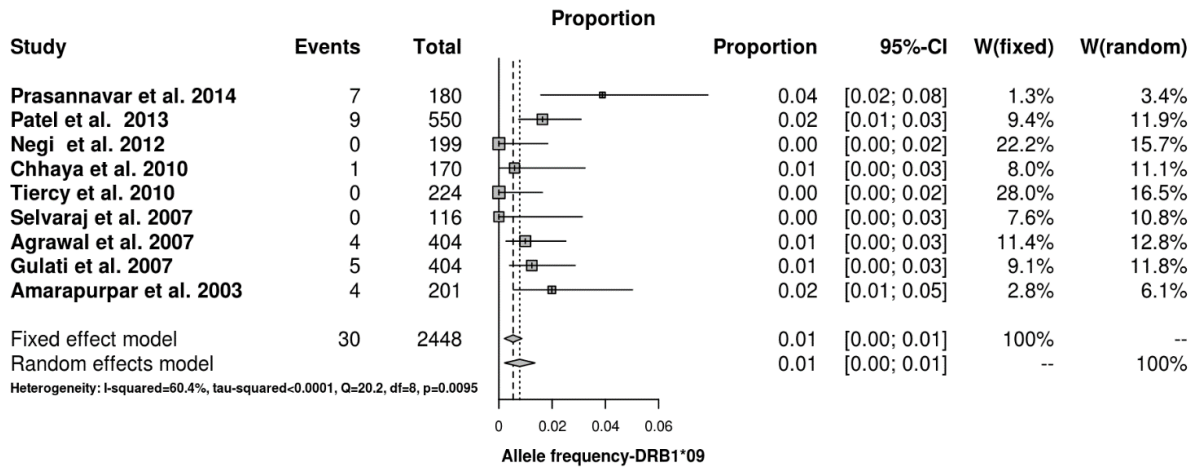


Figura suplementar 8E. Frequência do alelo HLA-DRB1*09 na Índia.

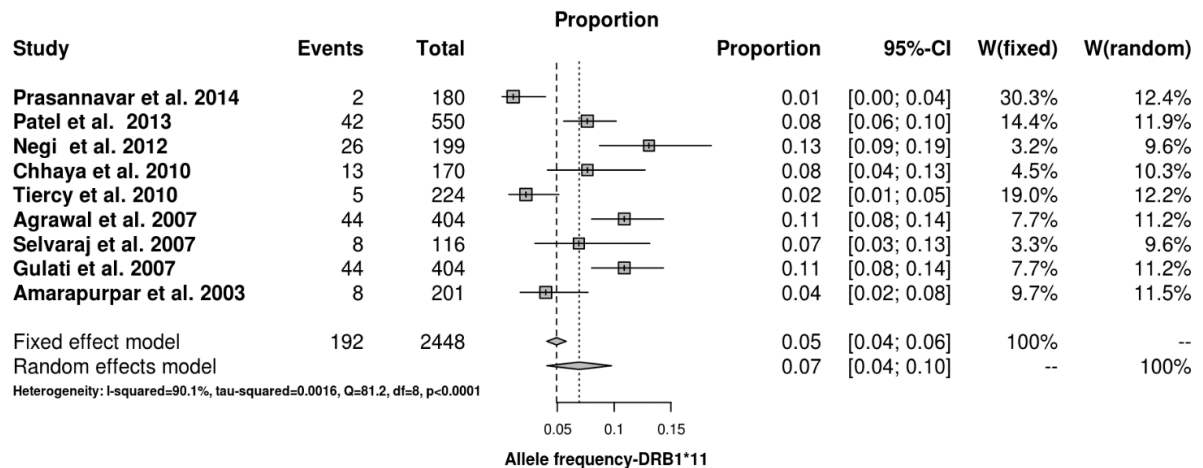


Figura suplementar 8F. Frequência do alelo HLA-DRB1*11 na Índia.

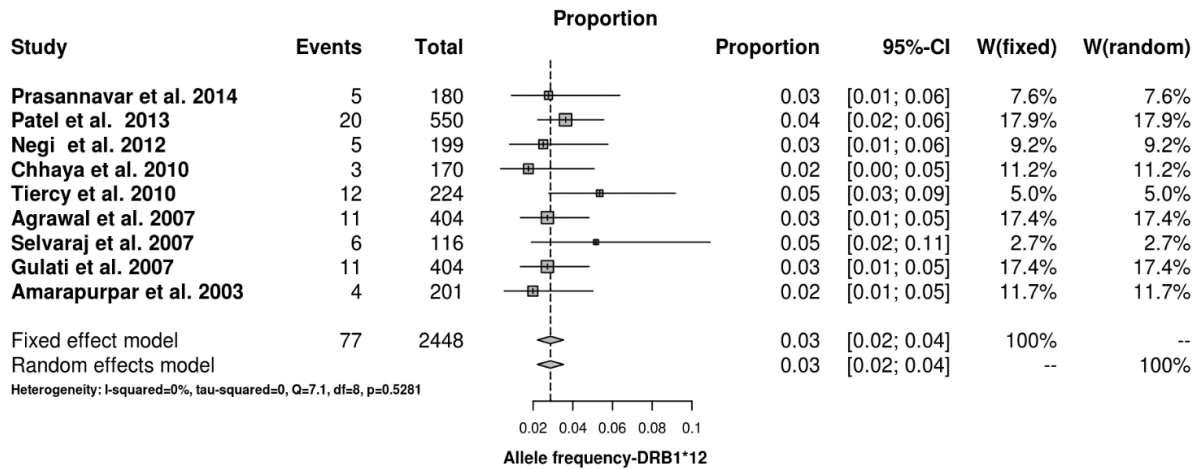


Figura suplementar 8G. Frequência do alelo HLA-DRB1*12 na Índia.

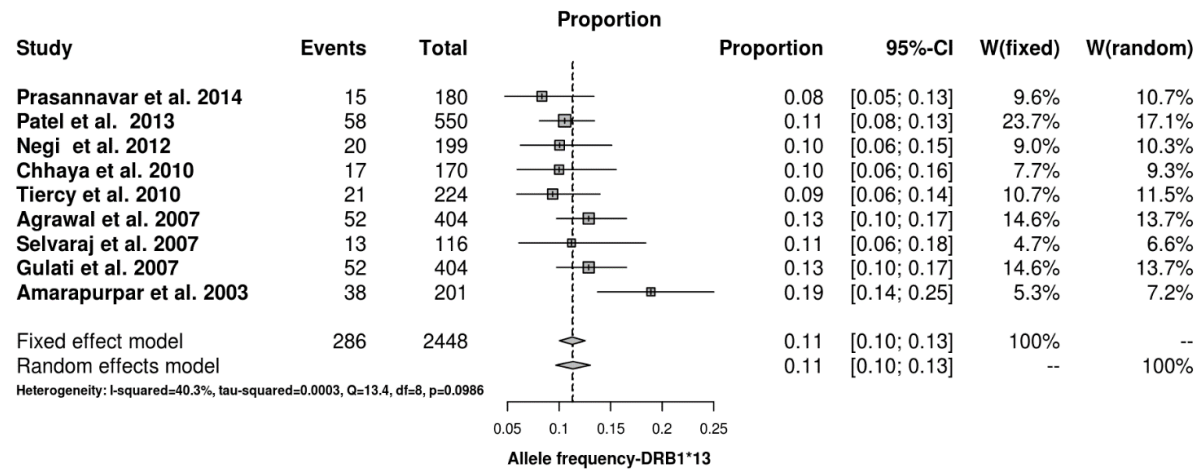


Figura suplementar 8H. Frequência do alelo HLA-DRB1*13 na Índia.

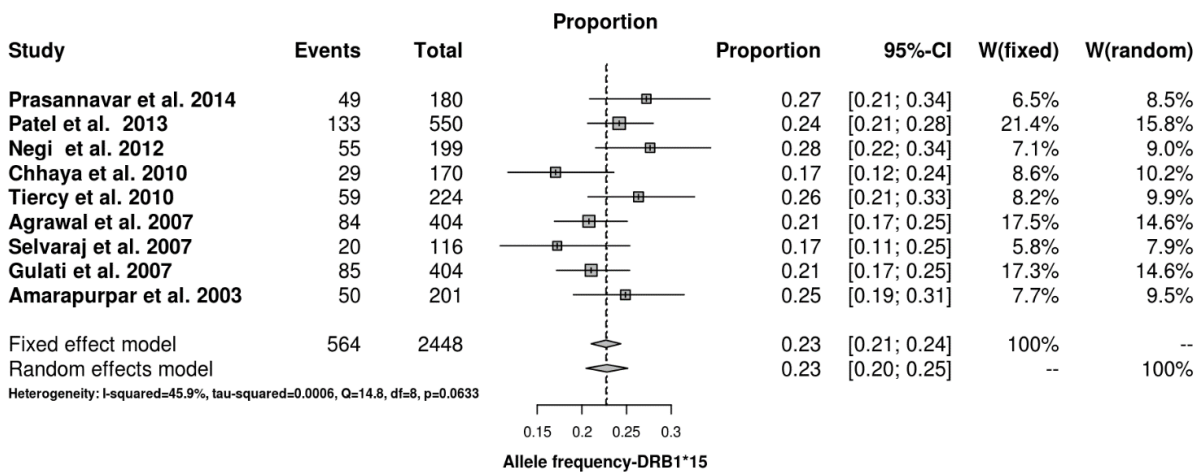


Figura suplementar 8I. Frequência do alelo HLA-DRB1*15 na Índia.

Apêndice 10. Figura suplementar 9. *Forest plot* dos artigos selecionados para a metanálise, na China, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

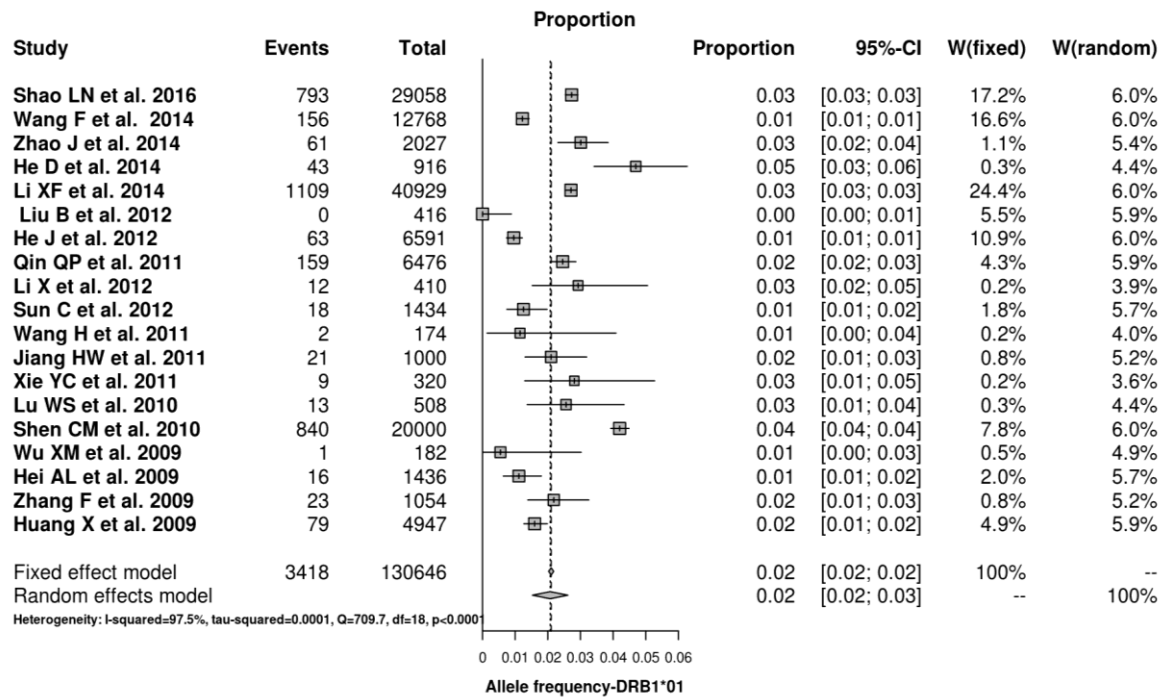


Figura suplementar 9A. Frequência do alelo HLA-DRB1*01 na China.

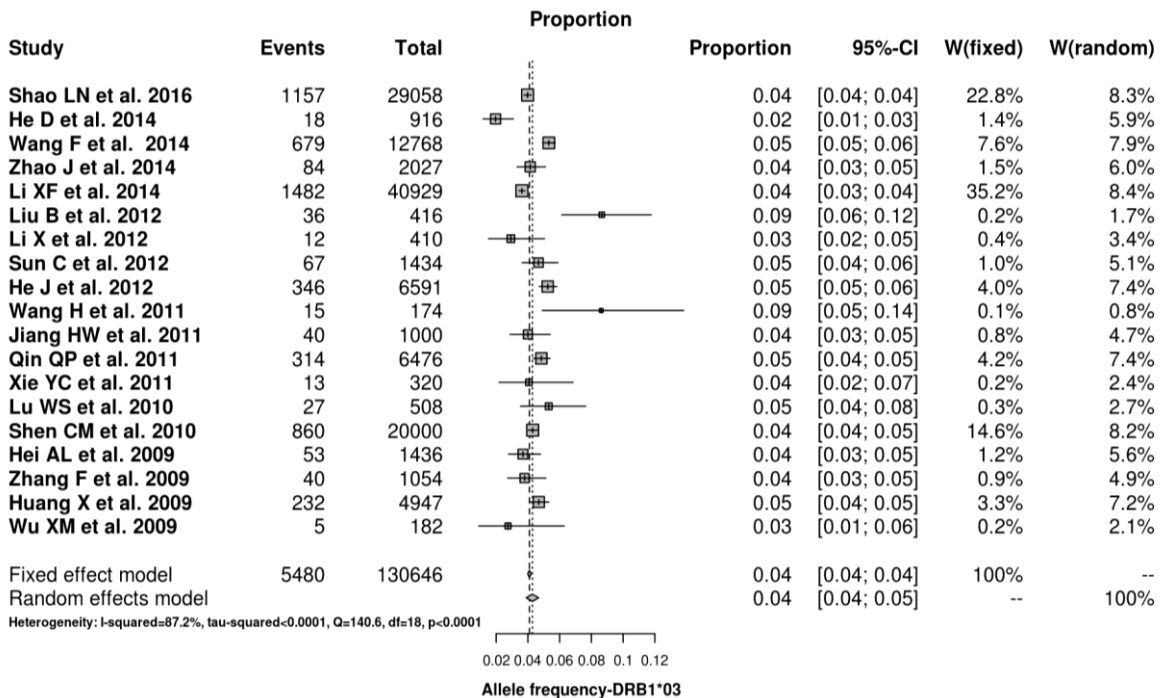


Figura suplementar 9B. Frequência do alelo HLA-DRB1*03 na China.

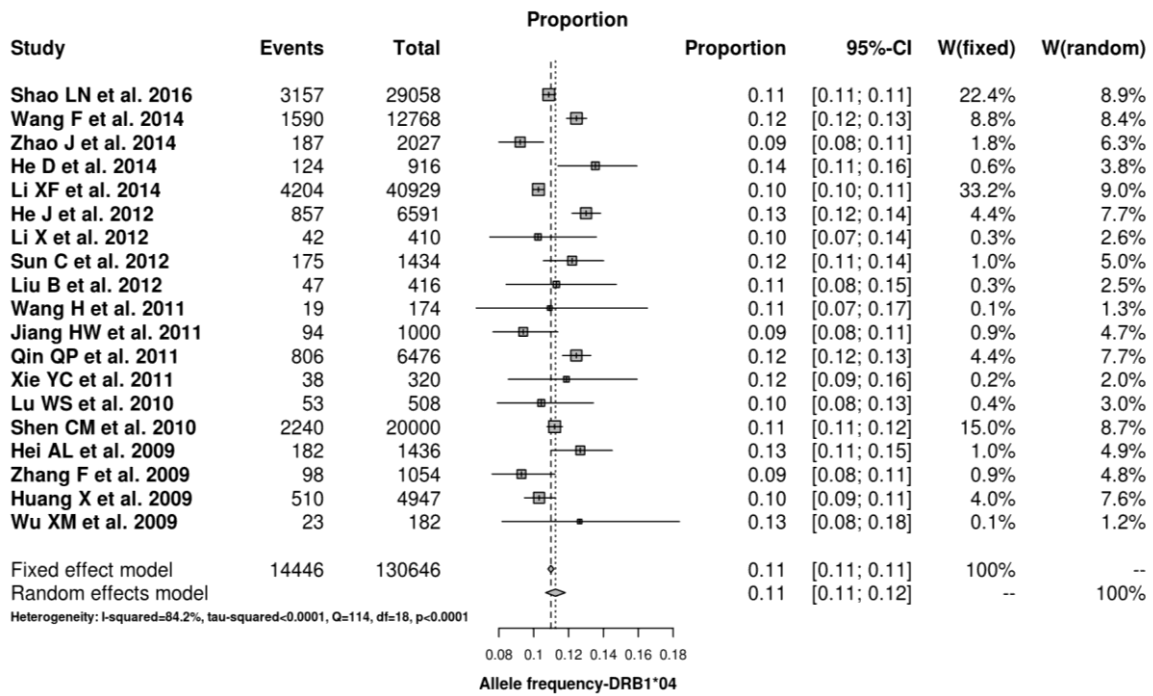


Figura suplementar 9C. Frequência do alelo HLA-DRB1*04 na China.

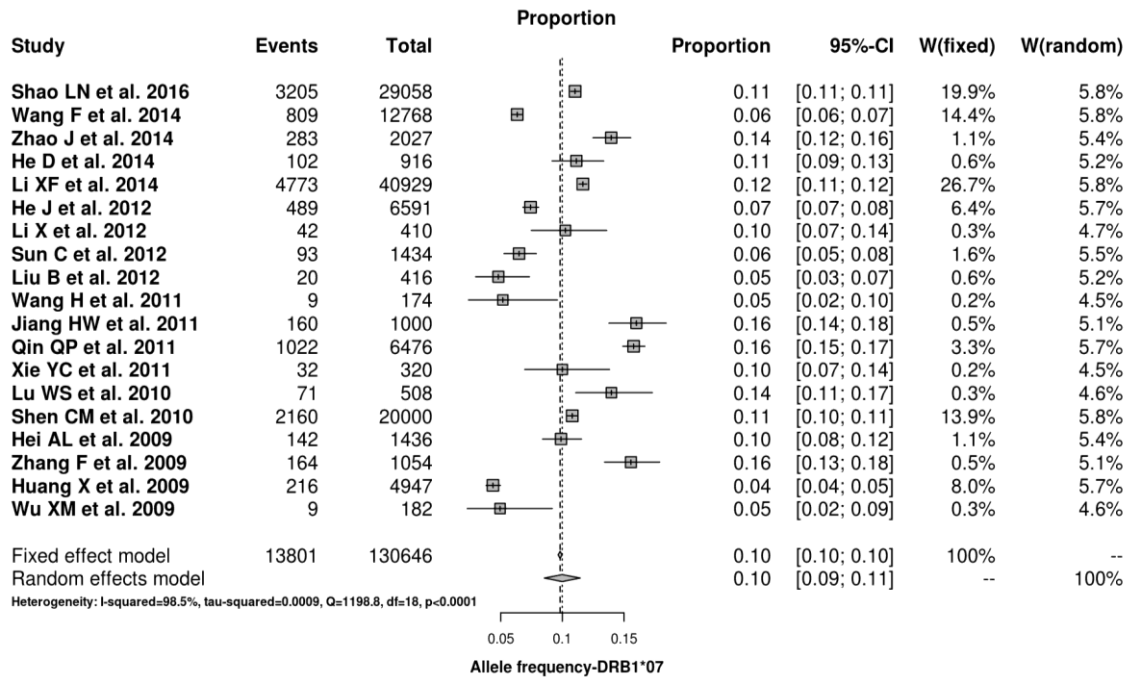


Figura suplementar 9D. Frequência do alelo HLA-DRB1*07 na China.

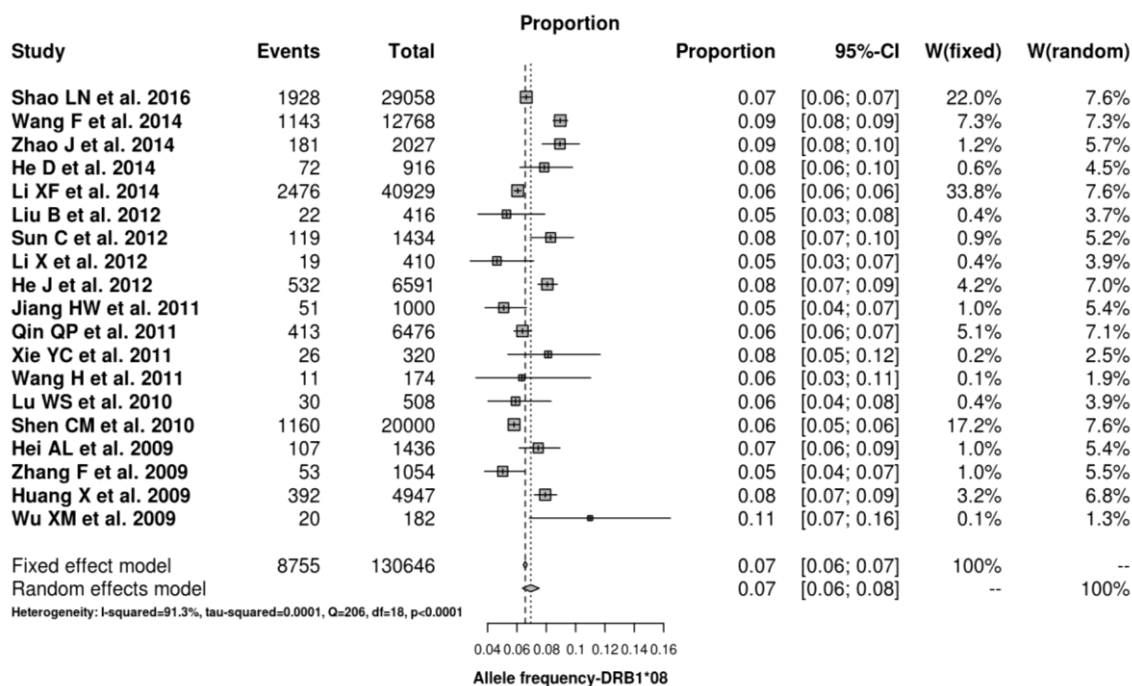


Figura suplementar 9E. Frequência do alelo HLA-DRB1*09 na China.

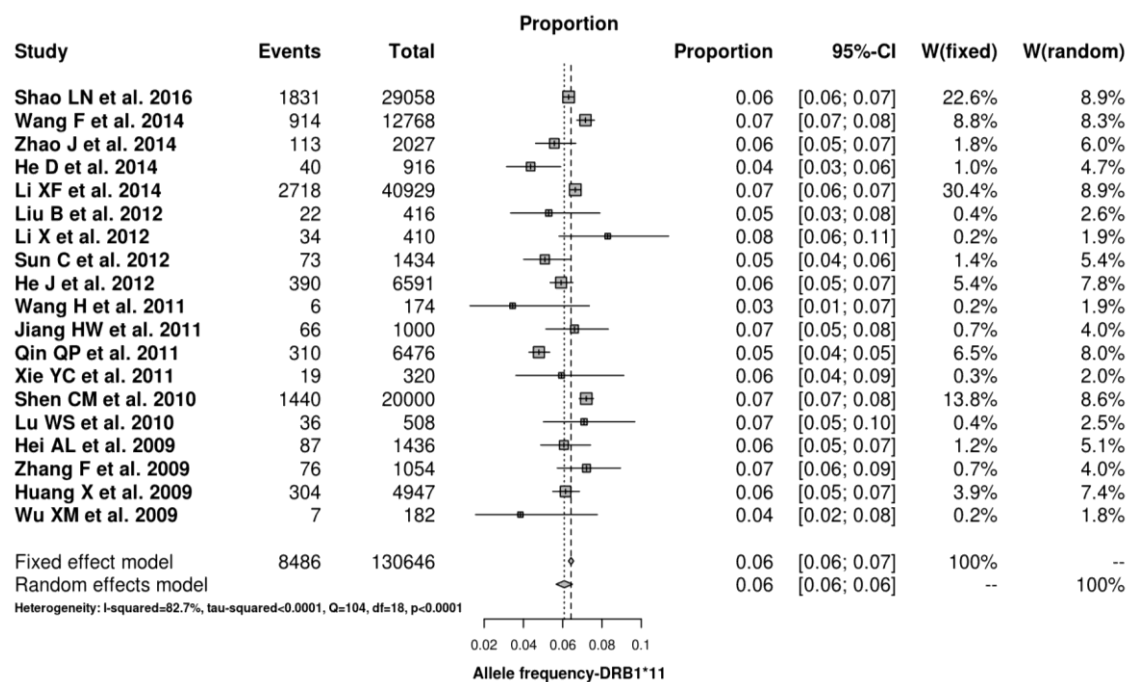


Figura suplementar 9F. Frequência do alelo HLA-DRB1*11 na China.

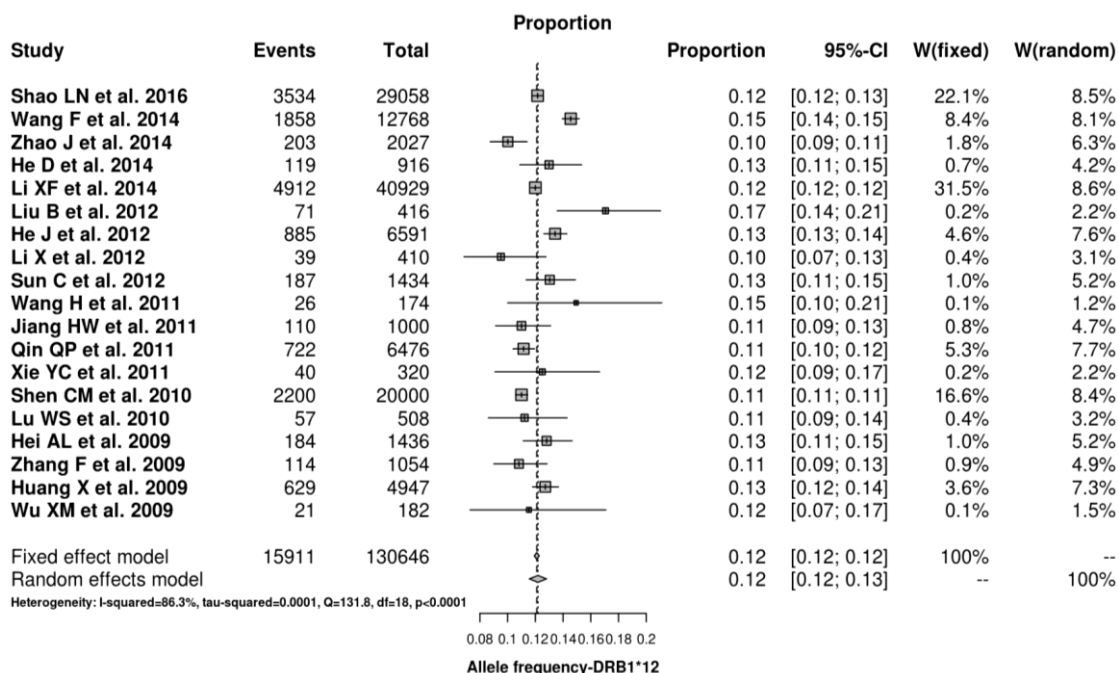


Figura suplementar 9G. Frequência do alelo HLA-DRB1*12 na China.

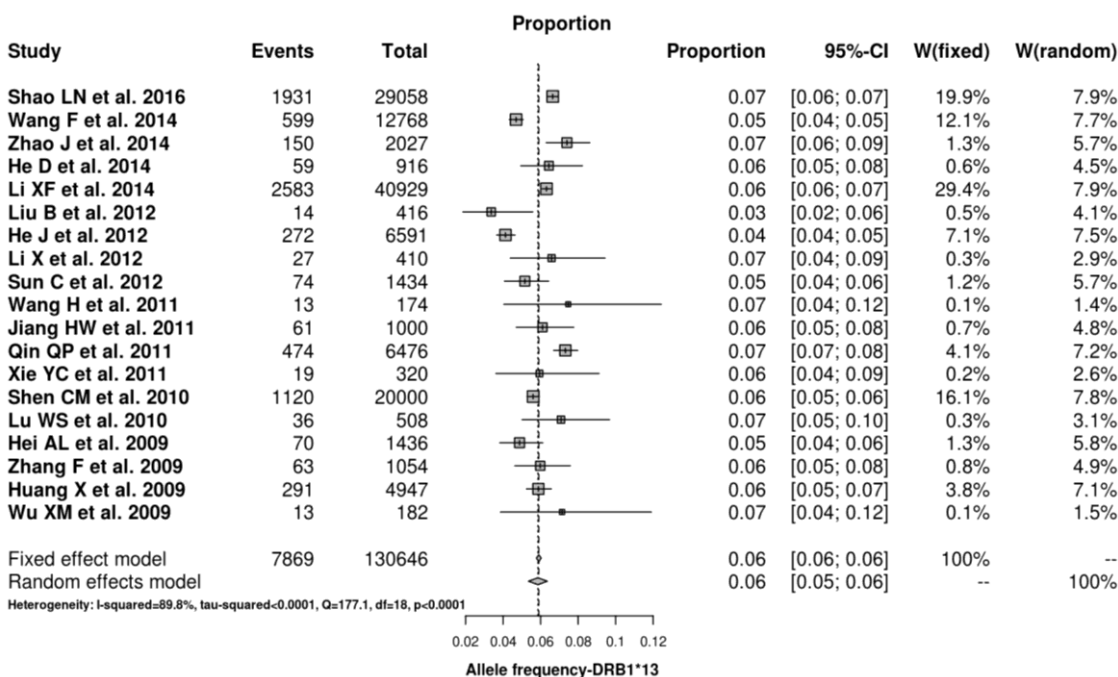


Figura suplementar 9H. Frequência do alelo HLA-DRB1*13 na China.

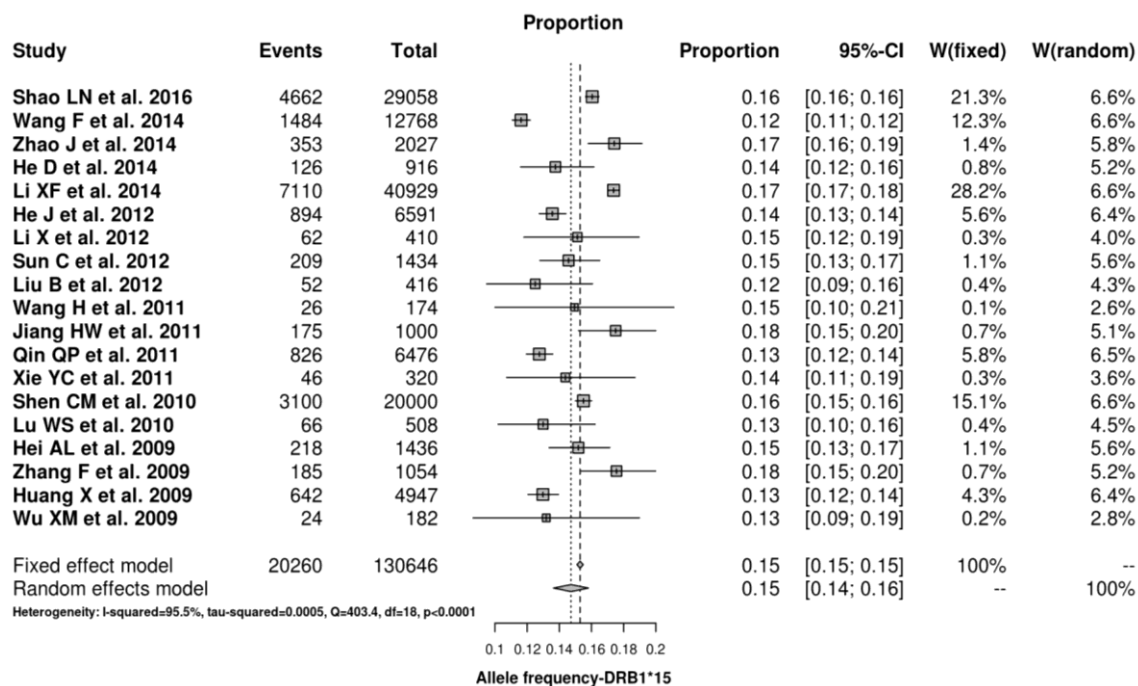


Figura suplementar 9I. Frequência do alelo HLA-DRB1*15 na China.

Apêndice 11. Figura suplementar 10. *Forest plot* dos artigos selecionados para a metanálise, na África do Sul, para os alelos HLA-DRB1 utilizados na predição de epítomos.

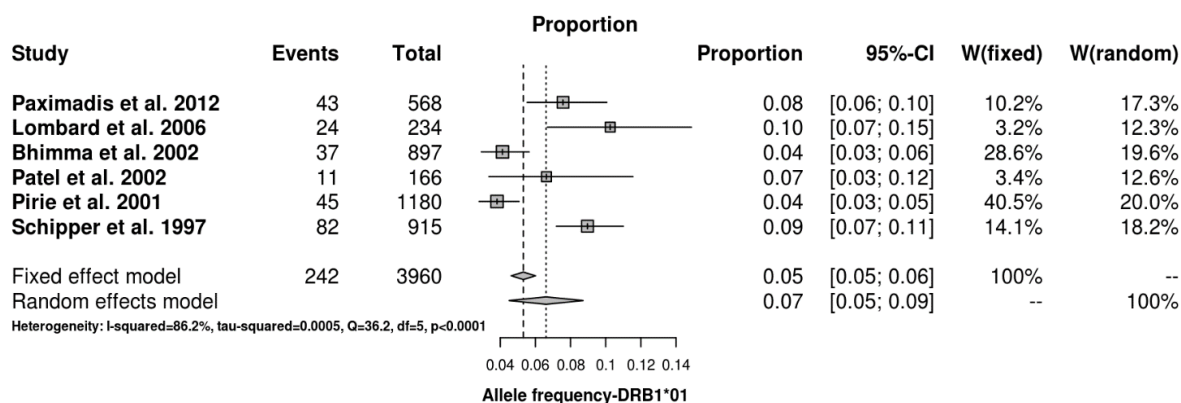


Figura suplementar 10A. Frequência do alelo HLA-DRB1*01 na África do Sul.

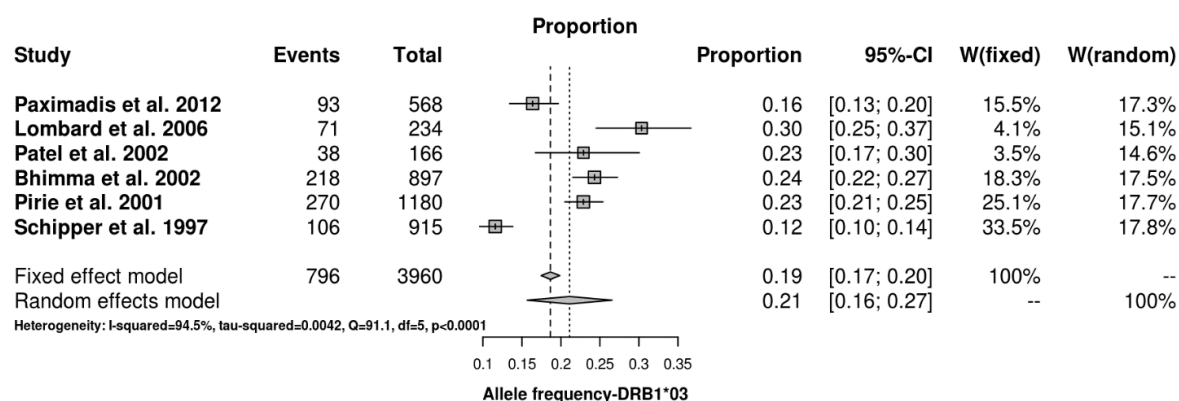


Figura suplementar 10B. Frequência do alelo HLA-DRB1*03 na África do Sul.

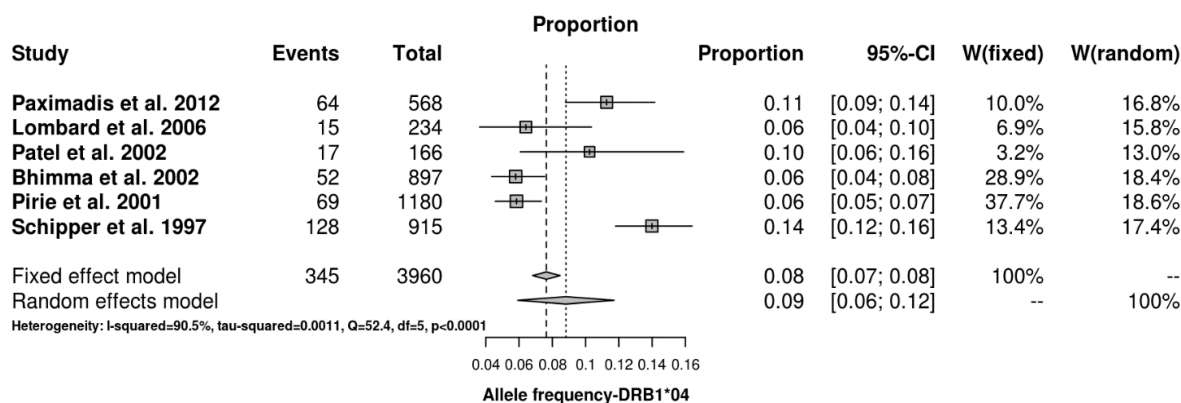


Figura suplementar 10C. Frequência do alelo HLA-DRB1*04 na África do Sul.

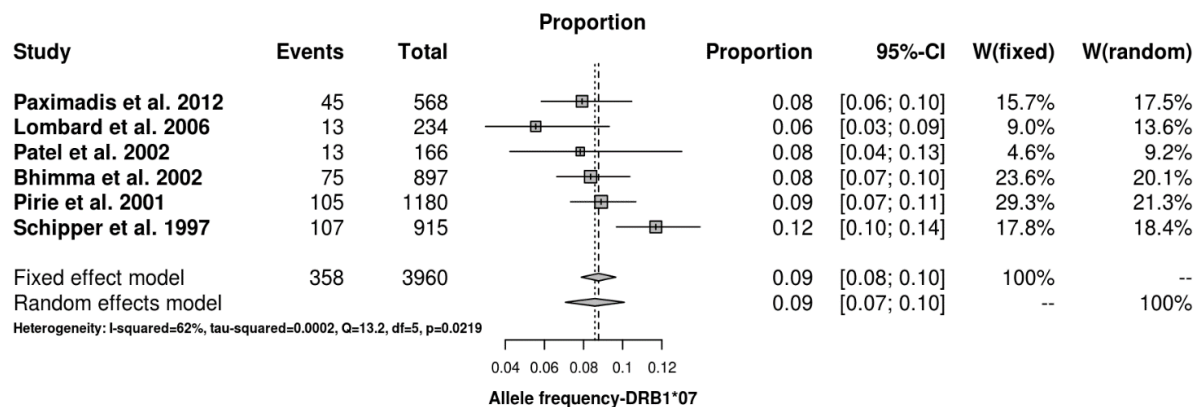


Figura suplementar 10D. Frequência do alelo HLA-DRB1*07 na África do Sul.

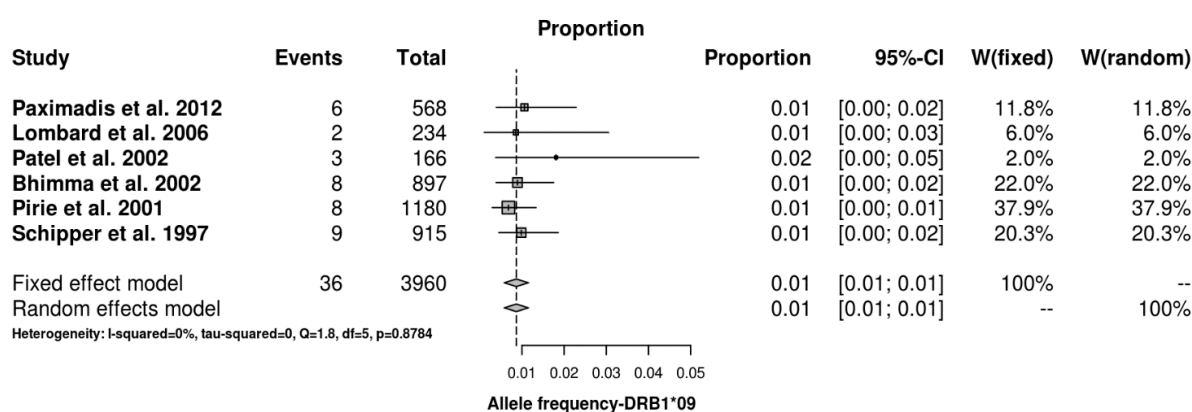


Figura suplementar 10E. Frequência do alelo HLA-DRB1*09 na África do Sul.

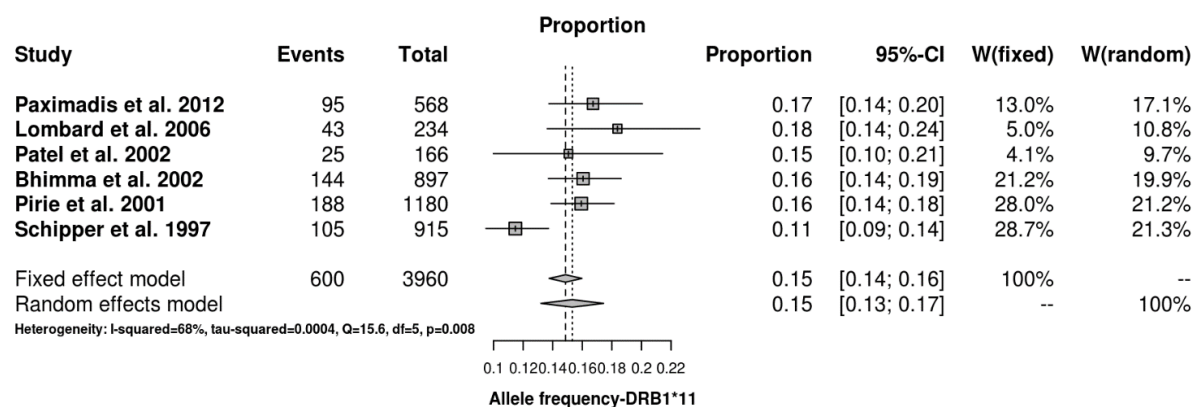


Figura suplementar 10F. Frequência do alelo HLA-DRB1*11 na África do Sul.

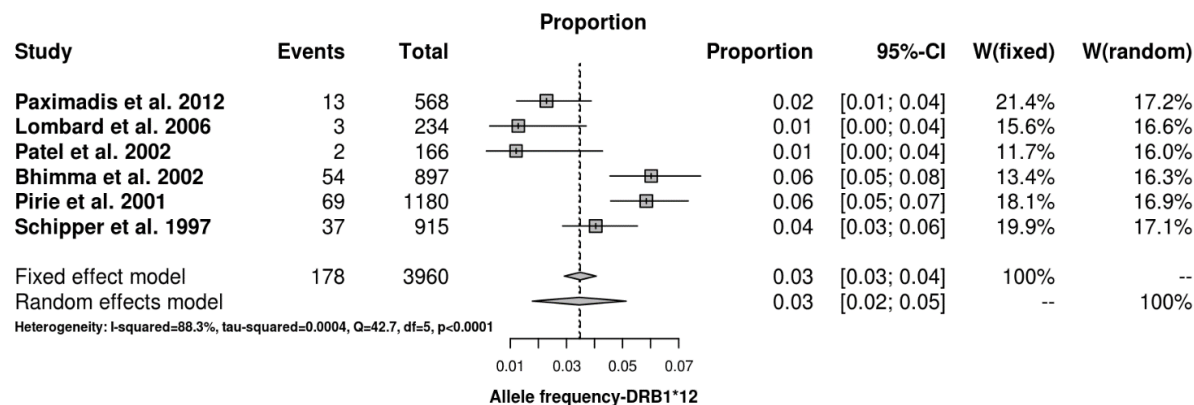


Figura suplementar 10G. Frequência do alelo HLA-DRB1*12 na África do Sul.

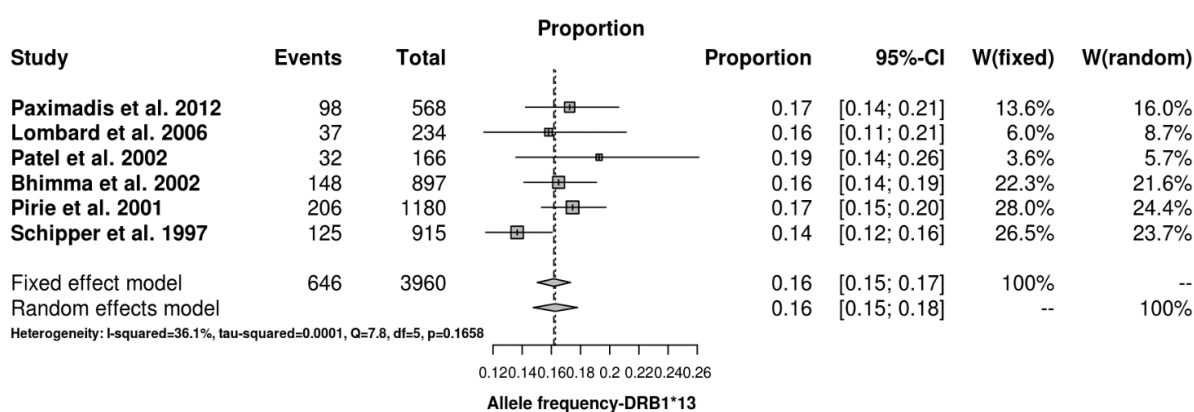


Figura suplementar 10H. Frequência do alelo HLA-DRB1*13 na África do Sul.

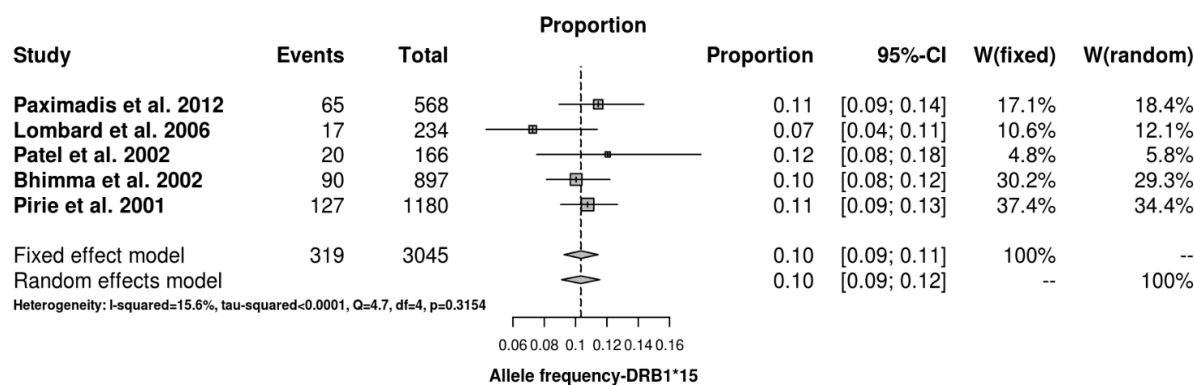


Figura suplementar 10I. Frequência do alelo HLA-DRB1*15 na África do Sul.

Apêndice 7. Tabela suplementar 1. Percentile rank da predição de epítomos aos subtipos alélicos HLA-DRB1*01 a *04 do mais frequentes.

HLA-DRB1	*0101	*0102	*0103	*0301	*0302	*0401	*0402	*0403	*0404	*0405	*0406	*0407	*0408	*0410	*0411
Proteína 1															
E1	15,82	3,32	2,43	1,12	2,96	1,31	0,5	1,4	1,39	2	1,4	0,8	0,3	2,7	2,6
E2	7,4	8	4,8	16,4	8,3	0,5	7,7	1	3,6	1,6	1	0,16	1	3,5	6
E3	13,5	7,4	7,26	13,57	24,7	2,5	1,8	7	7,6	9,5	7	2,8	2,3	1,9	14,8
E4	43	10	31	17	0	13	1	12	1,7	16	12	17	5	2,3	17
E5	8,3	2	7	12	11	10	6,4	13	4	4,5	13	9	5	0,4	11
Proteína 2															
E1	1	4	4	12	1	7	10	2	1	8	2	3	4	5	5
E2	10	9	3	19	20	3	11	5	3	15	5	1	2	9	13
E3	11	4	6	5	4	3	4	5	3	7	5	7	4	5	6
E4	6	6	7	11	1	2	0,6	12	6	10	12	6	3	4	23
E5	16	0,2	12	0,3	14	1	0,8	3	2	3	3	3	0,6	0,2	3
Proteína 3															
E1	14	2,4	15	17	19	7	0,2	12	14	21	12	14	2,8	2	18
E2	15	11	15	9	19	4	12	15	5	1	8,4	7,7	7,1	6,4	5,8
E3	17	9	8	8	36	4	9	16	2	1	8,7	8	7,3	6,6	5,9
E4	12	3,3	12,7	3,8	30	2,5	4	16	2	5,6	16	17	3,5	2	20
E5	1	13	15	15	0	3	0,1	17	22	25	17	24	5,4	4	16
Proteína 4															
E1	5,20	0,79	0,28	3,31	0,23	0,51	0,40	0,19	2,04	1,63	0,19	0,06	0,14	1,46	0,51
E2	15,38	6,91	23,69	3,99	4,95	1,23	0,27	3,02	1,41	0,90	3,02	1,41	0,30	1,46	5,52
E3	0,47	3,34	0,01	4,59	0,35	2,79	0,95	0,09	1,71	5,19	0,09	0,43	2,78	3,49	0,09
E4	13,71	4,72	8,89	17,90	16,27	5,77	6,03	10,40	3,29	7,09	10,40	9,40	5,01	4,68	1
E5	17,39	5,22	23,69	0,53	2,71	3,05	0,45	8,17	3,05	1,80	8,17	11,90	4,66	1,05	7,44
E6	0,42	5,15	11,86	11,59	1	6,65	6,82	11,90	4,14	0,82	11,90	8,88	1,11	3,23	12,82

Apêndice 8. Tabela suplementar 2. *Percentile rank* da predição de epítomos aos subtipos alélicos HLA-DRB1*07 a *15 do mais frequentes.

Epítopo	*0701	*0901	*1101	*1102	*1103	*1104	*1106	*1201	*1202	*1301	*1302	*1303	*1307	*1312	*1501	*1502	*1503	*1504
Proteína 1																		
E1	9	0,5	0,1	1,65	1,4	0,65	0,65	0,9	20	2,4	3,9	1,6	0,35	5,7	2,6	0,6	5,66	9
E2	5	3,9	11,3	19	43	20,4	20,4	38	49	20	37	12,8	7,5	14,7	1	9,4	32,6	23,4
E3	5,5	13,7	9,3	7,5	33,4	6,8	6,8	7,5	1	17	16	19,5	8	34,6	19,7	11	46	46
E4	1	28	14	2,3	16	10,4	10,4	48,9	22,4	4,6	12,8	21	10,2	27	4,5	2,3	17	15
E5	23	11	8	9	26,7	5,6	5,6	7,8	26	8,4	6	13,8	5	17,6	3,3	1,7	4,6	12
Proteína 2																		
E1	10	1	5	6	26	3	3	8	21	7	1	1	3	24	13	17	27	20
E2	9	0,3	7	13	26	15	15	7	1	18	13	12	4	16	28	2	21	18
E3	12	16	7	10	6	5	5	8	1	10	4	7	13	22	8	5	26	1
E4	27	24	5	0,2	1	3	3	16	1	1	25	27	2	29	20	7	1	28
E5	30	26	3	6	17	3	3	0	20	3	1	1	3	1	8	3	16	20
Proteína 3																		
E1	16	19	7	2	7	4,5	4,5	1	13	4,6	15	7	8,5	7,5	9	11	9	7
E2	5,1	4,5	3,8	3,2	1	2,5	1,9	1,2	0,6	0,03	0,6	1,3	1,9	2,6	1	3,28	3,9	4,5
E3	5,2	4,5	3,9	3,2	1	2,5	1,8	1,8	0,4	0,19	0,8	1,5	2,23	2,9	1	3,6	4,2	4,9
E4	2	8	9	9	27	1	1	1	1	11	1	16	4	23,5	4,4	7	26	28
E5	23	1	11	1	17,6	8,3	8,3	11	23	5	17	24	11,5	26	8	12	22	23
Proteína 4																		
E1	0,18	0,07	0,35	2,27	4,86	0,84	0,84	1	18,83	1,93	2,85	0,69	0,40	1,64	7,92	0,35	4,85	5,54
E2	12,85	3,21	0,16	0,29	5,86	1,89	1,89	1,37	4,12	1,93	2,11	2,11	0,08	1,28	6,06	0,90	3,76	2,76
E3	1,42	0,79	3,13	4,77	0,23	1,89	1,89	3,53	5,81	4,22	3,47	0,01	6,95	0,28	5,66	3,60	0,50	1,96
E4	12,81	21,79	14,24	11,68	21,26	10,97	10,97	4,41	1	10,35	20,12	14,29	17,27	23,29	2,35	1,26	18,88	26,10
E5	13,27	2,70	2,02	0,14	2,71	1,16	1,16	1	8,64	0,23	16,33	2,06	1,10	3,68	1	2,25	10,62	8,57
E6	12,17	0,50	1,33	9,20	1	4,82	4,82	2,12	15,68	5,45	1	1	3,11	1	1,69	0,19	9,74	10,85

