

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

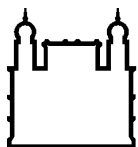
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo de Associação entre o Sistema HLA e a Hanseníase

Matilde Romero

Rio de Janeiro

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Autora: Matilde Romero

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O SISTEMA HLA E A HANSENÍASE

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO

2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R763 Romero, Matilde

Estudo de associação entre o sistema HLA e a Hanseníase / Matilde Romero. – Rio de Janeiro , 2010.

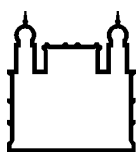
xiv, 88 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.

Bibliografia: f. 72-88

1. Hanseníase. 2. HLA. 3. Locus. 4. *Mycobacterium leprae*. 5. Interferon-gama. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Autora: Matilde Romero

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O SISTEMA HLA E A HANSENÍASE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

EXAMINADORES:

Dra. Mariza Gonçalves Morgado – Fundação Oswaldo Cruz - Presidente

Dr. Geraldo Moura Batista Pereira – Fundação Oswaldo Cruz - Titular

Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrinho Pôrto – UERJ - Titular

Dr. Antônio Guilherme Fonseca Pacheco – Fundação Oswaldo Cruz – Suplente/Revisor

Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes – Fundação Oswaldo Cruz – Suplente

Rio de Janeiro, 04 de Outubro de 2010.

Aos meus pais: Ramón (*in memoriam*) e Mathilde por seu amor incondicional.
Aos meus irmãos: Malvina, Helena, Ramón e Márcia que são meus melhores amigos.
Aos meus sobrinhos: Marcella, Eduarda, Vítor e Amanda que me proporcionam muitas alegrias.

Agradecimentos

Ao Dr. José Roberto Moraes (*in memorium*), pelos primeiros ensinamentos em HLA que sempre foram transmitidos com muito entusiasmo e incentivo que terei o privilégio de carregar por toda minha vida.

À Dra. Maria Elisa Moraes, por ser mais que uma mestra, uma verdadeira amiga.

Ao meu orientador Dr. Milton Moraes, pelos ensinamentos, apoio e contribuição imensuráveis neste projeto, mas principalmente por me incentivar e até acalmar nos momentos mais difíceis.

À Dra. Cynthia Cardoso por todos os ensinamentos que foram transmitidos de maneira muito clara e com muita paciência para esclarecer todas as minhas dúvidas no decorrer do mestrado.

Ao Dr. Antonio Pacheco pelo suporte estatístico e pela revisão tão cuidadosa dessa dissertação.

Às amigas Carolina e Claudia por estarem comigo desde o início em todos os momentos e principalmente me incentivando nas disciplinas tornando-as mais animadas.

À amiga Silvia que me ajudou nas adaptações das figuras sempre com muita paciência.

Aos amigos que fiz no laboratório de Hanseníase: Patrícia, Luana, Alejandra, Beatriz (Xuxu), Guilherme, Paula, Flávia, Lucía, Carolzinha, Suelen, Tiana, Marcelo, Sandro, Valcemir, Carlos Diego, Diogo e Thiago, pelo companheirismo e bons momentos de convívio.

Aos amigos que fiz no laboratório de Imunogenética: Esther, Christina, Alexandre, William, Marisa, Cesar, Gaspar, Izabella, Leandro, Anna Paula, Priscilla, José Luiz, Rogéria, Cristina e Regina; pelo carinho, companheirismo, momentos de descontração e principalmente pela paciência em virtude de minha constante ausência nos últimos meses.

Aos amigos do laboratório JRM: Isabel, Milene, Thábyta, Branca e Ana Claudia que sempre me incentivaram.

Por fim, ao Eduardo, por ser um companheiro maravilhoso e que mesmo sem entender do assunto sempre me apoiou e incentivou.

Índice

Lista de siglas e abreviaturas -----	viii
Lista de figuras -----	x
Lista de tabelas -----	xi
Resumo -----	xii
Abstract -----	xiii
I. INTRODUÇÃO -----	1
1. HANSENÍASE -----	1
1.1. Aspectos Gerais -----	1
1.2. Epidemiologia e Transmissão -----	2
1.3. Agente Etiológico -----	3
1.4. Classificação da doença -----	5
1.5. Diagnóstico e Tratamento -----	8
1.6. Imunologia -----	9
1.7. Influência Genética na Hanseníase -----	11
2. O SISTEMA HLA -----	14
2.1. Definição e Histórico -----	14
2.2. Organização Genômica -----	15
2.3. Estrutura e Função das Moléculas HLA -----	18
2.3.1. Moléculas HLA classe I -----	18
2.3.2. Moléculas HLA classe II -----	18
2.4. Processamento e Apresentação de Antígenos -----	20
2.4.1. Antígenos Citosólicos -----	20
2.4.2. Antígenos Endocitados -----	20
2.4.3. Apresentação Cruzada -----	21

2.4.4. A Apresentação dos peptídeos -----	22
2.5. Fator de Necrose Tumoral (TNF) -----	23
2.6. Polimorfismo e Desequilíbrio de Ligação -----	25
2.7. HLA e Doenças -----	26
2.8. Desenhos e Estudo em HLA e Doenças Infecciosas -----	28
2.9. HLA e Hanseníase -----	30
II. OBJETIVOS -----	35
1. Objetivo Geral -----	35
2. Objetivos Específicos -----	35
III. MATERIAIS E MÉTODOS -----	36
1. População e Desenho de Estudo -----	36
2. Extração de DNA -----	38
2.1. Pacientes -----	38
2.2. Controles -----	38
3. Genotipagem dos Alelos HLA -----	39
3.1. Tipagem HLA pelo método Luminex -----	40
3.2. Tipagem HLA pelo método InnoLipa -----	40
4. Genotipagem do Polimorfismo TNF -308G>A -----	41
5. Análise Estatística -----	42
IV. RESULTADOS -----	44
1. Análise dos Alelos HLA-A -----	44
2. Análise dos Alelos HLA-B -----	44
3. Análise dos Alelos HLA-C -----	47
4. Análise dos Haplótipos HLA -----	48
4.1. Análise das combinações haplotípicas HLA-A-C, HLA-A-B e HLA-B-C ---	48

4.2. Análise dos Haplótipos HLA-A-B-C -----	53
5. Análise do Polimorfismo TNF -308G>A -----	55
6. Análise dos Haplótipos estendidos HLA –A-B-C-DRB1-TNF -308G>A -----	56
V. DISCUSSÃO -----	58
1. Estudo de Alelos HLA classe I (HLA-A, B e C) e Hanseníase -----	58
2. Estudo de Haplótipos HLA classe I e Hanseníase -----	60
3. Estudo do Polimorfismo TNF -308G>A e Hanseníase -----	61
4. Estudo dos Haplótipos Estendidos (HLA –A-B-C-DRB1-TNF -308) e Hanseníase -----	63
5. Outras Considerações -----	64
6. O Sistema HLA e o Processo Evolutivo -----	67
7. Considerações Finais -----	68
VI. CONCLUSÕES -----	70
Conclusão Geral -----	71
REFERÊNCIAS -----	72

Lista de siglas e abreviaturas

APC: célula apresentadora de antígenos

BAAR: bacilo álcool-ácido resistente.

BB: borderline-borderline

BL: borderline-lepromatosa

BT: borderline-tuberculoide

DC-SIGN: receptor de células dendríticas, do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin”.

DL: desequilíbrio de ligação.

DN: dano neural.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

ENH: Eritema nodoso hansênico, também denominada Reação do Tipo 2.

GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófago

HLA: antígeno leucocitário humano, do inglês “human leukocyte antigen”.

HSP: proteína de choque térmico.

I: hanseníase indeterminada.

IFN- γ : interferon-gama.

IL: interleucina.

KDa: Kilodaltons

LAM: lipoarabinomanana

LL: lepromatosa

LMP2 - LMP7: polipeptídeo 2 e 7 de baixa massa molecular (do inglês: low-molecular mass polypeptide).

LPS: lipopolissacarídeo.

LT- α : linfotoxina alfa.

MB: multibacilar.

Mbp: Mega pares de base (10^6).

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, major histocompatibility complex)

MMPI e II: polipeptídeo maior de membrana 1 e 2

MS: Ministério da Saúde.

MIIC: compartimento do moléculas MHC classe II.

NF- κ B: fator nuclear kappa-B

NO: óxido nítrico.

NRAMP: proteína associada à resistência natural de macrófagos, do inglês “natural resistance associated macrophage protein”.

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAMP: padrão molecular associado ao patógeno

PARK2: gene que codifica a proteína parkina.

PB: paucibacilar.

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGL-1: glicolípido fenólico 1.

PN: forma neural pura, também conhecida como hanseníase neurítica.

PQT: poliquimioterapia.

PRR: receptor de reconhecimento padrão.

RNA: ácido ribonucleico.

RR: Reação reversa, também denominada Reação do Tipo 1.

SD: Shine-Dalgarno

SLC11A1: gene que codifica a proteína conhecida como NRAMP1. A sigla vem do inglês “solute carrier family 11, member 1”.

SNPs: polimorfismos de base única, do inglês “single nucleotide polymorphisms”.

STRs: polimorfismos do tipo microssatélite, do inglês “short tandem repeats”.

SSOP: Sequence-specific Oligonucleotide Probes (Sondas de oligonucleotídeos seqüências específicos).

TAP: transportador associado a processamento de antígenos.

TGF- β : fator de crescimento e transformação beta, do inglês “transforming growth factor beta”.

Th1/Th2: linfócitos T auxiliares 1 e 2, do inglês “T helper”.

TLR: receptores Toll, do inglês “Toll-like receptors”.

TNF: fator de necrose tumoral

TT: tuberculose.

VDR: receptor de vitamina D.

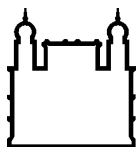
WHO: do inglês “World Health Organization

Lista de Figuras

Figura 1.1: Taxas de prevalência da hanseníase no mundo -----	3
Figura 1.2: Aspectos imunológicos das manifestações clínicas da hanseníase -----	7
Figura 1.3: Influência genética no curso da hanseníase -----	13
Figura 1.4: Representação esquemática do cromossomo 6 humano -----	17
Figura 1.5: Estrutura de uma molécula HLA Classe I e Classe II -----	19
Figura 1.6: Representação esquemática de possíveis fontes de proteínas apresentadas pelas moléculas HLA Classe I -----	21
Figura 1.7: Diagrama em forma de fita de uma fenda de ligação da molécula HLA ---	22
Figura 3.1: Fluxograma das etapas de análise dos alelos e haplótipos HLA -----	37
Figura 3.2: Representação gráfica utilizada para discriminação alélica por PCR em tempo real para o polimorfismo do gene <i>TNF</i> -308 -----	42
Figura 5.1: Influência genética nos estágios de imunidade do hospedeiro diante do M. Leprae -----	69

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Exemplos de associações de alelos HLA com doenças infecciosas -----	30
Tabela 1.2: Associação de alelos e haplótipos HLA com a hanseníase em diferentes populações -----	33
Tabela 1.3: Associação de polimorfismos não-HLA na região 6p21.3 com a Hanseníase em diferentes populações -----	34
Tabela 3.1: Características gerais dos indivíduos componentes das três populações de estudo de acordo com sexo e etnia -----	36
Tabela 4.1: Distribuição de frequência alélica HLA-A entre pacientes com hanseníase e controles -----	45
Tabela 4.2: Distribuição de frequência alélica HLA-B entre pacientes com hanseníase e controles -----	46
Tabela 4.3: Distribuição de frequência alélica HLA-C entre pacientes com hanseníase e controles -----	47
Tabela 4.4: Distribuição de frequência das combinações haplotípicas HLA-A-C -----	49
Tabela 4.5: Distribuição de frequência das combinações haplotípicas HLA-A-B -----	50
Tabela 4.6: Distribuição de Frequência das combinações haplotípicas HLA- B-C -----	52
Tabela 4.7: Distribuição de Frequências dos Haplótipos HLA-A-B-C -----	54
Tabela 4.8: Frequências alélicas e genotípicas observadas nos grupos de pacientes e controles para o polimorfismo de base única <i>TNF</i> -308 -----	56
Tabela 4.9: Distribuição de frequência haplotípica em controles e pacientes portadores de hanseníase e análise de associação com a doença -----	57



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

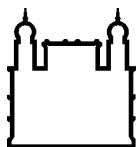
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O SISTEMA HLA E A HANSENÍASE

RESUMO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/TESE

Matilde Romero

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório com tropismo para Macrófagos na pele e células de Schwann nos nervos periféricos. As manifestações clínicas da hanseníase correspondem ao tipo de resposta imune do hospedeiro ao patógeno para conferir suscetibilidade. Muitas doenças têm sido relacionadas com o sistema HLA devido à sua importância na resposta imune adaptativa. Diversos estudos genéticos, em diferentes populações, têm sido realizados com o propósito de associar o HLA-DRB1 com a ocorrência da hanseníase *per se* e suas formas clínicas. Porém, os trabalhos realizados com HLA classe I são limitados. O presente estudo teve como objetivo analisar possíveis associações entre os alelos e haplótipos HLA classe I, além do polimorfismo *TNF* -308G>A e a hanseníase *per se*. Dessa forma, um estudo de caso-controle foi realizado em uma população de 778 pacientes não relacionados, portadores de hanseníase e 661 controles residentes na mesma área geográfica do Rio de Janeiro. Inicialmente, foram identificadas as frequências alélicas e haplotípicas de HLA-A, HLA-B e HLA-C, assim como o polimorfismo *TNF* -308G>A, que foram comparadas entre os casos e controles. Posteriormente, foram identificadas as frequências dos haplótipos estendidos (HLA-A-B-C-DRB1-*TNF* -308G>A) e comparadas entre as duas populações do estudo. Os resultados demonstraram uma associação entre os alelos HLA-A* 11 e HLA-A* 30 com a susceptibilidade à hanseníase ($p=0,009$ e $p=0,017$, respectivamente), enquanto os alelos HLA-A* 01, HLA-B*27, HLA-B*50 e HLA-C*05 sugeriram uma associação com a resistência à doença ($p=0,029$, $p=0,005$, $p=0,002$ e $p=0,039$, respectivamente). As análises dos haplótipos revelaram associação significativa de HLA-A*11-B*15 (OR=6,15) e HLA-A*30-B*42-C*17 (OR=4,16) com a susceptibilidade à hanseníase, assim como o HLA-A*11-B*35-C*04 (OR=2,37), mas com perda de significância do teste quando corrigido para as covariáveis sexo e etnia ($p=0,117$). Por outro lado, os haplótipos HLA-A*01-C*06 (OR=0,34), HLA-B*27-C*02 (OR=0,10) e HLA-B*50-C*06 (OR=0,18) demonstraram associações significativas com a resistência à doença. Os resultados também mostraram que o genótipo GA do *TNF* -308 esteve associado com a proteção à hanseníase (OR=0,74), porém com o nível de significância considerado “borderline” quando corrigido ($p=0,06$). Em relação ao haplótipo estendido, o estudo indicou associação entre HLA-A*02-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR=4,66) e HLA-A*03-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR=4,72) e a susceptibilidade à hanseníase, porém com perda de nível de significância quando corrigido para as covariáveis sexo e etnia ($p=0,077$ e $p=0,101$, respectivamente). Muitas dessas associações já foram encontradas em outras populações, confirmando a importância desse sistema no desenvolvimento da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF ASSOCIATION BETWEEN ALLELES AND HAPLOTYPES OF THE HLA SYSTEM AND LEPROSY

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Matilde Romero

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that is an obligate intracellular parasite with tropism for Macrophages in the skin and Schwann cells in the peripheral nervous system. Clinical manifestations of Leprosy correlate with the type of immune response from the susceptible host to the pathogen. The HLA system has been related to several diseases, due to its important role in the adaptive immune response. Several genetic studies of different populations have been conducted to correlate susceptibility or resistance of the HLA-DRB1 to leprosy *per se* and its clinical forms, whereas HLA class I studies are limited. This present study aimed to analyze the possible association between alleles and haplotypes HLA class I and the *TNF* -308G>A polymorphism and leprosy *per se*. Therefore, we used a population-based case control study with 778 unrelated patients with leprosy and 661 controls from the same geographic area of Rio de Janeiro. First, HLA-A, HLA-B and HLA-C were evaluated, resulting in the allele and haplotype frequencies that were compared between cases and controls, as well as the *TNF* -308G>A polymorphisms. Lastly, the extensive haplotype frequencies (HLA-A-B-C-DRB1-*TNF* -308G>A) were performed and compared between both populations. Our results suggested association of the HLA-A*11 and A*30 alleles and leprosy susceptibility ($p=0.009$ and $p=0.017$, respectively), whereas HLA-A*01; HLA-B*27; HLA-B*50 and HLA-C*05 appeared associated with resistance to leprosy ($p=0.029$; $p=0.005$; $p=0.002$ and $p=0.039$, respectively). Analyses of the haplotypes demonstrated significant association of HLA-A*30-B*15 (OR=6.15) and A*30-B*42-C*17 (OR=4.15) with susceptibility of leprosy, as well as the HLA-A*11-B*35-C*04 (OR=2.37), but did not reach significant level when adjusted for the covariates gender and ethnicity ($p=0.117$). In opposite, HLA-A*01-C*06 (OR=0.34), B*27-C*02 (OR=0.10) and B*50-C*06 (OR=0.17) haplotypes demonstrated significant association with resistance to leprosy. Results also showed that the GA genotype of *TNF* -308 was associated to protection to leprosy (OR=0.74), but with the significance level considered “borderline” when adjusted ($p=0.06$). For the extensive haplotype, the study indicated association between HLA-A*02-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR=4.66) and HLA-A*03-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR=4.72) and susceptibility to leprosy, but with lost significance level when adjusted for the covariates gender and ethnicity ($p=0.077$ and $p=0.101$, respectively). Many of these associations have already been found in other populations with leprosy, which confirmed the importance of this system in the disease development.

I. INTRODUÇÃO

1. HANSENÍASE

1.1. Aspectos Gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que é um parasita intracelular obrigatório, principalmente de macrófagos na pele e de células de Schwann nos nervos periféricos. O *M. leprae* foi descoberto em 1873 por Gerhard Henrik Armauer Hansen, um médico norueguês que, baseado em estudos epidemiológicos, formulou a hipótese de que a hanseníase possuía uma causa específica e assim, mudou o conceito causador da doença que era considerada hereditária. A hanseníase é uma doença milenar que, apesar da diminuição de sua prevalência nos últimos anos, ainda permanece como problema de saúde pública em muitos países (OMS, 2009).

Enquanto a maioria dos indivíduos que são expostos ao bacilo *M. leprae* são resistentes, um pequeno grupo, entre 0,1 – 1% desenvolve a doença. As manifestações clínicas da hanseníase estão associadas ao tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro ao patógeno, sendo caracterizadas por lesões cutâneas e do sistema nervoso periférico. O curso da doença pode se estender por anos e o tropismo do *M. leprae* pelos nervos periféricos implica em neuropatia que pode levar a incapacidade e deformidade física em vários graus com consequências psico-sociais para os pacientes e seus familiares.

Embora o *M. leprae* possua baixa patogenicidade, sua infectividade é elevada. Esta propriedade não depende apenas de suas características intrínsecas, mas sobretudo, de sua relação com o hospedeiro e o grau de endemicidade do meio. Estudos reportaram um risco aumentado em até 10 vezes, quando há uma situação de mais de um caso no mesmo domicílio (Vijayakumaran e col., 1998). Os fatores mais importantes são a proximidade e intensidade do contato e a suscetibilidade herdada. Porém, ainda existem lacunas de conhecimento quanto a outros prováveis fatores de risco implicados, como sexo, idade e especialmente aqueles relacionados ao ambiente social (Moet e col, 2004 e Portal da Saúde, 2010).

1.2. Epidemiologia e Transmissão

Até a década de 1990 a hanseníase era uma doença endêmica com ampla distribuição mundial, incluindo os países da Europa e Ásia. Um programa de eliminação da hanseníase, adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1991, definiu que a prevalência de registros deveria estar abaixo de 1 caso por 10.000 habitantes. A introdução da poliquimioterapia (PQT) em larga escala possibilitou que essa meta fosse alcançada por muitos, mas não todos os países. A hanseníase continua sendo um problema de saúde pública em diversos países de baixo desenvolvimento sócio-econômico. Conforme dados divulgados pela OMS, em 2009 a prevalência da hanseníase global foi de 213.036 casos e o número de casos novos detectados foi 249.007. Destes, cerca de 80%, concentram-se em apenas 5 países: Índia, Brasil, Indonésia, República Democrática do Congo e Bangladesh.

O Brasil tem diminuído sua prevalência anualmente, porém com valor acima de 20 casos a cada 100.000 habitantes (Figura 1.1), possui a maior prevalência no ranking mundial (OMS, 2009). Em 2008, ao Brasil coube ainda o segundo lugar no ranking em número de novos casos (38.914). O Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase, adotado no ano de 2006 com o objetivo de reduzir a taxa de prevalência para menos de 10 casos a cada 100.000 habitantes, passou recentemente por revisão das normas e critérios de controle, tratamento e sistema de vigilância com o objetivo de reduzir as fontes de transmissão principalmente nas regiões com maiores números de casos, porém com acompanhamento por meio do coeficiente de detecção de casos novos em substituição ao indicador de prevalência (Guia de Vigilância Epidemiológica/ Ministério da Saúde-MS).

Diversos fatores como; o diagnóstico tardio e o longo período de incubação da doença; contribuem para a persistente taxa elevada de transmissão da hanseníase, apesar dos programas mundiais de controle e tratamento. Além disso, baixas condições sócio-econômicas e falta de acesso ao tratamento adequado estão associadas com a persistente incidência da doença em determinadas regiões brasileiras como Norte e Nordeste. Juntas, essas duas regiões foram responsáveis por mais de 60% de novos casos no ano de 2009 (DATASUS, 2010).

Pouco se sabe sobre o mecanismo de transmissão do *Mycobacterium leprae*. Acredita-se que, através do convívio de indivíduos suscetíveis com pacientes não tratados, o bacilo penetre pelas vias aéreas superiores e, dependendo da resposta imune do

organismo, pode ou não se disseminar. O *M. leprae* tem um período de incubação lento que varia entre 3 e 5 anos e demonstra preferência por crescimento em regiões mais frias do organismo, sendo caracterizada por lesões cutâneas e do sistema nervoso periférico, além de acometer mucosas, olhos, testículos e linfonodos. Novas estratégias de controle da doença e monitoramento das populações de alto risco continuam sendo um desafio (Gallo e col., 2005 e Warwick e Lockwood, 2004).

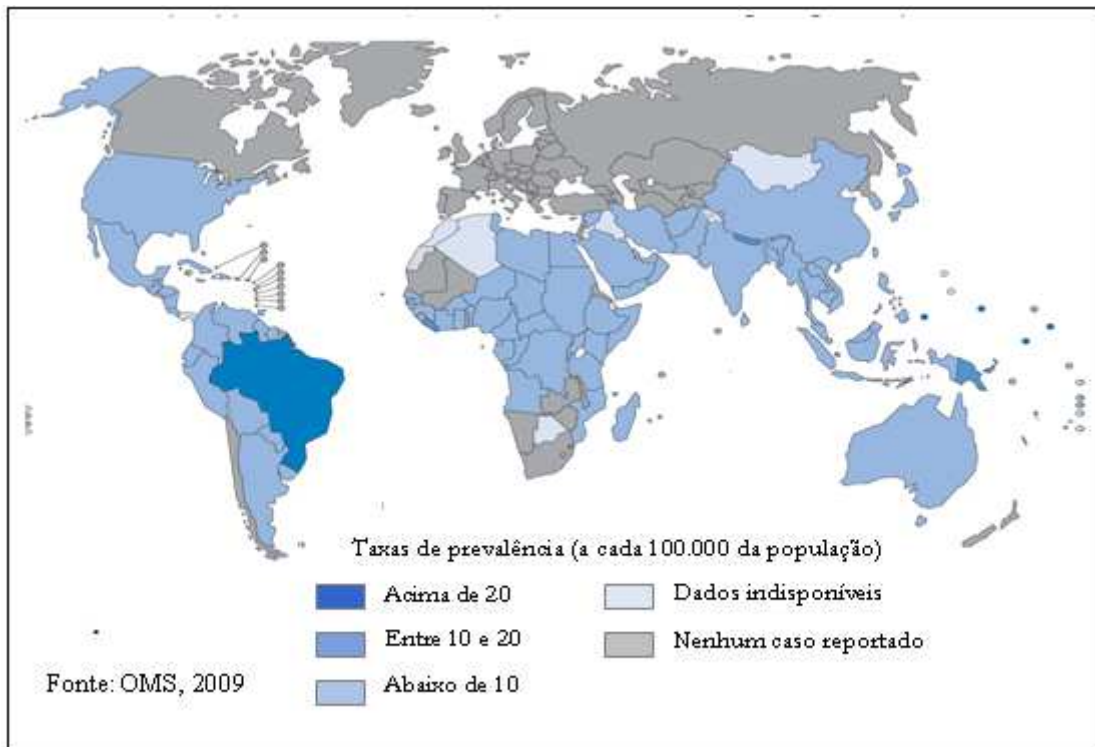


Figura 1.1: Taxas de prevalência da hanseníase no mundo. Dados reportados no mês de Janeiro de 2009 pela Organização Mundial de Saúde. O Brasil possui a maior taxa de prevalência mundial.

1.3. Agente Etiológico

O *Mycobacterium leprae* é um bacilo em forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado com extremidades arredondadas de aproximadamente 1 a 8 micra de comprimento e 0,2 a 0,5 micrômetro de largura. Cora-se em vermelho pela fucsina e não se decora após a lavagem em solução de álcool-ácido sendo, portanto, um bacilo álcool-

ácido resistente (Ress, 1985). Possui um envoltório celular formado por membrana plasmática, parede celular e uma camada mais externa denominada cápsula, composta por um complexo lipídico similar ao de outras micobactérias, como os lipopolissacarídeos (LPS) e lipoarabinomanana (LAM). Porém, o domínio lipídico que confere especificidade imunológica ao *M. leprae* é o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), que parece estar envolvido na interação do bacilo com a laminina da matriz extracelular e envolvida na ligação às células de Schwann nos nervos periféricos do hospedeiro (Daffé & Draper, 1998). Outros dois importantes polipeptídeos de membrana foram identificados por métodos bioquímicos, o MMP-I que é uma proteína de 35 kDa e o MMP-II que possui peso molecular de 22 kDa (Hunter e col., 1990). Acredita-se que outras proteínas importantes estejam presentes na membrana celular do *M. leprae*, porém os métodos convencionais ainda não permitiram sua identificação.

Em 2001 foi publicada a sequência completa do genoma do *M. leprae* que demonstrou possuir 3,27 Mbp, incluindo 1.604 genes codificadores de proteínas e 1.116 pseudogenes, diferentemente do *Mycobacterium tuberculosis* que possui 3.959 genes e apenas 6 pseudogenes. Comparações entre estes dois genomas sugerem que o *M. leprae* tenha sofrido uma extrema redução evolutiva (Cole e col., 2001). Porém, Akama, e col. (2009) demonstraram, através de análise da expressão de RNA, que muitos pseudogenes e regiões não codificantes do *M. leprae* não são silenciosas, mas fortemente expressas. A função da expressão desses pseudogenes ainda não é conhecida, mas acredita-se que seja de regulação dos genes e isto poderia explicar porque o bacilo pode sobreviver com um número tão limitado de genes codificadores de proteínas (Akama e col., 2009). Com o objetivo de entender melhor o impacto transcricional dos pseudogenes e suas possíveis traduções na fisiologia do *M. leprae*, uma análise de expressão gênica foi conduzida por Williams e col. (2009), na qual demonstrou que 43% de todos os pseudogenes encontrados no genoma do *M. leprae* foram transcionalmente ativos. Porém, os RNAs expressos não são traduzidos devido a controles pós-transcricionais como a falta de códons iniciadores de tradução e de sequências Shine-Dalgarno (SD) no RNA mensageiro, além de possuir regiões com vários “stop códons”. Estes mecanismos silenciadores de tradução garantem uma economia de energia quando não há produção de proteínas que, aparentemente, não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do bacilo (Williams e col., 2009).

Características marcantes distinguem o *M. leprae* de outros patógenos como duplicação lenta (aproximadamente 11-13 dias), temperatura ideal de crescimento entre

27°C e 30°C e incapacidade de crescimento em meio de cultura, sendo sua propagação restrita a modelos animais, como tatus e coxim de pata de camundongos. Estas características têm dificultado o acesso à informação sobre os eventos que são necessários para que ocorra a transmissão da hanseníase, como: a exposição, o início da infecção e vários aspectos da progressão da doença.

1.4. Classificação da Doença

Durante o curso natural da hanseníase algumas fases podem ser claramente identificadas. Conforme Figura 1.3, estas fases são: hanseníase *per se*, gravidade das formas clínicas e ocorrência e severidade de episódios reacionais (Moraes e col, 2006). Os pacientes também podem apresentar uma forma indeterminada que constitui um estágio inicial da doença e que, conforme o estado imunológico do indivíduo, podem evoluir para a cura, permanecer neste grupo indefinidamente, ou evoluir para as outras formas da hanseníase. Pacientes com a forma indeterminada apresentam clinicamente manchas hipocrômicas e/ou áreas de hipo ou anestesia e a baciloscopia é negativa (Ministério da Saúde - MS, 2008).

A classificação das formas clínicas da hanseníase foi bem estabelecida por Ridley e Jopling em 1966, com importante contribuição para o entendimento da doença. Conforme ilustrado na Figura 1.2, seu grande espectro clínico e histopatológico está relacionado com a resposta imunológica do paciente. Em um dos extremos, pacientes com predomínio de resposta imune mediada por células apresentam lesões bem demarcadas, exame histopatológico caracterizado por infiltrado granulomatoso e baciloscopia negativa ou com raríssimos bacilos. Esta é a forma polar da hanseníase, denominada Tuberculóide (TT). No outro extremo, os pacientes apresentam certo grau de resposta imune humoral, com numerosas lesões nodulares e infiltrações difusas em várias partes do corpo. A baciloscopia é positiva com grande quantidade de bacilos e globias (agregados de bacilos). Esta é a forma polar altamente infectante da hanseníase, denominada Lepromatosa (LL) ou Virchowiana (Scollard e col., 2006).

A maioria dos pacientes encontra-se em uma categoria dimórfica ou “borderline” entre as duas formas polares da hanseníase que estão subdivididas em: “borderline tuberculóide” (BT); “borderline borderline” (BB) e “borderline lepromatoso” (BL). Os pacientes também podem exibir uma forma rara conhecida como hanseníase neural pura, um caso clínico isolado caracterizado principalmente por lesões unicamente nos nervos. A neuropatia na hanseníase resulta não apenas da infecção, mas também das respostas imunológicas e do processo inflamatório desencadeados contra o *M. leprae*, levando ao comprometimento neural, deformações e atrofia, que são os principais agravos relacionados à doença.

Os episódios reacionais na hanseníase são complicações de uma inflamação aguda que podem interromper o curso natural da doença. Estas reações podem ser do tipo I (reação reversa, RR) ou do tipo II (eritema nodoso hansênico, ENH). As reações do tipo I ocorrem nos pacientes borderline (BT, BB e BL) e decorrem do aumento espontâneo da imunidade celular com expressão de genes para citocinas pró-inflamatórias, levando a hipersensibilidade do tipo tardia aos antígenos do *M. leprae* e consequente eliminação do bacilo. Diversos estudos reportaram as citocinas IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF aumentadas tanto localmente, nas reações de lesões na pele, quanto sistematicamente, no soro e nos leucócitos circulantes. Como resultado, os pacientes apresentam reações inflamatórias com lesões na pele e neuropatia aguda. As reações do tipo II ocorrem em pacientes multibacilares (BL e LL), ou seja, com imunidade celular baixa para o *M. leprae* e com carga bacilar grande nas lesões cutâneas e dos nervos periféricos, além de forte resposta a anticorpos policlonais com altos níveis de imunoglobulinas circulantes. As lesões agudas do eritema nodoso hansênico são caracterizadas por infiltrado neutrofílico sobrepondo o padrão crônico lepromatoso (Scollard e col, 2006).

A implicação das citocinas TNF e IL-1 em episódios reacionais da hanseníase foi sugerida pela primeira vez por Sarno e col. (1991). Posteriormente, Yamamura e col. (1992) caracterizaram a dinâmica dos padrões de citocinas associadas a estas reações, através da identificação de RNA mensageiro de citocinas expressas em lesões. Nas reações reversas estiveram aumentadas as citocinas IL-1, TNF, IL-2 e IFN- γ enquanto que, no ENH houve aumento de expressão das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10. Mais recentemente, Moraes e col. (1999) analisaram o padrão de expressão gênica de citocinas, em células mononucleares de sangue periférico e em amostras de lesões de pacientes com estados

reacionais da hanseníase e observaram que IFN- γ , fator estimulador de colônia de macrófagos (GM-CSF), receptor de IL-2 (IL-2R), IL-2R, perforina e TNF estiveram aumentadas nesses pacientes em relação aos pacientes que não apresentaram estados reacionais. Também identificaram aumento de IL-6, IL-10, IL-12 e TNF em lesões de pele, demonstrando a importância de determinadas citocinas nos processos inflamatórios dos estados reacionais, especialmente o IFN- γ que amplifica a produção de TNF aumentando a resposta de células T nesses pacientes.

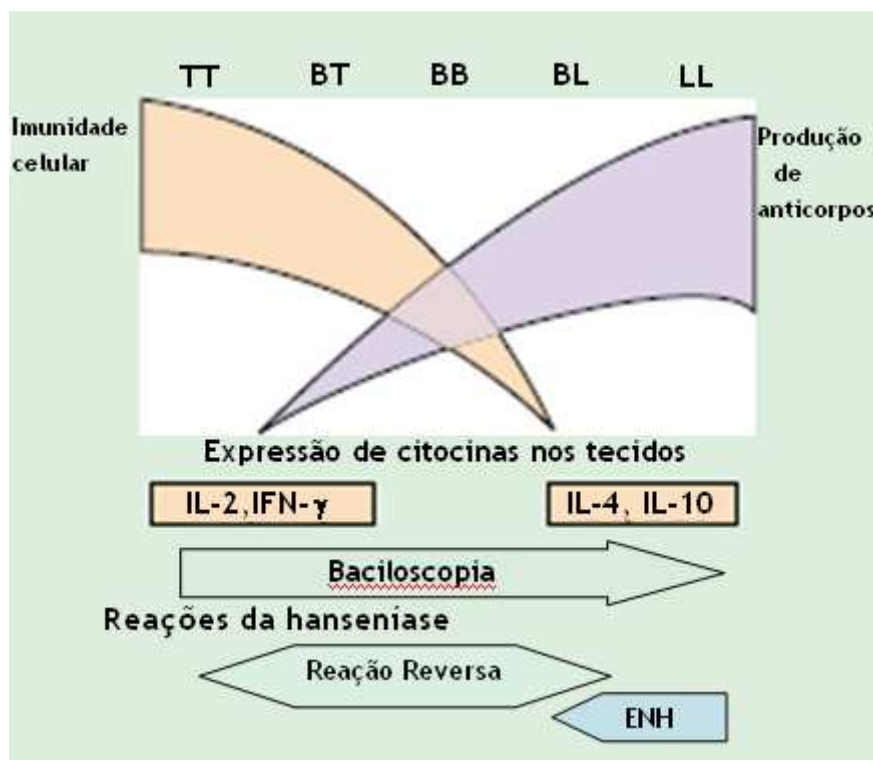


Figura 1.2: Aspectos imunológicos das diferentes manifestações clínicas da hanseníase. O polo tuberculoide (TT) apresenta maior imunidade celular enquanto que o polo lepromatosa (LL) maior produção de anticorpos que decresce em virtude da expressão de citocinas específicas. Os níveis de bacilos estão aumentados nas formas LL. Reações reversas podem ocorrer nas duas formas clínicas e o ENH é comum em indivíduos do pólo LL. Fonte: Adaptado de Britton & Lockwood, 2004.

1.5. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, não havendo testes com sensibilidade e especificidade viáveis que possam detectar infecções assintomáticas ou prever a progressão clínica da infecção. Os pacientes podem ser classificados como paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB) conforme o número de lesões encontradas em esfregaços de pele, através de um exame baciloscópico. Para uma classificação operacional mais detalhada, a concentração de anticorpos IgM contra o antígeno (PGL-1) pode ser detectada no soro dos pacientes através de ensaio imunoenzimático – ELISA (Chin-A-Lien e col., 1992), ou ainda correlacionada com o índice baciloscópico para indicar se o anticorpo específico do *M. leprae* é um reflexo da carga bacilar (Butlin e col., 1997). Dessa forma, a maioria das formas multibacilares (LL/BL) da hanseníase podem ser detectadas, porém são testes limitados para a identificação das formas paucibacilares (TT/BT) dos pacientes, uma vez que estes desenvolvem resposta imune celular e não humoral (Geluk e Ottenhoff, 2006).

A medida padrão da imunidade mediada por célula ao *M. leprae* é a reação de Mitsuda, uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio, que é avaliada após uma injeção intradérmica de bacilos mortos aplicada nos pacientes, cuja medição é realizada após 3 a 4 semanas (Goulart e col., 2002). Este teste não é específico para a hanseníase, pois indivíduos que nunca foram expostos ao *M. leprae* podem desenvolver uma reação positiva. Porém, pacientes que apresentam uma resposta negativa são associados com a forma lepromatosa da hanseníase (LL) e um resultado positivo está associado à habilidade do paciente em desenvolver uma resposta granulomatosa, envolvendo a participação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T CD4+ para a eliminação do bacilo (Scollard e col., 2006).

Mais recentemente, testes moleculares como PCR convencional e PCR em tempo real têm sido propostos para o diagnóstico das formas clínicas da hanseníase quando quantidades muito pequenas do bacilo não são detectáveis pelos métodos convencionais (Martinez e col., 2006). Técnicas de imagens, como ultrassonografia e Imagem de Ressonância Magnética são usadas nos casos específicos de hanseníase neural pura (Goulart e Goulart, 2008).

O tratamento da hanseníase, com administração da poliquimioterapia (PQT), é estabelecido a partir da classificação operacional proposta pela OMS que é essencialmente clínica com base no número de lesões cutâneas, em regiões endêmicas onde métodos diagnósticos laboratoriais não estejam disponíveis ou não sejam confiáveis. Os pacientes são considerados paucibacilares (PB), quando apresentam até cinco lesões cutâneas; ou multibacilares (PB), quando apresentam mais de cinco lesões (OMS, 2008).

1.6. Imunologia

A função primária do sistema imune é, além de manter a homeostasia individual, o combate as infecções. Porém, na hanseníase a resposta imune é responsável pelo amplo espectro clínico da doença. Os indivíduos podem ser suscetíveis ou resistentes à infecção pelo *M. leprae*. Numa primeira etapa, os indivíduos suscetíveis são ditos suscetíveis *per se* e, numa segunda etapa, desenvolvem as diferentes formas clínicas que constituem o espectro de gravidade.

A resistência ao desenvolvimento da doença clínica é conferida pela combinação de uma resposta imune inata efetiva e a baixa virulência do *M. leprae*. Após a infecção do hospedeiro pelo bacilo, pela mucosa nasal, por exemplo, inicia-se uma resposta imune primária através dos receptores de reconhecimento padrão (PRR), presentes nas células do hospedeiro que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os receptores de reconhecimento padrão podem ser: receptores semelhantes a Toll 1 e 2 (TLR1/2), receptores de manose, receptores DC-SIGN e os receptores de complemento.

Os (TLRs) são os principais receptores de reconhecimento de componentes da membrana de patógenos pelos macrófagos e células dendríticas na imunidade inata. Como exemplo, podemos citar os lipopolissacarídeos (LPS), o lipoarabinomana (LAM) e especificamente em *M. leprae*, o PGL-1, além dos polipeptídeos de membrana MMP-I e MMP-II. Vários estudos demonstraram a importância desses receptores como iniciadores tanto da resposta imune inata como adaptativa. Krutzik e col. (2003) demonstraram que o heterodímero TLR2-TLR1 media a ativação celular de monócitos e células dendríticas, desencadeando a produção de citocinas como o TNF, que leva a uma resposta inflamatória aguda e à morte do *M. leprae*. O homodímero TLR2 reconhece lipoproteínas do *M. leprae* como a proteína maior de membrana tipo II (MMP-II) e a lipoproteína de 33-kDa, que

estão envolvidas na ativação e maturação de células apresentadoras de antígenos (Modlin, 2009).

O *M. leprae* utiliza seus próprios componentes de membrana para promover sua sobrevivência. O reconhecimento do glicolípido PGL-1 pode ser facilitado pelo componente de complemento C3, mas através dessa via, não ocorre formação do “burst respiratório” nos macrófagos, sendo este um mecanismo pelo qual o bacilo neutraliza os radicais tóxicos de oxigênio ainda durante a fagocitose. Os receptores de manose reconhecem moléculas específicas do lipoarabinomanana (LAM) presente na membrana de diversos patógenos, que podem modular várias funções efetoras de fagócitos mononucleares, incluindo TNF e produção de nitrito, porém o reconhecimento do *M. leprae* por esta via também não viabiliza o “burst respiratório” (Scollard e col., 2006).

Quando fagocitado, o *M. leprae* continua utilizando seus componentes de membrana para neutralizar a atividade bactericida dos macrófagos. Estudos recentes evidenciaram que o bacilo utiliza o triptofano-aspartato contendo proteína capsial (Coro1a), encontrado na membrana fagossomal de pacientes, para suprimir a ativação da resposta imune inata mediada por TLR-2 nos macrófagos, impedindo sua maturação (Tanigawa e col., 2009).

Além disso, o *M. leprae* pode interferir na resposta imunológica secundária induzindo a produção de TNF, IL-12, IL-10 e TGF- β 1 pelos macrófagos infectados. Estas citocinas são opostas em muitas formas de ação, incluindo suas ações sobre o próprio macrófago. Pacientes que desenvolvem um perfil de resposta imune tipo 1 (Th1) apresentam lesões mais localizadas ou cura da hanseníase. Seus macrófagos produzem a citocina TNF que promove sua própria ativação, ampliando a produção de óxido nítrico (NO), para a destruição do bacilo. A ativação do TNF é mediada pelo IFN- γ , uma citocina produzida por células T CD4⁺ (auxiliadoras), que se diferencia na presença da IL-12. As células T CD4⁺ virgens que se diferenciam em células Th1 produzem, além do interferon γ (IFN- γ), a interleucina-2 (IL-2) que estimula o crescimento de células T antígeno específicas.

Por outro lado, pacientes que apresentam as formas disseminadas da hanseníase, desenvolvem um perfil de resposta imune tipo 2 (Th2). As citocinas autócrinas IL-10 e TGF- β 1 desativam os próprios macrófagos, aumentam a proliferação bacilar e contrapõem os efeitos do TNF, IFN- γ e IL-12. As células T CD4⁺ se diferenciam em células Th2 e secretam a citocina IL-4 que age nas células B para estimular a produção de anticorpos

(imunidade humoral), além de agir conjuntamente com a IL-10 na supressão da ativação dos macrófagos. Os bacilos então, se multiplicam levando a lesões e infiltrações por todo o corpo dos pacientes.

É importante ressaltar que o predomínio de um tipo de resposta imune não implica na anulação da outra e que muitos pacientes podem produzir citocinas tanto do perfil Th1 quanto do Th2 (Scollard e col., 2006).

Para confirmar estes mecanismos diferenciados de ativação da resposta imune, foram realizados estudos de expressão gênica de citocinas típicas das respostas Th1 e Th2 em pacientes que apresentavam as diferentes formas da doença. De fato, observou-se expressão aumentada de IL-2 e IFN- γ nos pacientes tuberculóides e de IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes lepromatosos, favorecendo a produção de anticorpos (Yamamura e col., 1991; Misra e col., 1995 e Dockrell e col., 1996). Também foi observado aumento significativo de expressão de IL-12 em monócitos de lesões tuberculóides quando comparada a lesões lepromatosas (Sieling e col., 1994). Estes achados motivaram o desenvolvimento de estudos de associação utilizando polimorfismos de base única (SNPs) como marcadores principalmente nas regiões promotoras dos genes TNF e IL-10.

1.7. Influência Genética na Hanseníase

Desde os primeiros estudos, nos anos 1970, os quais propuseram que os genes do sistema HLA poderiam influenciar o controle da resposta imune na hanseníase (de Vries e col., 1976), diversas investigações envolvendo genes candidatos indicam que os fatores genéticos do hospedeiro influenciam no desenvolvimento da doença desde a infecção, seguido do direcionamento das formas clínicas, até os episódios reacionais (Figura 1.3).

Utilizando-se de modelo murino, a primeira evidência de um determinante genético de suscetibilidade ou resistência à hanseníase foi demonstrada por Skamene e col. (1982) que identificou o gene da proteína 1 associada à resistência natural de macrófagos (NRAMP1) que em camundongos, influencia a viabilidade e/ou a replicação do patógeno dentro do macrófago através do transporte de ferro e outros cátions divalentes pela membrana fagossomal. Este gene está localizado no cromossomo 2q35 humano e embora seja altamente homólogo ao do camundongo, sua função ainda não está bem estabelecida.

Foi primeiramente associado com a suscetibilidade à hanseníase em um estudo de famílias com múltiplos casos de hanseníase (Abel e col., 1998). Recentes estudos têm sugerido que o NRAMP1 esteja associado com os diferentes tipos da doença através da influência de moléculas HLA, regulação e expressão de TNF e indução de síntese de óxido nítrico (Blackwell e col., 2000).

Através da primeira clonagem posicional utilizada para identificar um gene humano associado com suscetibilidade a doenças infecciosas, Mira e col. (2004), identificaram variantes de dois SNPs na região promotora do gene da parkina (PARK2) como associado com a suscetibilidade à hanseníase *per se* em famílias vietnamitas e confirmado na população brasileira. A parkina foi inicialmente associada à doença de Parkinson e sua função está relacionada à síntese de uma ligase da via ubiquitina-proteossoma de degradação protéica intracelular (Zhang e col., 2000). Na hanseníase, Schurr e col. (2006), sugeriram que a parkina possa participar da resposta antioxidante nas células de Schwann, favorecendo o estabelecimento da infecção.

Estudos de polimorfismos do gene do receptor de vitamina D humano (VDR) indicaram que diferentes alelos estavam associados com as formas tuberculóide e lepromatosa da hanseníase (Roy e col., 1999 e Modlin e col., 2009). Este gene está localizado no cromossomo 12q12 e codifica um receptor de proteína intracelular que se liga ao metabólito ativo da vitamina D (1,25-dihydroxyvitamina D3). A ligação desse receptor leva à ativação de monócitos, influenciando na função dos linfócitos T (Scollard e col., 2006).

Genes de citocinas envolvidos na ativação da resposta imune, nas diferentes formas da hanseníase, têm sido identificados como associados com a suscetibilidade ou resistência à doença. O gene da citocina antiinflamatória IL-10 está localizado no cromossomo 1q32 e possui vários SNPs em sua região promotora, formando haplótipos que estão associados com os níveis de produção de IL-10. O haplótipo de três SNPs -3575T/-2849A/-2763C foi associado com a suscetibilidade à hanseníase *per se* (Moraes e col., 2004), enquanto o haplótipo -1082G/-819C/-592C foi associado à forma lepromatosa (LL) na população brasileira (Franceschi e col., 2009). O alelo *IL10* -819T esteve associado com a suscetibilidade a hanseníase na população brasileira em dois estudos diferentes (Santos e col., 2002 e Pereira e col., 2009) e confirmado na população indiana (Malhotra e col., 2005).

Outras citocinas envolvidas na ativação da resposta imune de micobactérias, como a IL-12 e o IFN- γ , foram geneticamente relacionadas com a hanseníase. Os primeiros polimorfismos estudados não apresentaram associação com a doença (Lee e col., 2003), porém um estudo de diversos polimorfismos (SNPs) na região promotora do gene *IL12RB2*, associou o haplótipo (-1035A, -1023A, -650G, -464A) com a proteção à forma LL na população japonesa (Ohyama e col., 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que o alelo A do polimorfismo 1188, na região 3'UTR do gene que codifica da porção p40 da IL-12 e IL-23 (*IL12B*) foi associado com a suscetibilidade à forma LL da hanseníase na população mexicana (Alvarado-Navarro e col., 2008).

A apresentação de peptídeos, no contexto das moléculas HLA, para os linfócitos T influenciam diretamente seu perfil de ativação e consequentemente a suscetibilidade à doença *per se* ou suas diferentes formas clínicas. Um estudo de ligação entre os genes da região do TNF e os genes HLA classe II demonstrou desequilíbrio de ligação entre diferentes *loci* HLA e os *loci* LTA e TNF (Shaw e col., 2001). O Sistema HLA tem sido amplamente associado à hanseníase em vários estudos do tipo caso controle e, como objeto desse estudo, será abordado posteriormente com maior detalhamento.

Como demonstrado, diversos genes foram associados à hanseníase e, embora algumas vezes controversas, essas associações têm contribuído para o avanço do entendimento dos fatores imunológicos nas diferentes manifestações clínicas e patológicas da hanseníase.

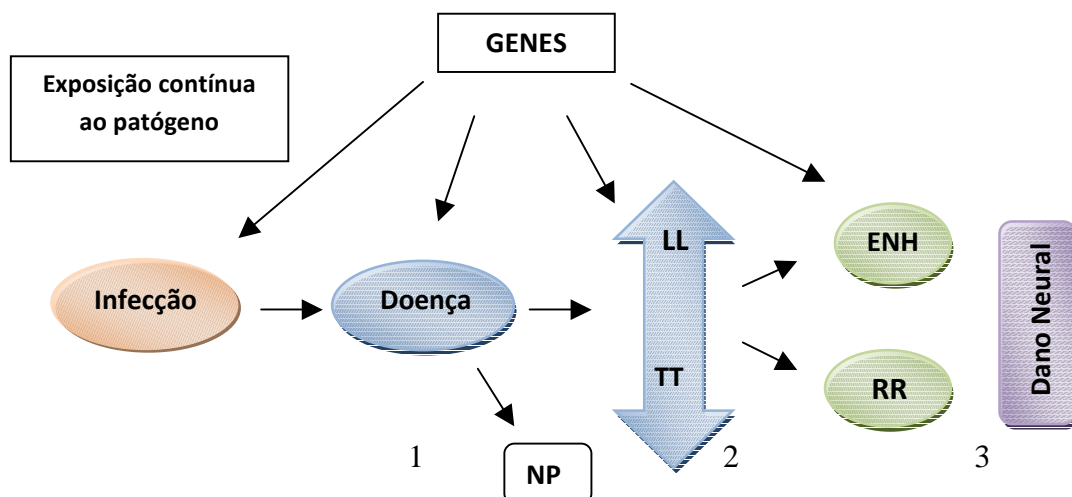


Figura 1.3: Influência genética no curso da hanseníase. Fatores genéticos podem contribuir para: o desenvolvimento da doença (1); gravidade das formas clínicas (2); e ocorrência de episódios reacionais e dano neural (3). LL: lepromatosa, TT: tuberculóide, PN: neural pura, ENH: eritema nodoso hansênico, RR: reação reversa. Adaptado de Moraes e col., 2006.

2. O SISTEMA HLA

2.1. Definição e Histórico

O conjunto de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade, ou MHC (Major Histocompatibility Complex), em humanos é denominado HLA (Human Leucocyte Antigen). Este complexo gênico está localizado no braço curto do cromossomo 6, na região 6.21.3. Nesta região encontram-se genes altamente polimórficos e polialélicos, os quais codificam moléculas de superfície celular, relacionadas com a resposta imune. As moléculas HLA são de importância fundamental na apresentação de antígenos aos linfócitos T. Dessa forma, para que linfócitos T reconheçam antígenos, é necessário que estes sejam processados na forma de peptídeos e apresentados por moléculas HLA. Com o auxílio das moléculas HLA, os linfócitos T são capazes de reconhecer a presença de agressores extracelulares (como, por exemplo, fungos e bactérias); invasores intracelulares (como infecções virais) ou alterações celulares (como neoplasias).

Em 1936, Peter A. Gorer definiu sorologicamente o primeiro antígeno de histocompatibilidade em camundongos e estabeleceu seu controle ao nível genético seguido de George D. Snell que definiu o sistema H-2 nessa mesma espécie. Juntos, esses dois estudos levaram ao descobrimento do Complexo Principal de Histocompatibilidade ou MHC (Thorsby, 2009). Anos depois, Jean Dausset observou, no soro de pacientes com múltiplas transfusões sanguíneas, a presença de anticorpos capazes de aglutinar leucócitos de um grande número de indivíduos, mas não de todos (Dausset, 1954). Os anticorpos presentes nesses soros pareciam reconhecer um sistema polimórfico de antígenos em leucócitos humanos, sendo então esse sistema denominado Antígeno Leucocitário Humano ou HLA.

Em 1958, Jean Dausset identificou o primeiro antígeno HLA humano, o qual foi denominado de “Mac”, correspondente ao atual antígeno HLA-A2 (Dausset, 1958). Neste mesmo ano, Jon van Rood (van Rood, 1958) e Rose Payne (Payne, 1958) descrevem a presença de anticorpos no soro de pacientes com múltiplas gestações que reagiam com os leucócitos de alguns, mas não todos os indivíduos testados, sugerindo tratar-se de um

sistema polimórfico de antígenos presente nos leucócitos humanos. Por esta descoberta, Dausset recebeu o Prêmio Nobel em 1980, o qual o dividiu com George Snell e Baruch Benacerraf (Thorsby, 2009).

Durante muito tempo após a descoberta do sistema HLA, sua única função era atribuída aos processos de rejeição em transplantes. Somente nos anos 60 e 70, reconheceu-se, a importância de produtos de genes deste sistema com a resposta imunológica a antígenos proteicos, através de pesquisas com cobaias e camundongos de linhagens endogâmicas (Lechler e Warrens, 2000).

Até os anos 1980, a identificação do polimorfismo HLA era realizada através de soros contendo aloanticorpos (antisoros) que reagiam com as células dos indivíduos estudados. Com o advento das técnicas moleculares, a diversidade desse sistema foi melhor compreendida, possibilitando maiores informações sobre seus genes, além de permitir a descoberta dos chamados genes HLA não clássicos.

2.2. Organização Genômica

O sistema HLA, que teve seu primeiro sequenciamento completo em 1999, ocupa uma área de aproximadamente 4 Mbp dividida em três grandes regiões (Figura 1.4): região de Classe I, situada na porção mais telomérica do MHC, com cerca de 1.800 kb; região de Classe II que encontra-se situada na região mais centromérica do MHC, com cerca de 700 kb e; região de Classe III, localizada entre as regiões de classe I e II estendendo-se por cerca de 900 kb (MHC Consortium, 1999).

As extremidades das regiões de Classe I e Classe II são compostas por uma região conhecida como xMHC que estende-se por cerca de 7.6 Mbp e possui dois grandes grupos de genes que expressam histonas e tRNA (Trowsdale, 2005).

A região HLA possui 239 *loci* com um grande número de genes envolvidos na resposta imune (Shiina e col., 2004). Devido à grande proximidade entre os genes desta região e à baixa taxa de permuta entre eles (aproximadamente 4%), a combinação de alelos de diferentes *loci* de um único cromossomo costuma ser herdada em conjunto através de uma

unidade, chamada haplótipo. Assim, cada indivíduo possui dois haplótipos, um de origem materna e outro de origem paterna (Abbas e col., 2008).

As três regiões HLA são descritas a seguir:

a) HLA Classe I

Esta região apresenta mais de 122 *loci* e cerca de 40 deles, são formados por genes que expressam algum produto funcional (Shiina, e col., 2004). Estes genes são divididos em clássicos: HLA-A, HLA-B e HLA-C e não clássicos: HLA-E, HLA-F e HLA-G (Klein e Sato, 2000). Ainda nesta região, temos os *loci* HLA-H, HLA-J, HLA-K e HLA-L, que são pseudogenes (Campbell e col., 1993).

Os genes dos *loci* HLA de classe I codificam um grande número de alelos. De acordo com os registros do banco de dados do Instituto de Pesquisa Anthony Nolan (Inglaterra), até Abril de 2010, foram identificados 1.001 alelos HLA-A, 1.605 alelos HLA-B, 690 alelos HLA-C, 09 alelos HLA-E, 21 alelos HLA-F e 46 alelos HLA-G (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>).

b) HLA Classe II

Um total de 34 *loci* forma essa região e seus genes codificam moléculas HLA de classe II que são divididos em clássicos: HLA-DR, DQ e DP; e não clássicos: HLA-DM e HLA-DO (Klein e Sato, 2000).

Assim como os genes dos *loci* HLA de classe I, os de classe II também codificam um grande número de alelos. Os dados do Instituto de Pesquisa Anthony Nolan revelaram, até Abril de 2010, 3 alelos HLA-DRA, 878 alelos HLA-DRB, 35 alelos HLA-DQA1, 108 alelos HLA-DQB1, 28 alelos HLA-DPA1, 138 alelos HLA-DPB1, 04 alelos HLA-DMA, 07 alelos HLA-DMB, 12 alelos HLA-DOA e 09 alelos HLA-DOB (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>).

c) HLA Classe III:

Diferentemente das regiões de classe I e II, esta região não possui genes que participam diretamente da apresentação e reconhecimento de antígenos, mas sim genes que codificam moléculas solúveis, localizados em um total de 62 *loci*, com importante papel na regulação da resposta imunológica, como o fator de necrose tumoral (TNF), linfotóxina-alfa (LTA) e Linfotóxina-beta (LTB), MICA, MICB e componentes do sistema complemento. O TNF é uma citocina pró-inflamatória e participa na resistência a agentes infecciosos, ativando a função microbicida de macrófagos. Portanto, possui grande importância funcional na infecção pelo *M. leprae* e sua estrutura e funções biológicas serão discutidas mais adiante.

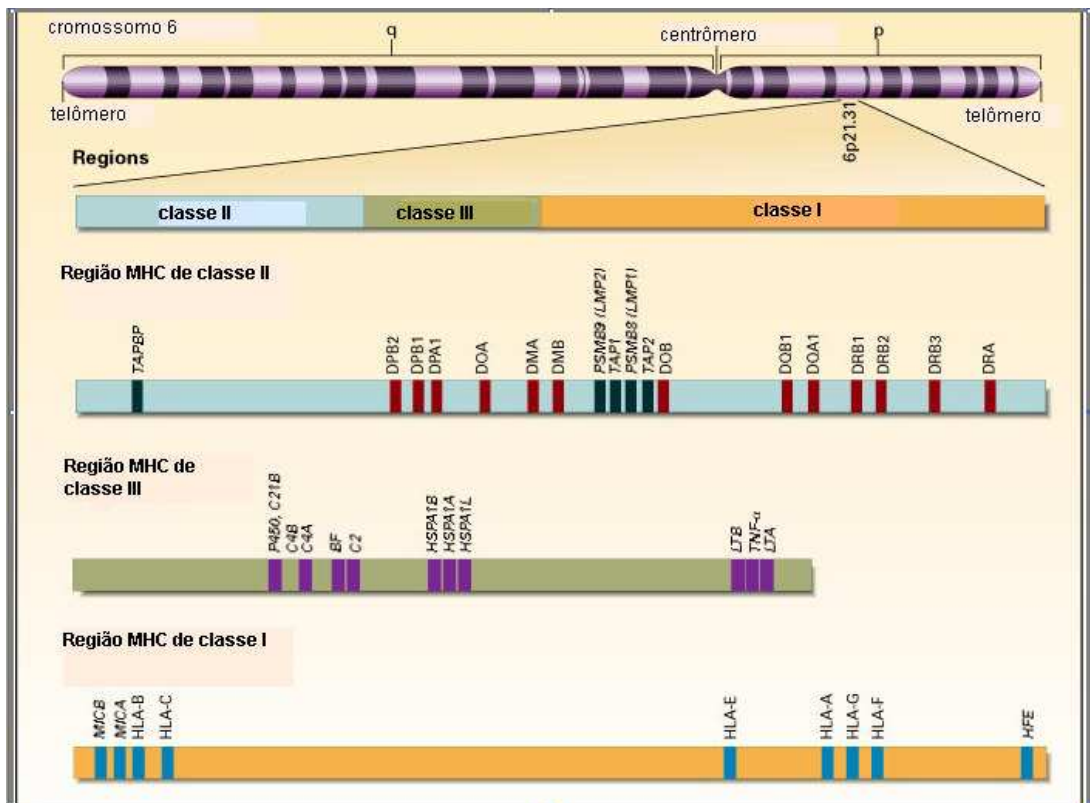


Figura 1.4: Representação esquemática do cromossomo 6 humano. As regiões do Sistema HLA com seus principais genes estão representados pelas cores: Laranja = região de classe I; azul = região de classe II e; verde = região de classe III. Fonte: Klein e Sato, 2000

2.3. Estrutura e Função das Moléculas HLA

2.3.1. Moléculas HLA Classe I

As moléculas HLA de classe I são heterodímeros que se expressam na membrana de todas as células nucleadas. São formadas por duas cadeias polipeptídicas denominadas alfa e beta. A cadeia alfa (cadeia pesada), de 45 kDa é constituída por três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), seguidos por uma porção transmembrana hidrofóbica e uma cauda citoplasmática hidrofílica. A cadeia beta, denominada beta-2-microglobulina, é monomórfica e possui cerca de 12 kDa. As duas cadeias associam-se através de uma ligação não covalente. Enquanto a cadeia alfa é codificada por genes localizados no cromossomo 6, a cadeia beta é codificada por um gene presente no cromossomo 15. Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formam uma fenda de ligação para o peptídeo (Figura 1.5). A maior parte do polimorfismo entre as moléculas de Classe I ocorre nesta região, o que permite que o sítio de ligação ao peptídeo varie de acordo com o produto alélico (Klein e Sato, 2000).

Os peptídeos, acoplados à fenda da molécula de Classe I, são reconhecidos pelo TCR (Receptor de linfócitos T) dos linfócitos T CD8+ (citotóxico). Esta propriedade de reconhecimento de antígeno restrito às moléculas HLA classe I, pelas células citotóxicas, conferiu o prêmio Nobel em medicina à Zinkernagel e Doherty em 1974. Uma célula de crescimento normal, mesmo sem infecção, apresenta constantemente peptídeos próprios aos linfócitos TCD8+. Porém, estes só são ativados quando reconhecem peptídeos estranhos, como por exemplo, nas infecções virais, e o resultado é a morte da célula infectada ou alterada (Bjorkman, 1997).

2.3.2. Moléculas HLA Classe II

As moléculas HLA de classe II apresentam distribuição celular mais restrita, ou seja, são encontradas principalmente em células apresentadoras de antígenos (APCs) como os macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, além de linfócitos B,

monócitos e linfócitos T ativados. São heterodímeros constituídos por duas cadeias polipeptídicas associadas: uma cadeia alfa de 34 kDa que possui dois domínios extracelulares ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e; uma cadeia beta de 29 kDa, formada pelos domínios extracelulares ($\beta 1$ e $\beta 2$). As duas cadeias possuem ainda, uma porção transmembrana hidrofóbica e uma cauda citoplasmática hidrofílica e, ambas são codificadas por genes localizados na região 6p21.3. Os segmentos aminoterminais $\alpha 1$ e $\beta 1$ das cadeias de classe II interagem para formar a fenda de ligação dos peptídeos. Nas moléculas de classe II, a maior parte dos polimorfismos está na cadeia β .

As moléculas HLA classe II participam na iniciação da resposta imune secundária, através da apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T $CD4^+$ (auxiliares). As células dendríticas são as APCs mais eficazes para induzir resposta imunológica celular, pois são as únicas capazes de apresentar os peptídeos aos linfócitos T virgens. Os macrófagos apresentam antígenos aos linfócitos T $CD4^+$ diferenciados na fase efetora da imunidade celular e os Linfócitos B apresentam antígenos aos linfócitos T $CD4^+$ durante as respostas imunes humorais.

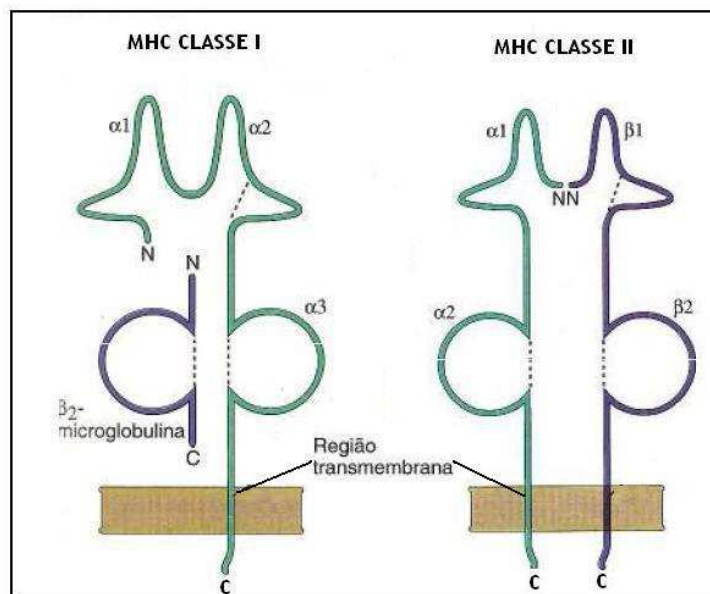


Figura 1.5: Estrutura de uma molécula HLA de classe I e de classe II. Fonte: Adaptado de Abbas e col., 2008.

2.4. Processamento e Apresentação de Antígenos

As vias de processamento de antígenos restritos às moléculas HLA de classe I e classe II utilizam mecanismos proteolíticos (proteossomos e lisossomos) que na maioria dos tipos celulares têm funções de degradação protéica generalizada e de reciclagem que não são usadas exclusivamente para exibição de antígenos ao sistema imune, indicando que estas vias evoluíram como adaptações de funções celulares básicas (Trombetta e Mellman, 2005).

2.4.1. Antígenos Citosólicos

As proteínas endógenas ou os antígenos exógenos presentes no citosol (Figura 1.6) são desdobrados quando ligados de forma covalente à ubiquitinas e assim, são introduzidos a um complexo enzimático multiproteico com atividade proteolítica (proteossomo) onde são degradados formando uma grande variedade de peptídeos. Estes são então transportados ao retículo endoplasmático (RE) através de uma molécula heterodímera chamada de transportador associado a processamento de antígenos (TAP). Estudos demonstraram que os peptídeos que apresentam tamanho entre 8 e 13 resíduos de aminoácidos são mais eficientemente transportados. O dímero TAP também se associa às moléculas HLA de classe I recém sintetizadas no RE por uma proteína de ligação chamada tapasina. Quando o peptídeo entra no RE, se liga à fenda da molécula HLA classe I e o complexo peptídeo-classe I é então liberado da tapasina e transportado, através de vesícula exocítica, para a superfície da célula (Abbas e col., 2008 e Schumacher e col., 1994).

2.4.2. Antígenos Endocitados

Antígenos protéicos endocitados (ou fagocitados), pelas APCs especializadas, são interiorizados em fagossomos que podem se fundir com vesículas de pH muito ácido e que

contêm enzimas proteolíticas (lisossomos). Estas enzimas proteolíticas são formadas principalmente por catepsinas que rapidamente clivam substratos protéicos gerando aminoácidos.

As moléculas HLA classe II, recém sintetizadas no RE, são associados à proteína de cadeia invariante (Ii), através dos heterodímeros $\alpha\beta$. Essa associação é denominada CLIP e é transportada a endossomos denominados compartimentos do MHC de classe II (MIIC). Estes endossomos passam por constante reciclagem, pois as moléculas HLA classe II não se acumulam nestas organelas, mas elas permanecem apenas o tempo suficiente para se ligarem aos peptídeos. A cadeia Ii é removida do CLIP através da molécula HLA-DM e assim, os peptídeos recém sintetizados são capazes de se ligar à fenda (Figura 1.7) das moléculas classe II (Trombetta & Mellman, 2005).

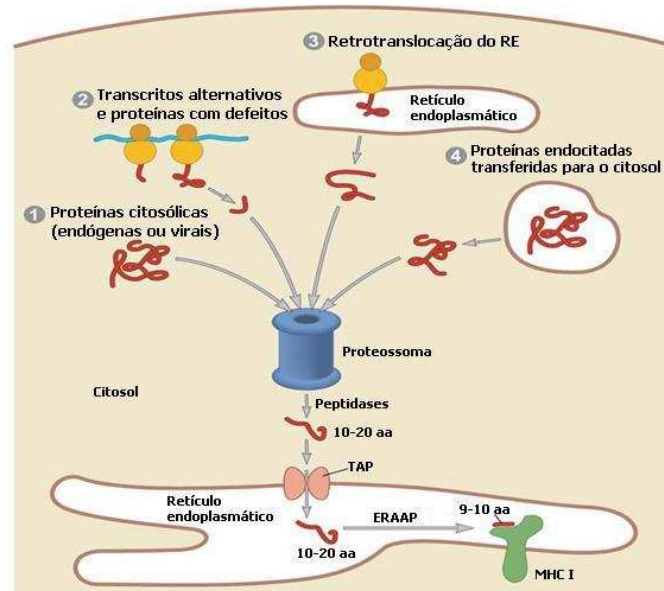


Figura 1.6: Representação esquemática de possíveis fontes de proteínas apresentadas pelas moléculas HLA Classe I. Adaptado de Trombetta e Mellman, 2005.

2.4.3. Apresentação Cruzada

Embora a maioria das moléculas classe I e classe II formem complexos com peptídeos derivados de proteínas endógenas e exógenas, respectivamente, sabe-se que este

conceito não é absoluto (Klein e Sato, 2000). Experimentos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a presença de “apresentações cruzadas” em diferentes tipos celulares. Moléculas HLA classe I podem apresentar peptídeos derivados de proteínas exógenas, como parasitas (Goldszmid e col., 2008) e moléculas HLA classe II de células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas, podem apresentar peptídeos citosólicos (ex. virais) que, muitas vezes, são capturados por endocitose como material exógeno de células apoptóticas (Trombetta e Mellman, 2005).

2.4.4. A Apresentação dos Peptídeos

Várias moléculas HLA distintas são expressas por cada célula de um indivíduo (Lechler e Warrens, 2000). Como consequência do processamento proteico, as superfícies celulares apresentam milhares de moléculas HLA ligadas a peptídeos. Estima-se que de 100.000 a 300.000 produtos de cada *locus* HLA classe I ou classe II sejam expressos (Rammensee e col., 1997). Enquanto um único tipo de peptídeo pode ser apresentado em milhares de exemplares, outros são apresentados em poucas cópias (Klein e Sato, 2000). O polimorfismo do HLA combinado com a complexidade de milhares de peptídeos diferentes sendo apresentados por cada produto alélico confere a heterogenicidade na apresentação dos antígenos (Stevanovic, 2002).

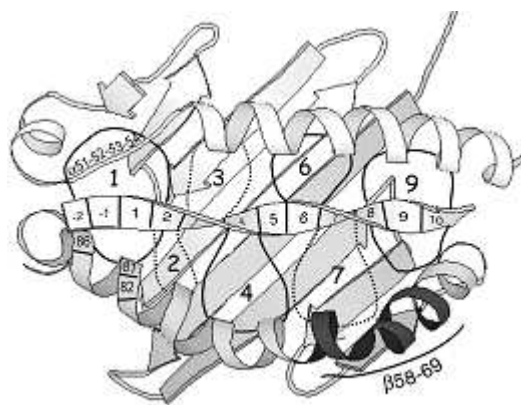


Figura 1.7: Diagrama em forma de fita de uma fenda de ligação da molécula HLA-DR1, derivada de uma estrutura de cristalografia. A estrutura torcida no centro da fenda representa um peptídeo com seus resíduos de aminoácidos numerados de -2 à 10. Alguns desses aminoácidos servem de âncora para prender o peptídeo às bolsas (pockets) da molécula que estão numeradas de 1 à 9. Fonte: Sato e col., 2000.

2.5. Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) constitui um grupo de genes denominados TNF- α (*TNFA*), LT- α (*LTA*) e LT- β (*LTB*). As principais células sintetizadoras de TNF são os fagócitos mononucleares ativadas, além de células T estimuladas, células “Natural Killer” (NK) e mastócitos. O TNF é sintetizado como uma proteína de membrana tipo II não-glicosilada que é expressa como um homotrímero e que, quando clivada por uma metaloproteinase, é liberado um polipeptídeo de 17 kD para formar um TNF circulante que é composto por três dessas cadeias polipeptídicas polimerizadas na forma piramidal com 51 kD. Esta forma permite a ligação simultânea de três moléculas receptoras (Abbas e col, 2008 e Elahi e col., 2009).

O TNF é um importante mediador na resistência contra infecções. É uma citocina pleiotrópica que ativa os neutrófilos e monócitos, aumenta a ação microbicida de macrófagos e das células NK. Através da via de sinalização de seu receptor TNF-R1, são ativados fatores de transcrição como o fator nuclear kappa-B (NF-kB) que regula a transcrição de vários genes envolvidos na produção de mediadores inflamatórios. Esta mesma via de sinalização pode ativar caspases que favorecem a apoptose celular (Abbas e col., 2008). Altas concentrações de TNF levam a efeitos patológicos em uma série de doenças como artrite reumatóide ou doença do enxerto contra o hospedeiro - rejeição a transplantes (Idriss e Naismith, 2000). Na hanseníase, Silva e col. (1989) demonstrou a presença de níveis de TNF no soro de pacientes que apresentavam a forma clínica menos severa da doença. Entretanto, experimentos *in vitro* demonstraram que neutrófilos secretam altos níveis de TNF quando estimulados por antígenos específicos de *M. leprae*, como a lipoarabinomanana (LAM-ML) contribuindo para o dano tecidual na hanseníase (Oliveira e col., 1999).

Alterações genéticas do TNF estão diretamente envolvidas no aumento de sua produção (Tsukamoto e col., 1998). Como a resposta do TNF à infecção é, pelo menos parcialmente, regulada ao nível transcricional, os polimorfismos na região promotora do *TNF* são objetos de interesse como potenciais determinantes de suscetibilidade a doenças. Vários polimorfismos de uma única base (SNPs) foram identificados nessa região, sendo os mais comuns: -1031T>C; -863C>A; -857C>A; -851C>T; -376G>A; -308G>A e -238G>A. O SNP *TNF* -308 afeta diretamente a expressão do TNF. A substituição de uma

Guanina (alelo TNF1) para uma Adenosina (alelo TNF2) aumenta a produção espontânea ou por estimulação do TNF (Mira e col., 1999). Foi demonstrado que essa troca está associada à suscetibilidade de várias doenças como infecções parasitárias - por exemplo, Malária (McGuire e col., 1994) e Leishmaniose (Cabrera e col., 1995), e doenças autoimunes como o Lúpus eritematoso sistêmico que demonstrou forte desequilíbrio de ligação entre o alelo *TNF* -308A e o haplótipo HLA-A1, B8, DR3 (Sullivan e col., 1997).

Na hanseníase, há um enorme contraste entre os diferentes estudos deste polimorfismo. Conforme observado na Tabela 1.3, primeiramente foi evidenciada associação da variante do *TNF* -308 com a forma lepromatosa (LL) na população da Índia (Roy e col., 1997). Porém, em um estudo com famílias da região norte do Brasil foi demonstrado proteção à hanseníase pelo alelo *TNF* -308A (Shaw e col., 2001) e outro estudo realizado no sul do Brasil identificou associação do genótipo *TNF* -308GG com a hanseníase *per se* e nenhuma associação com os genótipos *TNF* -308GA/AA (Franceschi e col., 2008). Também não foi encontrada associação significativa do *TNF* -308A e a forma multibacilar na população do Rio de Janeiro (Santos e col., 2002) ao contrário da população da Tailândia, em que o *TNF* -308A foi associado com a suscetibilidade desta forma (Vejbæsya e col., 2007). Por outro lado, não foi detectada nenhuma associação deste SNP com a suscetibilidade à hanseníase na população da Malásia (Fitness e col., 2004).

Diante desses diferentes resultados, Cardoso, CC (2009) realizou um estudo de epidemiologia genética e meta-análise com o objetivo de definir a associação entre este SNP e a hanseníase na população brasileira. Os resultados sugeriram uma associação entre o *TNF* -308G>A e a proteção entre brasileiros, sustentando o uso desse SNP como marcador do efeito da proteção da hanseníase.

2.6. Polimorfismo e Desequilíbrio de Ligação

A variação genética pode, essencialmente, ser originada através de mutações pontuais e trocas de segmentos polimórficos por recombinação sendo, portanto um processo aleatório. A maior questão é como as diferentes variações são selecionadas durante o processo evolutivo. Diversas teorias têm procurado explicar a existência do polimorfismo na região MHC (Lechler e Warrens, 2000). Dentre os vários modelos evolutivos propostos, encontra-se o de vantagem de heterozigotos ou sobredominância. Nesse modelo indivíduos heterozigotos apresentam um valor adaptativo superior aos homozigotos, pois possuem uma maior capacidade de apresentação peptídica (Porto e Pontes, 2009).

Porém, estudos mais recentes propõem um modelo coevolutivo entre patógenos e hospedeiros, no qual os patógenos com mutações que evitam sua apresentação por moléculas MHC são favorecidos pela seleção natural, enquanto os hospedeiros com moléculas MHC capazes de apresentar os patógenos resistentes são favorecidos (Porto e Pontes, 2009). Borghans e col. (2004) utilizaram um algoritmo genético para investigar esse modelo de coevolução e indicaram que as mudanças nos genes dos patógenos (através do acúmulo de mutações de escape), e nos genes que codificariam moléculas HLA (que apresentassem de forma mais eficiente essas mutações), ocorreriam paralelamente. Dessa forma, estes genes aumentariam de frequência na população de hospedeiros, recomeçando o ciclo.

Os alelos dos genes MHC são altamente polimórficos e se combinam de maneira aleatória originando haplótipos; no entanto, existe um forte desequilíbrio de ligação nessa região. Isto se deve ao fato de que algumas associações haplotípicas são encontradas em uma frequência maior do que o esperado levando-se em conta as frequências alélicas dos genes individuais. Estudos recentes sugerem que o genoma humano esteja organizado em blocos de haplótipos com alto desequilíbrio de ligação (DL), separado por regiões de baixo DL e que blocos que não apresentem nenhuma evidência de recombinação sejam encontrados em maior ou menor proporção em diferentes populações (Shifman e col., 2003).

Diversos fatores influenciam o desequilíbrio de ligação, e entre eles pode-se mencionar: i) as taxas de recombinação, as quais dependem da distância entre os genes do

genoma; ii) mistura relativamente recente de populações em equilíbrio, porém heterogêneas em relação às suas frequências haplotípicas, o que ainda não permitiu que se atingisse uma distribuição aleatória dos alelos; iii) deriva genética onde genes e haplótipos são transmitidos a cada geração de uma população de forma aleatória, ou seja, nem todos os genes serão transmitidos, uma vez que apenas uma pequena fração de todos os possíveis zigotos se tornam maduros. Assim, quando a deriva é aumentada em populações pequenas e estáveis, o desequilíbrio de ligação tende a aumentar devido à perda de determinados haplótipos; iv) seleção natural através da seleção contra variantes deletérios que podem aumentar o LD quando haplótipos deletérios são eliminados de uma população; v) rápido crescimento populacional que diminui o desequilíbrio de ligação através da redução do efeito da deriva genética (Ardlie e col., 2002).

Diante do exposto, podemos afirmar que as frequências alélicas e haplotípicas do sistema HLA são o resultado do alto grau de polimorfismo genético e o desequilíbrio de ligação de seus alelos.

2.7. HLA e Doenças

Os trabalhos de McDevitt e colaboradores, nos anos 60 e 70, que demonstraram a influência dos genes do MHC sobre a resposta imune de cobaias e de camundongos (McDevitt & Sela, 1965 e Benacerraf & McDevitt, 1972), assim como a demonstração, por Lilly e col (1964) de que a susceptibilidade a leucemias induzidas por vírus em camundongos era parcialmente controlada por este complexo, estimulou o interesse por pesquisas sobre associação entre HLA e doenças no homem.

A primeira descrição de associação de doença com o Sistema HLA ocorreu durante o Terceiro Workshop Internacional de Histocompatibilidade, em 1967. Amiel relatou uma frequência de 51% do antígeno HLA “4C” em pacientes com doença de Hodgkin e de 27% do mesmo antígeno em indivíduos sadios (Amiel J.L., 1967). Nos anos subsequentes, vários estudos de populações e famílias foram realizados para demonstrar associações de diferentes tipos de doenças com os antígenos HLA que eram reconhecidos na época (“HL-A” e “HL-B”). São exemplos dessas doenças: Glomerulonefrites (Patel e col., 1969),

Lupus Eritematoso Sistêmico (Grumet e col., 1971) e Psoríase (Russell e col., 1972 e White e col., 1972).

Em 1973, dois grupos de pesquisadores associaram a Espondilite Anquilosante ao HLA-B27, estando este antígeno presente em cerca de 90% dos pacientes e em apenas 8% nos controles (Schlosstein e col., 1973; Brewerton e col., 1973). Esta descoberta incentivou muitos outros estudos com o objetivo de demonstrar a relação entre genes marcadores dentro do complexo HLA e várias condições de doença. Alguns alelos HLA conferem alto risco para determinadas doenças, principalmente as autoimunes, que atualmente são diagnosticadas com o auxílio desses marcadores genéticos. Dentre elas, podemos citar:

- i) Narcolepsia que é uma doença fortemente associada ao alelo DQB1*0602, sendo que 90 a 100% dos pacientes apresentam esse alelo (Caillat-Zucman, 2008);
- ii) Doença celíaca, na qual mais de 90% dos pacientes expressam a molécula DQ2, codificada por DQA1*0501- DQB1*0201 e a maioria dos outros pacientes carregam a molécula DQ8, codificada por DQA1*0301-DQB1*0302 (Caillat-Zucman, 2008 e Qiao e col., 2009);
- iii) O alto risco da Diabetes tipo I está associado com os haplótipos DRB1*0401-DQB1*0302 e DRB1*0301-DQB1*0201 em caucasóides, enquanto que DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 está associado a proteção da doença (Caillat-Zucman, 2008);
- iv) Artrite Reumatóide, que inicialmente foi associada ao Dw4 através de estudos com cultura mista de linfócitos (Stastni, 1976), sabe-se hoje que é uma doença associada a um epítipo compartilhado que consiste de uma série de aminoácidos codificados pelos códons 67-74 do gene HLA-DRB1 em diferentes grupos étnicos, dentre eles estão DRB1*0401 em caucasóides, DRB1*0405 em asiáticos e DRB1*1402 em índios americanos (Lechler e Warrens, 2000 e Morgan e col., 2010). Moraes e col. (1997) demonstraram associação desse mesmo epítipo compartilhado com o Pênfigo Foliáceo em uma população de índios Terena, confirmando os resultados de outras duas populações brasileiras, mestiços e índios Xavantes.

Atualmente, os genes HLA clássicos têm sido associados, através de estudos caso-controle ou estudos de famílias com mais de 100 doenças. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos com a correlação genótipo-fenótipo na maioria destas doenças. Normalmente, doenças associadas ao HLA são complexas não estando ligadas a um único gene. Em relação ao sistema HLA, é difícil assumir que um único alelo esteja relacionado à determinada doença, uma vez que esses alelos estão, muitas vezes, em forte desequilíbrio de ligação. A associação do sistema HLA à doença pode ser o resultado da combinação de várias moléculas expressas por genes de diferentes *loci*, além da participação de outros genes não HLA (Shiina e col., 2004).

Vários estudos de associação de polimorfismos de outros genes relacionados ao HLA com doenças têm sido realizados, dentre estes genes encontram-se os que participam do processamento de antígenos, como os das subunidades do proteossoma (LMP2, LMP7), os de encaixe do peptídeo nas moléculas HLA classe I (TAP1, TAP2) ou classe II (DMA, DMB) e os da resposta inflamatória como os genes que codificam para o fator de necrose tumoral (TNF), a linfotóxina A (LTA) e a proteína de choque térmico HSP70 (Lechler e Warrens, 2000). Porém, há grande dificuldade em discriminar se estas associações são primárias ou secundárias, uma vez que os alelos destes *loci* também apresentam desequilíbrio de ligação com alelos HLA classe I e classe II (Shiina e col., 2004). Assim como esta, outras questões precisam ser respondidas como qual o mecanismo de associação e qual a interação dos genes HLA com outros genes e com os fatores ambientais.

2.8. Desenhos de Estudo em HLA e Doenças Infecciosas

A principal função do sistema imunológico humano é a proteção contra patógenos infecciosos, porém algumas vezes a resposta imune do hospedeiro não é o suficiente para eliminá-los, o que pode desencadear uma doença. Outros fatores também são importantes para a susceptibilidade a doença, como a virulência dos patógenos e os fatores ambientais onde vivem diferentes populações (Lechler e Warrens, 2000).

Os estudos de associação de HLA e doenças infecciosas humanas têm como objetivo determinar quais polimorfismos afetam diferencialmente a susceptibilidade dessas doenças e se estas variações explicam a heterogeneidade da resposta imune observada no percurso de cada infecção. Estudos familiares podem ajudar a estimar a suscetibilidade genética do hospedeiro através da análise de seu núcleo familiar, no qual se pode medir o risco relativo da doença nos irmãos do indivíduo afetado comparado com o risco da população em geral. Entretanto, este tipo de estudo pode superestimar a contribuição genética para a susceptibilidade à infecção devido aos fatores ambientais em que se encontram essas famílias. Estudos com gêmeos reduzem esse problema (Lechler e Warrens, 2000).

Estudos populacionais caso-controle são mais utilizados em epidemiologia genética devido à simplicidade de recrutamento de pacientes (casos) e indivíduos saudáveis (controles). A distribuição de alelos ou haplótipos HLA é comparada entre pacientes não relacionados portadores de doença e os controles, selecionados de acordo com a idade, sexo, etnia e outros fatores demográficos. Estes estudos requerem conhecimento prévio dos genes candidatos de interesse, assim como seu polimorfismo associado à doença (Thomas & Witte, 2002 e Moraes e col., 2006).

As análises genéticas epidemiológicas em doenças infecciosas aumentaram muito desde a publicação do genoma humano, sendo que a maioria dos desenhos experimentais está baseada em estudos de caso-controle utilizando-se marcadores como microsatélites e SNPs (Pacheco e Moraes, 2009). Através da identificação de novos genes da resposta imune que determinam susceptibilidade a doenças infecciosas, pode-se chegar a novas descobertas de intervenção terapêutica ou novas estratégias de vacinas (Lechler e Warrens, 2000). Na Tabela 1.1 estão listados alguns exemplos de doenças infecciosas relacionadas ao sistema HLA. No item abaixo será apresentada uma tabela detalhada dos dados de estudos de associação de HLA em hanseníase.

Tabela 1.1: Exemplos de associações de alelos HLA com doenças infecciosas.

Doença	Genes HLA	População	Estudos
Hepatite B persistente	DRB1*1302	Gambia	Thursz e col. (1995/97)
Resposta a vacina da hepatite B	HLA-DR14; DR52	China	Hsu e col. (1993)
Hepatite C crônica	DR5	Itália	Peano e col. (1994)
Infecção por HIV tipo 1	B*57	USA	Tang e col. (2010)
Malária	B53; DRB1*1302	Gambia	Hill e col. (1991/1994)
Filariose (Elefantíase)	DQB1*0201; DPB1*0402	Nigéria	Murdoch e col. (1997)
Leishmaniose cutânea	DR2; DQ3	Brasil	Petzl-Erler e col. (1991)
Leishmaniose Visceral	A26	Iran	Faghiri e col. (1995)
Esquistossomose	DR2	Japão	Hirayama e col. (1987)
Tuberculose Pulmonar	A24; DRB1*04	China; Síria	Ding e col. (2010) Harfouch (2008)

2.9. HLA e Hanseníase

A região do sistema HLA, que abrange os genes de classe I e II, o TNF, o LTA e outros genes, tem sido associada com a ocorrência de hanseníase em diversos estudos, quer sejam familiares ou de caso-controle. Conforme observado na Tabela 1.2, foram descritas diversas associações de genes HLA com a hanseníase *per se*, além de suas diferentes formas clínicas. Os estudos de associação de genes HLA classe I têm sugerido alguns alelos e haplótipos como associados com a suscetibilidade ou resistência à doença, porém de maneira inconsistente.

As associações de genes HLA classe II têm apontado o HLA-DR2, que é a equivalência sorológica do DRB1*15 e DRB1*16, como associado à hanseníase em pacientes de populações étnicas diferentes, porém as tentativas de correlacionar o HLA com as formas clínicas específicas da doença têm apontado algumas controvérsias (Lechler e Warrens, 2000). A associação do HLA-DR2 com a forma tuberculóide (TT) foi observada nas populações da Índia (de Vries e col., 1980), Turquia (Cem Mat e col., 1988), Tailândia (Shauf e col., 1985) e Brasil (Visentainer e col., 1997), porém não houve diferença significativa na frequência do alelo HLA-DR2 nas formas tuberculóide (TT) ou lepromatosa (LL) nos estudos da população coreana (Kim e col., 1987) e no sul da China

(Wang e col., 1999). Ao contrário, os alelos DRB1*1501 e DRB1*1502 foram fortemente associados com a forma multibacilar da hanseníase no norte da Índia (Rani e col., 1993).

Alguns estudos têm demonstrado que o HLA-DQ1, que é a equivalência sorológica dos alelos DQB1*05 e DQB1*06, está associado com a forma TT na Tailândia (Shauf e col., 1985) e com a forma LL na Índia (Rani e col., 1992), porém essa associação pode ser devido a forte ligação que existe entre o HLA-DR2 e o HLA-DQ1.

As associações entre o alelo DRB1*10 e a suscetibilidade a hanseníase *per se* têm sido observadas nas populações da Turquia (Koçak e col., 2002), Brasil e Vietnã (Vanderborgh e col., 2007), enquanto o alelo DRB1*04 e seu subtipo DRB1*0405 têm sido associados à proteção da hanseníase *per se* nas populações da Coreia (Kim e col., 1987), Japão (Joko e col., 2000) e Brasil (Silva e col., 2009 e Vanderborgh e col., 2007), mas também nas formas paucibacilar na Argentina (Motta e col., 2007) e multibacilar na Tailândia (Hsieh e col., 2010).

Ainda não está totalmente claro se as manifestações clínicas da hanseníase envolvem diretamente os genes HLA ou um efeito combinado entre estes e outros genes não-HLA. Conforme a Tabela 1.3, foi evidenciada associação do alelo TAP2-B com a suscetibilidade da forma tuberculóide (TT), particularmente nos pacientes HLA-DR15 (Rajalingam e col., 1997), enquanto o alelo MICA*5A5.1 (codifica proteína MICA incompleta) apresentou-se associado com a suscetibilidade à hanseníase, porém independentemente do HLA-DRB1 (Tosh e col., 2006).

Como foi mostrado, diversos genes e alelos foram associados com a hanseníase, especialmente aqueles dos *loci* do sistema HLA. Entretanto, poucos desses genes candidatos foram replicados entre as diferentes populações, provavelmente por fatores como tamanho amostral inadequado ou limitações das metodologias de identificação desses genes. Através das novas metodologias de sistemas multiplex e microarranjos de genotipagem, estudos de associação do genoma completo ou pan-genômicos (tradução livre do inglês para genome-wide association studies) com a hanseníase têm sido conduzidos com o objetivo de entender melhor as causas da doença através das variantes genéticas.

Um estudo caso-controle de associação do genoma completo com a hanseníase foi realizado entre 1.931 indivíduos da população chinesa utilizando como marcadores um total de 491.883 SNPs. Foram realizados também, três estudos de replicação independentes

com um total de 3.254 pacientes e 5.955 controles. Os resultados das análises sugeriram associação entre SNPs de seis genes com a doença, entre eles o HLA-DR (cromossomo 6p21), o NOD2 (cromossomo 16q12) e o gene que codifica o ligante TNFSF15 (cromossomo 9q32). As associações observadas dentro da região HLA foram o SNP rs9264868 situado entre os *loci* HLA-B e HLA-C e o SNP rs9271366, entre os *loci* HLA-DR e HLA-DQ. Após realização de controle do efeito genético de rs9271366, a associação dentro dos *loci* HLA-B/-C permaneceu significativa, sugerindo que estas duas associações são independentes. Estas associações foram mantidas mesmo após replicação do teste (Zhang e col., 2009).

Outro estudo de associação populacional baseado em caso-controle foi realizado na população de New Delhi, Índia, para identificar as variantes genéticas de 2.092 genes através do genoma de 258 pacientes portadores de hanseníase e 300 controles. O estudo foi replicado em mais duas populações indianas, incluindo uma análise de desequilíbrio de transmissão em 246 famílias. Utilizando a metodologia de microarranjo, mais de 48.000 SNPs foram incluídos. Todas as análises demonstraram uma forte associação positiva de SNPs localizados nos *loci* HLA classe II com a hanseníase, sendo estes rs9270650, situado no *locus* DRB1 e rs1071630, situado no *locus* DQA1. O mesmo efeito também foi observado no gene do receptor Toll-like localizado no cromossomo 4p14, através da variante rs5743618 (TLR1 I602S/ T1805G). Além disso, os dados demonstraram que o locus TLR1 é altamente diferenciado quando comparado com o restante do genoma, sugerindo que infecções micobacterianas possam ter contribuído para o alto grau de diferenciação e atual distribuição do TLR1 humano (Wong e col., 2010).

Os resultados desses trabalhos demonstram a importância das moléculas, codificadas pelas variantes desses genes e que estão envolvidas na resposta imune, na relação entre o *M. leprae* e o hospedeiro como determinantes de suscetibilidade à hanseníase.

Tabela 1.2: Associação de alelos e haplótipos HLA com a hanseníase em diversas populações.

Fatores Genéticos				
Susceptibilidade	Resistência	Forma Clínica	População	Referência
HLA Classe I				
A9, A10, A32, B5, B21, Cw1, Cw2	A3, B44, B49	<i>Per se</i>	Turquia	Koçak e col., 2002
A11, A33		<i>Per se</i>	Coreia	Kim e col., 1987
A*0206, A*1102; A*1102-B*4006-C*1502	A*0101; C*0401; C*0602	<i>Per se</i> ; LL	Sul da Índia	Shankarkumar, 2003
	B*46 e MICA-A5	MB	Sul da China	Wang e col., 1999
B7	Bw54	LL	Japão	Izumi e col. (1982)
Bw17; B7	A2	TT; LL	Tailândia	Greiner e col. (1978)
B8		<i>Per se</i>	Japão	Takata e col. (1978)
HLA Classe II				
DR2		TT	Índia; Turquia; Brasil	Van Eden e col. (1980); de Vries e col. (1980); Cem Mat e col. (1988); Visentainer e col. (1997)
DR2		TT e LL	Japão	Izumi e col. (1982)
DR2, DQ1		TT e <i>per se</i>	Tailândia; USA; Egito	Shauf e col. (1985); Todd e col. (1990); Hegazy e col. (2002)
DR1, DR2, DR9, DQ1	DR4, DR53, DQ3	<i>Per se</i>	Coreia	Kim e col. (1987)
DR2, DQ8, DQ1		LL	Índia	Rani e col. (1992)
DRB1*1501; DRB1*1502; DQB1*0601; DQA1*0103	DRB1*0701; DQB1*0503	TT e LL	Norte da Índia	Rani e col. (1993)
DRB1*1501	DRB1*0405		Japão	Joko e col. (2000)
DRB1*1502			Índia	Mehra e col. (1995)
DRB1*15	DRB1*09		China	Zhang e col. (2009)
DRB1*16	DRB1*04	<i>Per se</i>	Brasil	Silva e col. (2009)
Arginina posição 13 ou 70-71 (DRB1*15, DRB1*1404)		TT	Índia	Zerva e col. (1996)
DR3 (DR17)		TT	Suriname; Venezuela	Van Eden e col. (1982); van Eden e col. (1985)
DR9, DR10, DQ1, DQ3	DQ5	<i>Per se</i>	Turquia	Koçak e col. (2002)
DRB1*10; DRB1*15	DRB1*04; DRB1*07; DRB1*12	<i>Per se</i>	Brasil; Vietnã	Vanderborgh e col. (2007)
	DRB1*0405	MB	Tailândia	Hsieh e col. (2010)
DQB1*06; DQB1*0402	DRB1*02; DRB1*04, DQB1*03	MB e PB	Argentina	Motta e col. (2007)

Tabela 1.3: Associação de diferentes polimorfismos na região HLA com a hanseníase em diversas populações.

Fatores Genéticos de outros polimorfismos		Forma Clínica	População	Referência
Susceptibilidade	Resistência			
<i>TNF</i> -308A		LL; MB	Índia; Tailândia	Roy e col. (1997); Vejbaesya e col. (2007)
	<i>TNF</i> -308A	<i>Per se</i>	Norte Brasil	Shaw e col. (2001)
	<i>TNF</i> -308A	MB	Brasil	Santos e col. (2002)
<i>TNF</i> -308GG	<i>TNF</i> -308GA/AA	<i>Per se</i>	Sul do Brasil	Franceschi e col. (2008)
DR15-TAP2B		TT	Índia	Rajalingam e col. (1997)
DRB1*15-MICA*5A		<i>Per se</i>	Índia	Tosh e col. (2006)
STR - $TNF\alpha$ e $TNF\beta$		LL	Vietnã	Mira e col. (2003)

O significado funcional dessas associações HLA na hanseníase ainda não é totalmente compreendido. Estudo realizado por Geluk e col. (1992) demonstrou que um determinado peptídeo do *M. leprae*, derivado da proteína de choque térmico (hsp65) é apresentada exclusivamente no contexto da molécula HLA-DR3 (DR17). Outro trabalho, do mesmo grupo, demonstrou que variações em resíduos específicos na molécula HLA-DR17 não diminuem a ligação do peptídeo, porém pode alterar a conformação do complexo peptídeo/HLA (Geluk e col., 1994).

Um estudo de modelagem molecular (Tabela 1.2) sugeriu que moléculas HLA-DR (DRB1*1501, 1502 e DRB1*1404) que apresentassem uma arginina nas posições 13, 70 e 71 (formando um “pocket”) também modificariam a ligação ao peptídeo nos pacientes com a forma tuberculóide da hanseníase. Esta conformação poderia estimular um clone particular de células T que não favoreceria a resposta imune destes pacientes (Zerva e col., 1996).

Como foi explanado, vários estudos avaliaram o polimorfismo do sistema HLA e sua associação com a proteção ou suscetibilidade à hanseníase e suas diferentes formas. Porém, a inconsistência das associações de Classe I (HLA-A, B e C) justifica a intensificação de estudos que busquem compreender melhor os mecanismos de interação dessas moléculas na relação entre o *M. leprae* e o hospedeiro na determinação da doença, e assim, estabelecer mecanismos profiláticos.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Realizar estudo de associação do tipo caso-controle dos antígenos leucocitários humanos em uma população de indivíduos portadores de hanseníase e compará-lo com um grupo de controles sadios residentes na cidade do Rio de Janeiro.

2. Objetivos Específicos

- 1) Realizar tipagem dos genes HLA classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e do polimorfismo do gene *TNF* -308G>A em pacientes com hanseníase e em indivíduos sadios residentes na mesma área geográfica – cidade do Rio de Janeiro.
- 2) Verificar a conformidade das distribuições dos genes HLA estudados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- 3) Calcular as frequências alélicas e haplotípicas do sistema HLA classe I encontrados nos pacientes e nos indivíduos sadios.
- 4) Calcular as frequências alélicas e genotípicas do *TNF* -308G>A.
- 5) Calcular as frequências dos haplótipos estendidos de HLA classe I, HLA classe II (DRB1) e HLA classe III (TNF).
- 6) Analisar a associação dos alelos de HLA genotipados neste estudo com a hanseníase *per se* quando comparada com o grupo controle.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. População e Desenho de Estudo

O estudo foi realizado entre 1439 indivíduos residentes na cidade do Rio de Janeiro e classificados fenotipicamente como caucasóides, mestiços ou negros de acordo com suas características morfológicas e de seus familiares. As características compreendem face, tipo de cabelo e cor de pele.

Foram selecionados 778 pacientes diagnosticados de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966) no Ambulatório Souza Araújo, localizado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e credenciado como centro de referência no controle da hanseníase. Para o grupo-controle foram selecionados 661 indivíduos sadios pertencentes à mesma área geográfica dos pacientes. As características gerais das populações utilizadas no estudo estão listadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Características gerais dos indivíduos componentes das três populações de estudo de acordo com sexo e etnia.

	Etnia			Sexo	
	Caucasoide	Mestiço	Negro	Feminino	Masculino
Controles(N= 661)	372 (56)	189 (29)	100 (15)	294 (44)	367 (56)
Pacientes(N= 778)	307 (52)	221 (37)	66 (11)	288 (37)	490 (63)

Resultados expressos como N (frequência %). Os valores da etnia não correspondem ao total de pacientes devido à falta de informação de alguns indivíduos.

Dos 1.439 indivíduos estudados, 902 tiveram seus alelos tipados para os *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-C no Laboratório de Imunogenética – Centro de Medula Óssea do

Instituto Nacional de Câncer (INCA). As genotipagens do SNP *TNF* -308G>A foram realizados em todos os indivíduos, que fazem parte deste estudo, no Laboratório de Hanseníase (FIOCRUZ). Conforme o fluxograma da Figura 3.1, foram inicialmente realizadas análises de frequências dos alelos HLA, seguida de uma análise de frequência das combinações dos haplótipos HLA-A-C, HLA-A-B, HLA-B-C e HLA-A-B-C, com o objetivo de avaliar o efeito das associações dos alelos quando combinados com outros de diferentes *loci* na região de Classe I.

Em seguida, foi realizada uma análise de frequência alélica e genotípica do SNP *TNF* -308G>A. Por fim, uma análise dos haplótipos estendidos que incluíram os alelos de Classe I (HLA-A, B e C), os alelos de Classe II (HLA-DRB1) e os de Classe III (*TNF* -308G>A) com o propósito de investigar se as associações seriam independentes.

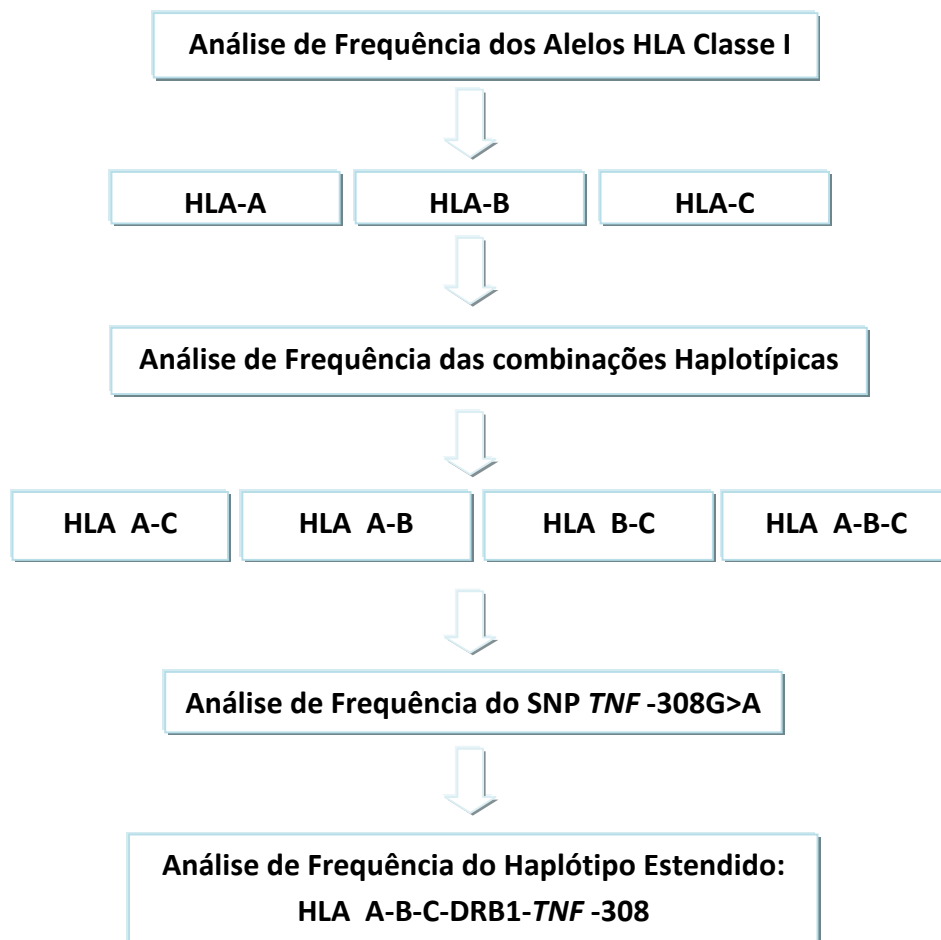


Figura 3.1: Fluxograma das etapas de análise dos alelos e haplótipos do sistema HLA.

2. Extração de DNA

A coleta das amostras, realizadas no ASA-FIOCRUZ (pacientes) e no INCA (controles), ocorreu perante a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido por escrito, de acordo com as normas do comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo CEP/FIOCRUZ 151/01).

2.1. Pacientes

As extrações de DNA genômico dos pacientes foram realizadas no Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz, a partir de sangue total utilizando-se o reagente DNAzol segundo as instruções do fabricante (Invitrogen Life Technologies, USA). O sangue foi coletado utilizando tampão citrato como anticoagulante e colocado em solução salina NaCl 0,9%. Após homogeneização, foi centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415C). Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet (botão de células) foi ressuspensão em solução hipotônica de Tris (20mM pH8,0) EDTA (10mM) para a lise das hemáceas. O material foi centrifugado novamente (4.000 rpm durante 10 minutos) e, após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em DNAzol, Invitrogen) para lise das membranas e degradação das proteínas. Em seguida adicionou-se etanol absoluto de modo a dobrar o volume da mistura, a qual foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos para precipitação do DNA. Após a última centrifugação (14000 rpm, 5 minutos), o *pellet* foi secado à temperatura ambiente, ressuspensão em solução alcalina (NaOH 8mM) e incubado a 65°C por 1 hora em banho seco (Boeckel) para eluição do DNA genômico. Este foi armazenado a -20°C.

2.2. Controles

A extração de DNA genômico dos controles foi realizada no Laboratório de Imunogenética do Centro de Medula Óssea (INCA), a partir de sangue total através do método “Salting out”. Um volume de 5ml de sangue foi coletado utilizando EDTA como anticoagulante e colocado em um tubo cônico de 50ml com solução hipotônica de Tris-HCl 1Molar (pH8,0). Após homogeneização por 10 – 15 min., foi centrifugado (2.000 rpm) durante 10 minutos para a lise das hemáceas. Este procedimento foi

repetido mais duas vezes ou até que as hemáceas fossem totalmente lisadas. Após descarte do sobrenadante o pellet foi ressuspenso em tampão contendo 1ml de Tris HCl (1M), NaCl (5M) e EDTA (0,5M); 400ml de SDS a 10% e 1,2 mg de proteinase K e incubado a 56°C por um período mínimo de 6h para lise das membranas e degradação das proteínas.

Em seguida foi acrescentado 1ml de acetato de sódio saturado para cada 4ml de material digerido, agitado vigorosamente por 15 segundos e centrifugado (2.500 rpm por 15 minutos) para separação das proteínas que formavam um pellet. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo cônico de 50ml e adicionado o dobro do volume de etanol absoluto para precipitação do DNA que foi removido para um tubo de polipropileno de 1,5ml e foi adicionado 1ml de etanol a 70% e centrifugado (12.000 rpm por 5 minutos) em microcentrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi desprezado e o etanol residual existente no material foi retirado por evaporação. O pellet foi ressuspenso em 300 ml de água ultra pura (milli-Q) e incubado a 37°C por 4hs em banho-maria para eluição do DNA genômico. Este foi armazenado a -20°C.

3. Genotipagem dos Alelos HLA

As tipagens dos *loci* HLA por baixa resolução fornecem identificação dos grupos alélicos de cada gene, enquanto as tipagens por média/alta resolução permitem a definição dos alelos de muitos genes HLA. Neste estudo, tanto para o grupo de pacientes, quanto para o de controles, foi utilizado o método PCR-SSOP reverso (Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes), empregando as tecnologias de baixa resolução: Luminex (fabricante One Lambda INC) e InnoLIPA (fabricante Innogenetics), sendo esta última utilizada para as tipagens que não puderam ser esclarecidas através do método Luminex (ex: tipificações ambíguas).

3.1. Tipagem HLA pelo método Luminex

Este método consiste de um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas identificadas por cores que representam diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas num citômetro de fluxo. As microesferas, representantes de uma determinada cor, contêm em sua superfície sondas oligonucleotídicas específicas para determinada sequência, de forma a permitir que diferentes microesferas possam ser trabalhadas em um único tubo.

Nesse método de PCR-SSOP reverso, a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores (primers) biotinizados. Então, os produtos marcados são desnaturados e hibridizados em um único tubo com as sondas acopladas às microesferas. Finalmente, faz-se a marcação com estreptavidina conjugada com ficoeritrina e a leitura da reação pelo analisador de fluxo LABScan 100. A determinação da tipagem HLA baseia-se no padrão de reação comparado com os padrões associados às sequências de genes HLA publicadas.

3.2. Tipagem HLA pelo método Inno-LIPA

Este método, denominado LIPA (Line Probe Assay), consiste de uma análise combinatória a partir de sondas de oligonucleotídeos específicas positivas fixadas como linhas paralelas em tiras de nitrocelulose.

Da mesma forma que na metodologia Luminex, nesse método de PCR-SSOP reverso, a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinizados. Os produtos marcados são desnaturados e hibridizados com as sondas fixadas nas tiras de nitrocelulose. Então, faz-se a marcação com estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina que se liga aos híbridos marcados com biotina formados. A incubação com substrato contendo cromogênio gera um precipitado púrpura/castanho e, portanto, as análises podem ser realizadas através do software “LIRAS for LIPA” ou ainda manualmente através de tabelas de tipificação fornecidas pelo fabricante.

4. Genotipagem do polimorfismo *TNF* -308G>A por PCR em tempo real

A genotipagem do SNP *TNF* -308G>A foi realizada através de um sistema TaqMan de discriminação alélica do tipo “Assay by Design”(Applied Biosystems), onde sondas específicas marcadas com fluoróforos diferentes determinam a discriminação alélica. Um único par de “primers” (iniciadores) é utilizado para a amplificação do fragmento flanqueando a posição em que se encontra o alelo polimórfico (sense 5' - CCAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTT -3' e antisense 5' - GGACCCTGGAGGCTGAAC - 3'). A discriminação alélica foi realizada por meio de utilização de sondas específicas, desenvolvidas para anelamento do alelo, marcadas com os fluoróforos G (5' - CCCGTCCCCATGCC -3') e A (5' -CCCGTCCTCATGCC- 3') VIC e FAM, respectivamente.

As reações foram realizadas em termociclador modelo ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) em um volume de 10 µl contendo 10 ng de DNA genômico, Assay 40 X em concentração final de 1 X contendo iniciadores e sondas em concentrações ideais e TaqMan PCR Master Mix 1 X. Todos os reagentes foram utilizados conforme recomendações do fabricante. Foram submetidas a uma pré-leitura (60°C por 1 min.) a fim de detectar o background da fluorescência. Em seguida as amostras foram submetidas à reação de amplificação que consiste em uma incubação inicial a 50°C por 2 min., para inativação da enzima AmpErase, 95°C por 15 min. e 60°C por 1 min., durante o qual ocorre o anelamento do primer e a extensão dos fragmentos. Foram realizados 35 ciclos dessa reação. Após a amplificação dos fragmentos, a discriminação alélica foi realizada através da interpretação do gráfico resultante da subtração do background coletado na pré-leitura do valor final obtido na pós-leitura. A representação gráfica pode ser observada na Figura 3.2. Amostras com fluorescência muito intensa no comprimento de onda do FAM foram consideradas homozigotas para o alelo G, as que apresentaram fluorescências equivalentes foram classificadas como heterozigotas e, por fim, as que apresentaram fluorescência mais intensa com comprimento de onda do VIC, foram identificadas como homozigotas para A.

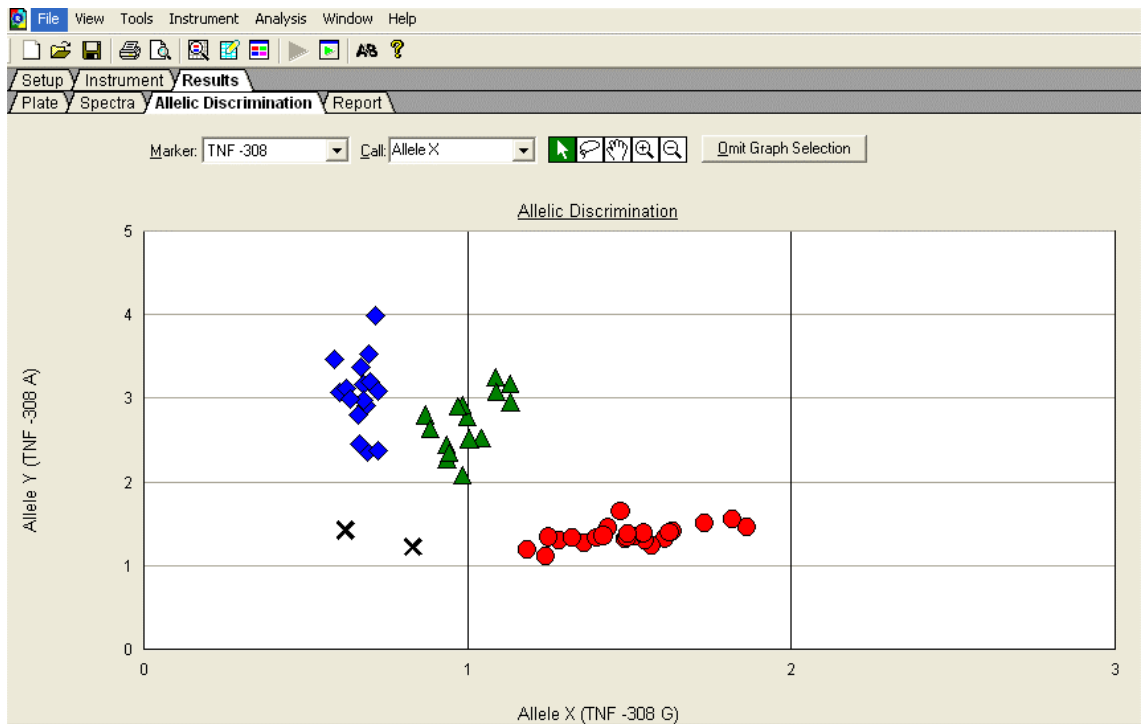


Figura 3.2: Representação gráfica utilizada para discriminação alélica por PCR em tempo real para o polimorfismo do gene *TNF* -308. Os homozigotos GG e AA estão representados respectivamente em círculos vermelhos e losangos azuis e os heterozigotos em triângulos verdes.

5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas conforme estudo previamente realizado por nosso grupo (Vanderborcht e col. 2007). Os desvios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo do *TNF* -308 e para os alelos HLA foram estimados a partir da comparação das frequências genotípicas observadas com as esperadas pela Lei de Hardy e Weinberg, utilizando o teste de Qui-quadrado.

As frequências alélicas e genotípicas dos alelos HLA e do SNP *TNF* -308G>A foram estimadas por contagem direta. As comparações entre as distribuições dos alelos HLA de pacientes e controles foram realizadas através do modelo LogLinear, enquanto que dos alelos e genótipos do SNP *TNF* -308G>A foram realizadas através do modelo de Regressão Logística.

As frequências dos haplótipos dos pacientes e controles, com valores iguais ou maiores que 0,5%, foram estimadas pelo método de máxima verossimilhança e comparadas através do modelo de Regressão Logística. Todos os estudos comparativos entre pacientes e controles foram realizados com estimativa de risco através do cálculo de Odds Ratio (OR) sem e com ajustes para as co-variáveis não genéticas sexo e etnia. O intervalo de confiança (IC) de 95% foi utilizado como medida de risco e o p-valor para medida dos níveis de significância estatística. Valores de OR acima de 1 indicam associação a risco com a doença e, abaixo de 1 indicam proteção, ao passo que valores iguais a 1 mostram não existir associação.

Além disso, foram realizadas análises de desequilíbrio de ligação (LD) dois-a-dois, que é a comparação entre 2 *loci* (conhecido como pairwise LD), entre os alelos HLA e o *TNF* -308, utilizando o parâmetro estatístico D'. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico R para Windows versão 2.9.2 (R Development Core Team, 2009), utilizando as bibliotecas “genetics”, “Design” e “haplo.stats”.

IV. RESULTADOS

1. Análise dos Alelos HLA-A

Na Tabela 4.1, as frequências alélicas e números absolutos para cada grupo alélico estão apresentados. Foram identificados no *locus* HLA-A, 21 alelos nos pacientes e 20 alelos no grupo de controles. O alelo mais frequente nos dois grupos foi o HLA-A*02 (pacientes = 23% e controles = 25%).

O alelo HLA-A*11 apresentou uma frequência aumentada nos pacientes (7%); em relação aos controles (4%). Da mesma forma, o HLA-A*30 também sugere diferença na mesma direção entre os grupos estudados, ou seja, frequência aumentada em pacientes (9%) quando comparados aos controles (6%). Por outro lado, o alelo HLA-A*01 apresentou frequência diminuída nos pacientes (6%) em relação aos controles (9%). Os resultados demonstram uma associação significativa entre os alelos HLA-A*11 e HLA-A*30 com a suscetibilidade à hanseníase ($p=0,009$ e $p=0,017$, respectivamente), enquanto o HLA-A*01 indica uma associação com a resistência à doença ($p=0,029$).

2. Análise dos Alelos HLA-B

Conforme Tabela 4.2, foram observados no *locus* HLA-B 30 alelos. Entretanto, o alelo B*82 não foi identificado nos pacientes e o B*78 não foi observado no grupo de controles. O alelo mais frequente nos dois grupos foi o HLA-B*35 (pacientes = 13% e controles = 12%).

Os alelos HLA-B*27 e B*50 apresentaram frequência diminuída nos pacientes (<1% e 1%) em relação aos controles (2% e 3%), respectivamente, demonstrando uma associação significativa entre o HLA-B*27 ($p=0,005$) e o B*50 ($p=0,002$) com a resistência à hanseníase. Não foi observada associação com a suscetibilidade à doença com nenhum alelo do *locus* B (Tabela 4.2).

Tabela 4.1: Distribuição de frequência alélica HLA-A entre pacientes com hanseníase e controles.

Alelos HLA	Pacientes(n=421) ¹	Controles(n=478) ¹	Valor p ²
A*01	49 ^(0,06)	90 ^(0,09)	0,029
A*02	197 ^(0,23)	237 ^(0,25)	<i>Referência</i>
A*03	72 ^(0,09)	89 ^(0,09)	0,960
A*11	60 ^(0,07)	41 ^(0,04)	0,009
A*23	57 ^(0,07)	52 ^(0,05)	0,369
A*24	76 ^(0,09)	112 ^(0,12)	0,290
A*25	07 ^(0,01)	18 ^(0,02)	0,103
A*26	27 ^(0,03)	29 ^(0,03)	0,756
A*29	37 ^(0,04)	43 ^(0,04)	0,770
A*30	73 ^(0,09)	53 ^(0,06)	0,017
A*31	33 ^(0,04)	43 ^(0,04)	0,618
A*32	24 ^(0,03)	25 ^(0,03)	0,706
A*33	28 ^(0,03)	24 ^(0,03)	0,187
A*34	13 ^(0,02)	09 ^(0,01)	0,203
A*36	05 ^(0,01)	12 ^(0,01)	0,283
A*43	01 ^(0,00)	02 ^(0,00)	0,687
A*66	06 ^(0,01)	06 ^(0,01)	0,978
A*68	57 ^(0,07)	55 ^(0,06)	0,324
A*69	01 ^(0,00)	00 ^(0,00)	0,999
A*74	18 ^(0,02)	14 ^(0,01)	0,225
A*80	01 ^(0,00)	02 ^(0,00)	0,687

¹Resultados apresentados como N^(frequência). ²Valores de p obtidos a partir do modelo estatístico Log Linear. *Referência*: haplótipo utilizado como base de comparação neste modelo. O número de indivíduos genotipados não corresponde ao número total da amostra devido a alguns desses não poderem ter sido testados para este *locus*.

Tabela 4.2: Distribuição de frequência alélica HLA-B entre pacientes com hanseníase e controles.

Alelos HLA	Pacientes(n=424)	Controles(n=476)	Valor de p
B*07	68 ^(0,08)	66 ^(0,07)	0,911
B*08	39 ^(0,05)	63 ^(0,07)	0,097
B*13	12 ^(0,01)	16 ^(0,02)	0,568
B*14	47 ^(0,06)	50 ^(0,05)	0,835
B*15	86 ^(0,10)	72 ^(0,07)	0,476
B*18	46 ^(0,05)	46 ^(0,05)	0,826
B*27	03^(0,00)	20^(0,02)	0,005
B*35	112 ^(0,13)	116 ^(0,12)	referência
B*37	12 ^(0,01)	06 ^(0,01)	0,207
B*38	15 ^(0,02)	19 ^(0,02)	0,736
B*39	28 ^(0,03)	26 ^(0,03)	0,759
B*40	39 ^(0,05)	39 ^(0,04)	0,610
B*41	15 ^(0,02)	15 ^(0,02)	0,885
B*42	22 ^(0,03)	16 ^(0,02)	0,281
B*44	73 ^(0,09)	103 ^(0,11)	0,129
B*45	22 ^(0,03)	27 ^(0,03)	0,612
B*47	02 ^(0,00)	01 ^(0,00)	0,543
B*48	02 ^(0,00)	02 ^(0,00)	0,955
B*49	14 ^(0,02)	32 ^(0,03)	0,056
B*50	05^(0,01)	26^(0,03)	0,002
B*51	56 ^(0,07)	76 ^(0,08)	0,219
B*52	17 ^(0,02)	16 ^(0,02)	0,516
B*53	25 ^(0,03)	24 ^(0,03)	0,860
B*55	13 ^(0,02)	14 ^(0,01)	0,892
B*56	04 ^(0,00)	04 ^(0,00)	0,765
B*57	27 ^(0,03)	23 ^(0,02)	0,573
B*58	34 ^(0,04)	28 ^(0,03)	0,448
B*78	01 ^(0,00)	00 ^(0,00)	0,999
B*81	09 ^(0,01)	07 ^(0,01)	0,723
B*82	00 ^(0,00)	01 ^(0,00)	0,999

¹Resultados apresentados como N^(frequência). ²Valores de p obtidos a partir do modelo estatístico Log Linear. *Referência*: haplótipo utilizado como base de comparação neste modelo. O número de indivíduos genotipados não corresponde ao número total da amostra devido a alguns desses não poderem ter sido testados para este *locus*.

3. Análise dos Alelos HLA-C

Após realização das genotipagens nos grupos de pacientes e controles para os grupos alélicos do locus HLA-C, foram encontrados 14 alelos em ambos os grupos, sendo que o C*07 foi o mais frequente (pacientes = 24% e controles = 23%). Na Tabela 4.3 encontram-se discriminadas as frequências alélicas e seus números absolutos.

Neste locus, apenas o HLA-C*05 apresentou uma frequência diminuída nos pacientes (4%) em relação aos controles (7%) demonstrando uma associação significativa entre o alelo HLA-C*05 com a resistência à hanseníase ($p=0,039$). Não foi encontrado nenhum alelo associado com a suscetibilidade à doença.

Tabela 4.3: Distribuição de frequência alélica HLA-C entre pacientes com hanseníase e controles.

Alelos HLA	Pacientes (n=419)	Controles (n=461)	Valor p
C*01	11 ^(0,01)	18 ^(0,02)	0,214
C*02	50 ^(0,06)	56 ^(0,06)	0,789
C*03	93 ^(0,11)	82 ^(0,09)	0,605
C*04	130 ^(0,16)	165 ^(0,18)	0,228
C*05	37^(0,04)	60^(0,07)	0,039
C*06	76 ^(0,09)	83 ^(0,09)	0,095
C*07	200 ^(0,24)	200 ^(0,23)	referência
C*08	52 ^(0,06)	52 ^(0,06)	0,732
C*12	53 ^(0,06)	48 ^(0,05)	0,892
C*14	15 ^(0,02)	25 ^(0,03)	0,127
C*15	42 ^(0,05)	34 ^(0,04)	0,858
C*16	51 ^(0,06)	43 ^(0,05)	0,451
C*17	34 ^(0,04)	32 ^(0,03)	0,725
C*18	14 ^(0,02)	12 ^(0,01)	0,376

¹Resultados apresentados como $N^{(\text{frequência})}$. ²Valores de p obtidos a partir do modelo estatístico Log Linear. *Referência*: haplótipo utilizado como base de comparação neste modelo. O número de indivíduos genotipados não corresponde ao número total da amostra devido a alguns desses não poderem ter sido testados para este *locus*.

4. Análise dos Haplótipos HLA

Os resultados da análise de LD (dois a dois) demonstraram que não há desequilíbrio de ligação entre HLA-A/C ($D'=0,454$) ou entre HLA-A/B ($D'=0,447$). Entretanto, observamos que há LD entre HLA-B/C ($D'=0,776$) notado diante da maior proximidade física desses dois *loci* no cromossomo.

4.1. Análise das combinações Haplótípicas HLA-A-C, HLA-A-B e HLA-B-C

O efeito de associação dos alelos, que demonstraram associações significativas com a susceptibilidade ou resistência a hanseníase, foi analisado através das distribuições de frequência dos haplótipos HLA-A-C (Tabela 4.4), HLA-A-B (Tabela 4.5) e HLA-B-C (Tabela 4.6).

Em relação aos alelos do *locus* HLA-A, foi identificada a combinação HLA-A*01-C*06 como indicando proteção à hanseníase ($OR=0,34$), porém com p-valor não significativo após ajuste para as covariáveis não genéticas. Entretanto, o haplótipo HLA-A*03-C*06 foi identificado como indicando proteção à doença ($OR=0,16$) e com p-valor significativo sem e com ajuste (0,028 e 0,050, respectivamente).

Dois outros alelos, identificados anteriormente como associados à doença, formaram haplótipos com o *locus* HLA-B indicando suscetibilidade à hanseníase. O haplótipo HLA-A*11-B*35 apresentou $OR = 2,19$, porém com p-valor considerado *borderline* (0,067) e após ajustarmos as covariáveis não genéticas, observamos uma $OR (2,11)$ similar a anterior, porém com p-valor não significativo (0,09). O haplótipo HLA-A*30-B*15 foi identificado como fortemente associado com a suscetibilidade ($OR = 6,1$) e com p-valor significativo (0,044), sendo esta associação mantida após ajuste para as co-variáveis sexo e etnia.

Também pudemos observar que o haplótipo HLA-A*02-B*40, embora não apresente alelos identificados anteriormente como associados à hanseníase, apresentou OR indicando associação com a suscetibilidade à doença (3,44) com p-valor significativo após ajuste (0,043).

Tabela 4.4: Distribuição de frequência das combinações haplotípicas HLA-A-C.

Haplótipos		Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-A	HLA-C	Controles (461)	Pacientes (419)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
02	07	0.052	0.060	Referência	Referência
01	07	0.045	0.033	0.548 (0.107)	0.651 (0.272)
02	04	0.041	0.036	0.727 (0.423)	0.828 (0.649)
02	05	0.033	0.023	0.621 (0.237)	0.555 (0.175)
24	07	0.031	0.024	0.577 (0.207)	0.703 (0.433)
03	07	0.027	0.031	0.773 (0.546)	0.809 (0.645)
11	04	0.024	0.026	1.048 (0.907)	1.084 (0.848)
68	04	0.023	0.013	0.541 (0.218)	0.462 (0.174)
01	06	0.022	0.011	0.344 (0.040)	0.416 (0.103)
24	03	0.020	0.018	0.699 (0.458)	0.768 (0.607)
02	03	0.019	0.025	1.332 (0.550)	1.598 (0.353)
02	06	0.018	0.015	0.730 (0.549)	0.861 (0.785)
24	04	0.016	0.020	0.794 (0.647)	0.801 (0.673)
03	06	0.015	0.003	0.168 (0.028)	0.200 (0.050)
03	04	0.014	0.019	0.964 (0.941)	1.004 (0.994)
23	04	0.014	0.005	0.219 (0.083)	0.233 (0.084)
29	16	0.014	0.017	1.031 (0.948)	1.163 (0.757)
23	07	0.013	0.015	1.125 (0.835)	1.171 (0.778)
02	16	0.013	0.014	1.086 (0.886)	1.050 (0.935)
02	12	0.012	0.013	0.980 (0.973)	1.207 (0.738)
24	02	0.012	0.002	0.142 (0.054)	0.174 (0.080)
30	17	0.012	0.022	1.369 (0.505)	1.723 (0.264)
02	08	0.011	0.006	0.586 (0.412)	0.558 (0.392)
30	07	0.011	0.020	1.350 (0.543)	1.200 (0.719)
02	02	0.010	0.016	1.039 (0.951)	1.185 (0.790)
31	07	0.010	0.009	0.782 (0.708)	0.871 (0.833)
68	07	0.010	0.021	1.787 (0.350)	2.078 (0.245)
30	06	0.009	0.008	0.742 (0.631)	0.849 (0.796)
31	04	0.009	0.007	0.259 (0.233)	0.464 (0.399)
33	08	0.009	0.007	0.814 (0.749)	-
03	03	0.008	0.008	1.277 (0.722)	1.537 (0.556)
26	12	0.008	0.014	1.691 (0.348)	1.902 (0.258)
31	03	0.008	0.007	0.85 (0.806)	1.01 (0.979)
31	15	0.008	0.011	1.15 (0.806)	1.15 (0.812)

Tabela 4.4 continuação

Haplótipos		Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-A	HLA-C	Controles (461)	Pacientes (419)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
11	07	0.007	0.006	1.12 (0.860)	1.28 (0.696)
23	02	0.007	0.007	1.08 (0.910)	-
24	12	0.007	0.012	1.77 (0.367)	1.67 (0.432)
68	03	0.007	0.011	1.40 (0.604)	1.87 (0.351)
33	04	0.004	0.011	3.38 (0.093)	-

Haplótipos de frequência $\geq 0.7\%$ em controles e pacientes portadores de hanseníase e análise de associação com a doença. ¹ Os resultados foram ajustados par as covariáveis sexo e etnia. Intervalo de confiança (CI) sem e com ajuste para covariáveis para o haplótipo HLA-A*01-C*06 (CI=0.125–0.953; CI=0.147–1.195, respectivamente) e para o haplótipo HLA-A*03-B*06 (CI=0.034–0.822; CI=0.040–1.001, respectivamente).

Tabela 4.5: Distribuição de frequência das combinações haplotípicas HLA-A-B.

Haplótipos		Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-A	HLA-B	Controles (476)	Pacientes (421)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
02	44	0,045	0,036	Referência	Referência
01	08	0,042	0,020	0,61 (0,240)	0,69 (0,386)
01	57	0,012	0,009	1,05 (0,926)	0,99 (0,993)
02	07	0,019	0,019	1,37 (0,515)	1,05 (0,922)
02	14	0,011	0,011	1,27 (0,700)	1,17 (0,808)
02	15	0,028	0,026	1,34 (0,522)	1,44 (0,433)
02	18	0,011	0,019	2,50 (0,098)	1,83 (0,310)
02	35	0,017	0,022	1,94 (0,201)	1,91 (0,223)
02	39	0,003	0,007	2,99 (0,196)	3,12 (0,195)
02	40	0,007	0,019	3,55 (0,038)	3,44 (0,043)
02	45	0,009	0,004	0,79 (0,781)	0,70 (0,667)
02	49	0,016	0,002	0,25 (0,118)	0,27 (0,144)
02	50	0,008	0,002	0,31 (0,180)	0,28 (0,160)
02	51	0,029	0,024	0,81 (0,663)	0,81 (0,647)
02	52	0,008	0,006	1,34 (0,633)	1,26 (0,712)
02	53	0,008	0,007	1,32 (0,702)	1,45 (0,609)
02	58	0,006	0,006	1,32 (0,726)	1,66 (0,547)
03	07	0,023	0,019	1,03 (0,951)	0,86 (0,784)
03	15	0,008	0,009	1,28 (0,718)	1,06 (0,930)
03	27	0,009	0,002	0,28 (0,180)	0,29 (0,200)

Tabela 4.5 continuação

Haplótipos		Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-A	HLA-B	Controles (476)	Pacientes (421)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
03	35	0,008	0,019	4,06 (0,034)	3,04 (0,099)
03	44	0,009	0,003	0,50 (0,403)	0,61 (0,556)
03	51	0,005	0,008	2,26 (0,432)	-
11	35	0,021	0,030	2,19 (0,067)	2,11 (0,097)
23	15	0,004	0,011	3,81 (0,059)	3,45 (0,100)
23	41	0,006	0,005	0,81 (0,808)	0,77 (0,750)
23	44	0,014	0,005	0,44 (0,250)	0,42 (0,233)
23	45	0,006	0,006	1,71 (0,047)	1,36 (0,703)
23	49	0,006	0,002	0,99 (0,996)	0,76 (0,761)
24	07	0,016	0,009	0,70 (0,547)	0,76 (0,654)
24	14	0,014	0,003	0,41 (0,267)	0,41 (0,280)
24	15	0,003	0,011	4,30 (0,101)	4,02 (0,141)
24	18	0,006	0,006	1,28 (0,777)	1,37 (0,713)
24	35	0,018	0,017	1,12 (0,824)	1,13 (0,817)
24	39	0,009	0,009	1,10 (0,880)	0,97 (0,963)
24	40	0,011	0,004	0,46 (0,335)	0,63 (0,528)
24	44	0,001	0,010	6,80 (0,086)	8,77 (0,055)
25	18	0,014	0,005	0,43 (0,226)	0,42 (0,213)
26	38	0,004	0,012	4,09 (0,068)	3,97 (0,071)
29	44	0,020	0,018	1,56 (0,349)	1,44 (0,461)
30	15	0,003	0,012	6,15 (0,044)	6,22 (0,040)
30	18	0,005	0,007	2,45 (0,285)	2,74 (0,207)
30	42	0,010	0,018	2,13 (0,153)	2,23 (0,151)
30	57	0,004	0,007	3,38 (0,129)	3,36 (0,124)
30	58	0,004	0,006	1,36 (0,685)	1,28 (0,750)
31	15	0,009	0,002	0,54 (0,487)	0,46 (0,398)
31	35	0,007	0,008	1,36 (0,638)	1,33 (0,669)
31	51	0,012	0,005	0,73 (0,669)	0,64 (0,561)
32	35	0,007	0,003	0,59 (0,605)	0,39 (0,343)
32	40	0,005	0,005	0,89 (0,890)	0,94 (0,937)
33	14	0,007	0,009	1,94 (0,308)	1,51 (0,552)
68	15	0,008	0,009	1,16 (0,839)	1,50 (0,579)
68	35	0,017	0,015	1,22 (0,719)	1,06 (0,923)
68	51	0,009	0,007	1,11 (0,875)	0,76 (0,707)

Haplótipos de frequência $\geq 0.5\%$ em controles e pacientes portadores de hanseníase e análise de associação com a doença. ¹ Os resultados foram ajustados para as covariáveis sexo e etnia. Intervalo de confiança (CI) sem e com ajuste para covariáveis para o haplótipo HLA-A*11-B*35 (CI=0.945–5.103; CI=0.874–5.113, respectivamente) e para o haplótipo HLA-A*30-B*15 (CI=1.044–36.257; CI=0.061–0.601, respectivamente).

As comparações entre as frequências dos haplótipos HLA-B-C demonstraram forte associação de dois haplótipos com a proteção à hanseníase. Embora o HLA-B*27-C*02 apresente um valor de OR sugerindo um efeito protetor muito forte a essa combinação alélica (OR=0,10 e 0,11; sem e com ajuste, respectivamente), os valores de p foram *borderline* (p=0,054 e 0,070, respectivamente). O haplótipo HLA-B*50-C*06, por sua vez, apresentou OR de 0,17 e 0,19 (sem e com ajuste, respectivamente) e p-valor significativo (0,003 e 0,004) respectivamente.

Embora não apresentando alelos identificados como associados à doença, a combinação haplotípica HLA-B*44-C*04 também demonstrou associação com a proteção à hanseníase mesmo após ajuste para as co-variáveis (OR=0,36; p=0,042), ao contrário do haplótipo B*57-C*07 que demonstrou forte associação com a suscetibilidade à doença (OR=6,17) e p-valor altamente significativo mesmo após ajuste (p=0,009).

Tabela 4.6: Distribuição de Frequência das combinações haplotípicas HLA- B-C.

Haplótipos		Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-B	HLA-C	Controles (461)	Pacientes (419)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
35	04	0,110	0,113	Referência	Referência
07	07	0,060	0,073	1,17 (0,507)	1,19 (0,498)
08	07	0,060	0,046	0,72 (0,241)	0,88 (0,677)
14	08	0,046	0,049	1,07 (0,797)	1,04 (0,888)
44	05	0,038	0,028	0,67 (0,242)	0,69 (0,293)
15	03	0,033	0,053	1,56 (0,129)	1,88 (0,038)
49	07	0,031	0,016	0,53 (0,092)	0,58 (0,154)
44	16	0,030	0,025	0,80 (0,536)	0,93 (0,853)
40	03	0,027	0,027	1,00 (0,984)	1,14 (0,703)
44	04	0,025	0,010	0,38 (0,033)	0,36 (0,042)
50	06	0,025	0,005	0,17 (0,003)	0,19 (0,004)
51	15	0,025	0,029	1,16 (0,666)	1,24 (0,554)
53	04	0,022	0,021	0,89 (0,750)	1,09 (0,821)
39	07	0,018	0,015	0,73 (0,476)	0,78 (0,578)
51	14	0,017	0,014	0,81 (0,632)	0,61 (0,307)
57	06	0,017	0,005	0,29 (0,052)	0,35 (0,099)
18	05	0,017	0,013	0,76 (0,547)	0,77 (0,584)
58	07	0,017	0,020	0,89 (0,776)	0,74 (0,491)
13	06	0,016	0,013	0,89 (0,815)	1,06 (0,897)
18	12	0,016	0,013	0,72 (0,460)	0,80 (0,627)
41	17	0,015	0,013	0,82 (0,677)	0,98 (0,974)

Tabela 4.6 continuação

Haplótipos		Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-B	HLA-C	Controles (461)	Pacientes (419)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
37	06	0,005	0,012	2,30 (0,229)	2,81 (0,142)
44	07	0,005	0,009	2,79 (0,131)	3,02 (0,116)
51	16	0,005	0,011	2,28 (0,210)	2,32 (0,213)
07	15	0,003	0,006	1,55 (0,601)	-
35	12	0,003	0,005	2,10 (0,384)	-
52	15	0,003	0,005	1,62 (0,525)	-
57	07	0,003	0,019	5,09 (0,023)	6,17 (0,009)
57	18	0,003	0,007	2,16 (0,316)	2,28 (0,287)
45	16	0,005	0,015	2,18 (0,181)	2,37 (0,147)
38	12	0,014	0,018	1,32 (0,499)	1,47 (0,364)
42	17	0,014	0,026	1,54 (0,289)	2,20 (0,070)
55	03	0,012	0,013	1,09 (0,857)	1,37 (0,522)
15	02	0,010	0,021	1,95 (0,126)	2,46 (0,051)
15	14	0,010	0,001	0,11 (0,046)	0,13 (0,066)
45	06	0,010	0,010	0,99 (0,997)	0,88 (0,829)
51	02	0,010	0,005	0,60 (0,470)	0,53 (0,426)
51	07	0,010	0,002	0,22 (0,099)	0,25 (0,132)
40	02	0,009	0,010	1,06 (0,900)	1,07 (0,894)
15	07	0,008	0,015	1,28 (0,635)	1,55 (0,402)
58	06	0,008	0,014	1,91 (0,226)	2,20 (0,168)
18	02	0,007	0,006	1,11 (0,866)	1,27 (0,714)
18	07	0,007	0,016	2,45 (0,082)	2,78 (0,056)
27	02	0,007	0,002	0,10 (0,054)	0,11 (0,070)
39	12	0,007	0,010	1,32 (0,629)	1,31 (0,641)
52	12	0,007	0,009	1,17 (0,795)	1,20 (0,756)
14	02	0,006	0,005	0,70 (0,646)	0,86 (0,851)
81	18	0,006	0,008	1,21 (0,760)	1,53 (0,526)

Haplótipos de frequência $\geq 0.5\%$ em controles e pacientes portadores de hanseníase e análise de associação com a doença. ¹ Os resultados foram ajustados para as co-variáveis sexo e etnia. Intervalo de confiança (CI) sem e com ajuste para co-variáveis para o haplótipo HLA-C*02-B*27 (CI=0.009–1.036; CI=0.010–1.199, respectivamente) e para o haplótipo HLA-C*06-B*50 (CI=0.056–0.552; CI=0.061–0.601, respectivamente).

4.2. Análise dos Haplótipos HLA A-B-C

Também foram avaliadas as frequências da combinação haplotípica formada pelos *loci* HLA-A, B e C. Conforme representado na Tabela 4.7, a análise mostrou diferença significativa entre as frequências de seis haplótipos nos grupos de pacientes e controles com valores de OR (sem e com ajuste, respectivamente) sugerindo suscetibilidade à hanseníase. São estes: HLA-A*02/B*35/C*04; HLA-A*02/B*15/C*03; HLA-A*30/B*42/C*17; HLA-A*03/B*35/C*04; HLA-A*26/B*38/C*12; HLA-A*24/B*15/C*03.

Dos alelos anteriormente associados à suscetibilidade ou proteção à doença, apenas o HLA-A*30 foi identificado como permanecendo associado com a suscetibilidade à hanseníase quando ligado ao B*42 e C*17, com p-valor significativo sem e com correção para as co-variáveis sexo e etnia (p=0,007 e 0,010, respectivamente). Os demais alelos, anteriormente associados à hanseníase, quando combinados em haplótipos não obtiveram frequência maior que 0,5% nos pacientes e controles.

Tabela 4.7: Distribuição de Frequências dos Haplótipos HLA-A-B-C

Haplótipos			Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-A	HLA-B	HLA-C	Controles (459)	Pacientes (416)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
01	08	07	0,039	0,020	Referência	Referência
02	44	05	0,029	0,023	1,20 (0,636)	0,97 (0,940)
11	35	04	0,022	0,028	2,37 (0,019)	1,87 (0,117)
03	07	07	0,021	0,019	1,88 (0,118)	1,33 (0,516)
02	07	07	0,018	0,023	2,41 (0,029)	1,70 (0,218)
02	35	04	0,018	0,027	2,93 (0,015)	2,68 (0,033)
24	35	04	0,018	0,016	1,28 (0,632)	1,01 (0,976)
02	49	07	0,015	0,002	0,30 (0,172)	0,28 (0,153)
29	44	16	0,015	0,015	2,30 (0,062)	2,12 (0,106)
68	35	04	0,015	0,008	1,19 (0,744)	0,38 (0,234)
02	51	14	0,014	0,007	1,02 (0,963)	0,66 (0,499)
24	07	07	0,014	0,007	0,72 (0,620)	0,81 (0,747)
25	18	12	0,013	0,005	0,67 (0,625)	0,55 (0,466)
02	14	08	0,012	0,008	1,52 (0,508)	1,28 (0,690)
02	15	03	0,007	0,010	2,85 (0,030)	2,70 (0,041)

Tabela 4.7 continuação

Haplótipos			Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-A	HLA-B	HLA-C	Controles (459)	Pacientes (416)	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
01	37	06	0,003	0,007	3,53 (0,150)	3,41 (0,130)
24	15	03	0,003	0,011	9,64 (0,019)	9,24 (0,044)
30	14	08	0,003	0,002	1,17 (0,834)	1,00 (0,997)
02	50	06	0,009	0,002	0,57 (0,565)	0,44 (0,407)
02	58	07	0,009	0,002	0,84 (0,829)	0,82 (0,785)
24	40	03	0,009	0,003	0,57 (0,519)	0,57 (0,521)
30	42	17	0,009	0,019	4,15 (0,007)	3,90 (0,010)
31	51	15	0,009	0,002	0,93 (0,923)	0,75 (0,733)
01	57	06	0,008	0,001	0,48 (0,371)	0,43 (0,315)
02	51	02	0,008	0,005	0,96 (0,961)	0,90 (0,904)
33	14	08	0,008	0,008	2,42 (0,158)	1,55 (0,539)
02	53	04	0,007	0,006	1,35 (0,676)	1,45 (0,593)
23	49	07	0,007	0,002	1,50 (0,584)	1,02 (0,979)
24	14	08	0,007	0,002	0,92 (0,924)	0,79 (0,795)
31	35	04	0,007	0,004	0,73 (0,696)	0,57 (0,532)
02	40	03	0,006	0,009	2,55 (0,124)	2,49 (0,160)
30	18	05	0,006	0,007	2,24 (0,218)	2,05 (0,268)
03	15	03	0,005	0,007	3,28 (0,111)	3,37 (0,106)
03	35	04	0,005	0,018	10,68 (0,003)	7,53 (0,014)
68	15	03	0,005	0,006	0,95 (0,960)	1,53 (0,642)
02	15	07	0,004	0,005	2,73 (0,221)	2,55 (0,264)
26	38	12	0,004	0,012	4,38 (0,033)	3,97 (0,050)
31	39	07	0,004	0,009	3,45 (0,096)	3,14 (0,127)

Haplótipos de frequência $\geq 0.5\%$ em controles e pacientes portadores de hanseníase e análise de associação com a doença. ¹ Os resultados foram ajustados para as co-variáveis sexo e etnia. Intervalo de confiança (CI) sem e com ajuste para co-variáveis para o haplótipo HLA-A*30-B*42-C*17 (CI=1.453–11.610; CI=1.383–10.943, respectivamente).

5. Análise do Polimorfismo *TNF* -308G>A

As análises de polimorfismo do *TNF* na posição -308 (*TNF* -308G>A) incluíram a genotipagem de 1439 indivíduos, sendo 778 pacientes e 661 controles. As frequências dos alelos A e G foram, respectivamente, 13% e 87% no grupo de controles e 10% e 90% nos pacientes. As frequências genóticas e valores absolutos obtidos encontram-se discriminados na Tabela 4.8. Os testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizados através do teste Qui-quadrado com 1 grau de liberdade, tendo sido considerados sem desvio do equilíbrio tanto o grupo de controles quanto o grupo de pacientes.

Os resultados das comparações entre as frequências alélicas e genóticas de cada grupo (Tabela 4.8) demonstraram que indivíduos carreadores do alelo A apresentam uma chance reduzida de desenvolver a hanseníase com OR=0,75 (p=0,02). Após o ajuste para as covariáveis o valor de OR foi sutilmente alterado (0,77) com p-valor *borderline* (p=0,05).

Tabela 4.8: Frequências alélicas e genóticas observadas nos grupos de pacientes e controles para o polimorfismo de base única *TNF* -308.

TNF -308	Pacientes	Controles	OR (95% CI; p - valor)	OR (95% CI; p - valor)¹
GG	628 ^(0,81)	501 ^(0,76)	referência	referência
GA	137 ^(0,18)	148 ^(0,22)	0,74 (0,57 – 0,96; p= 0,02)	0,76 (0,58 – 1,01; p = 0,06)
AA	13 ^(0,02)	12 ^(0,02)	0,86 (0,39 – 1,91; p = 0,72)	0,79 (0,34 – 1,87; p = 0,60)
Total	778	661		
Alelo G	1393 ^(0,90)	1150 ^(0,87)	referência	referência
Alelo A	163 ^(0,10)	172 ^(0,13)	0,78 (0,57 – 1,08; p = 0,13)	0,79 (0,56 – 1,12; p = 0,19)
Carreador A (GA +AA)	150 (0,19)	160 (0,24)	0,75 (0,58 - 0,96; p=0,02)	0,77 (0,58 – 1,01; p=0,05)

¹valores calculados com correção para as co-variáveis sexo e etnia.

6. Análise dos Haplótipos Estendidos HLA A-B-C-DRB1-TNF -308G>A

A amostragem desse estudo foi previamente genotipada para os alelos HLA de Classe II (DRB1) por Vanderborgh e col. (2007) e o SNP TNF -308G>A (Santos e col., 2002 e presente estudo). Assim, uma análise dos haplótipos estendidos dos alelos HLA classe I (HLA-A-B-C), classe II (HLA-DRB1) e classe III, através do SNP *TNF* -308G>A foi realizada para verificar se as associações dos alelos de classe I à hanseníase seriam independentes da participação de outros *loci* da mesma região 6p21. As frequências dos haplótipos foram estimadas por máxima verossimilhança e comparadas as de valores iguais ou maiores que 0,55%, através de regressão logística sem e com correção para as co-variáveis não genéticas sexo e etnia.

O desequilíbrio de ligação dois-a-dois (pairwise LD) foi verificado através do cálculo de parâmetro D' . Incluindo-se o HLA-DRB1, os resultados demonstraram que não há desequilíbrio de ligação entre os pares HLA-A/DRB1 ($D' = 0,329$), HLA-B/DRB1 ($D' = 0,447$) e HLA-C/DRB1 ($D' = 0,327$). Da mesma forma, a comparação dos loci HLA com o *TNF* -308 temos: (HLA-A/*TNF*: $D' = 0,698$; HLA-B/*TNF* : $D' = 0,561$; HLA-C/*TNF* : $D' = 0,521$ e HLA-DRB1/*TNF* : $D' = 0,417$). Portanto, um LD sugestivo de ligação aparece entre HLA-A e *TNF*.

Conforme representado na Tabela 4.9, o haplótipo mais frequente no grupo controle foi o HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-*TNF* -308A, confirmando dados da literatura (Wilson e col., 1993). Houve diferença significativa entre as frequências dos haplótipos: HLA-A*03-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR = 4.72) e HLA-A*02-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR = 4.66) nos grupos de pacientes e controles, indicando associação com a suscetibilidade à hanseníase, embora o p-valor seja considerado *borderline* (0,045 e 0,051, respectivamente). Após ajuste para as co-variáveis sexo e etnia, estes haplótipos mantiveram os valores de OR, porém com perda de significância estatística (p=0,101 e p=0,077, respectivamente) em virtude da redução no poder do teste acarretada pelo uso dos ajustes.

Tabela 4.9: Distribuição de frequência haplotípica em controles e pacientes portadores de hanseníase e análise de associação com a doença.

Haplótipos					Frequências		Modelo de Regressão Logística	
HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	TNF-308	Controles ⁽⁴⁵⁰⁾	Pacientes ⁽⁴⁰⁴⁾	OR (p-valor)	OR (p-valor) ¹
01	08	07	03	A	0,022	0,004	Referência	Referência
02	44	05	04	G	0,015	0,006	1,26 (0,804)	1,38 (0,758)
01	08	07	03	G	0,012	0,001	0,26 (0,276)	0,24 (0,272)
11	35	04	01	G	0,012	0,013	2,22 (0,218)	2,05 (0,282)
24	07	07	15	G	0,012	0,004	1,17 (0,837)	1,15 (0,852)
29	44	16	07	G	0,012	0,011	2,13 (0,212)	2,02 (0,253)
23	44	04	07	G	0,009	0,001	0,28 (0,319)	0,23 (0,293)
02	35	04	01	G	0,007	0,014	3,15 (0,122)	2,73 (0,222)
03	07	07	15	G	0,007	0,016	4,72 (0,045)	3,99 (0,101)
24	35	04	01	G	0,007	0,004	1,28 (0,756)	1,68 (0,537)
30	42	17	03	G	0,006	0,003	2,32 (0,455)	2,41 (0,382)
02	07	07	15	G	0,005	0,019	4,66 (0,051)	4,80 (0,077)
02	44	05	13	G	0,004	0,010	3,59 (0,119)	1,76 (0,465)
02	35	04	11	G	0,002	0,008	2,59 (0,327)	2,14 (0,502)

¹ Os resultados foram ajustados para as covariáveis sexo e etnia. Intervalo de confiança (CI) sem e com ajuste para covariáveis do haplótipo HLA-A*03-B*07-C*07-DRB1*15-TNF-308G (1.038 – 21.525; 0.765 – 20.841, respectivamente) e para o haplótipo HLA-A*02-B*07-C*07-DRB1*15-TNF-308G (0.992 – 21.926; 0.847 – 27.214, respectivamente).

V. DISCUSSÃO

5.1. Estudo de alelos e combinações haplotípicas HLA classe I e hanseníase

Muitos estudos de associação de HLA classe II e hanseníase foram realizados (Tabela 1.2), entretanto nos estudos de moléculas HLA classe I para esta infecção, existem poucos dados na literatura. Nos pacientes, o *M. leprae* consegue inibir a formação do fagolisossomo, onde reside e se multiplica, devido às suas características intrínsecas (como, por exemplo, os componentes de membrana para neutralizar a atividade bactericida dos macrófagos; van Beers e col., 1996). Apesar disso, foi demonstrado por van der Well e col. (2007) forte presença do bacilo no citoplasma. Assim, independentemente da suscetibilidade individual, alguns bacilos são processados e apresentados através do complexo peptídeo/HLA de classe I, sendo reconhecidos pelo linfócito T CD8+ e podem gerar uma resposta imune protetora. A citotoxicidade dessas células envolve grânulos citotóxicos que contêm perforina capazes de formar um poro na célula alvo permitindo a entrada de granzimas que induzem a apoptose e lise celular (Modlin, 2002). Um dos componentes que media a atividade microbiana é a granulicina a qual foi correlacionada com a capacidade de eliminação de patógenos intracelulares (Stenger e col., 1998).

A importância das células T CD8+ restritas às moléculas HLA classe I, na resistência à infecção pelo *M. tuberculosis*, foi demonstrada através de experimentos em que o gene $\beta 2$ -microglobulina foi suprimido (Flynn e col., 1992). Outro estudo identificou que a proteína de choque térmico (hsp 65) do *M. leprae* induz aumento da atividade citolítica das células CD8+ em pacientes paucibacilares na presença de IL6 e IFN- γ (Sasiain e col., 1998). As associações sugeridas até o momento de HLA classe I e hanseníase são variadas, porém sem um alelo ou grupo alélico considerado consistente entre os estudos.

Os resultados apresentados nas primeiras análises deste trabalho (Tabela 4.1) apontaram os alelos HLA-A*11 e HLA-A*30 como associados com a suscetibilidade à hanseníase *per se* na população do Rio de Janeiro. Estudo realizado na população da Coreia identificou aumento do antígeno HLA-A11 nos pacientes portadores de hanseníase (Kim e col., 1987) e, na população do sul da Índia, o alelo A*1102 esteve associado com a

suscetibilidade à hanseníase *per se* quando comparado aos controles (Shankarkumar e col., 2003). Por outro lado, o alelo A*30 não foi evidenciado em nenhum outro trabalho de associação com a hanseníase, sugerindo que esta associação seja étnico-específica à doença, uma vez que este alelo é um dos mais frequentes na nossa população. O alelo HLA-A*01 esteve associado com a resistência à hanseníase, confirmando os resultados de Shankarkumar e col. (2003) que identificaram o HLA-A*0101 associado na mesma direção aos pacientes portadores de hanseníase quando comparados aos controles.

A análise do locus B demonstrou que o HLA-B*27 e B*50 estão fortemente associados com a proteção à hanseníase, conforme Tabela 4.2. Estas associações não foram encontradas em outros estudos de HLA e hanseníase. Estudos de HLA e outras doenças como artrites reativas ou espondilite anquilosante, demonstraram que os indivíduos HLA-B*27 positivos têm uma chance de 60 a 70 e de 90 a 100 vezes maior, respectivamente, de desenvolver a doença do que os indivíduos que não são HLA-B27 (Brewerton e col., 1974 e Brewerton e col., 1973). Os mecanismos e a base de associação do HLA-B27 a estas doenças são desconhecidos. Uma das hipóteses descritas é a habilidade da molécula HLA-B27 de se ligar a um único “set” de peptídeos artritogênicos resultando em uma resposta de células T citotóxicas restrita a peptídeos encontrados apenas nas articulações teciduais, levando à doença (Benjamin e Parham, 1990). Outra possibilidade é que algumas características da bioquímica ou biologia celular do HLA-B27 predisponham a essas doenças, como a expressão na superfície celular que pode ocorrer independentemente da presença de tapasina (Peh e col., 1998) ou ainda que a formação e estabilidade do homodímero B27 seja independente da cadeia β 2-microglobulina para apresentar peptídeos (Allen e col., 1999). Estas hipóteses comprovam o desempenho desta molécula na apresentação de peptídeos endógenos aos linfócitos T. No caso da hanseníase, podemos considerar a hipótese de que as propriedades físico-químicas da molécula HLA-B27 ao se ligar e apresentar os peptídeos, formados através do processamento proteico do *M. leprae*, sejam mais eficientes ao reconhecimento de clones específicos de linfócito T CD8⁺, quando comparadas com outras moléculas, capazes de gerar uma resposta imune competente para eliminação do bacilo.

Não foi encontrada associação do HLA-B*50 tanto com a hanseníase, quanto com outras doenças. Este alelo apresentou uma frequência de 2,5% na população do Rio de Janeiro, conforme estudo realizado por Guimarães, L.T. (dados não publicados), confirmando dados da população brasileira (Moraes, M.E., comunicação pessoal). O grupo

de controles desse estudo apresentou frequência similar (3%), em relação à nossa população, porém a frequência desse alelo no grupo de pacientes portadores de hanseníase foi de apenas 1%. Diante destes dados, análises de associação haplotípica entre os *loci* HLA-A-B (tabela 4.5) e entre HLA-B-C (tabela 4.6) foram realizadas. Não foram encontradas associações significativas para haplótipos formados pelos alelos HLA-A e HLA-B*50 relacionados com a hanseníase. Em relação às análises haplotípicas HLA-B-C, os resultados demonstraram forte associação do haplótipo B*50-C*06 com a resistência à doença (OR = 0.17), mesmo após correção para as co-variáveis sexo e etnia (OR = 0.19). Devido à associação negativa encontrada do alelo C*0602 com a hanseníase na população indiana (Shankarkumar e col., 2003), foi levantada a hipótese de que a identificação do alelo B*50, como associado com a proteção à hanseníase, fosse devido a sua forte ligação com C*06 na nossa população controle, porém a frequência deste último alelo foi idêntica entre nossos controles e pacientes (9%). Assim, podemos considerar que a associação com a hanseníase seja devido à presença do alelo HLA-B*50 e que este, quando combinado com HLA-C*06 apresente um efeito potencializado para conferir proteção à hanseníase.

Os relatos de associação de *locus* C são raros. No presente estudo, conforme Tabela 4.3, o alelo HLA-C*05 sugeriu associação (p=0.039) com a resistência à hanseníase, associação esta não encontrada em outras populações. Yen e col. (2001) identificou esse alelo como associado com a suscetibilidade à artrite reumatóide, corroborando com as hipóteses de associação do HLA-B*27. As análises dos haplótipos não demonstraram nenhuma ligação do HLA-C*05 com outros alelos associados à hanseníase. Infelizmente, alguns dos haplótipos formados por alelos de baixa frequência nos *loci* HLA estudados formam combinações raras muito difíceis de serem comparadas.

5.2. Estudo dos haplótipos HLA A-B-C e hanseníase

Embora o HLA-A*30 e a combinação haplotípica HLA-A*30-B*15 estejam fortemente associados com a suscetibilidade à hanseníase (OR=6,15) nesse estudo, quando analisamos as associações haplotípicas HLA-A-B-C, o A*30 aparece associado com B*42-C*17 indicando suscetibilidade à doença (OR=4,15). Conforme dados descritos no Programa Nacional de Doadores de Medula Óssea Americano (NMDP), estes haplótipos

são muito frequentes em diferentes populações, reforçando o efeito do HLA-A*30 na suscetibilidade à hanseníase independentemente de sua combinação haplotípica.

Em relação aos outros cinco haplótipos que foram evidenciados como sugerindo suscetibilidade à doença, HLA-A*02-B*35-C*04; HLA-A*02-B*15-C*03; HLA-A*03-B*35-C*04; HLA-A*26-B*38-C*12; HLA-A*24-B*15-C*03, nenhum outro estudo de associação destes haplótipos com a hanseníase foi descrito anteriormente. Os alelos que formam estes haplótipos apresentam alta frequência na população da região sudeste do Brasil (Souza, 2009), sendo o HLA-A*02 e o B*35 os mais frequentes neste estudo. Existe uma forte ligação entre estes alelos (NMDP) e, na nossa população de pacientes, eles formaram haplótipos com maior frequência em relação aos nossos controles. Devido à altíssima variabilidade desse sistema e a heterogeneidade de nossa população, pode-se inferir que o número de amostras analisadas não foi suficiente para identificar a distribuição destes haplótipos nesse estudo. De qualquer maneira, não podemos desconsiderar a hipótese de que estes alelos, quando expressos conjuntamente, sejam ineficientes para apresentar peptídeos aos clones específicos de células T CD8+ capazes de gerar uma resposta imune. Em 1976, De Vries e col. já sugeriram que a resposta do hospedeiro ao *M. leprae*, conferindo suscetibilidade e o tipo de hanseníase, fosse controlada por pelo menos genes de dois *loci* HLA nas diferentes populações.

5.3. Estudo do polimorfismo *TNF* -308G>A e Hanseníase

O fator de necrose tumoral (TNF) tem sido identificado como importante estimulador celular para a produção de mediadores inflamatórios em diferentes doenças. Na artrite reumatóide, por exemplo, diversos estudos sugerem a possibilidade de um polimorfismo na região do TNF que seja independente para a suscetibilidade à doença, porém com possível modificação de risco quando ligado a um alelo DRB1, também de suscetibilidade, formando um haplótipo. Dessa maneira, a contribuição de suscetibilidade do DRB1 pode ser devido ao efeito epistático deste polimorfismo TNF (Lechler e col., 2000). Na hanseníase, o TNF pode ser considerado como o maior fator de patogênese da infecção, pois além de sua propriedade de promover uma resposta imune capaz de eliminar o *M. leprae*, ele pode também mediar manifestações patológicas da doença. Diversos estudos

têm demonstrado associação entre o gene *TNF* e a hanseníase. Conforme meta-análise de Cardoso, CC (2009), o *TNF* -308G>A tem sido demonstrado como importante marcador de associação com a hanseníase, especialmente na população brasileira. O resultado deste estudo demonstrou um efeito protetor nos genótipos carreadores do alelo A confirmando os resultados descritos anteriormente em populações de diferentes regiões brasileiras (Shaw e col., 1997; Santos e col., 2002 e Franceschi e col., 2009).

Diversas análises funcionais deste SNP foram realizadas, sendo os primeiros ensaios iniciados por Wilson e col. (1994), no qual demonstraram que o alelo A esteve associado com aumento de 6 a 7 vezes na taxa de transcrição do gene *TNF* quando comparado ao alelo G. Uma revisão apresentada por Barley e col., demonstra que mais recentemente os estudos funcionais têm sido conduzidos através de diferentes técnicas como; i) medição direta da produção de *TNF* em sangue total estimulado (com LPS, por exemplo); ii) transfecção transitória de regiões promotoras artificiais introduzidas em linhagens celulares e; iii) quantificação de transcritos de RNA alelo específico (Bayley e col., 2004). Porém, mesmo diante destes diferentes modelos de estudo, os resultados foram conflitantes em relação à associação de carreadores do alelo -308A e a produção de *TNF*. Alguns experimentos utilizando linhagens celulares diversas, diferentes períodos de tempo após estimulação, concentrações e tipos de estímulos variados, não foram capazes de observar diferença na atividade das variantes alélicas deste SNP (Stuber e col., 1995; Somoskovi e col., 1999; Kroeger e col., 2000). No entanto, outros estudos apresentaram associações do alelo A e o aumento da expressão de *TNF* utilizando construções de alelos em regiões promotoras (Wilson e col., 1997), cultura de células de indivíduos saudáveis (Louis e col., 1998), ou ainda células derivadas de pacientes transplantados (Fernandes e col., 2002).

Uma hipótese alternativa, para a divergência nestes resultados, foi proposta por Cardoso (2010) em que o *TNF* -308G>A não seria a variante funcional por si só, mas sim, a combinação deste com outras variantes na mesma região. Tem sido sugerido que padrões distintos da resposta imune seriam atribuídos à combinação de diferentes SNPs. Ainda na região HLA classe III, podemos citar o gene *LTA* que tem sido amplamente estudado através do SNP localizado na posição +252 do primeiro íntron (Moraes e col. 2006) e sua caracterização funcional tem demonstrado que a variante do alelo G aumenta a expressão do gene *LTA* no infarto do miocárdio (Ozaki e col., 2002 e 2004). Uma análise de associação sugeriu proteção do haplótipo -308A/+252G à hanseníase *per se* na região norte do Brasil (Shaw e col., 2001). Assim, podemos supor que, pelo menos na população

brasileira, indivíduos carreadores do alelo -308A ou do haplótipo -308A/+252G seriam capazes de restringir a replicação do *M. leprae* e a progressão de possível doença através da produção de níveis elevados de TNF e LTA (Moraes e col., 2006). Ainda, o estudo de Alcais (2007) evidenciou, a partir de uma estratégia de clonagem posicional, o SNP LTA +80A como associado à hanseníase em Vietnamitas e Indianos com um efeito relevante em crianças até 15 anos de idade. O alelo LTA +80A também foi associado à baixa produção de LTA (Knight et al 2007). Portanto, o conhecimento aprofundado da estrutura de desequilíbrio de ligação da região de TNF/LTA/HLA levará ao entendimento definitivo dos marcadores de fato envolvidos na suscetibilidade a hanseníase (ver também abaixo).

5.4. Estudo dos haplótipos estendidos HLA-A-B-C-DRB1-TNF e Hanseníase

O TNF está localizado na região de classe III do HLA à distância centromérica de 250kb do HLA-B e telomérica de 850kb do HLA-DR. Esta localização cromossômica, assim como a relevância funcional destes genes, aumenta a possibilidade de que a associação com a hanseníase seja devido a uma combinação haplotípica dos genes HLA e TNF. Estudos de haplótipos multilocus formados por genes HLA e TNF, em outras doenças, têm evidenciado que muitas vezes as associações não são independentes. Shibue e col. (2000) demonstraram que a combinação haplotípica dos alelos *TNF* -1031T, -863C, -857T e HLA-DRB1*0405 esteve significativamente aumentada em pacientes com artrite reumatóide na população do Japão, enquanto que Vejbaesya e col. (2009) identificaram dois haplótipos estendidos que incluíam TNF, LTA, HLA classe I e II associados à dengue secundária em pacientes da Tailândia. Em relação à hanseníase, este é o primeiro trabalho de associação com haplótipos estendidos na região 6p21.3.

Nossas análises identificaram os haplótipos estendidos HLA-A*03-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR=4.72) e HLA-A*02-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G (OR=4.66) indicando associação com a suscetibilidade à hanseníase *per se*. Embora não tenhamos encontrado associação entre os alelos de classe I que formaram estes haplótipos e a doença, o HLA-B7 foi identificado como associado à forma clínica LL da hanseníase nas populações do Japão e da Tailândia (Izumi e col., 1982 e Greiner e col., 1978), como demonstrado na Tabela 1.2. Diversos estudos demonstraram associação do DRB1*15

(sorologicamente DR2) com a suscetibilidade à doença *per se*, como também a algumas formas clínicas em diferentes populações. Em estudo prévio desta população, este alelo foi evidenciado por Vanderborcht e col. (2007) que observou altas frequências do DRB1*1503 em Afro-descendentes e do DRB1*1501 em Euro-descendentes. Estas frequências correspondem ao mesmo perfil encontrado na população brasileira (Moraes e col., 1993), sugerindo que o efeito do alelo DRB1*15 seja étnico específico, uma vez que não foi observado em outras populações, como a Vietnamita. Quanto ao *TNF* -308G>A, os trabalhos de Shaw e col. (2001) e Santos e col. (2002) que identificaram o alelo -308A como associado com a proteção à hanseníase na população brasileira, corroboram nossos resultados. A ligação desses alelos dentro da região HLA para a formação destes haplótipos sugere que a variedade dos produtos codificados por estes genes possam atuar conjuntamente na determinação do tipo de resposta imune que o hospedeiro desenvolve diante da infecção pelo *M. leprae* e que leva a doença.

5.5. Outras considerações

Temos observado no decorrer dessa dissertação que alguns alelos HLA que conferem alto risco para determinadas doenças, como o DRB1*04 na diabetes tipo I e artrite reumatóide, inversamente na hanseníase está associado com a proteção à doença (Kim e col., 1987; Joko e col., 2000; Vanderborcht e col., 2007; Motta e col., 2007; Silva e col., 2009; Hsieh e col., 2010). Da mesma forma que haplótipos formados pela ligação do DRB1*15 a outros alelos, estão associados à proteção da diabetes tipo I (Caillat-Zucman, 2008), opostamente observamos neste estudo que, os haplótipos estendidos associados com a suscetibilidade na hanseníase, contêm o DRB1*15, que já foi amplamente discutido. Os mecanismos pelos quais as variações genéticas determinam a resposta imune individual para determinantes antigênicos podem ser: a seleção dos determinantes; falhas no repertório de células T; ou supressão mediada pelas células T (Lechler e Warrens, 2000). Especialmente nestes dois exemplos de doenças (diabetes tipo I e artrite reumatóide) tem sido observado que o efeito protetor ou de risco está relacionado com a estrutura das moléculas que compartilham resíduos de aminoácidos comuns e que se distinguem de outras moléculas. Estes resíduos, muitas vezes, são encontrados em “pockets” dentro da fenda onde o peptídeo é ligado. Isto implica na seleção de determinantes antigênicos que serão ou não reconhecidos pelas células T. No caso destas doenças, a resposta imune é

direcionada contra determinados tecidos do próprio indivíduo, o que caracteriza uma doença autoimune. Já nas doenças infecciosas, como na hanseníase, a resposta imune é capaz de eliminar ou neutralizar o agente infeccioso.

Diante dessas considerações, é interessante observar que o padrão associado à resistência a infecção micobacteriana está também associado a doenças autoimunes. Assim, poderíamos especular sobre um possível “programa” da resposta imune protetora que foi selecionado ao longo da evolução humana e que hoje esse mesmo programa de imunidade exacerbada teria um papel deletério nos episódios autoimunes. E talvez os mecanismos ora descritos para o desencadeamento da resposta imune contra antígenos autólogos nessas doenças seriam responsáveis por essa resposta eficiente que contém a infecção pelo *Mycobacterium leprae*.

A resposta granulomatosa da hanseníase é influenciada fortemente pela genética. Alcaïs e col. (2000) demonstraram que variações na sequência da proteína associada à resistência natural de macrófagos (NRAMP1) estão ligadas à resposta granulomatosa mediante o estímulo de lepromina (teste Mitsuda) e parece que a seleção de determinantes HLA é definitiva.

Porém, ainda não está claro se apenas a variação estrutural das moléculas seja responsável pelas associações com as doenças. Atualmente há um interesse muito grande em identificar as variações genéticas que possam modular a expressão de genes. Além da restrição de resposta a antígenos, a regulação dos níveis de expressão dos genes HLA é crucial para a promoção da resposta imune. Através de modelos experimentais, a super expressão do MHC classe I foi correlacionada com a indução de diversas doenças autoimunes (Cohen e col., 2008), enquanto estudos com pacientes demonstraram que a queda na regulação da expressão destes genes esteve associada com muitos tipos de tumores, assim como, com a progressão da doença, resistência terapêutica e redução da sobrevivência (Luczynski e col., 2004 e Vitale e col., 2005). A baixa expressão de classe I também foi observada em células infectadas com HIV-1 ou células oncogênicas transformadas por vírus (Howcroft e col., 1993 e Pizzato e col., 2003).

A expressão dos genes HLA classe II é específica de determinados tipos celulares, sendo restrita principalmente por células epiteliais tímicas e células apresentadoras de antígenos derivadas da medula óssea. O nível de expressão varia de acordo com o estágio de desenvolvimento destas células, por exemplo, a maturação de uma célula dendrítica é

caracterizada pela diminuição de expressão dos genes classe II, enquanto células T ativadas são identificadas pela expressão destas moléculas (Handunnetthi e col., 2010). A baixa expressão destes genes pode estar associada aos estágios de certas doenças, como por exemplo, durante uma infecção grave ou prolongada (Pachot e col., 2005).

Tanto os genes MHC classe I, quanto os de classe II, são induzidos à expressão através da estimulação do IFN- γ e compartilham elementos cis-regulatórios similares em suas regiões promotoras que também se associam a complexos de fatores de transcrição similares (Meissner e col., 2010). Diversos mecanismos podem contribuir para a determinação da expressão dos genes HLA, incluindo mecanismos epigenéticos, estimuladores de tipos celulares específicos ou fatores ambientais. Um exemplo deste último mecanismo é a atuação da vitamina D como imunomodulador da expressão de genes classe II que foi demonstrado por Rigby e col. (1990). A deficiência de vitamina D está associada com a suscetibilidade de várias doenças autoimunes e infecciosas, incluindo tuberculose, que foi descrita por Davies e col. (1985), e hanseníase (Montoya e col., 2009). A vitamina D atua no organismo através de complexos receptor-ligantes. Um desses complexos, na presença de outros receptores, é capaz de atuar como fator de transcrição, ligando-se a elementos de resposta da vitamina D (VDRE), na região promotora de diversos genes. Ensaio funcionais demonstraram que o VDRE na região promotora proximal do HLA pode influenciar a expressão do DRB1*1501 na esclerose múltipla (Ramagopalan e col., 2009). Ainda não se sabe como essa interação pode interferir na etiologia da doença, uma hipótese plausível é que a perda de vitamina D na infância possa afetar a expressão alelo-específica no timo resultando em perda de tolerância central e aumentando o risco de autoimunidade numa fase posterior da vida. Pacientes com tuberculose e hanseníase possuem associações genéticas com o receptor de vitamina D e, muitas vezes, são deficientes dessa vitamina, o que pode resultar em redução da expressão de determinados alelos HLA associados à doença (Handunnetthi e col., 2010).

5.6. O sistema HLA e o processo evolutivo

“Em 1949, Haldane sugeriu que as doenças infecciosas poderiam ser os principais agentes da seleção natural na história relativamente recente da humanidade” (de Vries e col., 1979). Porém, há uma dificuldade muito grande em estimar a influência das variáveis genéticas e ambientais que evidenciem diretamente a seleção por microorganismos. Com o objetivo de evidenciar o controle genético para a sobrevivência em epidemias, de Vries e col. (1979) estudaram um grupo de descendentes de imigrantes que saíram da Holanda, em 1845, para se estabelecerem em uma colônia agrícola no Suriname. Na ocasião da imigração, o grupo era composto por 55 famílias, porém duas semanas após sua chegada, eles sofreram um surto de febre tifóide o que acarretou na morte de 49% desta população. Seis anos depois, um surto de febre amarela matou outros 20%. Das 55 famílias imigrantes, 5 foram dizimadas, 44 perderam um ou mais membros e apenas 6 famílias não sofreram mortes.

O estudo foi, então, realizado com 41 descendentes diretos dos sobreviventes e 31 indivíduos entre cônjuges ou filhos para que fosse possível deduzir seus próprios genótipos. Diversos polimorfismos foram testados, entre eles: o grupo sanguíneo ABO; a glicoxalase I (GLO); grupos sorológicos como o terceiro fator de complemento (C3) e o marcador de cadeia- γ (Gm) e; HLA-A, B e C. Os resultados foram comparados com um grupo controle de holandeses para testar se a heterogeneidade, do grupo testado, seria resultado de deriva genética. Apesar do número pequeno de amostras, foi possível observar uma heterogeneidade significativamente aumentada nos polimorfismos de C3, Gm, HLA-B e GLO. Em relação ao HLA, houve aumento na frequência de alguns alelos, como B13, B38 e B50 e diminuição de outros, como o B7, em relação aos controles. Dessa forma, foi sugerido que o aumento da frequência de alguns alelos poderia ser parcialmente devido ao desequilíbrio de ligação com outros genes (GLO, por exemplo) conferindo resistência às doenças, enquanto a diminuição na frequência do B7 poderia indicar associação com a mortalidade, possibilitando uma seleção através do controle genético da imunidade ou imunopatologia dos agentes infecciosos da febre amarela e tifóide naquela população.

As duas principais características genéticas do sistema HLA são o alto grau de polimorfismo e o significativo desequilíbrio de ligação que existe entre os alelos de seus diferentes *loci*, o que caracteriza a alta heterogeneidade entre as diferentes populações

(Ardlie e col., 2002). Há evidências que estas características sejam devido à seleção natural diferencial (Borghans e col., 2004). A importante função do sistema HLA na regulação da resposta imune sugere que este sistema controle diferencialmente as doenças infecciosas, reforçando a proposta de um modelo co-evolutivo entre patógenos e hospedeiros.

5.7. Considerações finais

Efetivamente, os resultados apresentados nesse trabalho podem inferir a importância do sistema HLA na hanseníase em nossa população. Muitos estudos ainda são necessários para decifrar o conjunto de genes e outros fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença. É claro que a participação de genes não-HLA e localizados fora do 6p21 como IL-10, MRC1, IFNG, PARK2, NOD2 e TLR1 (Moraes e col., 2004; Pereira e col., 2009; Alter e col., 2010; Cardoso CC, 2009; Wong e col., 2010; Zhang e col., 2010) está confirmada em várias populações (Figura 5.1); porém, o papel detalhado de cada um deles e a correlação genótipo-fenótipo ainda não está definido. Além disso, os dados deste trabalho juntamente com a literatura (Moraes e col., 2006; Alcaïs e col., 2007; Vanderborcht e col., 2007) demonstraram que a região 6p21, incluindo os genes HLA de classe II e I (apresentados nesses estudo), também participam definitivamente da suscetibilidade a hanseníase. Por fim, os resultados de estudos pan-genômicos evidenciaram SNPs intrônicos de frequência alta nas regiões de HLA associados à hanseníase (Wong e col., 2010; Zhang e col., 2010), indicando que provavelmente alelos clássicos do HLA devem ser responsáveis pelos sinais desses estudos.

O objetivo deste estudo foi aplicar conhecimentos sobre o sistema HLA para compreender melhor a suscetibilidade genética à hanseníase diante dos padrões de resposta do hospedeiro ao *M. leprae*. O reconhecimento de antígenos endógenos e exógenos, que são apresentados pelas moléculas HLA classe I e classe II aos linfócitos, demonstram a importância dessas moléculas na determinação da suscetibilidade ou resistência às doenças infecciosas humanas como a hanseníase. A análise dos estudos de associação de alelos ou haplótipos HLA como marcadores de suscetibilidade em nossa população poderá aumentar o sucesso de ações profiláticas através da identificação de contatos, como familiares, domiciliares ou mesmo residentes de regiões endêmicas, que sejam mais suscetíveis à

doença. Estes conhecimentos também poderão levar à compreensão das vias e mecanismos utilizados pelo hospedeiro para resistir às doenças infecciosas com aplicação na identificação de moléculas e vias que sejam potenciais alvos de intervenção terapêutica.

A partir deste trabalho pretende-se continuar a pesquisa de polimorfismos de suscetibilidade, tanto do sistema HLA como de outros sistemas, com diferentes desenhos de estudo na população brasileira. A identificação de genótipos como marcadores de suscetibilidade poderá contribuir para um aprofundamento no conhecimento dos mecanismos moleculares patogênicos da hanseníase e ser utilizada como possível ferramenta no auxílio ao diagnóstico precoce da doença, bem como um instrumento na otimização de ações profiláticas como parte das estratégias de controle e eliminação da doença.

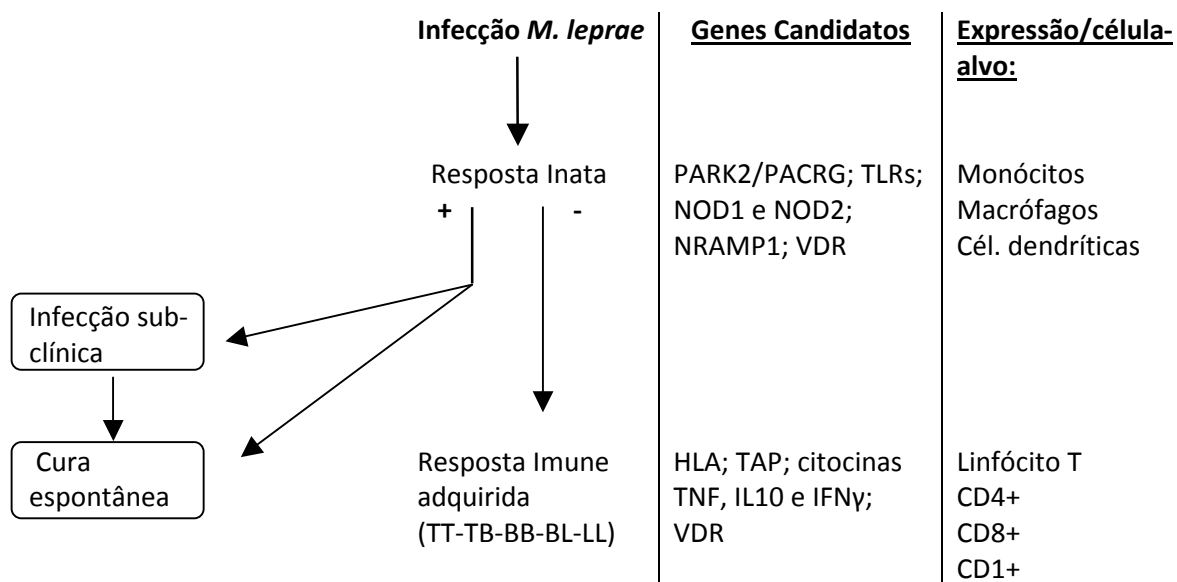


Figura 5.1: Influência genética nos dois estágios de imunidade do hospedeiro diante do *M. leprae*. Adaptado de Scollard e col. (2006).

VI. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados nesse estudo, podemos concluir que:

1. No estudo do *locus* HLA-A foi possível observar associações dos alelos HLA-A*11 e A*30 com a suscetibilidade e do alelo A*01 com a proteção à hanseníase *per se* na população do Rio de Janeiro.
2. O resultado das associações HLA-A*01 e A*11 confirmam dados da literatura, ao contrário do HLA-A*30 que parece ser uma associação específica de nossa população.
3. Nos estudos de combinações haplotípicas, foi observado um efeito aditivo desses alelos do *locus* A, quando combinados com os *loci* HLA-B e C.
4. Em relação ao *locus* HLA-B, dois alelos demonstraram associação com a proteção à hanseníase, o HLA-B*27 e o HLA-B*50. Estas associações não foram encontradas em outras populações, porém foram mantidas quando estes alelos se associaram ao *locus* C.
5. O HLA-C*05 demonstrou associação com a proteção à doença.
6. No estudo do SNP *TNF* -308G>A, foi possível identificar que os genótipos carreadores do alelo A conferem um efeito protetor à hanseníase, corroborando dados prévios descritos anteriormente na população brasileira.
7. Na análise do haplótipo estendido, foi observada associação dos haplótipos HLA-A*03-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G e HLA-A*02-B*07-C*07-DRB1*15-*TNF* -308G com a suscetibilidade à hanseníase *per se*. Estas associações reforçam o efeito de suscetibilidade do DRB1*15, amplamente descrito na literatura.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. O Complexo Principal de Histocompatibilidade. In: *Imunologia celular e molecular*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008 p.97-136

Abel L, Sanchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis* 1998 Jan;177(1):133-45.

Adans LB; Fukutomi Y; Krahenbuhl JL. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. *Infec and Immunity*. 1993 Oct; 61(10):4173-4181

Akama Takeshi; Suzuki K; Tanigawa K; Kawashima A; Huhehasi W; Nakata N; Osana Y; Sakakibara Y; Ishii N. Whole-Genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. *J. Bacteriology*. 2009 May; 191(10):3321-3327

Alcaïs A; Sanchez FO; Thuc NV; Lap VD, Oberti J; Lagrange PH; Schurr E; Abel L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (mitsuda reaction) in linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *The J Infect Disease*. 2000;181:302-8

Alcaïs A; Alter A; Antoni G; Orlova M; Nguyen VT; Singh M; Vanderborcht PR; et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet*. 2007 Apr;39(4):517-22

Allen R L; O'Callaghan CA; Mc Michael AJ; Bowness P. HLA-B27 can form a novel $\beta(2)$ -microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J. Immunology*. 1999; 162:5045-5048

Alter A; de Leseleuc L; van Thuc N; Thai VH; Huong NT; Ba NN; Cardoso CC; Grant AV; Abel L; Moraes MO; Alcaïs A; Schurr E. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet*. 2010 Mar;127(3):337-48

Alvaro-Navarro A; Montoya-Buelna M; Munoz-Valle JF; Lopez-Roa RI; Guillen-Vargas C; Fafutis-Morris M. The 3'UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the West of Mexico. *Immunol Lett*. 2008 Jun; 118(2):148-51

Amiel JL. Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. *Histocompatibility Testing 1967*, Copenhagen, Munksgaard. 1967;p.79

Anthony Nolan Research Institute. Disponível em: <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>. Acesso em 13 de Junho de 2010

Ardlie KG; Kruglyak L; Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews*. 2002 Apr; 3:299-309

Bakker PIW; Mcvean G; Sabeti PC; Miretti MM; Green T; Rioux J. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nature Genetics*. 2006; 38:1166-1172

Barnes PF; Chatterjee D; Brennan PJ; Rea TH; Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infection and Immunity*. 1992 Apr; 60(4):1441-1446

Bayley JP; Ottenhoff THM; Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphism? *Genes and Immunity*. 2004 Feb; 5:315-329

Beiguelman B. Genetics and Leprosy. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2002;7(1):117-128

Benacerraf B & McDevitt HO. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*. 1972 Jan;175(19):273-279

Benjamin R & Parham P. Guilt by association: HLA B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*. 1990; 11:137-142

Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: A view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell*. 1997 Apr; 89:167-170

Blackwell JM. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Int. Journal Parasitology*. 1998; 28(1):21-28

Blackwell TS; Christman JW; Hagan T; Price P; Edens T; Morris PE; Wolff SN; Goodman SA; Christman BW. Oxidative stress and NF-kappaB activation: correlation in patients following allogeneic bone marrow transplantation. *Antioxid Redox Signal*. 2000 Spring;2(1):93-102

Borghans JA; Beltman JB; de BoerRJ. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*. 2004 Feb; 55(11):732-9

Brewerton DA; Caffrey M; Hart FD; James DCO; Nicholls A; Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A27. *Lancet*. 1973; i:904-907

Brewerton DA; Caffrey M; Hart FD. Reiters disease and HL-A27. *Lancet*. 1974 ii:996-998

Butlin CR; Soares D; Neupane KD; Failbus SS; Roche PW. IgM anti-phenolic glycolipid-1 antibody measurements from skin-smear sites: correlation with venous antibody levels and bacterial index. *Int J Lepr Other Mycobact Diseases*. 1997; 65:465-468

Cabrera M; Shaw MA; Sharples C; Williams H; Castes M; Convit J; Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995 Nov;182(5):1259-64

Caillat-Zucman S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens*. 2008;73:1-8

Campbell R & Milner CM. MHC genes in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 1993; 5:887-893

Cardoso CC. Estudo da associação entre polimorfismos de base única (SNPs) nos genes *IL10*, *IFNG* e *TNF* e a suscetibilidade à hanseníase. Rio de Janeiro, 2009. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Instituto Oswaldo Cruz.

Cem Mat M; Yazici H; Ozbakir F; Tüzün Y. The HLA association of lepromatous leprosy and borderline lepromatous leprosy in Turkey. A preliminary study. *Int J Dermatol*. 1988 May;27(4):246-47

Charron D. Immunogenetics today: HLA, MHC and much more. *Current Opinion in Immunology*. 2005; 17:493-497

Chin-a-Lien RAM; Van Rens MM; Leiker DL; Naafs B; Klatser PR. Follow-up of multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-I based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? *Leprosy Review*. 1992; 63:21-27

Cohen H; Parekh P; Sercan Z; Kotekar A; Weissman JD; Singer S. In vivo expression of MHC Class I genes depends on the presence of a downstream barrier element. *Plos One*. 2008 Aug;4(8):1-15

Cole ST; Eigimeier K; Parkhill J; James KD; Thomson NR; Wheeler PR; Honore N; Garnier T; Churcher C; Harris D; et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001 Feb; 409(22):1007-1011

Daffé M & Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol*. 1998; 39:131-203

DATASUS – Departamento de Informática do SUS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Hanseníase. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hanseníase/bases/Hansbrnet.def>

Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*. 1958; 20:156-66

- Dausset J. Leuco-agglutinins VI. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang.* 1954; 4(6): 190-198
- Davies PD; Brown RC; Woodhead JS. Serum concentrations of vitamin D metabolites in untreated tuberculosis. *Thorax.* 1985 Mar;40(3):187-90
- De Vries RRP; Fat RF; Nijenhuis LE; van Rood JJ. HLA-linked genetic control of host response to *Mycobacterium leprae*. *Lancet.* 1976 Dec; 2(7999):1328-30
- De Vries RRP; Khan PM; Bernini LF; van Loghem E; van Rood JJ. Genetic control of survival in epidemics. *J Immunogenetics.* 1979; 6:271-287
- De Vries RR; Mehra NK; Vaidya MC; Gupte MD; Meera KP, van Rood JJ. HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. *Tissue Antigens.* 1980 Oct;16(4):294-304
- Dockrell HM; Young SK; Britton K; Brennan PJ; Rivoire B; Waters MFR; Lucas SB; Shahid F; Dojki M; Chiang TJ; Ehsan Q; McAdam KPWJ; Hussain R. Induction of Th1 cytokine responses by micobacterial antigens in leprosy. *Infec and Immunity.* 1996 Oct; 64(10):4385-89
- Elahi MM; Asotra K; Matata BM; Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: na analysis of association with health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009; 1792:163-172
- Feitosa MF; Borecki I; Krieger H; Beiguelman B; Rao DC. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *American Journal_Human Genetic.* 1995; 56:1179-1185
- Fernandes H; Koneru B; Fernandes N; Hameed M; Cohen MC; Raveche E; Cohen S. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation.* 2002 Jun;73(12):1886-91
- Fitness J; Floyd S; Warndorff DK; Sichali Lifted; Mwaungulu L; Crampin AC; Fine PEM; Hill AVS. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71(3):330-340
- Flynn JL; Goldstein MM; Triebold KJ; Koller B; Bloom BR. Major Histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Dec; 89(24):12013-7

Franceschi DSA; Mazini PS; Rudnick CCC; Sell AM; Tsuneto LT; Ribas ML; Peixoto PR; Visentainer JEL. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infec Diseases*. 2009;13:493-498

Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JA, Moraes MO, Antunes SL, Pessolani MCV, et al. Hanseníase: Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. Em: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Vol. II. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2005. p.1383-94

Geluk A; Meijgaarden KE; Janson AAM; ET AL. Functional analysis of DR17(DR3)-restricted mycobacterial T cell epitopes reveals DR17-binding motting motif and enables the design of allele-specific competitor peptides. *J Immunol*. 1992;149:2864-71

Geluk A; Fu XT; Meijgaarden KE; et al. T cell receptor and peptide-contacting residues in the HLA-DR17(3) β 1 chain. *Eur J Immunol*. 1994;24:3241-44

Geluk A; Ottenhoff THM. HLA and Leprosy in the pre and postgenomic eras. *Human Immunology*. 2006; 67:439-445

Gerbase-DeLima M & Musatti CC. Complexo HLA e Doenças. *Rev Bras Alerg Imunol*. 1989 Dez;12(6):185-190

Goldszmid RS; Coppens I; Lev Avital; Caspar P; Mellman I; Sher A. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii* infected dendritic cells. *J Exp Med*. 2008; 206(2): 399-410

Goulart IMB; Penna GO; Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2002 Ago; 35(4):365-375

Goulart LR & Goulart IMB. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res*. 2009; 301:123-137

Goulart LR & Goulart IMB. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res*. 2008 Jul;300(6):269-90

Greiner J; Schleiermacher E; Smith T; Lenhard V; Vogel F. The HLA system and leprosy in Thailand. *Hum Genet*. 1978 Jun;42(2):201-13

Grumet FC; Coukell A; Bodmer JG; et al. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus: a possible genetic predisposition to disease. *N Engl J Med*. 1971;285:193-196

Guia de Vigilância Epidemiológica: Hanseníase. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Caderno 7. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_hansenia.pdf

Handunnetthi L; Ramagopalan SV; Ebers GC; Knight JC. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes and Immunity*. 2010;11:99-112

Hauptmann G; Bahram S. Genetics of the central MHC. *Current Opinion in Immunology*. 2004;16:668-672

Hegazy AA; et al. Leprosy in a High-prevalence Egyptian village: epidemiology and risk factors. *Tropical Medicine Rounds*. 2002;41:681-686

Howcroft TK; Strebel K; Martin MA; Singer DS. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon T at of HIV. *Science*. 1993;260:1320-22

Hsieh NK; Chu CC; Lee NS; Lee HL; Lin M. Association of HLA-DRB1*0405 with resistance to multibacillary leprosy in Taiwanese. *Hum Immunol*. 2010 Jul;71(7):712-16

Hunter SW; Rivoire B; Mehra V; Bloom BR; Brennan PJ. The major native proteins of the leprosy bacillus. *The J. Biological Chemistry*. 1990 Aug;265(24):14065-68

Idriss HT; Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*. 2000;50:184-195

Izumi S; Suglyama K; Matsumoto Y. ET AL. Analysis of the immunogenetic background of Japanese leprosy patients by the HLA system. *Vox Sang*. 1982; 42(5):243-247

Joko S; Numaga J; Kawashima H; Namisato M; Maeda H. Human leukocyte antigens in forms of leprosy among Japanese patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000 Mar;68(1):49-56

Kim SJ; Choi IH; Dahlberg S; Nisperos B; Kim JD; Hansen JA. HLA and leprosy in Koreans. *Tissue Antigens*. 1987 Mar;29(3):146-53

Klein J; Sato A. The HLA system. First of two parts. *The New England J. Medicine*. 2000 Sep; 7:702-709

Koçak M; Balci M; Pençe B; Kundakçi N. Associations between human leukocyte antigens and leprosy in the Turkish population. *Clin Exp Dermat*. 2002;27:235-39

Kroeger KM; Steer JH; Joyce DA; Abrahan LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* 2000;12(2):110-119

Krutzik SR; Ochoa MT; Sieling PA; Uematsu S; Ng YW; Legaspi A; Liu PT; Cole ST; Godowski PJ; Maeda Y; Sarno EN; Norgard MV; Brennan PJ; Akira S; Rea TH; Modlin RL. Activation and regulation of toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003 May; 9(5):525-32

Lechler R; Warrens A. HLA in Health and Disease. Academic Press, Second Edition. 2000

Lee SB; Kim BC; Jin SH; Park YG; Kim SK; Kang TJ; Chae GT. Missense mutations of the interleukin-12 receptor beta 1(IL12RB1) and interferon-gamma receptor 1 (IFNGR1) genes are not associated with susceptibility to lepromatous leprosy in Korea. *Immunogenetics.* 2003 Jun; 55(3):177-81

Lilly F; Boyse EA; Old LJ. Genetic basis for susceptibility to viral leukaemogenesis. *Lancet.* 1964; ii:1207-09

Louis E; Franchimont D; Piron A; Gevaert Y; Schaaf-Lafontaine N; Roland S; et al Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol.* 1998 Sep;113(3):401-6

Luczynski W; Stasiak-Barmuta A; Krawczuk-Rybak M; Szymanski M; Malinowska I; Mitura-Lesiuk M. Monocytes in children with leukemias and lymphomas – down-regulation of HLA and costimulatory molecules. *Acta Biochim Pol.* 2004;51(4):1067-73

Maeda Y; Mukai T; Spencer J; Makino M. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. *Infec and Immunity.* 2005 May;73(5):2744-50

Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 2005 Nov;118(2):295-300.

Marsh SG; Albert ED; Bodmer WF; Bontrop RE; Dupont B; Erlich HA; Geraghty D; Hansen E; Hurley CK; Mach B. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens.*2009; 74(3):272-275

Martinez AN; Britto CFPC; Nery JAC; Sampaio EP; Jardim MR; Sarno EN; Moraes MO. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clinical Microbiol.* 2006 Sep; 44(9):3154-3159

McDevitt, HO & Sela, M. Genetic control of the antibody response. Demonstration of determinant-specific differences in response to synthetic polypeptide antigens in two strains of inbred mice. *J Exp Med.* 1965; 122:517-31

McGuire W; Hill A; Allsopp CE; et al. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994; 371:508-510

Meissner TB; Li M; Biswas A; Lee KH; Liu YJ; Bayir E; et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *PNAS*. 2010; p.1-6

MHC Consortium – Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*. 1999 Oct;401(6756):870-71

Mira JP; Cariou A; Grall F; Delclaux C; Losser MR; Heshmati F; Cheval C; Monchi M; Teboul JL; Riche F; Leleu G; Arbibe L; Mignon A; Delpech M; Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*. 1999 Aug;282(6):561-68

Mira MT; Alcais A; di Pietrantonio T; Thuc NV; Phuong MC; Abel L; Schurr E. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes and Immunity*. 2003; 4:67-73

Mira MT; Alcais A; Van Thuc N. ET AL. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nature Genetics*. 2003; 33(3): 412-415

Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004;427(6975):636-40.

Misra N; Murtaza A; Walker B; Narayan NPS; Misra RS; Ramesh V; Singh S; Colston MJ; Nath I. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology*. 1995; 86:97-103

Modlin RL. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002;15:1-6

Modlin RL. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009 Oct;6(4):343-53

Moet FJ; Meima A; Oskam L; Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev*. 2004 Dec; 75(4):310-26

Montoya D; Cruz D; Teles RMB; Lee DJ; Ochoa MT; Krutzik SR; Chun R; et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host & Microbe*. 2009 Oct;6:343-353

- Moraes ME; Fernandez-Vina M; Salatiel I; Tsai S; Moraes JR; Stastny P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. *Tissue Antigens*. 1993 May;41(5):238-42
- Moraes ME; Fernandez-Vina M; Lazaro A; Dias LA; Filho GH; Friedman H; Rivitti E; Aoki V; Stastny P; Moraes JR. Na epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. *Tissue Antigens*. 1997 Jan;49(1):35-40
- Moraes MO; Cardoso CC; Vanderborcht PR; Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Leprosy Review*. 2006; 77:189-202
- Moraes MO; Duppre NC; Suffys PN; Santos AR; Almeida AS; Nery JAC; Sampaio EP; Sarno EN. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics*. 2001; 53:45-47
- Moraes MO; Pacheco AG; Schonkeren JJM; Vanderborcht PR; Nery JAC; Santos AR; Moraes ME; et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes and Immunity*. 2004; 5:592-595
- Moraes MO; Sampaio EP; Nery JAC; Saraiva BCC; Alvarenga FBF; Sarno EN. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *British J. Dermatology*. 2001;144:175-181
- Moraes MO; Sarno EN; Almeida AS; Saraiva BCC; Nery JAC; Martins RCL; Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon- γ and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand. J. Immunol*. 1999;50:541-49
- Morgan AW; Robinson JI; Conaghan PG; Martin SG; Hensor EMA; Morgan MD; et al. Evaluation of the rheumatoid arthritis susceptibility loci HLA-DRB1, PTPN22, OLIG3/TNFAIP3, STAT4 and TRAF1/C5 in an inception cohort. *Arthritis Res Ther*. 2010 Mar;12(2): R57
- Motta PMF; Cech N; Fontan C; Gimenez MF; Lodeiro N; Marinic K; Molinari ML; Sotelo MG; Sorrentino AH. Role of HLA-DR and HLA-DQ alleles in multibacillary leprosy and paucibacillary leprosy in the province of Chaco (Argentina). *J Enferm Infec Micr Clin*. 2007;25:627-31
- Munk ME; Anding P; Schettini APM; Cunha MGS; Kaufmann SHE. Soluble tumor necrosis factor alpha receptors in sera from leprosy patients. *Infec and Immunity*. 1999 Jan;67(1):423-425

NMDP – National Marrow Donor Program. Haplotype Frequencies. Disponível em: http://www.bioinformatics.nmdp.org/HLA/Haplotype_Frequencies/index.html

Oliveira RB; Moraes MO; Oliveira EB; Sarno EN; Nery JAC; Sampaio EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF- α and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukocyte Biology*. 1999 Mar;65:364-371

OMS - Organização Mundial de Saúde 2010 (do inglês “World Health Organization-WHO”). Leprosy: the disease [online]. Disponível em: <http://www.who.int/lep/leprosy/en/index.html>

Ohyama H; Ogata K; Takeuchi K; Namisato M; Fukutomi Y; Nishimura F; Naruishi H; Ohira T; Hashimoto K; Liu T; Suzuki M; Uemura Y; Matsushita S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol*. 2005; 58:740-43

Ozaki K; Ohnishi Y; Iida A; Sekine A; Yamada R; Tsunoda T; Sato H; Hori M; Nakamura Y; Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*. 2002 Dec;32(4):650-54

Ozaki K; Inoue K; Sato H; Iida A; Ohnishi Y; Sekine A; Sato H; Odashiro K; Nobuyoshi M; Hori M; Nakamura Y; Tanaka T. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. *Nature*. 2004 May;429(6987):72-5

Pacheco AG & Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease Markers*. 2009;26:1-14

Pachot A; Monneret G; Brion A; Venet F; Bohe J; Bienvenu J; Mougin B; Lepape A. Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med*. 2005 Jan;33(1):31-8

Patel R; Mickey MR; Terasaki PI. Leucocyte antigens and disease is association of HL-A2 and chronic glomerulonephritis. *Br Med J*. 1969;2:424-426

Payne R; Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J. Clin. Invest*. 1958; 37:1756-62

Peh CA; Burrows SR; Barnden M. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity*. 1998; 8:531-542

Pereira AC; Brito-de-Souza VN; Cardoso CC; Dias-Baptista IMF; Parelli FPC; Venturini J; Villani-Moreno FR; Pacheco AG; Moraes MO. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes and Immunity*. 2009 Mar;10(2):174-80

Pizzato N; Garmy-Susini B; Le Bouteiller P; Lenfant F. Down-regulation of HLA-G1 cell surface expression in human cytomegalovirus infected cells. *Am J Reprod Immunol*. 2003;50:328-33

Porto LCMS & Pontes LFS. Estudos de associação HLA x Doenças: Extratos do II Simpósio Brasileiro. Rio de Janeiro: Ed. UERJ, 2009 p.11-29

Programa Nacional de Eliminação da hanseníase. Plano Nacional de eliminação da hanseníase a nível municipal 2006-2010 e informações técnicas. Disponível em: HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm

Qiao SW; Sollid LM; Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol*. 2009 Feb;21(1):111-7

Rajalingam R; Singal DP; Mehra NK. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens*. 1997 Feb; 49(2): 168-72

Ramagopalan SV; Maugeri NJ; Handunnetthi L; Lincoln MR; et al. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *Plos Genetics*. 2009 Feb;5(2):1-6

Rammensee HG; Bachmann J; Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs. New York: Springer. 1997

Rani R; Zaheer SA; Suresh NR; Walia R; Parida SK; Mukherjee A; Mukherjee R; Talwar GP. Association of HLA antigens with differential responsiveness to Mycobacterium vaccine in multibacillary leprosy patients. *J Clin Immunol*. 1992 Jan;12(1):50-55

Rani R; Fernandez-Vina MA; Zaheer SA; Beena KR; Stastny P. Study of HLA classe II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from North India. *Tissue Antigens*. 1993; 42:133-137

Ress RFW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed). *Leprosy*, 1st ed. New York: Churchill Livingstone Inc. 1985. p. 31-52.

Ridley DS; Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Diseases*. 1966; 34:255-273

- Rigby WFC; Waugh M; Graziano RF. Regulation of Human Monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Blood*. 1990 Jul;76(1):189-97
- Roy S; McGuire W; Mascie-Taylor CG; Saha B; Hazra SK; Hill AV; Kwiatkowski D. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis*. 1997 Aug; 176(2):530-32
- Roy S; Frodsham A; Saha B; Hazra SK; Mascie-Taylor CGN; Hill AVS. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect. Dis*. 1999;179:187-191
- Russell TJ; Schultes LM; Kuban DJ. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *The New Eng J Med*. 1972 Oct:738-740
- Santos AR; Suffys PN; Vanderborcht PR; Moraes MO; Vieira LMM; Cabello PH; Bakker AM; et al. Role of tumor necrosis factor and- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. 2002; 186:1687-91
- Santos DO; Suffys PN; Bonifacio K; Marques MA; Sarno EN. In vitro tumor necrosis factor production by mononuclear cells from lepromatous leprosy patients and from patients with erythema nodosum leprosum. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 1993 Jun; 67(3pt1):199-203
- Sarno EN; Grau GE; Vieira LMM; Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. *Clin. Exp. Immunol*. 1991; 84:103-108
- Sasiain MDC; Barrera SDL; Kink S; Finiasz M; Aleman M; Farina MH; Pizzariello G; Valdez R. Interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are necessary in the early stages of induction of CD4 and CD8 cytotoxic T cells by Mycobacterium leprae heat shock protein (hsp) 65kD. *Clin. Exp. Immunol*. 1998 Jul; 114:196-203
- Sato AK; Zarutskie JA; Rushe MM; Lomakin A. Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DRB1. *The J. Biol Chemistry*. 2000 Jan;275(3):2165-73
- Schauf V; Ryan S; Scollard D; Jonasson O; Brown A; Nelson K. et al. Leprosy associated with HLA-DR2 and DQw1 in the population of northern Thailand. *Tissue Antigens*. 1985; 26:243-247
- Schlosstein L; Terasaki PI; Bluestone R; Pearson CM. High association of an HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis. 1973 Apr;288(14):704-706

Schumacher TNM; Kantesaria DV; Heemels MT et al. Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.* 1994; 179:533-540.

Schurr E; Alcaïs A; de Leseleuc L; Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol.* 2006 Dec;18(6):404-10

Scollard DM; Adams LB; Gillis TP; Krahenbuhl JL; Truman RW; Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clinical Microbiology_Reviews.* 2006 Apr; 19(2): 338-381

Shankarkumar U. HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. *Leprosy Review.* 2004; 75(1):79-85

Shankarkumar U; Ghosh K; Badakere S; Mohanty D. Novel HLA class I alleles associated with Indian leprosy patients. *J. Biomed. Biotechnology.* 2003; 3:208-211

Shaw MA; Collins A; Peacock CS; Miller EN; Black GF; Sibthorpe D; et al. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNFA. *Tuber Lung.* 1997; 78(1):35-45

Shaw MA; Donaldson IJ; Collins A; Peacock CS; Lins-Lainson Z; Shaw JJ; Ramos F; Silveira F; Blackwell JM. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumor necrosis factor genes. *Genes and Immunity.* 2001; 2:196-204

Shibue T; Tsuchiya N; Komata T; Matsushita M; Shiota M; Ohashi J; Wakui M; Matsuta K; Tokunaga K. Tumor necrosis factor α 5'-flanking region, tumor necrosis factor receptor II, and HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2000 Apr; 43(4):753-57

Shifman S; Kuypers J; Kokoris M; Yakir B; Darvasi A. Linkage disequilibrium patterns of the human genome across populations. *Human Molecular Genetics.* 2003;12(7):771-776

Shiina T; Inoko H; Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens.* 2004 Aug; 64:631-49

Sieling PA; Wang XH; Gately MK; Oliveros JL; McHugh T; Barnes PF; Wolf SF; Golkar L; Yamamura M; Yogi Y. *J Immunol.* 1994 Oct; 153(8): 3639-47

Silva CL & Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *J Infect Dis.* 1989 Apr;159(4):787-90

Silva SA; Mazini PS; Reis PG; Sell AM; Tsuneto LT; Peixoto PR; Visentainer JEL. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for

leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infectious Diseases*. 2009 Aug;9:134-140

Skamene E, Gros P; Forget A; Kongshavn PA; Charles CS; Taylor BA. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature*.1982;297:506-509

Somoskövi A; Zissel G; Seitzer U; Gerdes J; Schlaak M; Müller-Quernheim J. Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release in sarcoidosis. *Cytokine*. 1999 Nov;11(11):882-7

Souza VNB; Pereira AC. Genética Humana na Susceptibilidade à Hanseníase. *Hansenologia Internationalis*. 2007; 32(1):81-93

Souza TSF; Moraes ME; Torres M; Hue MI. Análise das frequências alélicas e haplotípicas dos loci HLA-A, -B e -DRB1 em pacientes candidatos a transplante de células-tronco hematopoéticas e doadores voluntários de medula óssea. *Rev Bras Hematol Hemoter. Temas Livres - XIV Congresso SBTMO*. 2010 Ago;32(3):23

Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1976 May;57(5):1148-57

Stenger S; Hanson DA; Teitlebaum R; Dewan P; Niazi KR; Froelich CJ; Ganz T; Thoma-Uszynski S; Melian A; Bogdan C; Porcelli SA; Bloom BR; Krensky AM; Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998; 282:121-125

Stevanovic S. Structural basis of immunogenicity. *Transpl Immunol*. 2002 Aug;10(2-3):133-136

Sullivan KE; Wooten C; Schmeckpeper BJ; Goldman D; Petri MA. A promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Arthritis Rheum*. 1997 Dec;40(12):2207-11

Tanigawa K; Suzuki K; Kimura H; Takeshita F; Wu H; Akama T; Kawashima A; Ishii N. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses toll-like receptor signaling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exper Immunol*. 2009; 156:495-501

The MHC sequencing consortium: Complete sequence and gene map of human MHC. *Nature*. 1999; 401:921-923

Thorsby E. A Short History of HLA. *Tissue Antigens*. 2009; 74:101-116

Thomas DC, Witte JS. Point: population stratification: a problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Jun;11(6):505-12

- Tosh K; Ravikumar M; Bell JT; Meisner S; Hill AVS; Pitchappan R. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in south India. *Human Molecular Genetics*. 2006 Aug; 15(19): 2880-2887
- Trombetta ES; Mellman I. Cell Biology of Antigen Processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23:975-1028
- Trowsdale J. HLA genomics in the third millennium. *Current Opinion in Immunology*. 2005; 17:498-504
- Tsukamoto K; Ohta N; Shirai Y; Emi M. A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. *J Hum Genet.* 1998;43(4):278-79
- Van Beers SM; Hatta M; Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999 Jun; 67(2):119-28
- Vanderborght PR; Pacheco AG; Moraes ME; Antoni G; Romero M; Verville A; Thai VH; Huong NT; Ba NN; Schurr E; Sarno EN; Moraes MO. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes and Immunity*.2007; 1-5
- Van der Wel N; Hava D; Houben D; Fluitsma D; van Zon M; Pierson J; Brenner M; Peters PJ. *M. Tuberculosis* and *M. Leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Gene*. 2007 Jun; 129:1287-98
- Van Rood JJ; Ernisse JG; Van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*. 1958; 181:1735-6
- Vejbaesya S; Luangtrakool P; Luangtrakool K; Kalayanaroj S; Vaughn DW; Endy TP; et al. Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin-alpha (LTA) gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Disease*. 2009 May; 199(10):1442-48
- Vejbaesya S; Mahaisavariya P; Luangtrakool P; Sermduangprateep C. TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Ass Thai*. 2007 Jun;90(6):1188-92
- Vijayakumaran P; Jesudasan K; Mozhi NM; Samuel JDR. Does MDT arrest transmission of leprosy to household contacts? *Int J. Leprosy* 1998; 66(2):125-130
- Visentainer JE; Tsuneto LT; Serra MF; Peixoto PR; Petzl-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Brazil Journal Medicine Biology-Res.* 1997;30:51-59

- Vitale M; Pelusi G; Taroni B; Gobbi G; Micheloni C; et al. HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage. *Clin Cancer Res.* 2005;11:67-72
- Wang LM; Kimura A; Satoh M; Mineshita S. HLA linked with leprosy in southern China: HLA-linked resistance alleles to leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999 Dec;67(4):403-08
- Warwick JB & Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet.* 2004 Apr;363:1209-19
- White SH; Newcomer VD; Mickey MR; Terasaki PI. Disturbance of HL-A antigens frequency in psoriasis. *The New Eng J Med.* 1972 Oct;740-743
- Williams DL; Slayden RA; Amin A; Martinez AN; Pittman TL; Mira A; Mitra A; Nagaraja V; Morrison NE; Moraes MO; Gillis TP. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC Genomics.* 2009 Aug; 10:397-416
- Wilson AG; Dd Vries N; Pociot F; Di Giovine FS; Van Der Putte LBA; Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177:557-560
- Wilson AG; Symons JA; Mc Dowell TL; Di Giovine FS; Duff GW. Effects of Tumor necrosis factor (TNF- α) promoter base transition on transcriptional activity. *Br. J. Rheumatol.* 1994;33-89
- Wilson AG; Symons JA; McDowell TL; McDevitt HO; Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Immunology.* 1997 Apr;94:3195-99
- Wong SH; Gochhait S; Malhotra D; Pettersson FH; Teo YY; Khor CC; Rautanen A; et al. Leprosy and the adaptation of human Toll-like Receptor 1. *PloS Pathogens.* 2010 Jul;6(7):1-9
- Yamamura M; Uyemura K; Deans RJ; Weinberg K; Rea TH; Bloom BR; Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 1991 Oct; 254(5029):277-9
- Yamamura M; Wang XH; Ohmen JD; Uyemura K; Rea TH; Bloom BR; Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* 1992 Aug; 149(4):1470-75
- Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ. Major Histocompatibility Complex Class I-recognizing receptor are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2001 May; 193(10):1159-67

Zerva L; Cizman B; Mehra NK; Alahari SK; Murali R; Zmijewski CM; Kamoun M; Monos DS. Arginine at positions 13 or 70-71 in pocket 4 of HLA-DRB1 alleles is associated with susceptibility to tuberculoid leprosy. *J. Exp. Med.* 1996 Mar; 183:829-836

Zhang Y; Gao J; Chung KK; Huang H; Dawson VL; Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2000;97:13354-59

Zhang FR; Huang W; Chen SM; Sun LD; Liu H; Li Y; Cui Y; et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *N Engl J Med.* 2009 Dec; 361:1-10