

Fabiana Covolo de Souza

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE REAÇÃO DE
MITSUDA E FENOTIPAGEM HLA EM PACIENTES
HANSENIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2005

Fabiana Covolo de Souza

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE REAÇÃO DE
MITSUDA E FENOTIPAGEM HLA EM PACIENTES
HANSENIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Esther Salles Nogueira.

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação/Coordenadoria de Controle de Doenças/Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Fabiana Covolo de

Estudo comparativo entre reação de Mitsuda e fenotipagem HLA em pacientes hansenianos / Fabiana Covolo de Souza. – São Paulo, 2005.

Dissertação (mestrado)—Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Maria Esther Salles Nogueira

1. Hanseníase 2. Antígeno de Mitsuda 3. Antígeno HLA 4. Mycobacterium leprae

SES/CCD/CD-075/05

*“Cada dia do homem é uma noite escura, ninguém sabe o que vai acontecer no próximo minuto. Quando alguém encontra seu caminho não pode ter medo, precisa ter coragem suficiente para dar passos errados e mesmo assim andar para frente. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada. É preciso confiar.
É preciso ter fé.
O caminho da sabedoria é não ter medo de errar”.*

(Autor desconhecido)

Dedicatória

*Aos meus pais, Clóvis e
Lia Márcia, alicerces da minha
vida, cujo apoio e dedicação me
deram forças para persistir e
superar os obstáculos impostos
pela vida.*

*As minhas irmãs Juliana e
Viviane, pelo constante apoio
e carinho.*

Agradecimentos Especiais

À Deus, pelas proteções recebidas e pela permissão de ser um instrumento a Seu serviço.

À Prof^a Dr^a Maria Esther Salles Nogueira, minha orientadora, pelo apoio, incentivo, amizade e dedicação.

À Elaine Valim Camarinha Marcos pela confiança, incentivo e amizade.

À Érika Mozer, um carinho especial.

*“Aqueles que passam por nós
não vão sós, não nos deixam
sós.*

*Deixam um pouco de si, levam
um pouco de nós”.*

(Saint-Exúpery)

Agradecimentos

Sentimento é algo complicado para ser traduzido em palavras, gratidão é um deles....

A todos os colegas funcionários da Equipe Técnica de Imunologia do ILSL, pela colaboração, companheirismo e carinho com que contribuíram de maneira direta ou indireta na realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública-CCD- São Paulo.

Ao Dr Marcos da Cunha Lopes Virmond, Diretor Técnico de Departamento do ILSL.

Ao Dr Somei Ura, Diretor Técnico da Divisão de Ensino e Pesquisa do ILSL.

À Patrícia Sammarco Rosa, médica veterinária do ILSL.

À Telma Ap. T. Sneideris, responsável pelo Centro de Processamento de dados do ILSL.

À Paula Opromolla, responsável pelo Núcleo de Apoio a Pesquisa do ILSL.

À Cleide Ortega, responsável pelo setor de Recursos Didáticos e Pedagógicos do ILSL.

Aos pacientes portadores de hanseníase que voluntariamente participaram do trabalho.

Obrigada a todos vocês.

RESUMO

Neste estudo propôs-se comparar o teste intradérmico de Mitsuda e os alelos HLA-DR2 /HLA -DR3 e HLA-DQ1 relacionados com as formas clínicas da hanseníase, visando contribuir para o delineamento de nova metodologia no auxílio prognóstico desta doença. Foram estudados 176 pacientes hansenianos (50 HT, 50 HV e 76 HD). A tipificação do HLA-DR e HLA -DQ foi determinada pela técnica de PCR/SSP e a reação de Mitsuda pela intradermorreação com leitura em 28 dias. Na forma HT os resultados demonstraram que a reação de Mitsuda foi positiva em todos os pacientes, sendo 16% positivo1+, 68% positivo2+ e 16% positivo3+. O diâmetro de induração variou entre 4,0 a 18,0mm, com valor médio de 7,5mm. A especificidade HLA-DR2 esteve presente em 28% dos pacientes deste grupo (24% HLA-DRB1*15 e 4% HLA-DRB1*16). A especificidade HLA-DR3 esteve presente em 16% dos pacientes (8% HLA-DRB1*17 e 8% HLA-DRB1*18), 2% apresentaram os alelos HLA-DR2 e HLA-DR3 simultaneamente, totalizando 46% da amostra estudada com o marcador. A forma HV apresentou a reação de Mitsuda negativa em todos os pacientes estudados. A especificidade do HLA-DQ1 esteve presente em 74% dos pacientes (34% HLA-DQB1*05, 28% HLA-DQB1*06 e 12% HLA-DQB1*05 e HLA-DQB1*06). No grupo HD, o padrão de leitura da reação de Mitsuda resultou em negativo em 48,7%, duvidoso 5,2%, positivo 1+ 30,3% e positivo 2+ 15,8%. O diâmetro da induração variou entre negativo a 7,5mm com valor médio de 2,4mm. Com relação aos alelos HLA, não foi possível realizar a comparação, por não se ter verificado após estudo de associação, nenhum alelo relacionado ao grupo HD. Realizou-se também análise não estratificada dos pacientes de acordo com a resposta ao teste de Mitsuda. Oitenta e cinco pacientes foram positivos para o teste de Mitsuda e destes, 43,5% possuíam o alelo HLA-DR2 ou HLA-DR3. Noventa e um pacientes tiveram reação de Mitsuda negativa, destes 65,9% apresentaram o alelo

RESUMO

HLA-DQ1. Os dados obtidos neste estudo permitiram concluir que a utilização isolada da tipificação HLA não constitui uma ferramenta adequada para auxílio no prognóstico da doença, embora o emprego em conjunto das duas metodologias poderão complementar o diagnóstico da hanseníase.

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

ABSTRACT

The relation between the Mitsuda intradermal test, the clinical form of leprosy, and HLA-DR2/HLA-DR3 and HLA-DQ1 alleles was studied. These investigations were done to find a way to assess the prognosis of the disease. A total of 176 patients were studied (50 tuberculoid (T), 50 lepromatous (L) and 76 borderline (B) - Madrid classification). The HLA-DR and -DQ typing was done through PCR/SSP and the intradermal reaction against the Mitsuda antigen was read after 28 days. The Mitsuda reaction was positive in all T patients, 16% were 1+ positive, 68% were 2+ positive and 16% 3+ positive. The diameter of the induration varied from 4 to 18 mm with a mean value of 7.5 mm. HLA-DR2 was present in 28% of the patients (24% HLA-DRB1*15 and 4% HLA-DRB1*16). HLA-DR3 was present in 16% of the patients (8% HLA-DRB1*17 and 8% HLA-DRB1*18). Simultaneous HLA-DR2 and HLA-DR3 alleles were present in 2% of the patients. Total 46% of the samples studied were positive with these markers. All patients with L form showed negative response to the Mitsuda antigen. The HLA-DQ1 was present in 74% of the patients (34% HLA-DQB1*05, 28% HLA-DQB1*06, 12% HLA-DQB1*05 and HLA-DQB1*06). In the group B, the response to the Mitsuda antigen was negative in 48.7% of the patients, suspect in 5.2%, 1+ positive in 30.3% of the patients and 2+ positive in 15.8%. The diameter of the induration varied from negative to 7.5 mm with a mean value of 2.4 mm. A comparison with the HLA alleles could not be done because no antigen showed statically any association. A non-stratified analysis of the patients according to response to the Mitsuda test was also performed. Eighty-five patients were positive for the Mitsuda test and among those 43.5% showed HLA-DR2 or HLA-DR3 alleles. Ninety-one patients were negative for the Mitsuda test and 65.9% of them showed the HLA-DQ1 alleles. These data lead to the conclusion that phenotyping alone is not an adequate auxiliary tool for prognosis of leprosy; nevertheless, the use of both methods together may be helpful for classification of the disease.

Key-Words: Leprosy. HLA. Lepromin. *Mycobacterium leprae*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ac:** Anticorpo
- APC:** Célula apresentadora de antígeno
- BB:** Hanseníase borderline borderline
- Bcg:** Gene Bcg
- BL:** Hanseníase borderline virchoviana
- BM:** Banho-maria
- BT:** Hanseníase borderline tuberculóide
- CD4+:** Linfócito T com fenótipo auxiliar/indutor
- CD8+:** Linfócito T com fenótipo supressor/citotóxico
- COL3A1:** Procolágeno III alfa I
- COOH:** Porção carboxiterminal
- CTLA4:** Antígeno associado ao linfócito T citotóxico
- DNA:** Ácido desoxirribonuclêico
- DNCB:** Dinitroclorobenzeno
- EDTA:** Ácido etilenodiaminotetraacético
- Fc:** Fração cristalizável da imunoglobulina
- HD:** Hanseníase dimorfa
- HDT:** Hanseníase dimorfa tuberculóide
- HI:** Hanseníase indeterminada
- HLA:** Antígeno Leucocitário Humano
- HSPA1A:** Proteína de choque térmico 1A
- HT:** Hanseníase tuberculóide
- HV:** Hanseníase virchoviana
- IFN- γ :** Interferon gama
- IgG:** Imunoglobulina G
- IL-2:** Interleucina- 2
- IL-4:** Interleucina 4
- ILSL:** Instituto Lauro de Souza Lima
- Ity:** Gene Ity
- LB:** Linfócitos B

LFA3: Ligante LFA3

LL: Hanseníase polar virchoviana

Lsh: Gene Lsh

LT: Linfócitos T

LTH1: Linfócito T helper 1

LTH2: Linfócito T helper 2

M. bovis: *Mycobacterium bovis*

M. lepraemurium: *Mycobacterium lepraemurium*

M. leprae: *Mycobacterium leprae*

MB: Multibacilar

MBL2: Lecitinas ligadoras de manose

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MLCwA: antígeno associado a parede celular do *M. leprae*

MLSA: antígeno solúvel do *M. leprae*

MLSA-LAM: antígeno solúvel do *M. leprae* com quantidades mínimas de lipoarabnomanana

NaCl: Cloreto de sódio

NH2: Porção aminoterminal

NRAMP1: Natural resistance associated macrophage protein 1

OMS: Organização Mundial da Saúde

PACRG: Gene PACRG

PARK2: Gene PARK2

PB: Paucibacilar

PCR: Reação da polimerase em cadeia

PPD: Derivado protéico purificado

PQT: Poliquimioterapia

Rpm: Rotação por minuto

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SSP: Primer de seqüência específica

TAP: Proteínas transportadoras de antígenos

TBE: Tris Borato EDTA

TCR: Receptor de linfócito T

TLR: Receptor toll-like

TNF: Fator de necrose tumoral

TT: Hanseníase polar tuberculóide

VDR: Receptor de vitamina D

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da leitura clínica da reação de Mitsuda em milímetros (mm) e alelos HLA em 50 pacientes MHT..... 41

Tabela 2. Distribuição da presença de alelo HLA-DR2 (HLA-DRB1*15 e HLA-DRB1*16) e HLA-DR3 (HLA-DRB1*17 e HLA-DRB1*18) em 50 pacientes HT com reação de Mitsuda positivo..... 43

Tabela 3. Distribuição de 50 pacientes HV, Mitsuda negativos, quanto os alelos HLA..... 44

Tabela 4. Distribuição da presença de alelos HLA-DQ1(HLA-DQB1*05 e HLA-DQB1*06) nos 50 pacientes HV com reação de Mitsuda negativa..... 46

Tabela 5. Resultados da leitura clínica da reação de Mitsuda em milímetros (mm) e alelos HLA em 76 pacientes HD..... 47

Tabela 6. Frequências de alelos HLA em 76 pacientes HD e 168 controles sadios(C)..... 50

Tabela 7. Distribuição de 85 pacientes hansenianos Mitsuda positivos quanto à presença de alelo HLA-DRB1*15 ou HLA-DRB1*16 (HLA-DR2), HLA-DRB1*17 ou HLA-DRB1*18 (HLA-DR3) e de 91 pacientes Mitsuda negativos quanto à presença do alelo HLA-DQB1*05 ou HLA-DQB1*06 (HLA-DQ1)..... 50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos Gerais	17
1.2. Reação de Mitsuda	21
1.3. O complexo HLA	25
1.4. Hanseníase e Complexo HLA	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. Critérios de Elegibilidade	34
2.2. Métodos	34
2.2.1. Teste de Mitsuda	34
2.2.2. Tipificação HLA de classe II	35
2.2.3. Análise Estatística	38
3. RESULTADOS	39
3.1. Teste de Mitsuda e Tipificação HLA	39
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7. ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que acomete cerca de 600.000 indivíduos por ano¹, sendo a América Latina responsável por 85.000 casos². Dos 122 países nos quais é considerado problema de saúde pública, Angola, Brasil, República Africana Central, Congo, Índia, Libéria, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia não conseguiram alcançar a meta de eliminação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O Brasil é um dos principais países endêmicos de hanseníase no mundo, com 79.908 doentes, representando, em 2003, um coeficiente de prevalência de 4.6 casos por 10.000 habitantes. As regiões Norte, Nordeste e Sudeste contribuem com 80% dos casos novos¹.

Apesar da hanseníase ter baixa mortalidade, apresenta elevado grau de contágio, constituindo um grave problema de saúde pública e social, devido às deformidades e incapacidades físicas por ela gerada e, conseqüentemente, discriminação e segregação dos doentes³.

Seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), foi descoberto por Armauer Hansen em 1873. É um bacilo em forma de bastonete, gram positivo, álcool-ácido resistente, que ao ser corado pelo método de Ziehl-Neelsen apresenta coloração vermelha, podendo ser encontrado isoladamente ou formando grupamentos em esfregaços de pele ou em cortes histológicos denominados globia. Apesar de todo o desenvolvimento tecnológico disponível, não é possível cultivar este bacilo *in vitro*^{4,5}.

A transmissão da doença ainda não está totalmente esclarecida; acredita-se que ocorra, na maioria das vezes, através do contato íntimo, direto e prolongado de pessoas suscetíveis com pacientes bacilíferos, e que fatores externos tais como a desnutrição, promiscuidade, miséria e falta de higiene favoreçam a transmissão⁶.

A eliminação dos bacilos ocorre principalmente pelas vias aéreas superiores, através das gotículas de Flugge^{7,8,9}. Outras vias de eliminação podem ser consideradas, tais como hansenomas ulcerados, leite materno, urina e fezes, sendo que as três últimas não possuem importância epidemiológica⁹.

A hanseníase pode se manifestar sob várias formas clínicas, dependendo da resistência do hospedeiro ao *M. leprae*¹⁰. É classificada, de acordo com os critérios estabelecidos no VI Congresso Internacional de Leprologia (Madrid 1953)¹¹ em dois tipos polares totalmente distintos, sob o aspecto clínico e imunológico: o pólo tuberculóide (HT), com imunidade celular eficiente à proliferação do bacilo, e o virchoviano (HV), com pouca ou nenhuma resposta celular¹⁰.

Além dos pólos estáveis, existem dois grupos intermediários denominados indeterminado (HI), que é considerado a fase inicial da doença, e dimorfo (HD), que apresenta manifestações variáveis entre HT e HV, segundo o estado imunológico do paciente frente ao *M. leprae*^{10,12}.

Ridley e Jopling (1966)¹³ propuseram uma classificação com algumas subdivisões baseadas em critérios clínicos, imunológicos e histológicos. A partir dela, os dimorfos (borderline) foram subdivididos e passaram a incluir os casos próximos aos pólos HT e HV, que se diferenciavam conforme esses critérios. Criou-se, assim, um espectro, no qual os extremos eram constituídos pelos tipos polares tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL) e pelos dimorfos, subdivididos em borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatoso (BL).

Em 1982, a OMS¹⁴ estabeleceu uma classificação que pudesse selecionar o esquema adequado de poliquimioterapia (PQT). As formas clínicas da doença foram, então, divididas em paucibacilares (PB), nos casos com até cinco lesões cutâneas e, multibacilares (MB), com mais de cinco¹⁵. Sob o ponto de vista operacional, portanto, os PB passaram a abranger pacientes com as formas HI, HT e HD próximos ao pólo HT, enquanto os pacientes MB englobariam aqueles classificados como HV, HD e HD próximos ao pólo HV.

A classificação oficial utilizada atualmente no Brasil baseia-se no proposto pelo VI Congresso Internacional de Leprologia de Madrid¹¹, porém não se pode descartar a de Ridley-Jopling, muito utilizada para a pesquisa¹³ e também a classificação operacional no tratamento com PQT da OMS^{14, 15}.

Clinicamente, a forma HT apresenta lesões em forma de máculas ou placas, em pequeno número, bem localizadas e delimitadas, com coloração em tom castanho. Pode apresentar bordo mais ou menos elevado e centro plano e hipocrômico. Observam-se alterações acentuadas da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. A baciloscopia é negativa e a reação de Mitsuda, positiva. O quadro histopatológico revela granulomas de células epitelióides bem diferenciadas, contornadas por linfócitos com bacilos escassos ou ausentes^{16,17,18}. Os linfócitos T (LT) com fenótipo supressor/citotóxico (CD8+) estão localizados predominantemente na região do manto e raramente dentro do granuloma. Os LT com fenótipo auxiliar/indutor (CD4+), por sua vez, encontram-se em grande quantidade entre os agregados de células epitelióides¹⁹.

Na forma HV, de menor resistência, as lesões na pele são polimorfas, numerosas, em geral com limites imprecisos; há comprometimento das mucosas, nervos, articulações, ossos e vísceras. O índice baciloscópico é sempre positivo e a reação de Mitsuda, negativa. A histopatologia mostra granulomas extensos, constituídos por aglomerados de macrófagos volumosos, multivacuolados, com grande quantidade de bacilos em seu interior¹⁶. Os LTCD4+ e TCD8+ estão uniformemente distribuídos por entre os granulomas histiocitários, sendo menor o número de células TCD4+ em relação às TCD8+¹⁹.

O grupo HD apresenta manifestações intermediárias entre os pólos HT e HV, de acordo com o grau de resposta imune ao bacilo. Existem casos semelhantes aos da forma HT, tanto do ponto de vista clínico, como do imunológico. A baciloscopia é positiva, mas não intensa e a reação de Mitsuda é fracamente positiva. Outros HD diferem muito pouco das lesões encontradas no pólo HV, a baciloscopia é positiva e a reação de Mitsuda negativa e há aqueles no meio do espectro ou dimorfos verdadeiros, que

apresentam lesões características "esburacadas" ou foveoladas, com baciloscopia sempre positiva e reação de Mitsuda negativa. Nos dimorfos o comprometimento dos nervos periféricos é intenso, provocando graves incapacidades¹⁷.

O grupo HI, considerado a fase inicial da doença, caracteriza-se por máculas hipocrômicas ou áreas circulares de pele aparentemente normais, com distúrbios da sensibilidade. Não há comprometimento de troncos nervosos e, portanto, não ocorrem incapacidades ou deformidades. A baciloscopia é negativa e a reação de Mitsuda pode ser negativa ou positiva. O quadro histopatológico apresenta infiltrado mononuclear inespecífico, com linfócitos delimitando o filete nervoso com raríssimos ou nenhum bacilo em seu interior¹⁷.

Modlin et al. (1982, 1983)^{19,20,21} sugeriram que os arranjos imunohistológicos estariam relacionados à resposta imune do hospedeiro. Assim, na forma HT, a associação entre os linfócitos auxiliares e as células epitelióides resultariam em resposta imune eficiente. Os LTCD8+, localizados na periferia do granuloma, atuam na restrição da reação granulomatosa. Na forma HV, a distribuição ao acaso das células auxiliares e supressoras originaria uma resposta imune deficiente, favorecendo a multiplicação bacilar. Os autores sugeriram, ainda, que a proximidade desses dois tipos celulares poderia inibir a maturação dos macrófagos em direção às células epitelióides e impedir a apresentação antigênica às células imunocompetentes, caracterizando uma resposta imune deficiente.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta celular dos pacientes HV ainda permanecem obscuros, todavia estudos revelam que essa anergia é específica ao *M. leprae*, permanecendo inalterada ou levemente diminuída em relação a outros antígenos, como o PPD (derivado protéico purificado), a tricofitina, a candidina e o DNCB (dinitroclorobenzeno)^{22, 23,24}.

Na hanseníase, vários estudos^{25,26,27,28} comprovam a relação da resposta imune do paciente com as diferentes formas da doença, devido à dicotomia imunológica entre hospedeiro e bacilo. Mutis et al. (1993)²⁹, estudando o

padrão de citocinas produzidas pelos LT do sangue periférico em hansenianos, encontraram linfócitos com atividades semelhantes aos LTH1 (helper 1) e LTH2 (helper 2). Segundo os autores, na forma HT os bacilos estimulariam os linfócitos TH1 a produzirem altos níveis de interleucina-2 (IL-2) e de interferon gama ($IFN\gamma$), responsáveis pela ativação macrofágica, enquanto, na forma HV, a estimulação dos LTH2 levaria a produção de níveis elevados de IL-4, a interleucina que atua sobre os linfócitos B (LB) levando a produção de anticorpos (Ac).

1.2. Reação de Mitsuda

Em 1914, Yoshinobu Hayashi, procurando um meio de cultivo para o *M. leprae*, iniciou testes cutâneos utilizando a suspensão de cultura contendo bacilos inativados pelo calor. Em um primeiro passo de seu experimento, o antígeno foi inoculado na região abdominal de cinco cobaias; como resultado obteve reação negativa em todos os animais. Em seguida, realizou o teste em 60 pacientes hansenianos, dos quais 44 apresentavam a forma lepromatosa (HV) e 16 do tipo neural (HT) da doença. Os resultados foram negativos na maioria dos pacientes com a forma lepromatosa (72,7%), e positivos naqueles com a forma neural (75%). Como na época Yoshinobu Hayashi não realizou o estudo com pessoas saudáveis, não se pode discutir o valor deste experimento para fins diagnósticos³⁰.

Esse estudo despertou o interesse de Kensuke Mitsuda³¹, um leprologista, que, em 1919, retomou as pesquisas no intuito de obter um teste que auxiliasse no diagnóstico da hanseníase. Mitsuda preparou suspensões de três tipos, partindo de nódulos de pacientes hansenianos. Duas contendo poucos bacilos e constituídas do sobrenadante de hansenomas. A terceira, rica em bacilos, constituída de tecido nodular fervido por duas horas em solução fisiológica.

Essas suspensões foram testadas em 403 hansenianos, sendo 279 com a forma HV e 124 HT. Baseando-se nos resultados obtidos, o autor concluiu que apenas aquela originada a partir de hansenomas obteve sucesso e que a injeção cutânea de 0,1ml desse material seria capaz de provocar uma reação eritematosa inicial, que desapareceria após dois ou três dias nos pacientes HV, mas evoluiria nos portadores da forma HT, apresentando ao final de duas semanas uma pápula infiltrada que persistiria por semanas ou meses. Ao realizar comparação histopatológica, verificou haver similaridade das lesões próprias deste tipo clínico com a reação presente nos pacientes. A injeção intracutânea da suspensão a partir dos nódulos hansenianos foi conclusiva para Mitsuda afirmar ser esta uma reação específica para a hanseníase.

Ao contrário de Yoshinobu Hayashi, Mitsuda estudou essa reação em crianças sadias e em indivíduos portadores de outras doenças, com o propósito de avaliar o valor prognóstico da suspensão. No grupo estudado a reação foi positiva, concluindo o autor que a reação não possuía um valor diagnóstico para a hanseníase e sugeriu a sua utilização no prognóstico da doença³¹.

Esses experimentos ficaram restritos ao Japão, até sua apresentação durante a Conferência de Strasbourg, em 1923. Contudo, somente ganharam credibilidade quando, prosseguindo com as pesquisas de Mitsuda, Fumio Hayashi, publicou seus resultados³².

Fumio Hayashi, em 1933, descreveu com detalhes os procedimentos utilizados na preparação da suspensão idealizada por Mitsuda e também os critérios para a avaliação clínica da reação. Em seu estudo, utilizou o antígeno em 192 pacientes, sendo que nos pacientes tuberosos observou 91% de negatividade e na forma neural 97% de positividade. Hayashi confirmou que resultados positivos dariam bom prognóstico para a doença³².

A leitura clínica da reação foi realizada, inicialmente, após oito dias da introdução do antígeno e, posteriormente, com 16 e 24 dias. A positividade da reação era baseada na medida do diâmetro da área infiltrada, e a partir desta, classificada em cruces. Reações que medissem 3,0 a 5,0 mm eram

consideradas como uma cruz (+); as de 5,0 a 10,0 mm, como duas cruces (++) , aquelas maiores do que 10,0 mm e com pus, como três cruces (+++) ³².

Somente em 1953, no 6º Congresso Internacional de Leprologia ¹¹, a reação de Mitsuda foi definitivamente incorporada aos critérios de classificação da hanseníase, nos quais os pacientes HT foram definidos como Mitsuda positivos. A forma HV e a maioria dos HD foram definidas como Mitsuda negativos. No grupo HI, a reação poderia variar de acordo com a capacidade imune do indivíduo, assim a reação indicaria para qual pólo a doença evoluiria.

A suspensão idealizada por Mitsuda recebeu várias denominações como lepromina, lepromina integral, lepromina H, mitsudina, antígeno de Mitsuda, sendo este o nome oficialmente adotado pelo Brasil desde 1977 ³³.

Devido à dificuldade na obtenção desses antígenos, ensaios foram realizados com tatus (*Dasypus novemcinctus*), modelo experimental da hanseníase, através da inoculação do *M.leprae*. Os resultados obtidos a partir desses experimentos foram positivos, então uma nova lepromina originada de tatus começou a ser utilizada, recebendo o nome de lepromina A (armadillo) ^{34, 35,36}.

Atualmente, são utilizados três tipos de antígenos: o integral, que consiste em uma suspensão obtida a partir de hansenomas oriundos de pacientes multibacilíferos, diluída em cloreto de sódio a 0,85% e fenol a 5%, com concentração final entre 4,0 a 16 x10⁷ *M. leprae*/ml ³⁷; o bacilar composto de bacilos sem os restos teciduais e o protéico, que utiliza proteínas do citosol, da membrana ou de proteínas solúveis da parede do *M. leprae* ³⁸.

A reação cutânea ao antígeno integral de Mitsuda origina duas respostas independentes, conhecidas como reação precoce (reação de Fernandez) e reação tardia (reação de Mitsuda).

A reação de Fernandez ³⁹ positiva é considerada uma reação de hipersensibilidade tipo IV, desencadeada por componentes hidrossolúveis de natureza protéica do bacilo, só se manifestando em organismos previamente sensibilizados. Caracteriza-se pelo aparecimento em 48 a 72 horas de um

eritema e induração com diâmetro maior ou igual a 10 mm. Histopatologicamente apresenta um infiltrado inflamatório composto, principalmente por neutrófilos e linfócitos.

A reação de Mitsuda positiva processa-se gradualmente e atinge sua intensidade máxima entre 21 a 28 dias. Histopatologicamente caracteriza-se com infiltrado inflamatório granulomatoso composto por células epitelióides, células gigantes e linfócitos, assumindo aspecto tuberculóide.

O critério adotado para a leitura foi formulado em 1946 na II Conferência Panamericana de Lepra e confirmado pelo Congresso Internacional de Leprologia de Madrid (1953)¹¹, como segue:

- negativo (-) ausência de resposta;
- duvidoso (\pm) infiltração com diâmetro $< 3,0$ mm;
- positivo (+) infiltração com diâmetro entre 3,0 e 5,0 mm;
- positivo (++) infiltração com diâmetro $> 5,0$ mm;
- positivo (+++) infiltração com diâmetro ≥ 10 mm e ulcerado.

Um dos estudos pioneiros para explicar a influência genética na resposta ao antígeno de Mitsuda foi realizado por Rotberg, em 1937⁴⁰, quando sugeriu a existência de um fator natural de resistência à hanseníase. Segundo o autor, a maioria (90%) da população demonstraria resistência à infecção pelo *M. leprae* e, somente uma pequena fração (10%) dos indivíduos seria geneticamente incapaz de montar uma resposta imunológica ao bacilo, razão pelo qual seria, permanentemente, Mitsuda negativo. A este grupo o autor denominou de margem anérgica. Relatou que a forma virchoviana da doença se originaria destes indivíduos Mitsuda negativos⁴⁰.

Em 1962, Beiguelman estudou 220 famílias que não apresentavam casos de hanseníase, e demonstrou que a reação de Mitsuda possui caráter familiar. Foi encontrada uma associação entre as distribuições dessa reação nas gerações paterna e filial, resultante de os filhos de genitores Mitsuda-negativo terem maior probabilidade de apresentar resposta negativa ao teste de Mitsuda que os filhos de genitores Mitsuda-positivo. Essa associação familiar permitiu aventar a hipótese de que seria em decorrência de um par

principal de alelos autossômicos a relação de dominância, sendo a resposta negativa ao teste de caráter recessivo. Aceitou-se, entretanto, que uma parte dos homozigotos recessivos poderia manifestar reação positiva, como decorrência da ação de fatores do ambiente. Essa associação também foi confirmada em outras amostras de famílias do Brasil e da Índia⁴¹.

1.3. O Complexo HLA

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC), no homem denominado de complexo HLA (Human Leukocyte Antigen), foi inicialmente descrito na década de 50 por Dausset. Ele notou, no sangue de mulheres múltiparas e no de indivíduos transfundidos, a presença de anticorpos que aglutinavam leucócitos originários de outros indivíduos^{42, 43,44}.

O MHC é definido como um conjunto de locos gênicos, localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p-21.3), que codificam aloantígenos (antígenos que diferem dentre indivíduos de uma mesma espécie). Sua importância foi reconhecida inicialmente no campo dos transplantes de tecidos e órgãos, por induzirem o processo de rejeição quando transferidos para um hospedeiro incompatível^{45,46}. Atualmente, sabe-se que os LT reconhecem os antígenos quando apresentados juntamente com as moléculas do complexo HLA na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC), onde a resposta imune específica se inicia, incluindo a produção de interleucinas, a proliferação e o controle das funções efetoras e reguladoras dos linfócitos^{47, 48,49}.

O MHC é dividido em três regiões distintas: classe I, classe II e classe III. Na região de classe I, existem genes que codificam glicoproteínas de superfície celular que correspondem aos antígenos HLA-A, HLA-B e HLA-C, conhecidos como antígenos clássicos de transplante. São muito polimórficos e determinam o reconhecimento do antígeno pelo LT CD8+. As moléculas

de classe I estão presentes em todas as células nucleadas do organismo. São constituídas por uma cadeia α com peso molecular de 44 KDa, polimórfica, codificada pelo MHC, que se associa na membrana celular à β 2-microglobulina, uma proteína com peso molecular de 12 KDa, não polimórfica, que é codificada por um gene localizado fora do MHC, no cromossomo 15^{50,51,52}.

A região de classe II contém genes que codificam as moléculas HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, que se ligam aos LT CD4+ durante o reconhecimento do antígeno. Essas moléculas apresentam distribuição restrita, estando presentes somente nas APC, como nos LB, nos macrófagos, nos monócitos, nos LT ativados e nas células dendríticas. As moléculas de classe II apresentam-se sob a forma de heterodímeros, constituídos por uma cadeia α de 34 KDa, associada a uma cadeia β de 29 KDa, ambas polimórficas e codificadas por genes localizados no MHC^{49,52,53}.

Na região de classe III, encontram-se genes responsáveis por várias funções. Como exemplo, genes codificadores de proteínas do sistema complemento (C2, C4, fator B), genes para a enzima 21-hidroxilase, fatores de necrose tumoral α e β (TNF), linfotoxinas e proteínas do choque térmico⁵⁴.

Estruturalmente, as moléculas de classe I apresentam um domínio citoplasmático carboxiterminal (COOH), uma região transmembrânica e três domínios externos aminoterminais (NH₂), compostos pelas cadeias α 1, α 2, α 3, sendo o domínio α 3 ligado não covalentemente à β 2-microglobulina. Os domínios α 1 e α 2 estão localizados na região hipervariável, caracterizando o polimorfismo das moléculas de classe I^{52, 55}. Devido a este polimorfismo, a apresentação do peptídeo pode variar de uma molécula para outra.

As moléculas de classe II estão associadas não-covalentemente, contendo a porção NH₂ extracelular e a porção intracelular COOH, sendo dois terços desta cadeia localizada na porção extracelular. Os domínios α 1 e β 1 formam o sítio de ligação com o antígeno, constituindo a porção variável da molécula (região hipervariável)^{49,52}. Os domínios α 2 e β 2 são

conservados, apresentando homologia com as regiões constantes das imunoglobulinas, indicando que os genes do MHC e das imunoglobulinas evoluíram a partir de um gene ancestral comum da superfamília das imunoglobulinas, assim como outras moléculas envolvidas na ativação dos LT, como receptores específicos de LT (TCR), CD3, CD4, CD8 e seu ligante LFA3, receptores para Fc de IgG, entre outros^{52,56,57}.

A nomenclatura do complexo HLA é periodicamente revisada pelo Comitê da Organização Mundial da Saúde (WHO) no qual estabelece que os locos gênicos sejam designados por letras (ex HLA-A, HLA-B, HLA-DR) e os alelos denominados pela adição de número após a letra (ex HLA-A2, HLA-B8). Inicialmente os alelos eram definidos por métodos sorológicos, com limitações, atualmente, com o advento de técnicas moleculares, estes podem ser definidos com maior precisão, com maior número de especificidades identificadas, sendo designados por um quarto número adicionado após o loco (ex: HLA-A*0101 e HLA-DRB1*0101), sendo os dois primeiros números a especificidade definida sorologicamente (fenótipo) e os dois seguintes o subtipo dentro da especificidade (genótipo)⁵⁸.

Os genes do MHC são herdados em blocos denominados haplótipos. Cada haplótipo é originado a partir de um cromossomo haplóide de origem paterna e outro de origem materna, que são expressos de forma codominante na superfície celular. O conjunto desses haplótipos constitui o genótipo HLA do indivíduo. Logo, cada indivíduo apresenta dois haplótipos, um de origem paterna e outro de origem materna⁵⁹.

A transmissão de uma geração para outra desses haplótipos obedece à herança mendeliana simples. Assim, a probabilidade de se encontrar em uma família dois irmãos com os dois haplótipos comuns (HLA idênticos) é de 25%, com apenas um haplótipo comum (HLA haploidêntico) é de 50%, e de não apresentarem haplótipos comuns (HLA distintos) é de 25%^{54,59}.

O polimorfismo do complexo HLA é enorme, cada loco HLA (A, B, C, DR, DQ e DP) pode ser ocupado, alternadamente, por uma série de genes alélicos, sendo que a frequência de heterozigose, em populações acasaladas ao acaso aproxima-se de 100%. É praticamente impossível

encontrar dois indivíduos, não aparentados, portando o mesmo genótipo HLA⁶⁰.

A freqüência dos antígenos e haplótipos HLA variam consideravelmente em diferentes grupos étnicos. Existem ainda diferenças, nas freqüências, quando se consideram diferentes populações dentro de um mesmo grupo racial⁶¹.

Além da diversidade de genes e do polimorfismo dos alelos, outra importante característica do complexo HLA é a existência de associações preferenciais entre determinados alelos de diferentes locos, denominadas de desequilíbrio de ligação, ou seja, se a freqüência concomitante de dois ou mais alelos, em um mesmo haplótipo observado, for maior do que a freqüência esperada, pode-se dizer que os genes estão em desequilíbrio de ligação⁶².

Com relação à associação do complexo HLA com as doenças, muitos estudos abrangendo as mais variadas patologias têm sido realizados. Associações importantes e interessantes têm sido descritas, devido a características peculiares contidas neste complexo, como o polimorfismo, a diversidade de genes e o envolvimento com a resposta imune⁶³.

Estudos foram iniciados a partir da década de 70, com a descrição da associação do antígeno HLA B-27 e a espondilite anquilosante pelos pesquisadores Schlosstein et al.⁶⁴ e Brewerton et al.⁶⁵ em 1973. Eles demonstraram a freqüência deste antígeno presente em 88% dos 96 pacientes estudados, enquanto, no grupo controle, apenas 4% a 8% possuía o antígeno.

Atualmente mais de 40 doenças tem ligações genéticas estabelecidas com o complexo HLA, tais como, narcolepsia e HLA-DR2, artrite reumatóide e HLA-DR4, hemocromatose e HLA-A3, psoríase e HLA-Cw6, esclerose múltipla e HLA-DR2, doença celíaca e HLA-DR3. Os mecanismos destas associações com os alelos, em particular, ainda não estão totalmente esclarecidos, acredita-se que para algumas destas doenças ocorra uma falha na expressão da molécula HLA, que resultaria em moléculas

deficientes, em outros casos os defeitos seriam em outros genes que influenciariam na expressão destas moléculas na superfície celular^{58,66}.

Para estudar o complexo HLA e doenças, dois tipos de análise podem ser utilizados: a análise de associação (estudo populacional) e a análise de cossegregação ou de ligação (estudo familiar).

Na análise de associação é realizada a comparação das freqüências dos antígenos entre pacientes e controles não aparentados, mas de mesma etnia⁶³. Calcula-se o risco relativo, em que é possível estimar-se a força da associação. O risco relativo indica quantas vezes um indivíduo portador de um determinado alelo é mais suscetível à determinada doença do que um indivíduo não portador⁶⁷.

O estudo familiar é um método para a verificação de genes de suscetibilidade a doenças dentro ou próximos ao complexo HLA por análise de ligação, que utiliza famílias com mais de um irmão afetado, nos quais é feita a comparação da ocorrência da doença à herança dos haplótipos HLA⁶⁸.

A análise de ligação permite a avaliação do caráter recessivo ou dominante do gene de suscetibilidade, não havendo necessidade de homogeneidade étnica entre as famílias estudadas. Torna possível, também, detectar genes de suscetibilidade mesmo que não correspondam a genes HLA conhecidos e/ou não estejam em desequilíbrio de ligação com os mesmos e pode auxiliar na localização do gene dentro do complexo HLA, desde que algum irmão afetado apresente recombinação entre os genes do complexo HLA⁶⁹.

As doenças infecciosas são as principais causas de morbidez e morte prematura nos países em desenvolvimento. Ainda que para algumas doenças infecciosas um gene principal de suscetibilidade tenha sido sugerido, a suscetibilidade para o agente infeccioso bem como a patogênese da doença são geralmente características multifatoriais. Em alguns casos, o componente genético ainda permanece desconhecido, mas para a maioria das doenças os genes têm sido identificados⁷⁰.

1.4. Hanseníase e Complexo HLA

Há muito tempo se tem considerado que a capacidade de certos indivíduos resistirem a algumas doenças, entre elas, à hanseníase, poderia estar influenciada por fatores genéticos⁷¹. O fenótipo de suscetibilidade para a infecção pelo *M.leprae* é complexo e sofre influência de vários fatores, tanto do hospedeiro quanto do parasita, além das condições ambientais⁷².

O complexo HLA na hanseníase tem sido amplamente estudado, na tentativa de elucidar os mecanismos que certos indivíduos possuem em relação à suscetibilidade ou à resistência à doença, uma vez que estes alelos atuam de forma direta na resposta imune, através da apresentação do peptídeo antigênico para a célula T. Devido ao alto polimorfismo do sistema, as respostas imunes geradas são diferentes entre os indivíduos^{72,73}. Segundo Ottenhoff (1984)⁷⁴, antígenos iguais são reconhecidos tanto por indivíduos doentes, quanto por indivíduos saudáveis, mas observam-se diferenças na habilidade desses indivíduos para responder a essas proteínas.

Vários estudos de associação foram realizados com os antígenos de classe I em diferentes populações na tentativa de encontrar marcadores genéticos para a hanseníase, mas esses estudos apresentaram resultados controversos.

Thorsby et al. (1973)⁷⁵, estudando uma população da Etiópia, verificaram aumento do antígeno HLA-B21 em pacientes HT, enquanto, Mehra et al. (1975)⁷⁶, estudando na Índia a mesma forma da doença, observaram a frequência diminuída do antígeno HLA-A9, associação também encontrada por Greiner et al. (1978)⁷⁷, na Tailândia, e por Chan et al. (1979)⁷⁸, na China.

Miyanaga et al. (1981)⁷⁹, estudando a população do Japão, não encontraram diferenças entre a frequência dos antígenos. Agrewala et al. (1989)⁸⁰, na Índia, verificaram aumento do antígeno HLA-A11 em pacientes HV com eritema nodoso hansênico.

No que diz respeito aos antígenos de classe II, os resultados são mais concordantes. A maioria das pesquisas revela associações positivas relacionando a hanseníase com o antígeno HLA-DR2 e DR3, em pacientes HT e do antígeno HLA-DQ1, em HV.

Van Eden et al. (1981)⁸¹, estudando a população da Índia, observaram aumento do HLA-DR2 no pólo HT, e, na população do Suriname (1982)⁸², aumento do HLA-DR3 nos pacientes HT e diminuição do mesmo antígeno nos HV.

No Japão, Izumi et al. (1982)⁸³ encontraram freqüência elevada do HLA-DR2 em pacientes HT, enquanto, nos HV, aumento do HLA-DQ1. Resultado semelhante foi obtido por Ottenhoff (1984)⁸⁴ em estudo realizado na Venezuela.

No Brasil, Visentainer et al. (1997)⁸⁵ e Marcos et al. (2000)⁸⁶, em estudos semelhantes, confirmaram os resultados descritos na literatura internacional^{81, 83}.

Com a utilização de técnicas de biologia molecular, atualmente, é possível especificar as subdivisões existentes no complexo HLA, denominados “*splits*”. Na hanseníase a forma HT está relacionada com o alelo HLA-DRB1*15 que é um subtipo do HLA-DR2 e HV relacionada com HLA-DQB1*06, subtipo do HLA-DQ1^{87,88,89,90}.

A suscetibilidade para a hanseníase, atualmente, têm sido muito discutida envolvendo vários marcadores, sendo estes, relacionados ou não com o MHC que atuam diretamente na resposta imune inata e adaptativa.

Além dos estudos clássicos de associação com as regiões de classe I e II do MHC, atualmente têm se pesquisado a participação de outros componentes como as proteínas transportadoras de antígeno (TAP), relacionadas com a ligação e transporte do peptídeo do *M. leprae* ao MHC-I do retículo endoplasmático à superfície celular⁹¹.

A região de classe III também tem sido estudada, pois, nesta região, são codificados componentes importantes para resposta imune inata e adaptativa, como os polimorfismos do TNF α , responsável pela ativação macrófaga, linfotóxina α , secretada pelas células natural *killer*, fatores do

complemento, como C4B na imunidade inata, a proteína do choque térmico de 70 kD 1A (HSPA1A) relacionada com as respostas mediadas pelo receptores Toll-like 2 e 4 (TLR2 e TLR4)⁹¹.

Estudos envolvendo marcadores não relacionados ao MHC são encontrados como o COL3A1(procolágeno III alfa I) e CTLA4(antígeno associado ao linfócito T citotóxico), receptores de vitamina D (VDR), receptores Toll-like 2(TLR2), lecitinas ligadoras de manose(MBL2)⁹¹.

O gene NRAMP1 (*natural resistance associated macrophage protein 1*),homólogo humano de genes identificados em camundongos, denominados *Lsh*, *Ity* ou *Bcg*, estariam associados à suscetibilidade a vários parasitas intracelulares, como *M. lepraemurium*, *M. bovis* e espécies de *Leishmania* e *Salmonella*. Esse gene pode ser considerado um dos mais importantes para a determinação da suscetibilidade ou da resistência do indivíduo a infecções micobacterianas⁷¹.

Abel et al. (2000)⁹², estudando a associação entre genes NRAMP1 e a reação de Mitsuda em uma população de 20 famílias do Vietnã, com pelo menos dois irmãos hansenianos, observaram a existência de relação positiva entre os genes NRAMP1 e a reação de Mitsuda. Segundo os autores, esses genes estariam participando da regulação da resposta imune antimicobacteriana. Por outro lado, Hatagima et al. (2001)⁹³, reproduzindo estudo similar em um grupo de 30 irmãos brasileiros hansenianos e saudáveis, não encontraram nenhuma associação significativa entre a reação de Mitsuda e genes NRAMP1.

Recentemente foi demonstrado por Mira et al.⁹⁴ que a suscetibilidade para a hanseníase, não importando a forma clínica, estaria associada aos genes PARK2 e PACRG, localizados no cromossomo 6 (q25-q26) em pacientes de origem vietnamita e brasileira.

Com relação aos genes do complexo HLA, acredita-se que atuem mais efetivamente na modulação da forma e na manifestação clínica da doença (a exemplo do que se verifica na positividade/negatividade da reação de Mitsuda) do que na suscetibilidade para a infecção propriamente dita⁷⁰.

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

Trabalhos realizados até o momento descrevem associações entre os antígenos HLA e as formas HT e HV, porém nenhum estudo foi encontrado com pacientes HD. Devido à falta de informações para este grupo, um estudo de associação foi realizado.

Como não encontramos na literatura registros de estudos sobre a possível relação entre alelos HLA de pacientes hansenianos HT, HD e HV com a leitura clínica da reação de Mitsuda o trabalho foi proposto. Com o objetivo de comparar os resultados da leitura clínica da reação de Mitsuda em pacientes hansenianos HT, HD, HV com os alelos do complexo HLA, através da reação intradérmica de Mitsuda e da tipificação dos alelos do complexo HLA de classe II (locos DRB1* e DQB1*).

Deste modo, uma associação positiva entre o alelo HLA e a reação de Mitsuda, poderia contribuir de maneira mais efetiva no auxílio da classificação e prognóstico da hanseníase.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Critérios de Elegibilidade

Participaram do estudo 176 pacientes com diagnóstico clínico de hanseníase firmado de acordo com os critérios clínicos, baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos estabelecidos pelo 6º Congresso Internacional de Madri (1953), totalizando 50 HT, 50 HV e 76 HD, oriundos do Serviço de Dermatologia Dr. Diltor V. A. Opromolla do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru. Os participantes foram informados sobre o propósito do estudo e somente participaram aqueles que concordaram, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética e Científica em Pesquisa, sob nº 02/2002/ILSL.

O grupo controle consistiu em 168 indivíduos sadios da mesma etnia e não aparentados, que compareceram ao Laboratório de Imunogenética do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) para realização de exames de Histocompatibilidade.

2.2. Métodos

2.2.1. Teste de Mitsuda

A suspensão de bacilos na concentração de $6,0 \times 10^7$ *M. leprae*/ml em solução isotônica de cloreto de sódio, esterilizada pelo calor e conservada com ácido fênico foi preparada no ILSL, injetada na face anterior do braço por via intradérmica no volume de 0,1ml, utilizando seringa tipo tuberculínica de 1ml e agulha de 13 x 3,8mm⁹⁵.

Após 28 dias foi realizada a leitura clínica da reação, utilizando-se como medida milímetros de induração. Calculou-se a média aritmética dos dois maiores diâmetros do nódulo, seguindo os critérios propostos pelo Congresso Mundial de Leprologia (Madrid, 1953)¹¹, descritos a seguir:

Negativo (-) ausência de resposta;

Duvidoso (\pm) infiltração com diâmetro < que 3,0 mm;

Positivo (+) infiltração com diâmetro entre 3,0 e 5,0 mm;

Positivo (++) infiltração com diâmetro > que 5,0mm;

Positivo (+++) infiltração com diâmetro \geq 10 mm e ulcerado

2.2.2. Tipificação HLA de classe II

A tipificação HLA de classe II locos -DRB1* e -DQB1* foi realizada através da técnica de polimorfismo de DNA, pelo método de PCR-SSP (reação em cadeia da polimerase, com *primers* de seqüência específica), utilizando kits de baixa resolução da marca One-Lambda-USA.

Coleta de sangue: Foram coletados 5ml de sangue venoso periférico em tubo de coleta a vácuo descartável, contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético).

Extração do DNA: Utilizou-se a técnica de *Salting-out*⁹⁶ para a extração de DNA, como descrito abaixo:

Centrifugar o sangue por 25 minutos a 1500 rpm. Após centrifugação, retirar e desprezar o plasma, recuperar o anel de leucócitos em 2 tubos tipo Eppendorff® (capacidade de 2ml) com 0,8ml de tampão para lise de células vermelhas (anexo 1), homogeneizar em agitador de tubos aproximadamente 10 segundos e centrifugar por 2 minutos a 12.000 rpm. Retirar o tubo da centrífuga, desprezar o sobrenadante, homogeneizar o botão formado em 1ml de tampão de lise de células vermelhas, em agitador de tubos por aproximadamente 10 segundos e novamente centrifugar por 2 minutos a

MATERIAL E MÉTODOS

12.000 rpm. Repetir esse procedimento até obter total lise das hemácias. A última lavagem deverá ser realizada com água ultrapura. Desprezar o sobrenadante recuperando o botão de leucócitos, acrescentar 0,04 ml de tampão de Proteinase K (anexo 2), 0,03ml de Proteinase K (anexo 3), 0,02ml de SDS (dodecilsulfato de sódio) 20% (anexo 4) e 0,24 ml de água ultrapura. Homogeneizar em agitador de tubos e incubar por 30 minutos a 55°C em banho-maria (BM), com agitação em intervalos de 15 minutos. Retirar do BM, acrescentar 0,1ml de NaCl(cloreto de sódio) 6M (anexo 5) e homogeneizar fortemente em agitador de tubos. Centrifugar por 6 minutos a 13.000 rpm. Após centrifugação, transferir o sobrenadante para um outro tubo por inversão e dobrar o volume obtido com etanol absoluto. Homogeneizar gentilmente por inversão durante 30 segundos e centrifugar por 1 minuto a 13.000 rpm. Retirar da centrífuga, desprezar o sobrenadante e acrescentar 1ml de etanol a 70%, agitar manualmente e centrifugar por 1 minuto a 13.000 rpm. Finalmente, desprezar todo o sobrenadante cuidadosamente e reconstituir com água ultrapura em volume variável entre 0,03 ml a 0,08 ml.

Verificar a concentração e a pureza da amostra através de leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm, respectivamente. Acertar a concentração da amostra em 100ng/ μ l conforme descrição do kit, utilizando a fórmula da relação entre soluto e solução ($V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$).

Reação da PCR: Descrita conforme especificações técnicas do fabricante (MicroSSP™ Generic Lote 05A One-Lambda/USA), como segue:

Retirar o material necessário do freezer -80°C para a realização das tipificações e, após descongelamento, homogeneizar o *mixer* com os nucleotídeos em agitador de tubos. Dispensar no microtubo do controle negativo 1 μ l de água ultrapura e 9 μ l de *mixer* com 2 μ l da enzima *Taq*

MATERIAL E MÉTODOS

polimerase. Logo após, acrescentar 39 µl da amostra de DNA extraído na solução do *mixer* e homogeneizar. Nos microtubos, já contendo os *primers* específicos para os locos -DRB1* (DRB1*01, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14, DRB1*15, DRB1*16, DRB1*17, DRB1*18 e -DQB1* (DQB1*02, DQB1*04, DQB1*05, DQB1*06, DQB1*07, DQB1*08, DQB1*09), dispensar 10-µl da solução *mixer*. Vedar bem toda a placa com microtubos e iniciar a amplificação em termociclador Applied Biosystems seguindo o programa descrito abaixo):

Número de ciclos	Passo	Temperatura (°C)	Tempo (seg)
01	01	94	130
	02	63	60
09	01	94	10
	02	63	60
20	01	94	10
	02	59	50
	03	72	30
Final	01	04	-

Finalizada a amplificação, retirar os microtubos do termociclador, transferir 10µl da reação PCR para gel de agarose 2,5% (Sigma) acrescido de 10µl de brometo de etídeo 0,01% (Sigma), utilizando o equipamento Micro SSP Gel System (One-Lambda-USA). A seguir realizar a eletroforese em tampão TBE (Tris Borato EDTA) (anexo 6) por 4 minutos a 150 volts. Fotografar o gel sobre o transluminador UV. Anotar a leitura final nos protocolos específicos que acompanham o kit (anexo 7).

2.2.3. Análise Estatística

Para o estudo de associação entre HD e alelos HLA utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Os valores corrigidos de $P(P_c)$ foram calculados multiplicando-se o valor de P pelo número de antígenos testados⁹⁷.

O Teste do Qui-quadrado foi utilizado para detecção de associação entre os resultados do teste de Mitsuda, independentemente da forma clínica, e alelos HLA.

As análises estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de significância com o emprego do pacote estatístico SPSS 11.0 for Windows.

3.0. RESULTADOS

3.1. Teste de Mitsuda e Tipificação HLA

Dos 176 pacientes estudados, a forma clínica HT consistiu em 26 homens e 24 mulheres, com idade variando entre 8 e 80 anos (média 50 anos[±20]). Na forma HV, 32 eram homens e 18 mulheres entre 25 a 91 anos (média 54 anos [±17]). No grupo HD, 41 eram homens e 35 mulheres entre 23 a 92 anos (média 57 anos [±15]).

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados da reação de Mitsuda em pacientes HT e os alelos HLA de classe II. A leitura clínica da reação, seguindo a classificação proposta¹¹, demonstrou que todos os pacientes HT apresentaram resultado positivo. O padrão de leitura foi positivo 1+ em 8 (16%) casos estudados; positivo 2+ em 34 (68%) e positivo 3+ nos 8 (16%) casos restantes. O diâmetro da induração variou entre 4,0 mm a 18,0 mm e o valor médio dos resultados foi de 7,5 mm (±2,6).

Na Tabela 2, encontram-se representados os 50 pacientes HT, Mitsuda positivos. Destes, 14 (28%) apresentaram o alelo HLA-DR2 (DRB1*15 ou DRB1*16), sendo 12 (24%) com o alelo HLA-DRB1*15 e 2 (4%) com HLA-DRB1*16. O alelo HLA-DR3(DRB1*17 ou DRB1*18) foi observado em 8 (16%) pacientes, sendo que 4 (8%) apresentaram o alelo HLA-DRB1*17 e 4 (8%) HLA-DRB1*18. Concomitantemente, em apenas 1 (2%) paciente, foram observados os dois alelos HLA-DRB1*15 e HLA-DRB1*17. Assim, do número total de pacientes estudados, 23 (46%) apresentaram o marcador relacionado com a forma HT.

Na Tabela 3, estão expressos os resultados dos alelos HLA-DQ1(HLADQ1*05 e HLA-DQB1*06) em todos os 50 pacientes HV, Mitsuda negativos.

Na Tabela 4, está demonstrada a distribuição da presença dos alelos HLA nos pacientes HV, Mitsuda negativos. Trinta e sete (74%) apresentaram o alelo HLA-DQ1(HLA-DQB1*05 ou HLA-DQB1*06), sendo 17 (34%) com

HLA-DQB1*05, 14 (28%) HLA -DQB1*06 e 6 (12%) HLA-DQB1*05 e HLA-DQB1*06.

Na Tabela 5, encontram-se representados os resultados da leitura clínica da reação de Mitsuda e os alelos HLA em pacientes do grupo HD. O padrão da leitura clínica do teste resultou negativo em 37 doentes (48,7%); duvidoso em 4 (5,2%); positivo 1+ em 23 (30,3%) e positivo 2+ em 12 (15,8%) casos estudados. O diâmetro da induração variou entre negativo a 7,5mm de induração, representando uma média de 2,4 mm ($\pm 2,5$).

Na Tabela 6, está demonstrado o estudo de associação realizado entre alelos HLA e grupo HD. Os resultados obtidos não sugeriram nenhum alelo HLA associado a esta forma clínica da doença ($p > 0,05$) quando comparados com grupo controle de pessoas sadias.

Uma outra forma de análise foi realizada na qual os pacientes não foram estratificados de acordo com sua forma clínica, mas separados de acordo com a reação de Mitsuda em positivos e negativos.

Na Tabela 7, verifica-se a distribuição de 85 (48,3%) pacientes hansenianos Mitsuda positivos, quanto à presença de alelo HLA-DRB1*15 ou HLA-DRB1*16 (HLA-DR2) e HLA-DRB1*17 ou HLA-DRB1*18 (HLA-DR3) e de 91(51,7%) pacientes Mitsuda negativos, quanto à presença do alelo HLA-DQB1*05 ou HLA-DQB1*06 (HLA-DQ1). No grupo com reação de Mitsuda positiva, 37 (43,5%) possuíam o alelo HLA-DR2 ou HLA-DR3 e no grupo com reação negativa, 60 (65,9%) possuíam o alelo HLA-DQ1. Verificou-se associação entre os pacientes Mitsuda negativo e alelo HLA-DQ1 a um nível descritivo de 0,002, pelo teste do Qui-quadrado.

RESULTADOS

Tabela 1. Resultados da leitura clínica da reação de Mitsuda em milímetros (mm) e alelos HLA em 50 pacientes HT.

Pacientes	Mitsuda (mm)	HLA			
		DRB1*	DRB1*	DQB1*	DQB1*
01	5,0	08	08	04	04
02	6,0	11	18	04	07
03	10,0	13	17	02	06
04	7,0	04	07	08	09
05	7,5	07	09	02	02
06	8,0	08	17	02	04
07	18,0	10	11	05	07
08	7,5	07	16	02	05
09	6,5	01	15	05	-
10	7,0	04	04	07	07
11	9,5	11	13	07	07
12	5,5	07	13	02	06
13	7,0	15	13	06	06
14	5,0	04	11	07	07
15	5,5	07	17	02	02
16	4,0	14	15	06	-
17	7,0	07	-	02	05
18	5,5	07	11	02	07
19	9,0	01	15	05	06
20	4,0	01	04	05	04
21	7,0	18	13	02	04
22	6,5	09	-	04	-
23	11,0	17	07	02	02
24	7,0	11	11	07	07
25	6,5	04	08	04	07

RESULTADOS

26	6,0	13	15	06	06
27	8,0	07	13	06	09
28	6,0	08	14	04	05
29	5,5	15	07	06	02
30	9,0	13	18	04	06
31	4,0	11	13	07	06
32	7,0	15	07	06	02
33	7,0	01	10	05	05
34	7,0	18	07	02	04
35	12,0	09	11	06	02
36	11,5	08	14	07	08
37	9,0	09	11	02	-
38	7,5	07	11	02	07
39	10,0	07	13	02	06
40	13,5	15	09	06	02
41	12,0	01	15	05	06
42	5,0	10	15	05	06
43	7,0	01	01	05	05
44	8,0	15	17	06	02
45	5,0	01	16	05	05
46	6,5	13	15	06	06
47	5,0	04	11	07	08
48	7,0	01	04	05	08
49	6,0	09	13	09	05
50	6,0	01	15	06	07

(-): não identificado

Tabela 2. Distribuição da presença de alelo HLA-DR2 (HLA-DRB1*15 e HLA-DRB1*16) e HLA- DR3 (HLA- DRB1*17 e HLA-DRB1*18) em 50 pacientes HT com reação de Mitsuda positiva.

Marcador	Alelo HLA	Presença de alelo	
		Pacientes com alelo	%
DR2	DRB1*15	12	24
	DRB1*16	2	4
DR3	DRB1*17	4	8
	DRB1*18	4	8
DR2+DR3	DRB1*15 + DRB1*17	1	2
Outros alelos		27	54
Total		50	100

Tabela 3. Distribuição de 50 pacientes HV, Mitsuda negativos, quanto os alelos HLA

Pacientes	HLA			
	DRB1*	DRB1*	DQB1*	DQB1*
01	08	13	04	09
02	08	08	07	07
03	16	17	02	07
04	17	07	06	02
05	11	16	07	-
06	09	16	02	05
07	04	16	07	04
08	01	13	05	-
09	11	13	06	07
10	01	11	05	07
11	01	13	05	-
12	11	18	07	04
13	04	04	08	08
14	13	-	05	07
15	01	10	05	05
16	15	09	06	09
17	13	15	06	06
18	10	13	05	06
19	08	15	06	07
20	01	04	05	08
21	07	15	06	09
22	16	11	05	06
23	04	13	04	06
24	04	15	02	06
25	01	14	05	05

RESULTADOS

26	01	13	05	06
27	16	17	02	05
28	07	08	04	09
29	07	16	05	09
30	07	13	06	09
31	14	17	05	02
32	04	07	02	08
33	01	04	04	05
34	11	16	06	-
35	07	07	02	02
36	04	16	08	-
37	07	08	02	-
38	04	13	04	05
39	15	17	02	06
40	15	11	06	07
41	01	11	05	07
42	17	15	05	02
43	04	13	05	08
44	13	16	06	07
45	10	11	05	07
46	15	16	05	06
47	01	13	05	06
48	15	17	02	06
49	15	16	05	06
50	11	11	07	07

(-): não identificado

Tabela 4. Distribuição da presença de alelos HLA-DQ1(HLA-DQB1*05 e HLA-DQB1*06) nos 50 pacientes HV com reação de Mitsuda negativa.

Marcador	Alelo HLA	Presença do alelo	
		Pacientes com alelo	%
DQ1	DQB1*05	17	34
	DQB1*06	14	28
	DQB1*05 e DQB1*06	6	12
Outros alelos		13	26
Total		50	100

Tabela 5. Resultados da leitura clínica da reação de Mitsuda em milímetros (mm) e alelos HLA em 76 pacientes HD.

Pacientes	Mitsuda	HLA			
		DRB1*	DRB1*	DQB1*	DQB1*
01	6,0	08	13	07	07
02	2,0	01	14	05	07
03	3,5	13	14	05	06
04	Negativo	07	10	02	05
05	7,0	13	13	06	06
06	6,0	01	08	04	05
07	3,5	14	15	05	06
08	Negativo	01	13	-	-
09	Negativo	13	15	06	07
10	Negativo	01	13	05	07
11	Negativo	01	04	05	07
12	Negativo	10	01	05	05
13	4,0	08	13	04	06
14	Negativo	01	17	02	05
15	2,5	11	13	06	06
16	7,0	01	17	05	02
17	Negativo	18	10	05	04
18	5,0	07	13	06	02
19	Negativo	01	15	05	04
20	Negativo	01	11	05	06
21	Negativo	04	04	07	07
22	5,0	04	10	05	08
23	Negativo	13	14	05	06
24	Negativo	07	16	02	05
25	Negativo	17	17	02	02

RESULTADOS

26	2,5	13	15	06	06
27	3,5	11	16	05	07
28	5,0	09	15	06	-
29	Negativo	15	18	02	04
30	Negativo	13	-	-	-
31	Negativo	08	13	04	06
32	4,0	04	04	07	08
33	Negativo	04	16	08	-
34	Negativo	04	11	07	08
35	Negativo	07	13	06	09
36	Negativo	17	07	02	09
37	5,0	11	04	07	07
38	Negativo	15	15	06	06
39	6,0	15	15	06	06
40	Negativo	11	15	06	07
41	5,0	04	07	02	07
42	3,5	04	07	07	04
43	Negativo	07	11	02	09
44	6,0	11	13	06	07
45	3,5	11	15	06	07
46	3,5	13	15	06	06
47	Negativo	13	15	06	06
48	3,5	11	14	05	07
49	5,0	11	16	05	07
50	Negativo	04	17	02	08
51	4,5	01	10	05	07
52	6,5	01	13	05	07
53	3,5	13	15	06	06
54	Negativo	10	15	05	06
55	6,0	08	11	04	07
56	Negativo	07	11	07	09

RESULTADOS

57	6,0	01	16	05	05
58	Negativo	04	11	07	07
59	4,0	13	13	06	06
60	Negativo	11	15	07	-
61	7,5	01	14	05	05
62	4,0	11	13	07	05
63	5,5	07	17	02	02
64	4,0	13	15	06	06
65	Negativo	07	15	02	06
66	3,0	04	13	06	08
67	6,0	11	11	07	07
68	Negativo	17	15	02	06
69	Negativo	09	11	07	-
70	2,5	01	13	05	06
71	Negativo	04	07	07	02
72	Negativo	04	04	07	07
73	5,0	15	15	06	06
74	3,5	11	15	06	07
75	Negativo	08	11	04	07
76	Negativo	01	11	07	07

(-): não identificado

Tabela 6. Frequências de alelos HLA em 76 pacientes HD e 168 controles sadios(C).

HLA	Freq. HD %	Freq.C%	P	Pc
DRB1*13(6)	34,2	24,4	0,03	0,63(ns)
DRB1*15(2)	30,3	16,7	0,02	0,42 (ns)
DQB1*02	22,4	39,3	0,01	0,21 (ns)
DQB1*06(1)	54,0	36,3	0,01	0,21 (ns)

P= valor de P, Teste Exato de Fisher; P<0,05

Pc= P corrigido; P<0,05

ns= não significativo

Tabela 7. Distribuição de 85 pacientes hansenianos Mitsuda positivos quanto à presença de alelo HLA-DRB1*15 ou HLA-DRB1*16 (HLA-DR2), HLA-DRB1*17 ou HLA-DRB1*18 (HLA-DR3) e de 91 pacientes Mitsuda negativos quanto à presença do alelo HLA-DQB1*05 ou HLA-DQB1*06 (HLA-DQ1).

Reação de Mitsuda	Presença de Alelo HLA nos pacientes				p*	Total
	Sim		Não			
	N	%	N	%		
Positivo¹	37	43,5	48	56,5	0,233	85
Negativo²	60	65,9	31	34,1	0,002	91
Total						176

* teste de Qui-quadrado, gl = 1.

1. em relação a HLA-DR2 e HLA-DR3

2. em relação a HLA-DQ1.

4.0. DISCUSSÃO

Os estudos sobre a distribuição da hanseníase entre os gêneros masculino e feminino em várias regiões do mundo, concordam que a doença afeta ambos os sexos, com predominância em homens^{98, 99}. Esta diferença é explicada por vários motivos como: grau de exposição, condições culturais e hábitos^{100, 101, 102}.

Neste estudo, os pacientes foram selecionados ao acaso, conforme encaminhamento médico e após diagnóstico confirmado de hanseníase. Observamos a freqüência de homens (56,2%) discretamente maior que as mulheres (43,8%), corroborando com a literatura. Verificamos também a predominância do sexo masculino na forma HV (32 homens para 18 mulheres), fato também descrito na literatura^{103, 104, 105}.

A hanseníase, por ser uma doença infecciosa crônica, tem a multiplicação bacilar lenta, como consequência possui um longo período de incubação. Acomete com maior freqüência os adultos entre 30 a 60 anos^{99, 106}. Com relação às idades dos pacientes incluídos neste estudo, houve variação entre 50 (± 20) anos na forma HT, 54 (± 17) anos na HV e 57 (± 15) anos no grupo HD. Estas variações são similares aos relatados por Barro (2004)¹⁰² quando avaliou a situação da hanseníase no município de Londrina-PR e encontrou maior incidência da doença na faixa etária entre 35 a 54 anos. Por outro lado, Brasil et al. (1998)¹⁰⁵ relataram uma maior incidência de casos, na faixa etária acima de 60 anos, na cidade de Severínia-SP

Embora o *M. leprae* tenha sido identificado como patogênico ao homem há mais de um século, até hoje não foi cultivado *in vitro*, fato este que dificulta um maior conhecimento das características biológicas desse agente.

Desde 1919, quando Kensuke Mitsuda³¹ idealizou o teste cutâneo obtido a partir de hansenomas para a avaliação da resposta imune celular, nenhum outro parâmetro confiável para avaliar essa resposta *in vivo* foi proposto.

A dificuldade na obtenção dos antígenos para o preparo da suspensão é um dos fatores que torna necessário o encontro de novos métodos para a substituição desse teste, uma vez que se utilizam hansenomas obtidos de pacientes multibacilares ou então, de tatus infectados para o seu preparo.

A partir do teste de Mitsuda, novos antígenos começaram a ser desenvolvidos como testes diagnósticos, incluindo o MLSA (antígeno solúvel do *M. leprae*)¹⁰⁷, MLSA-LAM (antígeno solúvel do *M. leprae* com quantidades mínimas de lipoarabinomanana) e o MLCwA (antígeno associado a parede celular do *M. leprae*)¹⁰⁸.

A finalização do seqüenciamento do genoma do *M. leprae* em 2000¹⁰⁹ proporcionou oportunidade única para identificar antígenos puros e específicos, capazes de induzir resposta celular, excluindo possíveis interferências que ocorrem quando se utiliza material de origem humana ou animal. Assim, peptídeos sintetizados com base no genoma do bacilo são os candidatos ideais para induzir resposta cutânea em indivíduos que nunca tiveram contato com o bacilo, naqueles que mantém contato direto com hansenianos e nos próprios doentes com algum grau de resistência.

Apesar desses estudos, o teste de Mitsuda continua sendo o único parâmetro imunológico aceito, internacionalmente, como critério para o auxílio na classificação das formas clínicas da hanseníase¹³.

A avaliação macroscópica da reação realizada através de leitura clínica, freqüentemente, encontra correspondência com a histopatologia, embora existam relatos de incompatibilidade entre essas avaliações^{110,111}. No presente estudo, os 50 pacientes HT analisados apresentaram resultados positivos na leitura clínica da reação de Mitsuda, com variações no diâmetro da induração. Nossos resultados concordam com as descrições da literatura⁴⁰ nos quais 90% dos indivíduos demonstraram resultados positivos 2⁺ para a reação de Mitsuda.

A capacidade de resposta que tanto indivíduos saudáveis como doentes possuem em reconhecer os mesmos antígenos é determinada através de características genéticas⁷⁴. O complexo HLA por sua vez, possui características genéticas importantes tais como o polimorfismo de genes,

herança mendeliana e atuação de forma direta na resposta imune. Na hanseníase, estudou-se amplamente este complexo, na tentativa de esclarecer os mecanismos de suscetibilidade ou resistência que certos indivíduos possuem para a doença.

Atualmente, acredita-se que a participação do complexo HLA na hanseníase ocorra na modulação da forma e na manifestação clínica da doença e não na suscetibilidade propriamente dita para a infecção^{70, 74}.

Estudos envolvendo diferentes populações do mundo^{80, 81, 82, 83, 84, 85, 86}, incluindo a brasileira, evidenciam os alelos HLA-DR2 e HLA-DR3 associados com a forma HT, sugerindo que estes alelos poderiam induzir uma vigorosa resposta de célula T, enquanto o alelo HLA-DQ1, estaria associado à HV, induzindo a uma resposta ineficiente, talvez pela indução de células T supressoras específicas ao *M. leprae*¹¹². De forma geral, os resultados entre os estudos indicam que as formas, HT e HV, estão associadas com HLA-DR2 e HLA-DQ1, respectivamente, em diferentes populações, confirmando a participação do HLA de classe II no direcionamento da forma clínica da doença.

No presente estudo, realizamos a reação de Mitsuda e a tipificação HLA de classe II nos pacientes com as diferentes formas clínicas da hanseníase, com o objetivo de estabelecer uma possível relação entre esses dois parâmetros. Nosso trabalho consistiu em uma investigação inédita, não tendo sido localizado nenhum relato na literatura consultada que demonstrasse o comportamento da reação de Mitsuda comparada à frequência dos alelos HLA nas formas HT, HD e HV. Nossos resultados não permitiram estabelecer nenhuma relação entre alelos HLA com as formas clínicas isoladas da hanseníase e a reação de Mitsuda.

Na amostra HT, apesar de todos os pacientes apresentarem reação de Mitsuda positiva, apenas 46% apresentaram os alelos HLA-DR2 (28%), HLA-DR3 (16%) e HLA-DR2/DR3 (2%), contrariando nossas expectativas de encontrar maior porcentagem de pacientes com esses alelos associados à resistência e direcionamento da forma clínica da doença.

Nos HV, Mitsuda negativo, 74% apresentaram o alelo HLA-DQ1. Apesar da porcentagem elevada, após análise estatística não verificamos comparação significativa.

Portanto, nas formas HT e HV não conseguimos afirmar o envolvimento direto dos alelos HLA-DR2 / HLA-DR3 e HLA-DQ1, com a resposta da reação de Mitsuda.

No grupo HD, os resultados foram mais discordantes, pois não demonstramos, após a realização do estudo de associação, nenhum alelo HLA associado a esta forma da doença ($p > 0,05$), portanto não obtivemos parâmetros para realizar a comparação com a reação de Mitsuda que concordando com a literatura, neste grupo, variou entre negativa a fracamente positiva.

Ottenhoff et al. (1987)¹¹³ em estudo envolvendo apenas pacientes HD que estavam em reação, localizados próximos ao pólo tuberculóide e pacientes não reacionais, verificou associação do HLA-DR3 com a resposta fortemente positiva da reação de Mitsuda nos pacientes reacionais. Segundo os autores, a frequência elevada do HLA-DR3 sugere a participação deste na imunidade celular dos pacientes que sofrem o surto reacional, fato também observado por Marcos et. al (2000)⁸⁶, em estudo com pacientes HT e HD reacionais.

A discordância entre nossos resultados e os obtidos nestes estudos pode ser justificada através da metodologia utilizada, uma vez que, nesse estudo empregamos a técnica de tipificação por biologia molecular, a qual apresenta melhor definição dos alelos, enquanto que nas referências acima citadas, os resultados foram obtidos através de técnicas sorológicas.

Como não encontramos associação positiva entre alelos HLA e reação de Mitsuda, nas formas clínicas isoladas, optamos por uma outra forma de análise na qual os pacientes foram separados em Mitsuda positivos e negativos.

Nos pacientes Mitsuda positivos, composto pelos HT e HD próximos ao pólo T não foi encontrada qualquer relação com os alelos HLA-DR2 e HLA-DR3, pois apenas 43,5% apresentaram o alelo, discordando da literatura,

que sugere a participação destes antígenos na indução de uma resposta imune celular eficiente contra o *M. leprae*, no entanto, no grupo com reação de Mitsuda negativa, composta pelos pacientes HV e HD próximos ao pólo V, foi possível detectar associação estatisticamente significativa a um nível descritivo de 0,002, pelo teste do Qui-quadrado, com o alelo HLA-DQ1 em 65,9% dos pacientes, confirmando a descrição da literatura quanto à participação deste antígeno na resposta imune celular deficiente^{74, 112}.

Fundamentado nos resultados obtidos, foi possível verificar o perfil de resposta imune celular específica para o *M. leprae* e a distribuição dos alelos HLA na população brasileira nas formas clínicas isoladas ou não. Todavia, os estudos devem ser ampliados para que se possa avaliar e compreender, com maior fidelidade, mecanismos como os de imunorregulação e fisiopatologia e evidenciar a participação destes componentes na infecção hansênica, para que diagnósticos mais precisos sejam firmados e novas terapêuticas sejam instituídas.

5.0. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho foi possível concluir que:

A utilização isolada da tipificação dos alelos HLA não constitui um método adequado para avaliar o prognóstico da doença;

A reação intradérmica de Mitsuda mantém-se como valiosa ferramenta utilizada na classificação e no prognóstico da doença;

Quando utilizados em conjunto, a tipificação dos alelos HLA poderia complementar o diagnóstico da hanseníase.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Elimination of Leprosy as a Public Health Problem. Disponível em: <http://www.who.int/lep/>. Acesso em 10 de maio 2005.
2. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. Eliminação da Hanseníase das Américas. Hanseníase Hoje 2003; 11.
3. Talhari S, Neves RG. Hansenologia. Manaus: Calderaro Ltda; 1984.
4. Rees RJW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC, editores. Leprosy. 4ed. Edinburg: Churchill. Livingstone; 1994. p.49-83.
5. Jopling WH, McDougall AC, Bakos L. Manual da Hanseníase. 4ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1991.
6. Organização Mundial da Saúde. WHO Expert Committee on leprosy: fourth report. Wld Hlth Org Techn Rep Ser 1977; 607:1-48.
7. Davey TF, Rees RJW. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. Leprosy Rev 1974; 45:121-34.
8. Shepard CC. The nasal excretions of Mycobacterium leprae in leprosy. Int J Leprosy 1962; 30:10-8.
9. Opromolla DVA, Ura S. Epidemiologia. In: Noções de Hansenologia. 2ed. Bauru: Centro de Estudos "Dr Reynaldo Quagliato". Instituto Lauro de Souza Lima, 2000. p.101-107.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações. In: Noções de Hansenologia. 2ed. Bauru: Centro de Estudos "Dr Reynaldo Quagliato". Instituto Lauro de Souza Lima, 2000.p.51-58.
11. Congresso Internacional de Leprologia, 6, Madrid, 1953. Memória Association International de la Lepra, 1953. 1344p.
12. Lastória JC, Opromolla DVA, Fleury RN, Rabermann F, Curi PR. Serial Mitsuda tests for identification of reactional tuberculoid and reactional boderline leprosy forms. Int J Leprosy 1998; 66(2): 190-200.
13. Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. A five- group system. Int J Leprosy 1966; 34(3): 255-73.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Guia para controle da Hanseníase. 2ed. Brasília, 1984.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para controle da Hanseníase. Ministério da Saúde. 1 ed. 2002. Brasília.
16. Fleury RN. Patologia e manifestações viscerais. In: Noções de Hansenologia. 2ed. Bauru: Centro de Estudos "Dr Reynaldo Quagliato". Instituto Lauro de Souza Lima, 2000. p. 63-71.
17. Opromolla DVA, Ura S. Atlas de Hanseníase. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 2002.
18. Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. Bull World Helth Organ 1974; 51(5): 451-65.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

19. Modlin RL, Hofman FM, Meyer PR, Sharma OP, Taylor CR, Rea TH. In situ demonstration of lymphocyte subsets in granulomatous inflammation: leprosy rhinoscleroma and sarcoidoses. *Clin Exp Immunol* 1983; 51(3):430-8.
20. Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. In situ characterization of T-lymphocyte subsets in leprosy granulomas. *Int J Leprosy* 1982; 50(3): 361-2.
21. Modlin RL, Gebhard JF, Taylor CR, Rea TH. In situ characterization of T-lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. *Clin Exp Immunol* 1983; 53(1):17-24.
22. Convit J, Pinardi ME, Rojas FA. Some considerations regarding the immunology of leprosy. *Int J Leprosy* 1971; 39(2):556-64.
23. Rea TH, Quismorio FP, Harding B, Nies KM, Di Saia PJ, Levan NE, et al. Immunologic responses in patients with lepromatous leprosy. *Arch Dermatol.* 1976; 112(6): 791-800.
24. Nogueira MES, Vilani-Moreno FR, Silva EA, Arruda MSP. *Imunologia*. In: *Noções de Hansenologia*. 2ed. Bauru: Centro de Estudos “Dr Reynaldo Quagliato”. Instituto Lauro de Souza Lima, 2000. p. 27-42.
25. Ávila JL, Convit J. Studies on cellular immunity in leprosy. I Lysosomal enzymes. *Int J Leprosy* 1970; 38(4): 359-364.
26. Foss NT. Aspectos Imunológicos da hanseníase. In: *Simpósio: Hanseníase*. Medicina Ribeirão Preto 1997; 30:335-339.
27. Goulart IMB, Penha GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(4):365-375.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

28. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: Insights from Leprosy. *J Invest Dermatol* 1994; 102(6):828-32.
29. Mutis T, Kraakman EM, Cornelisse YE, Haanen JB, Spits H, De Vries RR, et al. Analysis of cytokine production by Mycobacterium- reactive T cell. Failure to explain Mycobacterium leprae- specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. *J Immunol* 1993; 150(10):4641-51.
30. Hayashi Y. Skin Testing with leprosy bacillus suspensions. *Int J Leprosy* 1953; 21:370-72.
31. Mitsuda K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. *Int J Leprosy* 1953; 21:347-58.
32. Hayashi F. Mitsuda's skin reaction in leprosy. *Int J Leprosy* 1933; 1:31-8.
33. Brasil, Leis e Decretos, etc. Instruções para a execução das normas baixadas pela Portaria Ministerial nº 165/Bbs, 14 de maio de 1976. *Diário Oficial*, 3 de fev.1977.p-1487.
34. Convit J, Pinardi ME. Leprosy: confirmation in the armadillo. *Science* 1974; 184(142): 1191-2.
35. Meyers WM, Kvernes S, Binford CH. Comparison of reactions to human and armadillo lepromins in leprosy. *Int J Leprosy* 1975; 43(3): 218-5.
36. Madeira S, Rosa PS. Hanseníase Experimental. In: *Noções de Hansenologia*. 2ed. Bauru: Centro de Estudos "Dr Reynaldo Quagliato" Instituto Lauro de Souza Lima, 2000. p.19-26.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

37. Bloom BR. Recommended safety requirements for the preparation of lepromin: a WHO memorandum. Bull WHO 1979; 57:921-3.
38. Brennan PJ. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. Lepr Rev 2000; 71:S50-4.
39. Fernandez JMM. The early reaction induced by lepromin. Int.J.Lepr 1940; 8:1-14.
40. Rotberg, A. Some aspects of immunity on leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis and classification of forms of the disease. Based on 1529 lepromin-tested cases. Rev. Brás. Lepr.1937; 5:45-97.
41. Beiguelman B. A reação de Mitsuda oitenta anos depois. Hansen Int 999 ; 24(2) :144-161.
42. Dausset J, Henna A. Presence d'une leucoagglutinine dans le serum d'un cas d'agranulocytose chronique. C R Soc Biol 1952; 146:1539.
43. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. J Clin Invest 1958; 37:1756.
44. Vanrood JJ, Eernisse JG, Vanleeuwen A. Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature 1958; 181:1735.
45. Mc Devitt HO. Regulation of immune response by the major histocompatibility system. N Engl J Med 1980; 303:1514-1517.
46. Stastny P, Ball EJ, Dry PJ, Nunez G. The human immune response region (HLA-D) and disease susceptibility. Immunol Rev 1983; 70:113-153.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

47. Munro A, Bright S. Products of the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response. *Nature* 1976; 264: 145-152.
48. Sasazuki T, Nishimura Y, Muto M, Ohta N. HLA-linked genes controlling immune response and disease susceptibility. *Immunol Rev* 1983; 70: 51-75.
49. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.
50. Goodman JW. Antigen Presentation & the Major Histocompatibility Complex. In: Appleton & Lange, ed. Basic & Clinical Immunology; 1994. p. 58-65.
51. Strachan T. Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *Br Med Bull* 1987; 43(1):1-14.
52. Strominger JL. Structure of class I and II HLA antigens. *Br Med Bull* 1987; 43(1):81-93.
53. Trowsdale J. Genetics and polymorphism: class II antigens. *Br Med Bull* 1987; 43(1):15-36.
54. Koskimies S, Eklund B. MHC genes and histocompatibility. A review. *Ann Chir Gynaecol*. 1997; 86 (2):171-9.
55. Goodfellow PN, Jones EA, Van Heiningen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V, et al. The β 2- microglobulin gene is on chromosome 15, and not in the HL-A region. *Nature* 1975; 254:267-269.
56. Williams AF. A year in the life of immunoglobulin superfamily. *Immunol Today* 1987; 8(10):298-303.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

57. Breitmeyer JB. Lymphocyte activation. How T cells communicate. *Nature* 1987; 329: 760-761.
58. Naik S. The Human HLA System. *J Indian Rheumatol Assoc* 2003;11:79-83.
59. De Lima MG, Mussatti CC. Complexo HLA e doenças. *Rev Bras Alerg Imunol.* 1989; 12(6): 185-190.
60. Musatti CC, De Lima MG. Funções biológicas das moléculas HLA. *Rev Bras Alerg Imunol.* 1989; 12: 178-184.
61. Baur MP, Danilovs JA. Population analyses of HLA-A, B, C, DR and the order genetic markers. In: Terasaki PI. *Histocompatibility Testing*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratories; 1980. p. 995-2110.
62. Baur MP, Neugebauer M, Albert ED. Reference tables of two-locus haplotype frequencies for all MHC markers loci. In: Albert ED, Baur MP, Mayr WR. *Histocompatibility Testing*. Berlin: Springer-Verlag; 1984. p.677-678.
63. Tiwari JL, Terasaki PI. *HLA and disease association*. Berlim: Springer-Verlag;1985.
64. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, w27, with ankylosing spondilitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-706.
65. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD. Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet* 1973; 1:904.
66. Klein J, Sato A. The HLA System. Review Articles. *Advances in Immunology*. The New England Journal of Medicine 2000; 343(11):782-786.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

67. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue antigens* 1994; 43:18-27.
68. Green JR, Woodrow JC. Sibling method for detecting HLA-linked genes in disease. *Tissue antigens* 1977; 9:31-35.
69. Hors J. HLA et maladies. In: Dausset J& Pla M ed. *HLA Complexe Majeur d' hitocompatibilité de l'homme*. Paris:Flammarion Medicine-Sciences;1985.
70. Petzel-Erler ML. Genetics of the immune response and disease susceptibility. *Cienc Cult (São Paulo)* 1999; 51: 199-211.
71. Lagrange PH, Abel L. Susceptibilité génétique à la lèpre chez l'homme. *Acta Leprol* 1996; 10(1): 11-27.
72. Marcos EVC. Imungenética. In: *Noções de Hansenologia*. 2ed.Bauru: Centro de Estudos "Dr Reynaldo Quagliato".Instituto Souza Lima, 2000.p.43-46.
73. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Imunologia*.4ed.2002. Revinter. Rio de Janeiro.
74. Ottenhoff THM. Immunology of leprosy. New developments. *Trop Geogr Med*. 1994; 46(2):72-80.
75. Thorsby E, Godal T, Myrvang B. HLA antigens and susceptibility to diseases. II. Leprosy. *Tissue antigens*1973; 3(5): 373-7.
76. Mehra NK, Dasgupta A, Ghei SK, Vaidya MC. Histocompatibility antigens (HLA-A) in leprosy. *Tissue antigens* 1975; 5(2):85-87.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

77. Greiner J, Schleiermacher E, Smith T, Lenhard V, Vogel F. The HLA system and leprosy in Thailand. *Hum Genet* 1978; 42(2): 201-13.
78. Chan SH, Oon BB, Kamarudin A, Wee GB. HLA and leprosy in Chinese. *Tissue antigens* 1979; 13(1): 73-4.
79. Miyanaga K, Juji T, Maeda H, Nakajima S, Kobayashi S. Tuberculoid leprosy and HLA in Japanese. *Tissue antigens* 1981; 18(5): 331-4.
80. Agrewala JN, Ghei SK, Sudhakar KS, Girdhar BK, Sengupta U. HLA antigens and erythema nodosum leprosum (ENL). *Tissue antigens* 1989; 33(4): 486-87.
81. Van Eden W, Mehra NK, Vaidya MC, D'Amarco J, Schreuder GMTh, Van Rood JJ. HLA and sporadic tuberculoid leprosy: a population study in Maharashtra, India. *Tissue antigens* 1981; 18(3): 189-94.
82. Van Eden W, de Vries RR, D'Amaro J, Schreuder I, Leiker DL, Van Rood JJ. HLA-DR associated genetic control of the type of leprosy in a population from Surinam. *Human Immunol.* 1982; 4(4):343-50.
83. Izumi S, Sugiyama K, Matsumoto Y, Ohkawa S. Analysis of the immunogenetic background of Japanese leprosy patients by the HLA system. *Vox sang* 1982; 42(5): 243-247.
84. Ottenhoff THM, Gonzalez NM, De Vries RR, Convit J, Van Rood JJ. Association of HLA specificity LB-E12 (MB1, DC1, MT1) with lepromatous leprosy in a Venezuelan population. *Tissue antigens* 1984; 24 (1): 25-29.
85. Visentainer JEL, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzel-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Bras J Med Biol Res.* 1997; 30(1): 51-9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

86. Marcos EVC, Souza FC, Ura S, Opromolla DVA. Estudo de associação entre antígenos HLA e reação hansênica tipo 1 ulcerada. *An Bras Dermatol* 2000; 75(3): 283-290.
87. Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA, Beena KR, Stastny P. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from North Índia. *Tissue antigens* 1993; 42:133-137.
88. Hegazy AA, Abdel-Hamid IA, Ahmed el-SF, Hammad SM, Hawas SA. Leprosy in a high-prevalence Egyptian village: epidemiology and risk factors. *Int J Dermatol* 2002; 41(10): 681-6.
89. Klatser PR, Janson AM, Thole JE, Buhner S, Bos C, Soebono H, et al. Humoral and cellular immune reactivity to recombinant *M.leprae* antigens in HLA-typed leprosy patients and healthy controls. *Int J Lepr* 1997; 65(2): 178-89.
90. Gorodezky C, Alaez C, Munguía A, Cruz R, Vazquez A, Camacho A, et al. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis* 2004; 84:82-92.
91. Fitness J, Tosh K, Hill AVS. Genetics of susceptibility to leprosy. *Review. Genes and Immunity* 2002; 3:441-453.
92. 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* 2000; 177(1):133-145.
93. Hatagima A, Opromolla DVA, Ura S, Feitosa MF, Beiguelman B, Krieger H. No evidence of linkage between Mitsuda reaction and the NRAMP1 locus. *Int J Leprosy* 2001; 69 (2):99-103.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

94. Mira MT, Alcaïs 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.
95. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Guia para Utilização de Medicamentos e Imunobiológicos na área de Hanseníase. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 2000.
96. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
97. Svejgaard A, Ryder LP. Association between HLA and disease. In: Dausset J, Svejgaard A eds. *HLA and disease*. Copenhagen: Munksgaard; 1977.
98. Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings, R.C. *Leprosy*. 2.ed.Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p.30.
100. Lana FCF, Lima RF, raujo MG, Fonseca PT. Situação epidemiológica da hanseníase no município de Belo Horizonte - MG período 92/97. *Hansen. Int.* 2000; 25(2): 21-133.
101. Asseis EA, Tornero N, Magalhães LB, Priscinoti T, Barth YL, casagrande NA. Alguns aspectos sobre a hanseníase na região de Londrina-Pr. 1968-1978. I. Características Gerais. *Hansen. Int.*, 1981; 6(1): 55-62.
102. Barro MPA. Avaliação da situação da hanseníase no município de Londrina de 1997 a 2001: aspectos epidemiológicos, operacionais e organizacionais. *Hansen. Int.*, 2004; 29(2): 110-117.
103. Bechelli LM, Rotberg A. Idade e Lepra: estudo dos fatores exposição e resistência. *Ver. Bras. Leprologia* 1949, 17(1): 31-44.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

104. Bechelli Lm, Domingues VM, Patwary KM. WHO epidemiologic random sample survey of leprosy in Northern Nigéria (Katsina), Cameroon and Thailand(Khon Kaen). *Int. J. Leprosy* 1966 34(3): 223-243.
105. Brasil MTLRF. Estudo soropidemiológico de hanseníase em área de alta endemicidade no estado de São Paulo. 1995. Hansen. *Int. J. Leprosy* 1998 ;23(20) :35-48.
106. Irgens LM. Secular trends in leprosy: increase in age at onset associated with declining rates and long incubations periods. *Int. J. Leprosy* 1985, 53(4): 610-617.
107. Fine PEM, Sterne JAC, Punnighaus Jm, Rees RJW. Delayed-type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. *Lancet* 1994; 344:1245-49.
108. Brennan PJ, Terlouw SM. New sin test antigens for diagnosis of leprosy. Transactions of the 15 th International leprosy Congress. *Int J. lepr*, 1998; 66:96A.
109. Dockrell HM. *Infection and Immunity* 2000; 68(10):5846-55.
110. Azulay RD, Andrade LMC, Silva C, Rabelo-Neto AV, Azulay JD, Neves RG et al. Comparison of the macroscopic readings and microscopic findings of the lepromin reaction. *Int J of Leprosy* 1960; 28:38-43.
111. Petri V, Mendes EV, Beiguelman B. Histology of the Mitsuda reaction of healthy adults with no know contacts with leprosy lesions. *Int.J. Leprosy* 1985; 53:540-545.
112. Britton WT. Leprosy 1962- 1992: immunology of leprosy. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1993; 87: 508-514.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

113. Ottenhoff THM, Converse GB, De Vries RRP. HLA Antigens and Neural Reversal Reaction in Ethiopian Borderline Tuberculoid Leprosy Patients. *Int. J. Leprosy* 1987;55(2):261-66.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
declaro que fui devidamente informado e concordo em participar do projeto de pesquisa denominado: "**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE REAÇÃO DE MITSUDA E FENOTIPAGEM HLA EM PACIENTES HANSENIANOS**", que está sendo realizado sob responsabilidade da Dr^a Maria Esther Salles Nogueira e Fabiana Covolo de Souza, no Instituto Lauro de Souza Lima.

O presente estudo tem por finalidade verificar se existe relação entre a reação de Mitsuda e os antígenos do complexo HLA. Para tanto, será necessário coletar 5ml de sangue venoso periférico (uma colher de sopa).

Declaro também que estou ciente de que os responsáveis por este trabalho estarão disponíveis em responder a quaisquer dúvidas de minha parte.

Por estes termos, firmo o presente.

Bauru, ____ de _____ de _____.

participante

orientador

pesquisador

ANEXOS

Reagentes utilizados na extração do DNA

Reagente 1:

Tampão para lise de células vermelhas 5X:

548g sucrose (concentração final 1,6M)

50 ml Triton-X (concentração final 5% v/v)

25 ml MgCl₂·6H₂O 1M (concentração final 25 mM)

60 ml Tris-HCl pH 7,5 (concentração final 60 mM)

Dissolver a sucrose em 500 ml de água pura. Adicionar o Triton-X, MgCl₂·6H₂O e o Tris-HCl. Ajustar o volume para 1000 ml com água pura. Estocar a 4°C. Para uso diluir para 1X.

Reagente 2:

Tampão Proteinase K:

750 µl NaCl 5M (concentração final 0,12M)

2,4 ml EDTA 0,5M pH 8,0 (concentração final 0,12M)

Ajustar o volume para 10 ml com água pura. Filtrar com Millipore 0,45µm. Estocar a 4°C.

Reagente 3:

Solução da enzima Proteinase K:

10 mg proteinase K

1 ml de água pura

Dissolver a proteinase em água pura. Estocar a -20°C . Preparar alíquotas com pequenos volumes para o congelamento.

Reagente 4:

Solução de SDS 20%:

2 g de SDS

Dissolver em 8 ml de água pura. Ajustar o volume para 10 ml. Estocar em temperatura ambiente.

Reagente 5:

Solução de NaCl 6M:

350,6g NaCl

Dissolver em 800ml de água pura. Ajustar o volume para 1000ml. Preparar, deixar descansar 24 horas, retirar o sobrenadante para utilizá-lo. Autoclavar e estocar em temperatura ambiente.

Reagente 6:

Tampão TBE 10X:

108g de tris base

55g de ácido bórico

40 ml de EDTA 0,5M pH 8,0

Dissolver o tris e o ácido bórico em 700 ml de água pura. Adicionar o EDTA. Ajustar o volume para 1000 ml. Estocar em temperatura ambiente. Para uso diluir para 1X.

Protocolo de leitura utilizado nas tipificações HLA:

WORKSHEET
Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray, Lot #05A

Cat #SSP2L & LSSP2L

Patient Male
 Donor Female

Name _____

Sample I.D. _____ Race _____ Birthdate _____ ABO/Rh _____

Disease _____ Relationship to Patient _____

Results _____ Tray Exp. Date _____
_____ Tray Dot # _____
_____ D-mix Lot #/Batch # _____

Comments: _____

(384-Well Format Only)
Load Position: 1 2
 4 3
Test No.: _____

Photo Documentation

Test Performed by _____ Date _____
Read by _____ Date _____
Reviewed by _____ Date _____

Position 2C/6C/10C: 125 / 175 / 200 bps
Position 2A/6A/10A: 100 / 125 / 150 / 175 / 200 bps
Position 3F/7F/11F: 150 / 175 / 200 / 225 bps
Please refer to Primer Information document for revision information.
Nomenclature includes HLA alleles listed in the January 2004 update of the IMGT database (Robinson J, et al., "IMGT/HLA database - a sequence database for the human major histocompatibility complex." Tissue Antigen (2000) 55:280-287). Complete update information is located at www.anthonynolan.com/HIG/index.html.

SSP2L_05A_WS2 REV 4: PAGE 1 OF 3
One Lambda, Inc. 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com
Templ_SSP_WS2 Rev 3

WORKSHEET
Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray, Lot #05A

Name _____ Sample ID _____

DRB Loci		1/5/9					2/6/10					3/7/11					4/8/12																
		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A								
Reaction Results (mark positive locations)																																	
Approximate Product Size (bp)		750	200	200	200	200	125	125	100/125	200	100	125	125	200/225	175/200	125-200	125/150	100-200	200/225	200	150-225	175	200	250	250	200	175
Serology Equivalent	DRB Loci Allele Group																																
N.C.	Negative Control (betaglobin)																																
DR1,DR-	DRB1*010101-0202/04-11																																
DR103	DRB1*0103																																
DR17,DR-,DR3	DRB1*030101-0102/04-0502/09/13-16/18-20/22-23/25																																
DR18	DRB1*030201-03																																
DR3,DR17	DRB1*0306/11																																
DR3,DR-	DRB1*0307/21																																
DR-	DRB1*0308																																
DR17	DRB1*0310																																
DR3,DR13,DR6	DRB1*0312;DRB1*1320/29																																
DR-	DRB1*0317/24;DRB1*1344;DRB1*1442-43																																
DR4,DR-	DRB1*040101-14/16-50																																
DR4	DRB1*0415																																
DR7,DR-	DRB1*070101-08																																
DR8,DR-	DRB1*080101-08/10-16/18-19/22-24/26-27																																
DR8,DR-	DRB1*0809/21;DRB1*1415																																
DR8	DRB1*0817																																
DR-	DRB1*0820;DRB1*1347																																
DR9,DR-	DRB1*090102-03																																
DR10	DRB1*100101-0102																																
DR11,DR-	DRB1*110101-0105/0401-0402/0601-0602/09/15/18-19/24/2701-29/31-33/35/37-39/43-44/46-47/49																																
DR11,DR-	DRB1*1102/14/16/20-21/48																																
DR11,DR-	DRB1*1103/11/40-41																																
DR11,DR-	DRB1*1105/22/26/30/34																																
DR11	DRB1*1107																																
DR11,DR-	DRB1*110801-0802/42																																
DR11,DR-	DRB1*1110/1201-1202																																
DR11	DRB1*1113																																
DR-,DR14	DRB1*1117;DRB1*1411																																
DR11,DR-	DRB1*1123/25/45																																
DR-	DRB1*1136																																
DR12,DR-	DRB1*120101-0302/05-08																																
DR5	DRB1*1204																																
DR-	DRB1*1209																																
DR13,DR6,DR-	DRB1*130101-04/12/15-16/21-23/28/30-36/38-40/48-49/51-53/58-59/61																																
DR13,DR-	DRB1*1305-0702/10-11/1401-1402/26/37/42/46/50/62																																
DR13,DR-	DRB1*1308/19/57																																
DR-,DR14	DRB1*1309;DRB1*1422/24-25/37																																
DR13,DR-	DRB1*1313/55																																
DR13	DRB1*1317																																
DR13	DRB1*1318																																
DR-	DRB1*1324/54																																
DR-	DRB1*1325/56																																
DR13,DR-	DRB1*1327/41																																
DR-	DRB1*1343																																
DR-	DRB1*1345																																
DR-	DRB1*1360																																
DR14,DR-	DRB1*140101-0102/0701-08/26/35/39																																
DR14,DR-,DR6,DR13	DRB1*1402/0501-06/09/14/17-21/23/29-30/33/36/41/44-45/47-48																																
DR1403,DR14,DR-	DRB1*140301-0302/12/40																																
DR1404,DR14,DR-	DRB1*1404/10/28																																
DR14	DRB1*1413																																
DR6	DRB1*1416																																
DR14	DRB1*1427																																
DR-	DRB1*1431																																
DR-	DRB1*1432/34/38																																
DR-	DRB1*1446																																

SSP2L_05A_WS2 REV 4: PAGE 2 OF 3

One Lambda, Inc. 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com
 Templ_SSP_WS2 Rev 3



WORKSHEET

Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray, Lot #05A

Name _____

Sample ID _____

DRB Loci

		1/5/9					2/6/10					3/7/11					4/8/12																					
		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A					
Reaction Results (mark positive locations)																																						
Approximate Product Size (bp)		750	200	200	200	200	125	100/125	200	100	125	125	200/225	175/200	125-200	125/150	100-200	200/225	200	150-225	175	200	250	200	200	175												
Serology Equivalent	DRB Loci Allele Group																																					
DR15.DR2.DR-	DRB1*150101-14																																					
DR16.DR2.DR-	DRB1*160101-0501/07-08																																					
DR52.DR-	DRB3*010101-06/08-11;DRB3*0201-17; DRB3*030101-03																																					
DR52	DRB3*0107																																					
DR-	DRB3*0218																																					
DR53.DR53*Blank*.DR-	DRB4*01010101-06																																					
DR51.DR-.DR51*Blank*	DRB5*010101-12;DRB5*0202-05																																					

DQB1 Locus

		4/8/12							
		H	G	F	E	D	C	B	A
Reaction Results (mark positive locations)									
Approximate Product Size (bp)			225	225	200	225	125	125	200
Serology Equivalent	DQB Locus Allele Group								
DQ2	DQB1*0201-03								
DQ7.DQ-.DQ8	DQB1*030101-0102/04/09-10/13								
DQ8.DQ-	DQB1*030201-0202/0501-0503/07-08/11								
DQ9.DQ3.DQ-	DQB1*030302-0303/06/12								
DQ4	DQB1*0401-02								
DQ5	DQB1*050101-04								
DQ6.DQ-.DQ1	DQB1*060101-19/21								