



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

Gislaine Aparecida Querino

**Estudo de Associação dos genes
HLA-DPA1 e *HLA-DPB1* em Hanseníase**

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Carla Pereira Latini
Coorientador(a): Dra. Fabiana Covolo de Souza-Santana

**Botucatu
2018**

Gislaine Aparecida Querino

Estudo de associação dos genes *HLA-DPA1*
e *HLA-DPB1* em Hanseníase

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Ana Carla Pereira Latini

Coorientadora: Dra. Fabiana Covolo de Souza-Santana

Botucatu
2018

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Querino, Gislaine Aparecida.

Estudo de associação dos genes *HLADPA1* e *HLADPB1* em hanseníase / Gislaine Aparecida Querino. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Carla Pereira Latini

Coorientador: Fabiana Covolo de Souza-Santana

Capes: 20205007

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Hanseníase. 3. Antígenos HLA.
4. Polimorfismo (Genética).

Palavras-chave: HLA; Hanseníase; *Mycobacterium leprae*;
Polimorfismo de base única.

Dedicatória

Aos meus pais Antonio Carlos e Ana por todo apoio e incentivo

Ao meu esposo Luiz por toda compreensão, paciência e
cumplicidade

À Beatriz, a razão da minha existência

Agradecimentos

À Deus, por estar sempre presente

À minha orientadora, Dra. Ana Carla Pereira Latini, pela
oportunidade de aprendizagem

À minha co-orientadora, Dra. Fabiana Covolo de Souza-Santana
por toda ajuda e incentivo

À PqC Ms. Elaine Valim Camarinha Marcos, por ter proporcionado
o início dessa jornada

À Priscila Balallai , Mara Lúgia e Verônica pelo auxílio no laboratório
de imunogenética

À Priscila Medeiros e Rodrigo Mendes pelas análises estatísticas

A Equipe Técnica de Patologia do ILSL-Bauru pelo acolhimento,
apoio e ajuda

A Dra. Ana Paula e a Ms. Rute, coordenadoras dos cursos de
Biomedicina e Farmácia respectivamente e aos colegas da
FIB/Bauru por todo apoio e incentivo

Às PqCs Dra. Andrea e Dra. Patrícia pela confiança e oportunidade
de trabalho

Ao Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais pela
oportunidade

Aos pacientes

Meus sinceros agradecimentos

Epígrafe

“É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca”

D. Helder Câmara

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que pode se manifestar sob diferentes formas clínicas a depender da resposta imune celular do hospedeiro. Vários marcadores genéticos têm sido definidos e, devido à participação dos alelos HLA na resposta imune, estes têm sido amplamente estudados na hanseníase. O HLA-DP constitui uma das moléculas clássicas de classe II, com poucos estudos em hanseníase. O objetivo deste trabalho foi conduzir um estudo de associação genética de base populacional em hanseníase para os genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* com duas amostras caso-controle: a primeira de Rondonópolis-MT, uma região hiperendêmica para hanseníase, e a segunda do Estado de São Paulo, uma região com índices epidemiológicos controlados. Foram realizados estudos com 9 tag SNPs na região dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* na população de Rondonópolis-MT (411 casos e 357 controles). O SNP rs9277341 que apresentou dados de associação com significância estatística após a correção de Bonferroni foi então testado na população de São Paulo (570 casos e 380 controles). Para avaliar o efeito funcional deste marcador foi determinada a produção das citocinas IL-10 e TNF após estímulo com antígeno sonificado de *M. leprae* em 21 controles saudáveis. Na população de Rondonópolis-MT foi realizada a tipificação dos alelos HLA-DPA1* e HLA-DPB1* através da técnica de PCR-SSO empregando-se o kit *Labtype-SSO* (One Lambda, CA, USA). Os resultados de genotipagem mostraram associação com hanseníase *per se* para o marcador rs9377341 do gene *HLA-DPA1* e dois marcadores do gene *HLA-DPB1* (rs1431402 e rs9277469). Associações de proteção para a forma multibacilar da hanseníase foram encontradas para os marcadores rs9277341 e rs2301220 do gene *HLA-DPA1* e para o marcador rs31350221 do gene *HLA-DPB1*. O SNP rs9277341, com dados significativos após a correção de Bonferroni e testado na população do Estado de São Paulo, não apresentou associação com hanseníase. A avaliação funcional mostrou que os carreadores do alelo G do rs9277341 apresentaram níveis maiores de IL-10 e TNF. Na tipificação dos alelos HLA, o alelo HLA-DPB1*03 foi associado à hanseníase *per se* e o genótipo HLA-DPB1*02/03 foi associado à hanseníase

per se e à proteção para a forma MB. Esses dados sugerem a participação dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* nos desfechos da hanseníase.

Palavras chave: Hanseníase, HLA, *Mycobacterium leprae*, polimorfismo de base única.

ABSTRACT

Leprosy, a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, displays different clinical manifestations depending on the immune response of the host. Several genetic markers have been defined and due to the involvement of the HLA alleles in the immune response they were extensively studied in leprosy. However, HLA-DP is a classical class II molecule with few studies on leprosy. The objective of this study was to conduct a population-based genetic association study in leprosy for the *HLA-DPA1* and *HLA-DPB1* genes with two case-control samples: the first from Rondonópolis - Mato Grosso (MT), a hyperendemic region in leprosy and the second from the state of São Paulo, a region with controlled epidemiological indices. Studies were carried out with 9 Tag Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in *HLA-DPA* and *HLA-DPB* genes in the population from Rondonópolis – MT (411 cases and 357 controls). The SNP rs9277341 who presented association data with statist significance after the Bonferroni correction was tested in the São Paulo population (570 cases and 380 controls). To evaluate the functional effect of this marker was carried a study of the production of IL-10 and TNF cytokines after stimulation with the sonicated antigen of *M. leprae* in 21 healthy controls. In the Rondonópolis populations was performed the HLA-DPA1* and HLA-DPB1* allele typing by Sequence-Specific Oligonucleotide – Polymerase Chain Reaction (SSO- PCR) using the Labtype-SSO kit (One Lambda, CA, USA). The genotyping results showed association with leprosy *per se* for the SNP rs9277341 in the *HLA-DPA1* gene and two markers in the *HLA-DPB1* gene (rs1431402 and rs9277469).The protections associations for the multibacilar form the leprosy was found for the markers rs9277341 and rs2301220 in the *HLA-DPA1* gene and the marker rs 31350221 in the *HLA-DPB1* gene. The rs9277341 with significatif datas after the Bonferroni correction and tested in the São Paulo state showed no association with leprosy. The functional study showed significantly increased IL-10 and TNF levels in G carriers. HLA typing analysis the HLA-DPB1*03 allele was associated

with leprosy *per se* and the HLA-DPB1*02/03 genotype was associated with leprosy *per se* and the protection with MB form. These data suggest an association of *HLA-DPA1* and *HLA-DPB1* genes with leprosy.

Keywords: Leprosy, HLA, *Mycobacterium leprae*, single-nucleotide polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

APC- célula apresentadora de antígenos
CCDC122 – do inglês *coiled-coil domain containing 122*
CD – grupo de diferenciação (*cluster of differentiation*)
CLIP – do inglês *class II-associated chain peptide*
D – grupo dimorfo
DC-SIGN – do inglês *dendritic cell-specific intercelular*
DD – dimorfo-dimorfo
DNA – ácido dextrorribonuclêico
DT – dimorfo-tuberculóide
DV – dimorfo-virchowiano
EDTA – ácido etileno diamino tetracético
ELISA – ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immnosorbent assay*)
ENH- eritema nodoso hansênico
GWAS – do inglês *genome wide association*
HI – hanseníase indeterminada
HLA – antígeno leucocitário humano
IB- índice baciloscópico
IFN – interferon
Ig - Imunoglobulina
Ii- cadeia invariante do HLA
IL – interleucina (interleukina)
IM- índice morfológico
LACC1 – do inglês *laccase domain containing 1*
LID-1 – do inglês *Leprosy IDRI diagnostic 1*
LRRK2 – do inglês *Leucine-rich repeat kinase 2*
LTA – linfotoxina alfa
MB- pacientes multibacilares
MHC- complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)
NDO-HSA- do inglês *Natural disaccharide linked to human serum albumin via octyl*
NLRs – do inglês *NOD-like receptor*
NOD – do inglês *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain*
NOD-LID1 – do inglês *Natural disaccharide octyl-Leprosy IDRI Diagnostic 1*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PABA - ácido para-aminibenzóico
PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecule patterns*)
PB- pacientes paucibacilares

PBMC – células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
PGL-1 – glicolípido fenólico I (*phenolic glycolipid I*)
PQT – poliquimioterapia
PRRs – receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptor*)
RIPK2 – do inglês *Receptor interacting protein kinase 2*
RR- Reação reversa
rRNA – RNA ribossomal
SNP – polimorfismo de base única (*single nucleotide polymorphism*)
T – pólo tuberculóide (*tuberculoid*)
TAP – transportador associado ao processamento de antígenos
TCR – receptor de linfócitos T (*T cell receptor*)
TGF – do inglês *transforming growth factor*
Th – T auxiliar (T helper)
TLRs – receptores do tipo *Toll like*
TNF – fator de necrose tumoral (*tumoral necrosis factor*)
Tregs – linfócitos T reguladores
TT – tuberculóide-tuberculóide
V – pólo virchowiano
VV – virchowiano-virchowiano
WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura	
1.1. Aspectos Gerais da Hanseníase.....	1
1.2. Manifestações Clínicas.....	4
1.3. Diagnóstico.....	6
1.4. Tratamento.....	8
1.5. Imunologia.....	9
1.6. Genética.....	11
1.7. Complexo HLA.....	13
1.8. Complexo HLA e Hanseníase.....	15
2. Objetivos	
2.1. Objetivos Gerais.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. Referências.....	20
4. Manuscrito.....	27
4.1. Introdução.....	28
4.2. Materiais e Métodos.....	30
4.2.1. População.....	30
4.2.2. Seleção de Marcadores.....	32
4.2.3. Extração de DNA e Genotipagem de <i>tag</i> SNPs.....	32
4.2.4. Tipificação de HLA.....	33
4.2.5. Cultura de células (PBMC) e quantificação de citocinas.....	33
4.2.6. Análise Estatística.....	33
4.3. Resultados.....	34
4.4. Discussão.....	37
4.5. Referências.....	40
5. Conclusão.....	43
6. Tabelas Suplementares.....	44

1. Revisão de Literatura

1.1. Aspectos Gerais da Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um patógeno intracelular que infecta primariamente macrófagos na pele e células de Schwann nos nervos periféricos¹. Recentemente, foi descoberta uma nova espécie de bacilo relacionado à hanseníase, o *Mycobacterium lepromatosis* sp. Essa nova espécie foi descrita com base em diferenças genéticas significativas em relação ao *M. leprae*².

A hanseníase é considerada uma das doenças mais antigas, com relatos que datam de 600 a.C, principalmente na Ásia e África, consideradas como regiões de origem da doença³. Destes locais, a hanseníase foi levada para outras regiões em razão dos movimentos migratórios⁴. A doença teria sido trazida à Europa pelas tropas de Alexandre o Grande, quando retornaram das conquistas no mundo desconhecido e trouxeram indivíduos contaminados com a doença nas campanhas da Índia (300 a.C.)⁵.

Uma descrição autêntica da hanseníase foi encontrada em um manuscrito chinês (“Remédios Secretos”) escrito há aproximadamente 190 a.C. onde é relatada uma doença que provocava perda de sensibilidade e o aparecimento de manchas vermelhas que após o inchaço inicial, ulceravam. Na sequência, ocorria a queda de sobrancelhas, cegueira, deformidade nos lábios, rouquidão, ulceração das plantas, desabamento do nariz e deslocamento de articulações⁶.

A chegada da hanseníase nas Américas é atribuída aos colonizadores espanhóis e portugueses aproximadamente entre os séculos XVI e XVII. Na América do Sul, os primeiros doentes foram observados na Colômbia e eram de origem espanhola^{3,6}. O maior fator de expansão da doença nas Américas é atribuído ao comércio de escravos. No Brasil não havia hanseníase entre os indígenas⁶. A suposta penetração no Brasil através do comércio de escravos contribuiu para o aumento do estigma da hanseníase, pois além das deformidades visíveis, somava-se a marca da origem escrava⁷. Entretanto, segundo Opromolla é discutível o papel desempenhado pelos escravos na

disseminação da doença, pois era difícil a negociação de escravos que apresentassem lesões de pele³. Os primeiros casos de hanseníase no Brasil foram notificados no ano de 1.600 no Rio de Janeiro de onde se espalhou para a Bahia e Pará e em seguida para o resto do país⁶.

A doença era considerada de caráter hereditário até o século XIX, quando o médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, ao analisar o material de lesões cutâneas, descobriu o *M. leprae*, o bacilo causador da doença⁷.

É uma doença infecciosa de evolução crônica, com incidência anual de aproximadamente 215.000 casos no mundo; após a instituição da poliquimioterapia (PQT), houve um declínio da doença na América Latina. Em 2016, o número de casos novos diagnosticados no mundo foi de 214.783, sendo que nas Américas o número foi de 27.356 e destes, 25.218 casos novos foram diagnosticados no Brasil. Considerado um dos principais países endêmicos, o Brasil, ocupa a segunda posição, abaixo da Índia que alberga o maior número de casos da doença (135.485 novos casos em 2016)⁸. Devido à alta incidência, a hanseníase é considerada um problema de saúde pública e social. Embora seja uma doença de baixa mortalidade, apresenta alta morbidade. Os pacientes acometidos apresentam morbidades relacionadas às deformidades e incapacidades físicas, que podem levar a discriminação e segregação dos doentes³.

O *M. leprae* pertence à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*. É um bacilo reto ou levemente encurvado, microaerófilo, imóvel, não formador de esporos, álcool ácido resistente com incapacidade de crescimento em meios artificiais. É um parasita intracelular obrigatório, predominante em macrófagos com afinidade por células cutâneas como queratinócitos, macrófagos e histiócitos e por células do sistema nervoso periférico como as células de Schwann¹.

A parede celular do *M. leprae* é constituída por ácido micólico, peptidoglicano e arabinogalactana. A interação com a laminina presente nas células de Schwann ocorre através de um lipídio específico do *M. leprae*, o glicolípido fenólico I (PGL-1) presente na camada externa^{1,3}.

Em 2001 foi publicado o sequenciamento completo do genoma do *M. leprae*, demonstrando que o bacilo da hanseníase possui aproximadamente 3,27 Mb, e que sofreu uma redução evolucionária comparado ao *Mycobacterium tuberculosis* que possui aproximadamente 4,41 Mb. Apresenta ainda um aumento notável do número de pseudogenes no seu genoma, sendo esta a mais provável justificativa para o seu desenvolvimento lento e a incapacidade do cultivo *in-vitro*⁹.

Em pesquisas realizadas com polimorfismos de base única (SNPs) por Monot e cols. foram encontradas diferenças entre sete cepas oriundas de diferentes partes do planeta. Os SNPs foram selecionados a partir de uma cepa Brasileira (Br4923), escolhida devido ao isolamento geográfico relativo do país e pelo fato do Brasil ser o segundo em número de casos. A análise encontrou cinco SNPs, sendo que um localiza-se em uma região não-codificante e quatro estão inseridos em pseudogenes. Quando foram feitas as análises das sete cepas distintas observou-se que o DNA do *M. leprae* é excepcionalmente bem conservado e que este bacilo é altamente clonal^{4,10}.

Posteriormente, após a análise de três SNPs informativos, encontrou-se quatro combinações diferentes, demonstrando que existe uma correlação entre a origem geográfica do paciente e o perfil genético da cepa. A partir daí foi possível obter informações sobre a rota de disseminação da doença pelo mundo, com provável origem no continente africano e uma possível disseminação através do comércio de escravos, os quais eram levados para outros continentes. Tudo indica que na maior parte do continente americano, a doença foi introduzida por colonizadores e imigrantes do velho mundo¹⁰.

Em estudo mais recente a cepa de Tamil Nadu, da Índia e a Br4923 do Brasil, foram novamente sequenciadas e comparadas revelando um baixo nível de diversidade. Para fins filogeográficos foram feitas novas análises envolvendo 78 SNPs informativos, permitindo classificar o *M. leprae* em 16 subtipos (A-P), para os quais foi possível fazer uma correlação entre distribuição geográfica, padrões de migração para os continentes e a rota de comércio. A partir destes dados foi possível o aprofundamento na compreensão da disseminação da hanseníase pelo mundo e a confirmação da associação entre o tipo de SNP e a origem geográfica das cepas. Análises filogenéticas recentes

que compararam amostras antigas e modernas de *M. leprae*, identificaram que o subtipo 3K é o *M. leprae* mais antigo¹¹.

1.2. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da hanseníase estão relacionadas com resposta imunológica do hospedeiro frente ao bacilo¹.

A classificação clínica de Ridley & Jopling (1966), a mais utilizada, considera aspectos clínicos, imunológicos, microbiológicos e histológicos e compreende: um polo tuberculoide (TT), onde os pacientes apresentam imunidade celular eficiente contra o *M. leprae*; um polo virchowiano (VV), onde os pacientes apresentam resposta imune celular ineficiente contra o bacilo; e formas intermediárias denominadas dimorfas, divididas em três de acordo com a resposta imunológica do paciente: DT– dimorfa-tuberculóide; DD – dimorfa-dimorfa; DV-dimorfa-virchowiana¹².

A classificação clínica da hanseníase adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sofreu algumas modificações ao longo dos anos. Para facilitar o diagnóstico e o tratamento da hanseníase, a OMS propôs em 1982 classificar os pacientes em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB) de acordo com a classificação de Ridely & Jopling e em relação à baciloscopia¹². Assim, pacientes TT e DT com baciloscopia ≤ 1 foram classificados como PB e pacientes DD, DV e VV com baciloscopia ≥ 2 classificados como MB¹³. Em 1988, a OMS alterou a classificação e considerou qualquer paciente com baciloscopia positiva como MB e pacientes com baciloscopia negativa como PB¹⁴. Em 1996, em razão de dificuldades operacionais para execução da baciloscopia e para fins de tratamento, a OMS adotou a classificação de acordo com o número de lesões: pacientes que apresentam menos do que cinco lesões como PB e como MB, os pacientes que apresentam mais do que cinco lesões¹⁵.

A hanseníase indeterminada (HI) é a fase inicial da doença, sem resposta imunológica definida. É caracterizada por máculas hipocrômicas com bordas não definidas com alteração de sensibilidade térmica, onde o número pode variar de acordo com a resposta imune celular do paciente. Não há comprometimento de nervos periféricos, incapacidades ou deformidades. De acordo com o perfil imunológico do indivíduo, pode evoluir para cura

espontânea, permanecer como grupo indeterminado ou evoluir para as formas clínicas da hanseníase. A presença de lesões infiltradas indica evolução para outras formas clínicas¹.

A forma TT apresenta pequeno número de lesões, geralmente hipopigmentadas, com bordas um pouco elevadas, bem delimitadas e centro plano. Alterações de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa são observadas. A baciloscopia é negativa e reação de Mitsuda positiva. Em razão de uma boa resposta imune celular, a presença de granulomas é uma observação frequente no exame histopatológico e isto dificulta a multiplicação bacilar. O sistema nervoso periférico pode ser comprometido de forma precoce e causar danos irreversíveis.^{1,3,16}.

A forma VV apresenta resposta imune celular deficiente, numerosas lesões com alto número de bacilos detectáveis ao microscópio, que se replicam descontroladamente e promovem infiltração de peles e nervos. São observados pápulas e nódulos (hansenomas) geralmente bilaterais e simétricos. Pode haver presença de madarose, xerose e edema de extremidades. Há perda de sensibilidade e espessamento de nervos. A reação de Mitsuda é negativa^{1,16}. A histopatologia revela a presença de macrófagos repletos de bacilos e micro colônias chamadas globias¹.

O grupo dimorfo é considerado instável, e de acordo com a resposta do hospedeiro ao bacilo, pode variar entre os pólos TT e VV. Pacientes DT apresentam placas eritematosas com variação de tamanho e número, com baciloscopia negativa ou fracamente positiva. Pacientes DV apresentam lesões em maior número com baciloscopia positiva e comprometimento de nervos periféricos. Pacientes DD apresentam máculas hipopigmentadas, baciloscopia positiva e comprometimento de nervos¹.

No decorrer da doença ou após o início do tratamento, alguns pacientes podem apresentar manifestações clínicas agudas secundárias à liberação de antígenos e a reações de hipersensibilidade. Essas reações são classificadas como tipo I e tipo II.

A reação tipo I é conhecida como Reação Reversa (RR), acomete principalmente pacientes DD e acontece após o aparecimento abrupto de um mecanismo de hipersensibilidade tardia contra as frações antigênicas do *M. leprae*. Há aumento relativo e absoluto de linfócitos TCD4+ com aumento de

citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF. É caracterizada pelo endurecimento e eritema extenso das lesões com neurite, o que leva a neuropatia motora e sensorial¹.

Nas reações tipo II ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) ocorre uma resposta inflamatória sistêmica associada a altas concentrações de TNF e a deposição de imunocomplexos, com infiltração de neutrófilos, ativação do complemento e comprometimento de vários órgãos. Acomete pacientes MB e é caracterizada por nódulos inflamatórios e lesões maculo-papulares na face, extremidades e no corpo. Os pacientes podem apresentar febre e algum grau de neurite com neuropatia motora e sensorial. Essas reações podem ser acompanhadas de iridociclite, orquite, artrite e miosite. Ocorre aumento de IFN- γ , TNF, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12¹.

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é clínico com a realização de exames dermatoneurológicos para identificar lesões ou áreas de pele com possíveis alterações de sensibilidade térmica, tátil e dolorosa. O diagnóstico laboratorial da hanseníase é importante para o diagnóstico diferencial com outras doenças dermatoneurológicas, casos suspeitos de recidiva e na classificação das formas clínicas da hanseníase¹⁶.

A baciloscopia de raspado dérmico da lesão, dos lóbulos das orelhas, cotovelos ou joelhos corados pelo Método de Ziehl-Neelsen avalia os índices baciloscópicos e morfológicos. O índice baciloscópico (IB) expressa o número de bacilos em uma escala logarítmica entre 0 e 6+. Pacientes MB apresentam IB positivo e pacientes PB apresentam IB negativo. O índice morfológico (IM) avalia a viabilidade do bacilo e é expresso em um percentual de bacilos íntegros em relação ao total de bacilos observados. Bacilos íntegros são observados em pacientes sem tratamento ou em casos de recidiva. Bacilos fragmentados apresentam pequenas falhas em sua parede celular em razão da interrupção da síntese de seus componentes. São considerados inviáveis ou mortos e são frequentes em pacientes após o tratamento. Bacilos granulados apresentam grandes falhas em sua parede celular com grânulos corados em

vermelho e também são considerados inviáveis ou mortos, frequentes em pacientes após o tratamento ¹⁷.

O exame histopatológico da biópsia de pele é considerado por Scollard e cols. o padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase. O exame permite a observação dos padrões histológicos da resposta imune do hospedeiro através da coloração de hematoxilina-eosina, o envolvimento de nervos cutâneos e a identificação dos bacilos álcool ácido resistentes dentro dos nervos através da coloração de Fite-Faraco^{1,17}. Essas observações são essenciais para confirmação do diagnóstico da hanseníase e classificação quanto à forma clínica, bem como estabelecer um diagnóstico diferencial com outras patologias como sarcoidose, granuloma anular, leishmaniose, linfoma cutâneo de células T entre outras ^{1,3}.

A reação de Mitsuda avalia a capacidade do indivíduo de estabelecer uma resposta imune celular frente ao patógeno. Utiliza-se uma suspensão de *M. leprae* inativados por calor úmido, injetada intradermicamente. O surgimento de pápula maior ou igual a 5mm após 4 semanas indica reação positiva e expressa resposta imune celular eficiente, com a formação de granulomas que impedem a multiplicação bacilar. A reação de Mitsuda não é específica para o *M. leprae*, mas uma resposta negativa ao teste está associada às formas DV e VV ^{1,18}.

Ensaio imunológico não são utilizados de rotina para o diagnóstico de hanseníase, mas podem em conjunto com a avaliação clínica auxiliar na classificação, monitorar o tratamento, identificar o risco de recidiva e fazer a avaliação dos contatos peridomiciliares¹⁹. Testes imunológicos como o anti-PGL-1, NDO-HSA, anti LID-1, anti NDO-LID1 têm sido utilizados principalmente em áreas endêmicas para avaliação de contatos e detecção precoce da hanseníase, com a finalidade de interromper a cadeia de transmissão da doença ²⁰⁻²³.

A detecção de anticorpos IgG e IgM contra o PGL-1 é o melhor teste imunológico padronizado e o mais utilizado em hanseníase. É realizado principalmente por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e a presença de anticorpos IgM no soro dos pacientes estão relacionados com a carga bacilar; títulos elevados são observados em pacientes MB e diminuídos em pacientes PB ^{19,23}.

Como o *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, a utilização de métodos moleculares auxilia a identificação do bacilo em amostras clínicas dos pacientes. Estes métodos compreendem a amplificação de sequências específicas do *M. leprae* através de PCR com posterior identificação de genes específicos do bacilo ou sequências específicas ^{1,24}.

1.4. Tratamento

O tratamento da hanseníase é realizado através da poliquimioterapia (PQT) padronizada em 1982 pela OMS (Organização Mundial de Saúde) e consiste da combinação de três medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina de acordo com a classificação operacional do paciente¹³.

A dapsona (4,41 Diamino-Diphenil-Sulfona) foi o primeiro agente antimicrobiano efetivo contra o *M. leprae*. É um medicamento bacteriostático e atua como antagonista competitivo do ácido para-aminibenzóico (PABA), o que impede sua utilização na síntese de ácido fólico pelo *M. leprae*. A clofazimina é um derivado iminofenazídico com leve ação bactericida que atua sobre o DNA do *M. leprae* inibindo sua replicação e crescimento. A rifampicina é um derivado semisintético da rifamicina B e tem ação bactericida. Atua sobre a enzima RNA-polimerase DNA dependente e inibe a síntese de RNA pelo bacilo ²⁵.

Nos pacientes PB o tratamento é realizado durante seis meses, através da associação de rifampicina (uma dose supervisionada mensal de 600mg) e dapsona (uma dose mensal supervisionada de 100mg e doses diárias de 100mg). Em casos de intolerância ou reações alérgicas a dapsona, utiliza-se clofazimina (dose diária de 50mg) e dose supervisionada mensal. Nos pacientes MB, o tratamento é realizado por 12 meses com associação de rifampicina (dose mensal supervisionada de 600mg), dapsona (dose mensal supervisionada de 100mg e dose diária de 50mg) e clofazimina (dose mensal supervisionada de 300mg e dose diária de 50mg). Se for necessário suspender a dapsona, a ofloxacina dever ser utilizada com uma dose mensal supervisionada de 400mg e dose diária de 400mg ¹⁶. No tratamento de reações tipo I é recomendado o uso de corticosteroides sem interrupção do esquema terapêutico da PQT. Nas reações tipo II é recomendado o uso da talidomida¹.

1.5. Imunologia

A resposta imune inata que é a primeira linha de defesa contra o *M. leprae* é considerada um fator crucial no desenvolvimento de uma resposta contra o bacilo²⁶. A exposição de um indivíduo ao *M. leprae* ao lado da influência de fatores genéticos e ambientais podem determinar a eficiência da resposta imune à infecção. Indivíduos com a doença podem evoluir para cura espontânea em razão de uma boa resposta imune e fatores genéticos ou podem desenvolver o espectro de hanseníase ^{27,28}.

A linha inicial de interação entre o bacilo e o hospedeiro é mediada através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) sendo os mais importantes os tipo Toll (TLRs), tipo NOD (NLRs) e os receptores do tipo lecitina C, como DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin*) e Decitina 1, que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) no bacilo. Receptores como TLR1/2 são os primeiros a atuar no processo de ativação da resposta imune inata. TLR1 reconhecem as lipoproteínas do *M. leprae* e promovem a diferenciação de monócitos em macrófagos com sinalização para produção de citocinas como IFN-gama e IL-6. Induzem também a maturação de células dendríticas CD1b⁺ que podem ativar outras células efetoras do sistema imune, como as células T e promover a eliminação do patógeno através de mecanismos microbicidas do hospedeiro^{1,26,29}. A regulação e a produção de citocinas podem influenciar a força da resposta imune e conseqüentemente as diferentes formas clínicas observadas na hanseníase. Polimorfismos genéticos também são capazes de regular os níveis de citocinas ²⁸. TLR2 participa da ativação da via antimicrobiana ativada pela vitamina D, que consiste na indução da produção de peptídeos antimicrobianos como a catalelicidina ²⁶.

Nos pacientes TT, a resposta Th1 ocorre da ativação de células TCD4⁺ por macrófagos que levam a produção de citocinas como IFN γ , IL-2 e TNF, com conseqüente imunidade mediada por células. O TNF é associado à resistência ao *M. leprae*, atuando na formação e estabilização do granuloma após a infecção do bacilo ^{22,29}.

Em indivíduos VV, ocorre ativação da resposta Th2, com produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, que inibem a função microbicida dos macrófagos. Há aumento de carga bacilar, ativação dos linfócitos B e produção de anticorpos ineficazes para a contenção da disseminação bacilar ²⁶.

A IL-10 secretada pelos monócitos/macrófagos possui atividade anti-inflamatória com inibição da produção de IL-1, IL-6 e TNF em culturas de polissacarídeos e IFN-gama em macrófagos ativados. Altos níveis de IL-10 e a baixa razão entre TNF/IL-10 têm sido correlacionados com hanseníase multibacilar, anergia de células T em pacientes VV e progressão da doença. Vários polimorfismos na região do gene *IL10* tem sido estudados e correlacionados com suscetibilidade a hanseníase e dentre eles, o SNP rs1800871 (-819C>T) que foi associado com a suscetibilidade à hanseníase na população brasileira³⁰.

Em indivíduos dimorfos as manifestações imunológicas podem oscilar entre os perfis Th1 e Th2 ²⁸.

Outros subtipos de células T como Th17 e Tregs também podem ter um papel crítico na resposta imune em hanseníase ³¹. Linfócitos Th17 tem atividade pró-inflamatória e produzem as citocinas IL-17, IL-22 e IL-21 que já foram associadas à hanseníase. Saini e cols. em 2013, evidenciaram o aumento de IL-17 em pacientes TT ³². Resultado semelhante foi observado por Azevedo e cols., em 2017, que além desse, também observaram o aumento de IL-21 em pacientes TT e DT e aumento de IL-22 em pacientes VV/DV/DD ³¹. O mesmo resultado já havia sido relatado por Lima Silveira e cols. em 2015 ³³.

As células Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) regulam negativamente a resposta imune para manter a homeostase ³⁴. Tregs tem a capacidade de inibir outras células através da produção de citocinas como TGF- β 1 e IL-10 o que pode suprimir principalmente a resposta Th1 e contribuir para a persistência e proliferação do bacilo, resultando em complicações da doença. A participação de células Tregs em hanseníase foi verificada com hanseníase *per se* e também nas formas clínicas. Saini e cols. (2014) e Sadhu e cols. (2018) observaram aumento de Tregs em pacientes VV e DV respectivamente, principalmente através do aumento de TGF- β 1 ^{32,35}. Azevedo e cols. em 2017 evidenciaram aumento de IL-10 e TGF- β 1 em pacientes VV, sendo que níveis de TGF- β 1 foi maior em DD/VV ³¹.

1.6 Genética

A ocorrência de doenças complexas é controlada por componentes genéticos como resultado da ação integrada de um número variado de genes, associado a fatores ambientais, sócio-econômicos, culturais entre outros. Para evidenciar a participação de genes e sua contribuição para a característica que se deseja estudar, diversas estratégias podem ser utilizadas como: análise de agregação familiar de casos, estudo comparativo de taxas de concordância da ocorrência da doença entre gêmeos mono ou dizigóticos e análises de segregação complexa ^{27,36}. Para evidenciar a localização, o número e identidade dos genes envolvidos são utilizadas estratégias como estudos de ligação e estudos de associação ²⁷.

Com a descoberta do *M. leprae* por Hansen em 1873 como agente etiológico da hanseníase, as teorias de transmissão hereditária da doença foram rejeitadas e começou-se a aceitar que a infecção pelo *M. leprae* e as manifestações clínicas decorrentes estariam relacionadas à predisposição genética dos indivíduos ³⁷. Entretanto, desde a Idade Média, há relatos de investigações sobre a hipótese de associação da hanseníase com a genética. Observações feitas por um monge franciscano de nome Bartholomaeus Angelicus, em 1246, afirmavam que a transmissão ocorria de pai para filho ³⁸.

Em 1973, Charkravartii realizou estudo com gêmeos em uma área endêmica de hanseníase na Índia e evidenciou taxas maiores de hanseníase entre gêmeos monozigóticos tanto para hanseníase *per se* quanto para as formas clínicas ³⁹.

Em 1988 foi realizado um estudo na ilha caribenha de Desirade com 953 indivíduos sendo 82 pacientes hansenianos (28 virchowianos e 54 não virchowianos). Os resultados desse estudo rejeitaram o modelo não familiar e indicaram um modelo de herança mendeliana com gene principal co-dominante ou recessivo que controla a suscetibilidade a doença ⁴⁰. Em 2001, esse achado foi em parte confirmado em estudo envolvendo uma amostra de 76 *pedigrees* brasileiros, que também resultou na rejeição de modelo predominantemente ambiental de controle de suscetibilidade à hanseníase⁴¹.

A seleção dos genes candidatos é realizada a partir da observação do possível papel crítico na patogênese da doença e/ou da localização genômica previamente envolvida no controle da doença ²⁷. Estudo de associação *genome-wide* (GWAS) é um poderoso desenho de estudo, baseado em uma extensa cobertura de marcadores genotipados em um único experimento que captura a grande maioria das variantes genômicas comuns ⁴². Vários marcadores de suscetibilidade genética para hanseníase têm sido definidos a partir da estratégia de estudos de associação focando genes candidatos. As regiões cromossômicas candidatas são inicialmente definidas por meio de estudos de ligação com *scan* genômico, e posteriores estudos de associação e clonagem de posição, para localização dos genes envolvidos, bem como marcadores informativos. Esta estratégia determinou importantes marcadores de suscetibilidade para hanseníase na população vietnamita localizados nas regiões 6q25-27 e 6p21 ⁴³⁻⁴⁵. Curiosamente, as associações positivas para alguns destes marcadores não têm sido replicadas na população brasileira ⁴⁵. Uma hipótese que explica esta controvérsia seria diferenças em variáveis que influenciam estas associações, como etnia e idade de manifestação da doença. Uma segunda possibilidade seria a existência de diferenças nos blocos de desequilíbrio de ligação (*bins*) entre as populações, de forma que o marcador informativo da associação da região poderia ser distinto. O único estudo de ligação com *scan* genômico conduzido com famílias brasileiras apontou picos de ligação nas regiões cromossômicas 6p21, 17q22 e 20p13 ⁴⁶.

O primeiro GWAS em hanseníase interrogou 491.883 marcadores SNPs genotipados em 706 casos e 1225 controles na China. Um total de 93 SNPs mostrou associação significativa com a hanseníase. Estes SNPs foram testados em três populações de replicação independentes, totalizando 3254 pacientes e 5955 controles. Como resultado, 15 SNPs distribuídos em sete genes: *CCDC122*, *LACC1*, *NOD2*, *TNFSF15*, *RIPK2*, *LRRK2* e *HLADRB1* foram considerados associados com hanseníase ⁴⁷.

A região 6p21, que tem sido amplamente envolvida em estudos de ligação com hanseníase, abriga os genes do complexo HLA de classe I, II e III. ⁴¹⁻⁴³. Além disso, os estudos de associação com os genes HLA de classe I, II e

III (SNPs localizados nos genes *TNF* e *LTA*) têm replicado e validado os dados para hanseníase em diversas populações, incluindo a brasileira ^{41, 48-49}.

1.7. Complexo HLA

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH), no homem foi descrito na França, em 1958, por Dausset durante um estudo com o soro de pacientes politransfundidos e de mulheres múltiplas onde observou a presença de anticorpos que aglutinavam leucócitos e que reagiam de forma diferente entre os indivíduos ⁵⁰.

O MHC é definido como um conjunto de *loci* gênicos, localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), que codificam aloantígenos (antígenos que diferem dentro de uma mesma espécie), cuja importância inicial deu-se no campo dos transplantes, por promoverem a rejeição entre doadores e receptores incompatíveis ⁵¹. A principal função das moléculas do MHC é a apresentação de antígenos para os linfócitos T ⁵².

Extremamente polimórfico, o MHC é constituído pelas regiões gênicas didaticamente subdivididas em região de classe I, II, III, de acordo com a sua localização no braço curto do cromossomo 6.

A região de classe I contém os loci HLA-A, B, C, que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade (HLA-A, B e C), os loci HLA-E, F, G, HFE, MICA e MICB, que codificam as moléculas não clássicas. As moléculas de classe I são expressas em todas as células nucleadas do organismo ⁵².

Na região de classe II estão localizados os loci HLA-DR, DQ e DP que codificam as moléculas clássicas e os loci HLA-DO e DM, que codificam moléculas não clássicas. As moléculas de classe II são expressas em células apresentadoras de antígenos (APCs), células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T ativados, macrófagos e monócitos ⁵¹⁻⁵². O HLA-DP é uma molécula heterodímera com uma cadeia alfa e uma cadeia beta, ambas polimórficas, codificadas pelos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* respectivamente. Estão descritos até o momento para o HLA-DPA1* 65 alelos que codificam 27 proteínas e para o HLA-DPB1* 1.014 alelos que codificam 692 proteínas diferentes ⁵³.

A região de classe III contém genes responsáveis por várias funções, incluindo proteínas do sistema complemento, enzimas como a 21-hidroxilase, enzimas glicolisadoras de moléculas HLA, TNF, LTA, receptor para IFN- γ , além de outros genes e pseudogenes com funções desconhecidas ⁵¹.

O mecanismo de apresentação de antígenos tem como objetivo produzir peptídeos que possam se associar as moléculas HLA. Esta associação ocorre antes da expressão dessas moléculas na superfície celular e é necessária para a montagem estável e expressão superficial das moléculas ²⁹.

Os peptídeos associados às moléculas de classe I são antígenos proteicos presentes no citosol originados de vírus, parasitas intracelulares ou proteínas que sofreram mutação em células tumorais. Esses antígenos proteicos são degradados a peptídeos por uma via sensível à ubiquitina e são processados no proteossoma e em seguida são transportados até o retículo endoplasmático através do transportador associado ao processamento antigênico (TAP). No retículo endoplasmático o TAP associa-se a uma proteína denominada tapasina e forma um complexo com as moléculas MHC de classe I sintetizadas nesse local. O complexo peptídeo-MHC de classe I move-se através do complexo de Golgi e é transportado até a superfície celular onde é reconhecido por células TCD8+ ²⁹.

Os peptídeos associados à classe II derivam em sua maioria de antígenos proteicos extracelulares que sofreram endocitose e foram internalizados em vesículas intracelulares delimitadas por membranas (endossomos) nas APCs. A montagem do MHC de classe II ocorre com o auxílio de chaperonas residentes no retículo endoplasmático, principalmente a calnexina. Uma proteína associada de cadeia invariante denominada (Ii) dirige as moléculas recém-formadas até os endossomos e ocupa a fenda de ligação de peptídeos. As moléculas MHC de classe II são transportadas até a superfície celular por vesículas endocíticas que neste caminho encontram as vesículas com os peptídeos gerados pela degradação das proteínas endocitadas e se fundem. Assim, as moléculas MHC de classe II encontram os peptídeos nas vesículas, e para que ocorra a associação do peptídeo à fenda da molécula, a proteína invariante (Ii) é degradada por enzimas proteolíticas e pela ação de uma molécula denominada HLA-DM. O complexo peptídeo-MHC II é reconhecido por células TCD4+ ²⁹.

No contexto da apresentação de antígenos das moléculas HLA-DP algumas exceções podem ocorrer e essas moléculas podem se ligar também a peptídeos endógenos ocorrendo uma apresentação cruzada. Estudos recentes conduzidos por Yamashita e cols.⁵⁴ e por Anczurowsku e cols.⁵⁵ identificaram que moléculas HLA-DP que possuíam na posição 84 da cadeia beta, um aminoácido do tipo glicina (HLA-DP^{84gly}) foram incapazes de se ligar a (li) através da CLIP, o que permitiu a ligação das moléculas com peptídeos endógenos. Dessa forma, os alelos HLA-DP foram classificados em duas categorias de acordo com o aminoácido presente nessa posição: em HLA-DP^{84asp} quando o aminoácido presente fosse um aspartato (encontrados nas moléculas DP5 e DP8) ou HLA-DP^{84gly} (encontrados nas moléculas DP2 e DP4). Tais diferenças podem ser clinicamente relevantes na manifestação das doenças⁵⁶.

1.8. Complexo HLA e Hanseníase

Na hanseníase o complexo HLA tem sido amplamente estudado na tentativa de elucidar os mecanismos genéticos da suscetibilidade ou resistência, bem como o prognóstico da doença, uma vez que estes alelos participam de forma direta na resposta imune²⁷. A região cromossômica 6p21, que abriga os genes do HLA classe I, II e III, tem sido sistematicamente envolvida com hanseníase em estudos de ligação^{41,43}. Além disso, a participação destes genes tem sido confirmada por estudos de associação usando polimorfismos de base única (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) como marcadores⁵⁷.

Estudos de hanseníase e moléculas HLA de classe I têm sido feitos em populações dos continentes asiático e americano⁵⁸⁻⁶⁴. No Brasil, em 2010 foram encontrados os alelos HLA-A*11 e A*30 relacionados à suscetibilidade, enquanto os alelos HLA-A*01, B*27, B*50 e C*05 foram associados com a resistência à doença na população do Rio de Janeiro⁶⁵. Também no Brasil, na população do norte do Paraná, Franceschi e cols. (2011)⁶⁶ confirmaram a associação do alelo HLA-A*11 com a suscetibilidade a hanseníase *per se* além dos alelos HLA-B*38 e C*12. O alelo HLA-C*16 foi associado com resistência. Outros alelos também foram identificados: HLA-C*07 relacionado à

suscetibilidade e os alelos HLA-B*35 e C*04 associados com efeito protetor a forma VV da doença.

Alter e cols. (2011), em um estudo com famílias no Vietnã, analisaram 682 SNPs na região do HLA e encontraram associação com hanseníase para 59 deles. Estes marcadores foram investigados em um segundo painel de famílias da mesma população e 12 SNPs na região do HLA classe I tiveram a associação confirmada. Os resultados foram então validados em um estudo caso-controle na Índia onde o alelo HLA-C*15:05 foi associado à doença ⁵⁷.

Em relação ao HLA de classe II, estudos com diferentes populações encontraram associação entre o HLA-DR2 e a forma TT: Suriname ⁶⁷, México ⁶⁸ e Brasil ⁶⁹⁻⁷⁰. No Japão, HLA-DR4 e HLA-DR9 apresentaram associação com proteção para hanseníase TT ⁶¹. O HLA-DQ1 foi associado à forma VV em estudos realizados em diversas populações: Venezuela ⁷¹, Índia ⁷², Japão ⁷³, Indonésia ⁷⁴, México ⁷⁵. No Brasil, foi encontrada associação com forma VV e o alelo HLA-DRB1*11 em estudo realizado na cidade de Goiânia ⁷⁶. No Rio de Janeiro, Vanderbourght e cols.⁴⁹ relataram associação entre o alelo HLA-DRB1*10 e suscetibilidade e o alelo HLA-DRB1*04 e proteção para hanseníase *per se*. Em 2009, um estudo confirmou na população do norte do Paraná a associação do HLA-DRB1*16 (subtipo do HLA-DR2) com a hanseníase *per se* e sugeriu a associação do HLA-DRB1*1601 com a forma dimorfa da doença, e descreveu ainda efeito protetor do HLA-DRB1*04 ⁷⁷.

Zhang e cols. em 2009, no primeiro GWAS em hanseníase, encontraram sete genes associados à hanseníase na população chinesa, e dentre estes o gene *HLA-DRB1* ⁴⁷. Outro estudo do mesmo grupo, com a população chinesa, encontrou associação do HLA-DRB1*15 com suscetibilidade e o HLA-DRB1*09 com proteção à hanseníase⁷⁸. Aguilar-Medina e cols. (2017), em estudo caso-controle em uma área com alta incidência de hanseníase no México, encontraram associação de suscetibilidade entre o HLA-A*28 e a forma VV, enquanto o HLA-DQB1*06 foi associado à forma dimorfa. Neste mesmo estudo, o alelo HLA-DQB1*07 foi associado como um marcador de resistência à hanseníase ⁵⁹. Krause-Kyora e cols. em um interessante estudo realizado em 2018, em esqueletos de pacientes VV de um leprosário enterrados em um cemitério da Dinamarca entre 1270-1750 Dc identificaram o haplótipo

HLA-DRB1*15:01/DQB1*06:02 associados a essa forma da doença, o que evidencia que os alelos HLA relacionados ao risco de hanseníase nas populações modernas já estava associado à hanseníase desde a Idade Média⁷⁹.

Estudos do tipo *GWAS* que testaram os genes *HLA-DP* têm sido realizados em doenças infecciosas como hepatite B em populações asiáticas: Matsura e cols. (2010) identificaram cinco SNPs na região dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* associados a hepatite B⁸⁰; em 2011, Guo e cols. realizaram um estudo caso-controle e identificaram onze SNPs nessa região com forte associação para hepatite B crônica⁸¹; em 2012, Hu e cols. e Migita e cols. também identificaram SNPs na mesma região associados com hepatite B⁸²⁻⁸³. Assim como a hanseníase, a hepatite B crônica é uma doença de caráter complexo cujo desfecho depende de variáveis relacionadas ao microrganismo, ambiente e hospedeiro, e causada por um parasita intracelular obrigatório, o que denota a importância destes genes nestas doenças.

Xie e cols. e Tanna e cols. encontraram associação de SNPs no gene *HLA-DPB1* com a poliangite granulomatosa, que é uma vasculite autoimune sistêmica caracterizada por inflamação dos vasos sanguíneos e formação de granuloma com envolvimento de trato respiratório, rins e outros tecidos, resultado de fatores ambientais e fatores genéticos do hospedeiro⁸⁴⁻⁸⁵. A lesão decorrente da hanseníase é de caráter granulomatoso, e esses dados denotam o envolvimento destes genes com a formação de granulomas.

Em relação à região de classe III, estudos com SNPs nos genes da *LTA* e do *TNF* demonstraram associação com hanseníase em diversas populações, incluindo a brasileira^{41,45,48}.

A *LT- α* apresenta ação pró-inflamatória e a baixa produção desta citocina proporciona uma deficiência frente à infecção pela micobactéria. Estudos realizados com as populações vietnamita, indiana e brasileira mostraram associação entre o gene *LTA* e hanseníase. Entre os marcadores estudados, foi detectada a associação do SNP na posição +80 (A>G) do gene *LTA* com a suscetibilidade para a manifestação precoce da hanseníase. Na população brasileira este efeito não pôde ser observado devido à manifestação tardia, característica da nossa população, em torno de 36 anos. Estes dados confirmam a associação deste gene com a doença atuando de maneira altamente dependente da idade, e reforça o caráter complexo da doença⁴⁵.

O gene *TNF* codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional, que é secretada principalmente pelos macrófagos. O TNF participa de vários processos biológicos incluindo a proliferação e diferenciação celular, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação ⁴⁸. Diversos estudos de associação evidenciaram o envolvimento deste gene com a hanseníase em populações distintas, sendo que o polimorfismo na posição -308 (G>A) na região promotora do gene já teve sua associação comprovada por vários estudos com diferentes populações, bem como por estudos de meta-análise ^{86,87}.

A persistente prevalência da hanseníase no Brasil e a dificuldade da eliminação da doença no país acentuam a relevância dos estudos epidemiológicos que visem à explicação dos fatores envolvidos de forma específica para a nossa população. A região 6p21 têm sido envolvida em muitos estudos com hanseníase e nesse sentido, a abordagem mais detalhada dos genes dessa região, principalmente aqueles pouco estudados em hanseníase como o *locus* HLA-DP é extremamente necessária. A investigação dessa região deverá contribuir para a elucidação das bases moleculares da suscetibilidade para a hanseníase envolvendo o complexo HLA.

Assim, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo de associação genética de base populacional em hanseníase para os genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* em amostras caso-controle de Rondonópolis-MT e do Estado de São Paulo.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

- Conduzir estudo de associação genética de base populacional em hanseníase para os genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* em amostras caso-controle de Rondonópolis-MT, uma região hiperendêmica para hanseníase e do Estado de São Paulo, uma região com índices epidemiológicos mais controlados de hanseníase.

2.2. Objetivos específicos:

- Realizar estudo de associação de *tag* SNPs na região dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* em amostras de Rondonópolis-MT

- Testar o SNP significativo na população de Rondonópolis em amostras do Estado de São Paulo;

- Fazer estudos funcionais do SNP significativo por meio de comparação da produção de IL-10 e TNF em controles saudáveis do Estado de São Paulo com diferentes genótipos.

- Realizar a tipificação dos alelos *HLA-DPA1** e *DPB1** com as populações de Rondonópolis-MT.

3. Referências

1 - Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Trumann RW, Willians DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(2):338-81.

2- Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, Li W, et al. A new *Mycobacterium* species causing Diffuse Lepromatous Leprosy. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130:856-864.

3 - Opromolla DVA. História. In: Noções de Hansenologia. 2nd ed. Opromolla D, editor. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; 2000:1–5.

4 - Monot M, Hanoré N, Garnier T, Araoz r, Coppée , Lacroix C. On the Origen of Leprosy. *Science.* 2005; 308:1040-1042.

5 - Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade;* 2004 Aug; 13(2):76–88.

6 – Skinsnes O. Immunopatology of leprosy: the century in review. *International Journal Leprosy.* 1973; 42:329-360.

7 - Santos LA de C, Faria L, Menezes RF de. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil: cenários de estigma e confinamento. *Rev. Bras. Estud. Popul.* 2008 Jun; 25(1):167–90.

8 – World Health Organization. Leprosy: Weekly Epidemiological Record, Septiembre 2017; 92(35):501-520.

9 – Cole ST, Eiglemeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR et al. Massive genes decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001 feb; 409.

10 - Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature Genetics.* 2009; 41 (12):1282-9

11 – Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loisseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Comunicatons.* 2018; 9:342

12- Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev.* 1966; 33:119-128.

- 13– World Health Organization. Chemoterapy of leprosy for control programmes.1982. Geneva, Technical Report Series, n° 675.
- 14 – Bloom BR, Grosset JH, Lechat MF, Due LK, Nkinda SJ, Rao CK, et al. Who Expert Committee on Leprosy. World Health Organization - Technical Report Series. 1988. p. 7–50
- 15 – WHO. WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Leprosy: Introduction. Essential Medicines and Health Products Information Portal. 1998. p. 28
- 16 – Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia prático sobre a hanseníase. Brasília, 2017. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseníase.pdf>
- 17 – Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- 18 - Mitsuda K. On the valor of a skin reaction to a suspension of leprous nodules. *Int J Lepr.* 1953; 21:347–58
- 19 – Buhner-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *Journ of Clin Microbiol.* 2003; 1:1991-5.
- 20 – Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP, Martelli CM, et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin and Vac Immunol.* 2007; 14: 1400-8.
- 21 – Stefani MMA. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Rev. Soc Bras Med Trop.* 2008; 41 (Sup. 2):89-94
- 22 – Geluk A, Bobosha K, Jolien J, Spencer JS, Banu S, Martins MB, et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *J Immunol.* 2012 May 15; 188(10): 4782-4791.
- 23 – Duthie MS, Raychaudhuri R, Tuterrow YL, Misquiti A, Bowman J, Casey A, et al. A rapid Elisa for diagnosis of Mb leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glicolipid conjugate. *Diag Microbiol and Infect Dis.* 2014; 79: 233-239.
- 24 - Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011 Oct;5(10):e1354

- 25 – Goulart IMB, Arbex LA, Carneiro MH, Rodrigues MS, Gadia R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(5): 453-60;
- 26 – Mazzini OS, Alves HV, Reis PG, Lopes AP, Sell AM, Santos-Rosa M, et al. Gene Association with leprosy: A Review of Published Data. *Front Immunol.* 2016; 6:658.
- 27 – Prevedello FC, Mira MT. Leprosy: a genetic disease? *An Bras Dermatol.* 2007; 82(5):451-459.
- 28 – Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006; 77:189-202.
- 29 - Abbas AK, Lichtman AHL, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 565
- 30 – Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista, Parrelli FPC, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009 Mar;10(2):174– 80.
- 31 – Azevedo MCS, Marques H, Binelli LS, Malonge MSV, Devides AC, Silva EA, et al. Simultaneous analysis of multiple Thelper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1, Th2, Th17 and tregs markers expression. In clinical forms and reactional events. *Med Microbiol Immunol.* 2017; 206:429-439.
- 32 – Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4⁺ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, non Th2 cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 9(7):e2338.
- 33 – Lima Silveira E, de Sousa JR, de Souza-Aarão TL, Fuzii HT, Dias Junior LB, Carneiro FR et al. New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. *J Am Acad Dermatol.* 2015; 72:729-730.
- 34 – Sadhu S, Mitra DK. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. *Front Immunol.* 2018; 9:604.
- 35 – Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- β secreting CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 8(1):e2639.
- 36 – Ranque B, Alter A, Schurr E, Abel L, Alcais A. La lèpre pour l'étude de la predisposition génétique aux maladies infectieuses. *Medicine/Sciences.* 2008; 24:491-7

- 37 - Beiguelman B. Genética e hanseníase. Cienc Saude Colet. ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva. 2002; 7(1):117-28
- 38 – Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect.* 2006; 8:1124-31.
- 39 – Charkravartii MR. A twin study on leprosy. Stuttgart: Georg Thieme. 1973
- 40 - Abel L, Demenais F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *Am J Hum Genet.* 1988; 42:256-66
- 41 – Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumor necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001; 2:196-204.
- 42 - Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput Biol.* 2012; 8(12):e1002822.doi10.1371/journal.pcbi.1002822
- 43 – Mira MT, Alcais A, Van Tuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat. Genet.* 2003; 33(3):412-25.
- 44 – Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004; 427(6975):636-640
- 45 – Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat. Genet.* 2007; 39(4):517-22.
- 46 – Miller EM, Jamielson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004; 5(1):63-7.
- 47 – Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *N Engl J Med.* 2009; 361:2609-18.
- 48 – Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis.* 2002; 186(11):1687-1691.
- 49 – Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun.* 2007; 8(4):320-4.
- 50 – Dausset J. The birth of MAC. *VoxSang.* 1984; 46(4):235-7

51- Donadi EA. Como entender a nomenclatura e o mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. Medicina, Ribeirão Preto. 2000; 33:7-18.

52 – Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. Yonsei Med J. 2007; 48(1):11-23.

53 – IPD-IMGT/HLA Release 3.32.0, 2018-09-05. Disponível em www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla.

54 – Yamashita Y, Anczurowski M, Nakatsugawa M, Tanaka M, Kagoya Y, Sinha A et al. HLA-DP^{>84gly} constitutively presents endogenous peptides generated by the class I antigen processing pathway. Nat Commun. 2017 May 10; 8:15244

55 – Anczurowski M, Yamashita Y, Nalatsugawa M, Ochi T, Kagoya Y, Guo T et al. Mechanisms underlying the lack of endogenous processing and CLIP – mediate binding of the invariant chain by HLA-DP^{84gly}. Scientific Report, 2018; 8:4804

56 – Whong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll like receptor 1. PLoS Pathog. 2010 Jul 1; 6:e1000979.

57 – Alter A, Huong NT, Singh M, Orlova M, van Thuc N, Katoch K, et al. Human leukocyte antigen class I region single-nucleotide polymorphisms are associated with leprosy susceptibility in Vietnam and India. J Infect Dis. 2011 May 1; 203(9):1274-81.

58 – De Souza-Santana FC, Marcos EVC, Nogueira ME, Ura S, Tomimori J. Human leukocyte antigen class I and class II alleles are associated with susceptibility and resistance in borderline leprosy patients from Southeast Brazil. BMC Infect Dis. 2015; 15:22

59 – Aguliar-Medina M, Escamilla-Tilch M, Frias-Castro LO, Romero-Quintana G, Estrada-Garcia I, Estrada-Parra S, et al. HLA Alleles are Genetic Markers for Susceptibility and Resistance towards Leprosy in a Mexican Mestizo population. An of Human Gen. 2017; 81:35-40.

60 - Takata H, Sada M, Ozawa S, Sekiguchi S. HLA and mycobacterial infection: increased frequency of B8 in Japanese leprosy. Tissue Antigens. 1978 Jan; 11(1):61-4.

61 – 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):243-7.

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

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

64 - Agrewala JN, Ghei SK, Sudhakar KS, Girdhar BK, Sengupta U. HLA antigens and Erythema Nodosum Leprosum (ENL). *Tissue Antigens*. 1989 Apr;33(4):486–7

65 - Romero M. Estudo de Associação entre o Sistema HLA e a Hanseníase. Instituto Oswaldo Cruz; 2010. p. 101.

66 - Franceschi DSA, Tsuneto LT, Mazini PS, Sacramento WS, Reis PG, Rudnik CCC, et al. Class-I human leukocyte alleles in leprosy patients from Southern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. SBMT*; 2011 Oct; 44(5):616–20.

67 – De Vries RR, Mehra NK, Vaidya MC, Gupte MD, Meera Khan P, Van Rood JJ. HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. *Tissue Antigens*. 1980 Oct; 16(4):294–304.

68 - Gorodezky C, Flores J, Arevalo N, Castro LE, Silva A, Rodriguez O. Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. *Lepr. Rev.* 1987 Dec;58(4):401–6.

69 - Visentainer JE, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzl-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1997 Jan;30(1):51–9.

70 – Marcos EVC. Imunogenética. In: *Noções de Hansenologia*. 2ed. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. Instituto Souza Lima. 2000; 43-46

71 - Ottenhoff TH, 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 Jul; 24(1):25–9.

72 - 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 India. *Tissue Antigens*. 1993 Sep; 42(3):133–7.

73 – Jako S, Numaga J, Masuda K, Namisato M, Maeda H. [HLA class II alleles and leprosy (Hansen's disease) classified by WHO-MDT criteria]. *Nihon Rai Gakkai Zasshi*. 1996 Jul; 65(2):121–7.

74 - 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. Other Mycobact. Dis.* 1997 Jun; 65(2):178–89.

75 - 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 (Edinb)*. 2004 Jan;84(1-2):82–92.

76 - Lavado-Valenzuela R, José Bravo M, Junqueira-Kipnis AP, Ramos de Souza M, Moreno C, Alonso A, et al. Distribution of the HLA class II frequency alleles in patients with leprosy from the mid-west of Brazil. *Int. J. Immunogenet*. 2011 Jun; 38(3):255–8.

77 – Silva AS, Mazzini OS, Reis PG, Sell AM, Tsuneto LT, Peixoto PR, et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the South of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis*. 2009; 9:134

78 – Zhang F, Liu H, Chen S, Wang C, Zhu C, Zhang L, et al. Evidence for no association of HLA-DRB1*15 and DRB1*09 with leprosy and the impact of DRB1*09 on disease onset in a Chinese Han population. *BMC Med Gen* 2009; 10:133.

79 – Krause-Kyora B, Nutsua M, Boehme L, Pierini F, Pedersen DD, Kornell S-C, et al. Ancient DNA study reveals HLA susceptibility locus for leprosy in medieval Europe. *Nat Comm*. 2018; 9:1569.

80 – Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, et al. Genome-Wide association study identifies genetic variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B. *Journ of Hepatol*. 2010; 52:S283.

81 – Guo X, Zhang Y, Li J, et al. Strong influence of human leucocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. *Hepatology*. 2011; 53:422-8.

82 - Hu L, Zhai X, Liu J, et al. Genetics variants in human leucocyte antigen/DP-DQ influence both hepatitis B virus clearance and hepatocellular carcinoma development. *Hepatology*. 2012; 55:1426-31

83 - Migita K, Abiru S, Ohtani M, et al. HLA-DP gene polymorphisms and hepatitis B infection in the Japanese population. *Transl Res*. 2012.

84 – Xie G, Roshandel D, Sherva R, et al. Association of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) with HLA-DPB1*04 and SEMA6A gene variants: evidence from genome-wide analysis. *Arthritis Rheum*. 2013 September; 65(9): 2457–2468

85 – Tanna A, Salama AD, Brookes P, Pusey CD. Familial granulomatosis with polyangiitis: three cases of this rare disorder in one Indoasian family carrying an identical HLA-DPB1 allele. *BMJ Case Reports*. 2012.

86 – Franceschi DS, Mazzini OS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, Peixoto PR, Visentainer JE. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the South of Brazil. *Int J Infect Dis*. 2009 Jul; 13(4):493-8.

87 – Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, Nery JAC, et al. TNF -308G→A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. J Infect Dis. 2011 Oct 15; 204(8):1256-63

4. Manuscrito

Estudo de associação dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* em hanseníase.

Gislaine Aparecida Querino

Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu/SP

Rodrigo Mendes de Camargo

Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu/SP

Vânia Nieto Brito de Souza

Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP

James Venturini

Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu/SP

Fátima Regina Vilani Moreno

Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP

Priscilla B B Mangilli

Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP

Elaine Valim Camarinha Marcos

Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP

Fabiana Covolo de Souza-Santana

Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP

Ana Carla Pereira Latini

Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que pode se manifestar sob diferentes formas clínicas a depender da

resposta imune celular do hospedeiro. Vários marcadores genéticos têm sido definidos e, devido à participação dos alelos HLA na resposta imune, estes têm sido amplamente estudados na hanseníase. O HLA-DP constitui uma das moléculas clássicas de classe II, com poucos estudos em hanseníase. O objetivo deste trabalho foi conduzir um estudo de associação genética de base populacional em hanseníase para os genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* com duas amostras caso-controle: a primeira de Rondonópolis-MT, uma região hiperendêmica para hanseníase, e a segunda do Estado de São Paulo, uma região com índices epidemiológicos controlados. Foram realizados estudos com 9 *tag* SNPs na região dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* na população de Rondonópolis-MT (411 casos e 357 controles). O SNP rs9277341 que apresentou dados de associação com significância estatística após a correção de Bonferroni foi então testado na população de São Paulo (570 casos e 380 controles). Para avaliar o efeito funcional deste marcador foi determinada a produção das citocinas IL-10 e TNF após estímulo com antígeno sonificado de *M. leprae* em 21 controles saudáveis. Na população de Rondonópolis-MT foi realizada a tipificação dos alelos HLA-DPA1* e HLA-DPB1* através da técnica de PCR-SSO empregando-se o kit *Labtype-SSO* (One Lambda, CA, USA). Os resultados de genotipagem mostraram associação com hanseníase *per se* para o marcador rs9377341 do gene *HLA-DPA1* e dois marcadores do gene *HLA-DPB1* (rs1431402 e rs9277469). Associações de proteção para a forma multibacilar da hanseníase foram encontradas para os marcadores rs9277341 e rs2301220 do gene *HLA-DPA1* e para o marcador rs31350221 do gene *HLA-DPB1*. O SNP rs9277341, com dados significativos após a correção de Bonferroni e testado na população do Estado de São Paulo, não apresentou associação com hanseníase. A avaliação funcional mostrou que os carreadores do alelo G do rs9277341 apresentaram níveis maiores de IL-10 e TNF. Na tipificação dos alelos HLA, o alelo HLA-DPB1*03 foi associado à hanseníase *per se* e o genótipo HLA-DPB1*02/03 foi associado à hanseníase *per se* e à proteção para a forma MB. Esses dados sugerem a participação dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* nos desfechos da hanseníase.

Palavras chave: Hanseníase, HLA, *Mycobacterium leprae*, polimorfismo de base única.

4.1.Introdução

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um parasita intracelular obrigatório com preferência pelas células de Schwann em nervos periféricos e macrófagos na pele ¹. É uma doença endêmica em países como o Brasil, Índia e Nepal com incidência aproximada de 215.000 casos por ano².

A hanseníase é uma doença espectral com diferentes formas clínicas que estão relacionadas com a resposta imunológica do hospedeiro. A classificação de Ridley & Jopling é a mais aceita e divide a doença em cinco formas. No pólo tuberculóide (TT) estão os pacientes com uma forte resposta imune celular ao *M. leprae*. No pólo virchowiano (VV) estão os pacientes com resposta imune celular deficiente ao bacilo. Entre esses dois pólos, encontram-se três formas intermediárias: dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV)³. A classificação operacional da Organização Mundial de Saúde, adotada para fins de tratamento⁴, divide os pacientes em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) de acordo com a baciloscopia e, mais recentemente, de acordo com o número de lesões⁵.

A resistência natural humana para a hanseníase é estimada como alta. Fatores ambientais e genéticos (do hospedeiro e da micobactéria) são importantes nas interações patógeno-hospedeiro e influenciam na manifestação da doença⁶. Como o *M. leprae* tem uma pequena diversidade genética e sofreu redução evolucionar^{7,8}, fatores genéticos do hospedeiro tomam grande importância nesta interação⁶. A existência de componentes genéticos como determinante da doença tem sido demonstrada em estudos de genética clássica, como análises de segregação complexa e estudos com gêmeos, bem como pelos estudos de epidemiologia genética⁹⁻¹⁴.

Muitos marcadores de suscetibilidade para a hanseníase têm sido definidos através de estratégias de associação com foco em genes candidatos, selecionados a partir da observação do possível papel crítico na patogênese da doença e/ou da observação da localização genômica previamente envolvida no controle da doença⁶. Esta estratégia determinou importantes marcadores relacionados à suscetibilidade em hanseníase na população vietnamita localizados na região 6q25-27 e 6p21 ⁹⁻¹¹. Na população brasileira, estudos de

ligação apontaram picos de ligação nas regiões 6p21, 17q22 e 20p13¹²⁻¹³. Na região 6p21 localiza-se o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), cujas moléculas expressas têm a função de apresentação de peptídeos derivados de patógenos ou de células tumorais às células T¹⁴.

A região do MHC abriga os genes do complexo HLA de classe I, II e III, onde estão as moléculas clássicas do sistema HLA: HLA-A, HLA-B e HLA-C (classe I) e HLA-DQ, HLA-DR e HLA-DP (classe II). Moléculas HLA têm sido sistematicamente associadas com hanseníase em diversas estratégias de estudos genéticos, como estudos de associação e de ligação, estudos com polimorfismos de base única (SNP) e estudos como *genome wide association* (GWAS)^{9,12,13,15-16}. Com o gene *HLA-DP* apenas um estudo realizado em hanseníase por Rani e cols (1995), na população do norte da Índia, não encontrou diferenças significativas entre as frequências de alelos HLA-DPB1 em doentes e controles saudáveis¹⁷. O HLA-DP é uma molécula heterodímera constituída por uma cadeia alfa e uma cadeia beta, ambas polimórficas, codificadas pelos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* respectivamente. Até o momento, são descritos 67 alelos para o HLA-DPA1* que codificam 29 proteínas e 1.014 alelos para o HLA-DPB1* que codificam 692 proteínas diferentes¹⁸.

A região 6p21 têm sido envolvida em muitos estudos com hanseníase e, nesse sentido, a abordagem mais detalhada dos genes dessa região, principalmente aqueles pouco estudados em hanseníase como o *locus* HLA-DP, é extremamente necessária. A investigação dessa região deverá contribuir para a elucidação das bases moleculares da suscetibilidade para a hanseníase envolvendo o complexo HLA.

Assim, este trabalho objetiva realizar um estudo de associação genética de base populacional em hanseníase para os genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* em amostras caso-controle de Rondonópolis-MT, uma região hiperendêmica para hanseníase, e do Estado de São Paulo, uma região com índices epidemiológicos mais controlados.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. População

Este estudo caso controle foi realizado com duas amostras populacionais. A primeira amostra foi constituída a partir de um estudo multidisciplinar realizado no município de Rondonópolis-MT, uma área hiperendêmica para hanseníase, é composta por 411 pacientes e 357 controles. Os casos foram provenientes do atendimento ambulatorial do Programa de Saúde da Família (PSF) deste município. Os pacientes foram classificados de acordo com os critérios de Ridley & Jopling³ e da OMS⁴. O grupo controle foi proveniente do mesmo município e foi selecionado em mutirões realizados na cidade para detecção de casos de hanseníase. Os mutirões foram realizados em locais públicos como faculdades, corporação de bombeiros, exército e postos criados para participação voluntária. O grupo foi selecionado após entrevista e a negativa de história pessoal da doença, além de exame clínico negativo realizado no dia do mutirão.

A segunda amostra foi composta de 570 casos e 380 controles proveniente do Estado de São Paulo, uma região com índice epidemiológico de hanseníase controlado. O grupo de casos foi constituído a partir de pacientes do atendimento ambulatorial de hanseníase do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru-SP). Os pacientes também foram classificados de acordo com os critérios de Ridley & Jopling¹² e da OMS⁴. O grupo controle foi constituído por indivíduos candidatos à doação de sangue do Hemonúcleo de Bauru. As características das populações estão descritas na tabela 1.

A população selecionada para avaliação funcional dos *tag* SNPs com significância estatística foi composta por 21 indivíduos saudáveis procedentes do Instituto Lauro de Souza Lima. Esta população foi composta por indivíduos não fumantes, sem doenças crônicas, sendo 10 mulheres e 11 homens.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru – SP, local onde o estudo foi realizado (CEP 172/09).

Tabela 1: Características dos grupos de pacientes e controles selecionados no município de Rondonópolis – MT e no Estado de São Paulo.

Características	Categorias	Casos	Controles	Casos Estado	Controles Estado
		Rondonópolis	Rondonópolis	São Paulo	São Paulo

		(n=411)	(n=357)	(n=570)	(n=380)
Idade (média±DP)		42,02±16,14	41,98±13,89	42±18,01	36±10,81
Etnia	Caucasóide	147(35,8%)	117(32,8%)	456(80%)	238(62,6%)
	Pardo	247(60,1%)	226(63,3%)	55(9,6%)	104(27,4%)
	Negro	17(4,1%)	14(3,9%)	32(5,6%)	24(6,3%)
	Amarelo			1(0,2%)	
	Sem Classificação			26(4,6%)	14(3,7%)
Sexo	Masculino	250(60,8%)	217(60,8%)	385(67,5%)	253 (66,6%)
	Feminino	161(39,2%)	140(39,2%)	185(32,5%)	127(33,4%)
Forma Clínica (OMS,1982)	PB	96(23,4%)		108(18,9%)	
	MB	310(75,4%)		434(76,1%)	
	Sem Classificação	5(1,2%)		28(4,9%)	
Forma Clínica (Ridley & Jopling, 1966)	VV	21(5,1%)		112(19,6%)	
	DV	63(15,3%)		147(25,8%)	
	DD	79(19,2%)		142(24,9%)	
	DT	159(38,7%)		59(10,3%)	
	TT	60(14,6%)		72(12,6%)	
	I	27(6,6%)		3(0,5%)	
	HNP			1(0,2%)	
	Sem Classificação	0,2(0,5%)		34(6,0)	

DP- desvio padrão; VV-virchowiano-virchowiano; DV-dimorfo-virchowiano; DD-dimorfo-dimorfo; DT- dimorfo-tuberculóide; TT – tuberculóide-tuberculóide; I-indeterminada; HNP-hanseníase neural pura; OMS-Organização Mundial de Saúde; PB-paucibacilar; MB-multibacilar

4.2.2. Seleção de marcadores

Marcadores tipo *tag* SNPs na região dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* foram selecionados no *International HapMap Project* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) a partir dos seguintes parâmetros: MAF (*minor allele frequency*) de 0,1, população de ancestralidade Yoruba (africanos), desequilíbrio de ligação entre os marcadores de r^2 maior ou igual a 0,8. A partir desta estratégia foram testados 9 marcadores neste estudo¹⁹. Os marcadores selecionados estão descritos no quadro 1.

Quadro 1: *tag* SNPs selecionados na região dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1*.

Genes	<i>tag</i> SNPs
<i>HLA-DPA1</i> <i>major histocompatibility complex, class II, DP</i> <i>alpha 1</i>	rs1367728
	rs2301220
	rs2301226
	rs9277341
	rs9277342
<i>HLA-DPB1</i>	rs1431402

<i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	rs2071353
	rs3135021
	rs9277469

4.2.3. Extração de DNA e Genotipagem dos tag SNPs

O sangue venoso periférico foi coletado em tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e o DNA foi extraído através da técnica de *salting-out*²⁰. A genotipagem dos tag SNPs foi realizada através do método de discriminação alélica por meio da tecnologia *TaqMan* (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*) utilizando o equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), seguindo instruções do fabricante.

4.2.4. Tipificação do HLA

Os alelos HLA-DPA1* e HLA-DPB1* foram determinados utilizando a técnica *Lab Type*TM (One-Lambda*, Canoga Park, CA, USA), a qual se aplica a tecnologia *Luminex*TM ao método de tipificação por DNA-SSO reverso.

4.2.5. Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e quantificação de citocinas.

As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas do sangue de controles saudáveis através da centrifugação com *Ficoll-Hypaque* (Sigma, St Louis, MO, USA). As células mononucleares na concentração de 2×10^5 células por poço da placa em meio RPMI-1640 com L-glutamina, suplementado com $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de penicilina-estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA). As culturas de células foram estimuladas por 48 horas com $8 \mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina-M, $10 \mu\text{g/ml}$ de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (Sigma) e *M. leprae* íntegro irradiado (cedido por Dr. Patrick Brennan, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) na proporção de 8 bacilos por célula. As culturas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera com CO_2 . Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas e estocados a -80°C . As citocinas IL-10 e TNF foram quantificadas em

duplicata por ELISA (kit DuoSet Quantikine, R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.6. Análise estatística

O modelo de regressão logística foi utilizado para comparar as frequências dos alelos, genótipos e carreadores para os grupos de casos e controles, com e sem ajuste para as covariáveis sexo e etnia. O nível de significância estatística de $p\text{-valor} < 0,05$ foi adotado. Para essas análises foi utilizado o programa R (Development Core Team, 2005) ²¹.

A correção de Bonferroni foi utilizada a fim de controlar o efeito de múltiplos testes antes de testar os marcadores na população do Estado de São Paulo.

Para controlar o efeito da etnia, foi realizada a correção por ancestralidade molecular na população de Rondonópolis através da genotipagem de 46 marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) ²². As estimativas de ancestralidade Européia, Africana e Nativo Americana foram feitas pelo software ADMIXTURE²³.

Como controle de qualidade as frequências dos genótipos para cada marcador no grupo controle foram testadas quanto ao enquadramento na lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Para tanto, as frequências observadas e esperadas foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado. As distribuições de frequências para todos os marcadores testados estão em equilíbrio.

Como controle de qualidade da genotipagem foi adotado a taxa de sucesso de genotipagem $>0,95$ e todos os marcadores atenderam a este critério.

Para avaliação da produção das citocinas TNF e IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMCs de controles saudáveis do Estado de São Paulo foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney U* em *GraphPad InStat* versão 3.10.32 bit para Windows 5. O nível de significância estatística adotado foi de $p\text{-valor} < 0,05$.

4.3 Resultados

HLA-DPA1

Foram testados cinco marcadores para o gene *HLA-DPA1* na amostra de Rondonópolis-MT e dois marcadores apresentaram dados com significância estatística: rs9277341 e rs2301220. Em relação à hanseníase *per se*, apenas o marcador rs9277341 apresentou resultados significativos para os genótipos AG, GG e para os carreadores de G (Tabela 2). Associações significativas de proteção à forma MB foram encontradas para o marcador rs2301220 (genótipo AG) e para o marcador 9277341 (genótipo AG e carreadores de G). (Tabela 3).

As frequências dos SNPs do gene *HLA-DPA1* sem significância estatística estão representadas nas Tabelas Suplementares 1 e 2.

Para controlar o efeito de múltiplos testes foi realizada a correção de Bonferroni na amostra de Rondonópolis-MT e apenas o marcador rs9277341 se manteve significativo ($p < 0,005$). Esse marcador foi testado na amostra do Estado de São Paulo e não houve dados com significância estatística (Tabelas Suplementares 3 e 4).

Após a genotipagem dos SNPs, foram determinadas as especificidades dos alelos HLA-DPA1* nas amostras de Rondonópolis e não houveram associações significativas (Tabelas Suplementares 5 e 6)

Tabela 2- Frequências de alelos, genótipos e carreadores em pacientes e controles para o SNP rs9277341 do gene *HLA-DPA1* e dados de associação para hanseníase *per se*, em Rondonópolis-MT

SNP	Alelos e Genótipos	Controle (%)	Pacientes (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs9277341	A	0,56	0,54	*	*
	G	0,44	0,46	1,28 (0,08)	1,25 (0,13)
	AA	115 (0,32)	92 (0,29)	*	*
	AG	172 (0,48)	223 (0,50)	1,62 (0,005)	1,56 (0,02)
	GG	69 (0,19)	90 (0,21)	1,63 (0,02)	1,55 (0,04)
	Carreador A			0,84 (0,33)	0,84 (0,34)
	Carreador G			1,62 (0,003)	1,51 (0,01)
		n= 356	n= 405		

OR - odds ratio

* categoria referência

**OR e p-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular

Tabela 3 – Frequência de alelos, genótipos e carreadores em pacientes MB e PB para os marcadores rs2301220 e rs9277341 do gene *HLA-DPA1* e dados de associação para forma clínica da hanseníase na população de Rondonópolis-MT.

	Alelos e Genótipos	MB (%)	PB (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs2301220	A	0,3	0,36	0,75 (0,26)	0,80 (0,41)
	G	0,7	0,64	*	*
	AA	27 (0,09)	9 (0,09)	0,70 (0,42)	0,97 (0,96)
	AG	131 (0,43)	51 (0,54)	0,76 (0,04)	0,57 (0,03)
	GG	148 (0,48)	35 (0,37)	*	*
	Carreador A			0,62 (0,04)	0,62 (0,06)
	Carreador G			0,92 (0,84)	0,76 (0,56)
rs9277341	A	0,53	0,46	*	*
	G	0,47	0,54	0,72 (0,16)	0,78 (0,32)
	AA	80 (0,26)	11 (0,12)	*	*
	AG	159 (0,52)	62 (0,65)	0,35 (0,003)	0,37 (0,006)
	GG	66 (0,22)	22 (0,23)	0,41 (0,02)	0,51 (0,11)
	Carreador A			1,09 (0,75)	0,92 (0,78)
	Carreador G			0,36 (0,003)	0,40 (0,01)
		n=306	n=95		

OR - odds ratio

* categoria referência

**OR e p-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular

HLA-DPB1

Para o gene *HLA-DPB1* foram testados na amostra de Rondonópolis-MT quatro marcadores e três deles foram associados à hanseníase. Os marcadores rs1431402 (genótipo AT e carreadores de T) e o rs9277469 (genótipo CA) mostraram associação com hanseníase *per se* (Tabela 4). O marcador rs31350221 (genótipo AG) mostrou associação com proteção para a forma MB. (Tabela 5).

As frequências dos SNPs do gene *HLA-DPB1* sem significância estatística estão descritas nas Tabelas Suplementares 7 e 8.

Tabela 4- Frequências de alelos, genótipos e carreadores em pacientes e controles para os marcadores rs1431402 e rs9277469 do gene *HLA-DPB1* e dados de associação para hanseníase *per se* em Rondonópolis-MT

SNP	Alelos e Genótipos	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs1431402	A	0,83	0,82	*	*
	T	0,17	0,18	1,20 (0,31)	1,170 (0,41)
	AA	254 (0,71)	262 (0,68)	*	*
	TA	87 (0,25)	132 (0,29)	1,47 (0,01)	1,50 (0,01)
	TT	15 (0,04)	12 (0,03)	0,77 (0,52)	0,58 (0,21)
	Carreador A			1,44 (0,35)	1,44 (0,35)

				1,36 (0,04)	1,35 (0,05)
	Carreador T				
rs9277469	A	0,37	0,38	1,04 (0,74)	1,04 (0,78)
	C	0,63	0,62	*	*
	AA	55 (0,15)	51 (0,13)	0,92 (0,73)	0,89 (0,64)
	CA	152 (0,43)	206 (0,51)	1,35 (0,05)	1,38 (0,04)
	CC	149 (0,42)	149 (0,37)	*	*
	Carreador A			1,24 (0,14)	1,25 (0,13)
	Carreador C			1,27 (0,25)	1,32 (0,18)
		n=356	n=406		

OR - *odds ratio*

* categoria referência

**OR e p-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular*.

Tabela 5 – Frequência de alelos, genótipos e carreadores em pacientes PB e MB para o marcador rs31350221 do gene *HLA-DPB1* e dados de associação para forma clínica da hanseníase na população de Rondonópolis-MT.

SNP	Alelos e Genótipos	MB (%)	PB (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs31350221	A	0,38	0,40	0,90 (0,69)	0,82 (0,45)
	G	0,62	0,60	*	*
	AA	45 (0,15)	12 (0,13)	0,38 (0,93)	0,82 (0,64)
	GA	141 (0,46)	52 (0,55)	0,70 (0,16)	0,58 (0,05)
	GG	120 (0,39)	31 (0,33)	*	*
	Carreador A				0,75 (0,24)
	Carreador G			0,83 (0,61)	0,87 (0,71)
		n=306	n=95		

OR - *odds ratio*

* categoria referência

**OR e p-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular*.

Após a genotipagem dos SNPs, as especificidades dos alelos HLA-DPB1* das amostras de Rondonópolis foram determinadas. Associações significativas foram encontradas como o alelo HLA-DPB1*03 para hanseníase *per se* e com o genótipo HLA-DPB1*02/03 para hanseníase *per se* e proteção à hanseníase MB (Tabela 6).

Tabela 6 – Frequências dos alelos e genótipos HLA-DPB1* em pacientes e controles e em pacientes PB e MB e dados de associação para hanseníase *per se* e para forma clínica da hanseníase em Rondonópolis-MT

Alelos	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)	PB (%)	MB (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)
DPB1*04	0,43	0,39	*	*	-	-	-	-
DPB1*03	0,07	0,09	1,89 (0,004)	1,74 (0,005)	-	-	-	-
Genótipos								
DPB1*04/04	0,43	0,39	*	*	0,10	0,15	*	*
DPB1*02/03	0,02	0,05	4,47 (0,011)	4,83 (0,010)	0,10	0,04	0,42 (0,032)	0,47 (0,008)
	n=385	n=306			n=67	n=226		

OR - odds ratio

* categoria referência

**OR e p-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular*.

PB – paciente paucibacilar

MB – paciente multibacilar

As tipificações dos alelos HLA-DPB1* e dados de associação sem significância para hanseníase *per se* e para forma clínica, na população de Rondonópolis-MT, estão apresentados nas Tabelas Suplementares 9 e 10.

ESTUDO FUNCIONAL PARA O MARCADOR rs9277341

Para avaliar o efeito funcional do SNP rs9277341 foi realizada a cultura de PBMC de 21 indivíduos saudáveis.

Os pacientes foram divididos de acordo com os genótipos em carreadores do alelo G (15 indivíduos saudáveis, sendo 6 mulheres e 9 homens) e genótipo AA (6 indivíduos saudáveis, com 4 mulheres e 2 homens). Após estímulo por 48 horas com antígeno do *M. leprae*, observamos maior produção das citocinas IL-10 ($p\text{-valor} < 0,0293$) e TNF ($p\text{-valor} < 0,0293$) nos carreadores do alelo G (Figura 1).

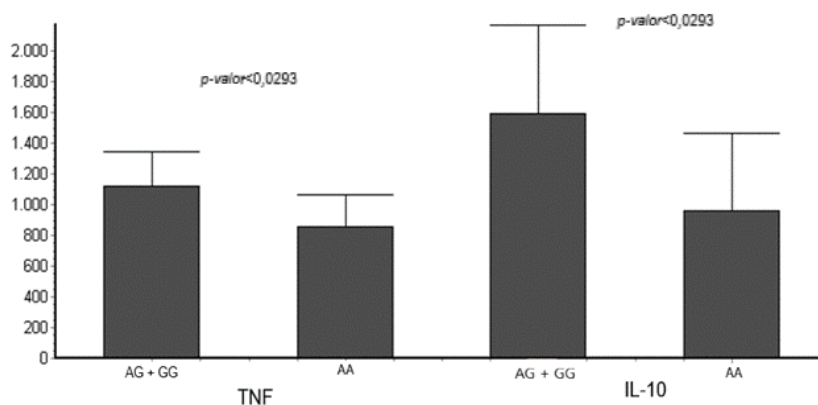


Figura 1: Produção *in vitro* de IL-10 e TNF por PBMCs estimuladas com *M. leprae* irradiado em proporção 1:8 de acordo com o genótipo para o polimorfismo rs9277341 em controles saudáveis (n=21; 15 AG+GG e 6AA).

4.4. Discussão

Esse é o primeiro estudo de epidemiologia genética em hanseníase que descreve a associação dos genes *HLA-DP* com os desfechos da hanseníase. Em uma primeira etapa do estudo a genotipagem de *tag* SNPs mostrou associação dos marcadores rs9277341 e rs2301220 do gene *HLA-DPA1* e dos marcadores rs431402, rs9277469 e rs31350221 do gene *HLA-DPB1* com hanseníase na população de Rondonópolis-MT. A fim de replicar os resultados, o marcador rs9277341 foi testado na população do Estado de São Paulo, entretanto o dado não foi significativo nessa população. A divergência nesses resultados pode ser atribuída à diferenças étnicas entre essas duas populações. A correção da etnia por ancestralidade molecular na população de Rondonópolis manteve a associação dos SNPs com os desfechos da hanseníase²⁴. Entretanto, não foi possível realizar a mesma correção na população do Estado de São Paulo, onde os dados sobre etnia foram obtidos por autodeclaração. Em razão da miscigenação da população brasileira²⁵⁻²⁷, a melhor estratégia para identificar e controlar a estratificação da população em estudos de associação genética, é o uso dos *AIMs* (*ancestry informative markers*), marcadores genéticos que possuem frequências substancialmente diferentes entre as populações e que, a partir de um conjunto validado para uma população, são capazes de informar o perfil de ancestralidade genética de um indivíduo²⁸⁻²⁹.

A fim de confirmar a associação encontrada para os genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* na população de Rondonópolis-MT, testamos a associação destes genes com os fenótipos da hanseníase por meio de uma segunda metodologia, capaz de detectar as especificidades dos alelos *HLA-DPA1** e *HLA-DPB1**, com dados mais informativos acerca da variabilidade destes genes. Para essa análise foram considerados os alelos com frequências maiores que 1%. Associação do genótipo *HLA-DPB1*02/03* com hanseníase *per se* e com proteção à forma MB e do alelo *HLA-DPB1*03* com hanseníase *per se* foi encontrada na população de Rondonópolis-MT.

O gene *HLA-DPB1* já foi associado à algumas doenças que apresentam certa similaridade com a hanseníase, principalmente no contexto de doenças complexas, onde fatores ambientais e genéticos do hospedeiro e do microrganismo são importantes na manifestação e no desfecho da doença, como é o caso da hepatite B, uma doença também causada por um parasita intracelular obrigatório. SNPs presentes na região do gene *HLA-DPB1* foram associados com suscetibilidade para a hepatite B crônica nas populações orientais³⁰⁻³³. O mesmo gene também foi associado a poliangite granulomatosa (GPA), que apresenta manifestações clínicas semelhantes a hanseníase com formação de granulomas³⁴⁻³⁵. Tais evidências denotam a importância de fatores imunogenéticos associados à manifestação dessas doenças.

No contexto da apresentação de antígenos pelas moléculas HLA-DP, os aminoácidos presentes em determinadas posições da cadeia beta têm um papel importante na seletividade dos peptídeos ligantes. A presença de glicina na posição 84 (HLA-DP^{84gly}) possibilita a ligação das moléculas DP2 e DP4 a peptídeos endógenos, ocorrendo uma apresentação cruzada^{36,37}. Da mesma forma, os resíduos de aminoácidos presentes na posição 69 da cadeia beta também sugerem essa capacidade seletiva que pode afetar a resposta imune e a manifestação das doenças^{38,39}. Selvaraj e cols. em 2012, ao investigar o desenvolvimento de tuberculose em pacientes HIV positivos, observaram que a presença de arginina na posição 69 da cadeia β do HLA-DPB1 teve efeito protetivo no desenvolvimento de tuberculose pulmonar⁴⁰. Em nosso estudo encontramos a associação do genótipo HLA-DPB1*0203 com suscetibilidade para a hanseníase *per se* e proteção à forma MB, no entanto não podemos afirmar quais resíduos estão presentes nessas posições. As moléculas DPB1*02 geralmente possuem uma lisina na posição 69 e um aspartato na posição 84³⁶. A possível troca desses aminoácidos pode influenciar na habilidade destas moléculas em apresentar epítomos críticos, as moléculas DP2 uma vantagem na seletividade dos peptídeos derivados do *M. leprae* apresentados às células T.

A fim de testar o efeito funcional do marcador rs9277341, avaliamos em controles saudáveis a produção *in vitro* das citocinas TNF e IL-10, que têm grande relevância para os desfechos da hanseníase. A produção de IL-10 e TNF, após o estímulo específico com *M. leprae*, foi maior nos carreadores do alelo G para o rs927741. As micobactérias e seus produtos são considerados

bons indutores de produção de IL-10 e TNF em monócitos ⁴¹. Lima e cols. identificaram maiores produções destas citocinas por PMBCs estimulados com *M. leprae* em contatos de área endêmica. Para os autores, o aumento da razão TNF/IL-10 está relacionado a condições restritivas para o bacilo, em razão da formação de granulomas que dificultam a multiplicação bacilar ainda no início da infecção. Já a diminuição desta razão pode ser traduzida como um efeito protetivo contra a destruição tecidual do perfil Th1⁴¹. Al-Attiyah e cols. (2012) observaram produções maiores de TNF e IL-10 por PBMCs de pacientes com tuberculose pulmonar após 48 horas de cultura pode interferir no efeito protetivo das citocinas Th1 e auxiliar a sobrevivência intracelular do *Mycobacterium tuberculosis*, levando a progressão da doença⁴². Rizzard e cols. (1998) ao observar a expressão e a secreção de citocinas em PBMCs de pacientes HIV positivos, verificaram que em estágios avançados da doença os níveis de IL-10 e TNF estão elevados, e poderiam ser utilizados para indicar progressão da doença⁴³. Assim, a maior quantidade dessas duas citocinas no tempo de estímulo usado em nossos experimentos pode indicar um perfil de resposta inicial mista (Th1 e Th2) após o estímulo com antígeno do *M. leprae*.

Nossos dados sugerem pela primeira vez o envolvimento dos genes *HLA-DP* com os desfechos da hanseníase, o que contribui para elucidar as bases moleculares da suscetibilidade para esta doença envolvendo o complexo HLA. A persistente prevalência da hanseníase em países como o Brasil e a dificuldade da eliminação da doença acentuam a relevância dos estudos que visem explicar os fatores envolvidos nesses problemas de forma específica para a nossa população. O melhor conhecimento dos fatores genéticos que estão associados com a hanseníase pode auxiliar na implantação de medidas profiláticas e terapêuticas, impactando na epidemiologia da doença no Brasil.

4.5 Referências

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Trumann RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(2):338-81.
2. WHO. Leprosy: Weekly Epidemiological Record, Septembre 2017; 92(35):501-520.
3. Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev.* 1966; 33:119-128.
4. World Health Organization. Chemoterapy of leprosy for control programmes. 1982. Geneva, Technical Report Series, n° 675
5. WHO. WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Leprosy: Introduction. Essential Medicines and Health Products Information Portal. 1998. p. 28
6. Prevedello FC, Mira MT. Leprosy: a genetic disease? *An Bras Dermatol.* 2007; 82(5):451-459.
7. Monot M, Hanoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the Origen of Leprosy. *Science.* 2005; 308:1040-1042.
8. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhil J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001 Feb22; 409.
9. Mira MT, Alcais A, Van Tuc N et al. Chromossome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat. Genet.* 2003; 33(3):412-25.
10. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004; 427(6975):636-640.
11. Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk fator for early-onset leprosy. *Nat. Genet.* 2007; 39(4):517-22.

12. Miller EM, Jamielson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 2004; 5(1):63-7.
13. Alter A, Huong NT, Singh M, Orlova M, van Thuc N, Katoch K, et al. Human leukocyte antigen class I region single-nucleotide polymorphisms are associated with leprosy susceptibility in Vietnam and India. *J Infect Dis.* 2011 May 1; 203(9):1274-81.
14. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J.* 2007; 48(1):11-23.
15. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumor necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001; 2:196-204
16. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *N Engl J Med.* 2009; 361:2609-18
17. Rani R, Fernandes-Viña MA, Zhang S, Stastny P. HLA-DPB1 alleles in a population from North India and description of a new variant (DPB1*5601). *Tissue Antigens.* 1995; 45:264-9.
18. IMGT/HLA Release 3.31.0, 05 Sept 2018; www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla
19. HapMap – International HapMap Project. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/projhapmap/>
20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Mar 11; 16(3):1215.
21. Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R foundation for statistic computing, 2008
22. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SEB, Amorim A et al. Straight forward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One* 7. 2012. <https://doi.org/10.371/journal.pone.0029684>.
23. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 2009. 19:1655-64.
24. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov.
25. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:177-82

26. Suarez-Kurtz G, Vargens D, Scruhiner CI, Bastos-Rodrigues L, Pena SDJ. Self-reported skin color genomic, ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenetic and Genomes*. 2007; 17(9):765-72
27. Santos RV, Fry PH, Monteiro S, Maio MC, Rodrigues JC et al. Color and genomic ancestry in Brazil: dialogues between anthropology and genetics. *Curr Anthropol*. 2009; 50:787-819
28. Leite TKM, Fonseca RMC, França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry self reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27162.
29. Durso DF, Bydloowski SP, Hutz MH, Suarez-Kurtz G, Magalhães TR, Pena SDJ. Association of genetic variants with self-assessed color categories in Brazilian. *PLoS One*. 2014; 9(1):e83926.
30. Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, et al. Genome-Wide association study identifies genetic variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B. *Journ of Hepatol*. 2010; 52:S283.
31. Guo X, Zhang Y, Li J, et al. Strong influence of human leucocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. *Hepatology*. 2011; 53:422-8
32. Hu L, Zhai X, Liu J, et al. Genetics variants in human leucocyte antigen/DP-DQ influence both hepatitis B virus clearance and hepatocellular carcinoma development. *Hepatology*. 2012; 55:1426-31
33. Migita K, Abiru S, Ohtani M, et al. HLA-DP gene polymorphisms and hepatitis B infection in the Japanese population. *Transl Res*. 2012.
34. Xie G, Roshandel D, Sherva R, et al. Association of granulomatosis with polyangiitis (Wegener’s) with HLA-DPB1*04 and SEMA6A gene variants: evidence from genome-wide analysis. *Arthritis Rheum*. 2013 September; 65(9): 2457–2468
35. Tanna A, Salama AD, Brookes P, Pusey CD. Familial granulomatosis with polyangiitis: three cases of this rare disorder in one Indoasian Family carrying an identical HLA-DPB1 allele. *BMJ Case Reports*. 2012.
36. Yamashita Y, Anczurowski M, Nakatsugawa M, Tanaka M, Kagoya Y, Sinha A et al. HLA-DP^{84gly} constitutively presents endogenous peptides generated by the class I antigen processing pathway. *Nat Commun*. 2017 May 10; 8:15244
37. Anczurowski M, Yamashita Y, Nakatsugawa M, Ochi T, Kagoya Y, Guo T et al. Mechanisms underlying the lack of endogenous processing and CLIP – mediated binding of the invariant chain by HLA-DP^{84gly}. *Scientific Report*, 2018; 8:4804

38. Berreta F, Butler RH, Diaz G, Sanarico N, Arroyo J, Fraziano M. Detailed analysis of the effects of Glu/Lys β 69 human leukocyte antigen-DP polymorphism on peptide-binding specificity. *Tissue Antigens*. 2003, 62:459-71.
39. Doytchinova IA, Flower DR. In silico identification of supertypes for class II MHCs. *J Immunol*. 2005, 174:7085-95.
40. Selvaraj P, Raghavan S, Swaminathan S, Alagarasu K, Narendran G, Narayanan PR. HLA-DQB1 and -DPB1 allele profile in HIV infected patients with and without pulmonary tuberculosis of south India. *Infect Genet and Evol*. 2008; 8:664–71.
41. Lima MCBS, Pereira GMB, Rumjanek FD, Gomes HM, Dupre N, Sampaio EP, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol*. 2000; 51:419-428.
42. Al-Attyah R, El-Shazly A, Mustafa AS. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients. *Scand J Immunol*. 2012; 75(6):633-32.
- 43 – Rizzard GP, Marriot JB, Cookson S, Lazzarin A, Dalgleish AG, Barcellini W. Tumour necrosis factor (TNF) and TNF-related molecules in HIV-1⁺ individuals: relationship with in vitro Th1/Th2-type response. *Clin Exp Immunol*. 1998; Oct 114(1):61-5

5. Conclusões

O presente estudo de associação genética dos genes *HLA-DPA1* e *HLA-DPB1* em hanseníase permitiu as seguintes conclusões:

- Os SNPs rs9277341 (*HLA-DPA1*), rs1431402 e rs9277469 (*HLA-DPB1*) apresentaram associação de suscetibilidade à hanseníase *per se* na população de Rondonópolis-MT
- Os SNPs rs9277341 e rs2301220 (*HLA-DPA1*) e rs31350221 (*HLA-DPB1*) apresentaram associação de proteção à forma MB na população de Rondonópolis-MT
- O alelo HLA-DPB1*03 e o genótipo HLA-DPB1*02/03 foram associados à suscetibilidade à hanseníase *per se* na população de Rondonópolis-MT
- O genótipo HLA-DPB1*02/03 foi associado à proteção à forma MB na população de Rondonópolis.
- A avaliação funcional para o SNP rs9277341 em controles saudáveis do Estado de São Paulo apresentou aumento da produção de IL-10 e TNF para os carreadores do alelo G.

6. Tabelas Suplementares

Tabela Sup 1- Frequências de alelos, genótipos e carreadores em pacientes e controles para os SNPs do gene *HLA-DPA1* e dados sem significância estatística para hanseníase *per se*, em Rondonópolis-MT

SNP	Alelos e Genótipos	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs1367728	A	0,12	0,86	0,86 (0,48)	0,9 (0,66)
	G	0,88	0,14	*	*
	AA	7 (0,02)	2 (0,02)	0,84 (0,71)	0,94 (0,89)
	GA	60 (0,20)	22 (0,23)	0,84 (0,32)	0,88 (0,49)
	GG	239 (0,78)	71 (0,75)	*	*
	Carreador A			0,84 (0,30)	0,88 (0,50)
	Carreador G			0,47 (0,77)	1,03 (0,94)
rs2301220	A	0,3	0,36	1,06 (0,67)	1,03 (0,81)
	G	0,7	0,64	*	*
	AA	27 (0,09)	9 (0,09)	0,99 (0,99)	0,95 (0,87)
	AG	131 (0,43)	51 (0,54)	1,19 (0,25)	1,14 (0,39)
	GG	148 (0,48)	35 (0,37)	*	*
	Carreador A			1,15 (0,32)	1,10 (0,49)
	Carreador G			1,08 (0,72)	1,11 (0,66)
rs2301226	A	0,2	0,21	1,31 (0,15)	1,20 (0,25)
	G	0,8	0,79	*	*
	AA	14 (0,05)	4 (0,04)	1,73 (0,17)	1,69 (0,19)
	AG	92 (0,30)	32 (0,34)	1,29 (0,11)	1,20 (0,27)
	GG	200 (0,65)	59 (0,62)	*	*
	Carreador A			1,33 (0,06)	1,25 (0,16)
	Carreador G			0,62 (0,23)	0,62 (0,83)
rs9277342	A	0,21	0,17	0,88 (0,48)	0,88 (0,51)
	G	0,79	0,83	*	*
	AA	12 (0,04)	3 (0,03)	0,69 (0,32)	0,73 (0,39)
	AG	102 (0,33)	26 (0,27)	0,91 (0,57)	0,91 (0,57)
	GG	192 (0,63)	66 (0,69)	*	*
	Carreador A			0,88 (0,42)	0,88 (0,44)
	Carreador G			1,38 (0,35)	1,32 (0,43)
		n= 306	n=406		

OR - *odds ratio*

* categoria referência

** valores calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular.

Tabela Sup 2 – Frequência de alelos, genótipos e carreadores em pacientes PB e MB para os SNPs do gene *HLA-DPA1* e dados sem significância estatística para forma clínica da hanseníase na população de Rondonópolis-MT.

SNP	Alelos e Genótipos	MB (%)	PB (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs1367728	A	0,12	0,86	0,86 (0,68)	0,73 (0,39)
	G	0,88	0,14	*	*
	AA	7 (0,02)	2 (0,02)	1,03 (0,96)	0,92 (0,92)
	GA	60 (0,20)	22 (0,23)	0,81 (0,45)	0,64 (0,15)
	GG	239 (0,78)	71 (0,75)	*	*
	Carreador A			0,82 (0,49)	0,67 (0,27)
	Carreador G			0,91 (0,91)	0,97 (0,97)
rs2301226	A	0,2	0,21	0,91 (0,75)	0,99 (0,97)
	G	0,8	0,79	*	*
	AA	14 (0,05)	4 (0,04)	1,03 (0,95)	1,18 (0,77)
	AG	92 (0,30)	32 (0,34)	0,84 (0,51)	0,91 (0,73)
	GG	200 (0,65)	59 (0,62)	*	*
	Carreador A			0,86 (0,56)	0,94 (0,83)
	Carreador G			0,91 (0,88)	0,81 (0,73)
rs9277342	A	0,21	0,17	1,28 (0,42)	1,71 (0,62)
	G	0,79	0,83	*	*
	AA	12 (0,04)	3 (0,03)	1,37 (0,63)	1,24 (0,74)
	AG	102 (0,33)	26 (0,27)	1,34 (0,25)	1,21 (0,49)
	GG	192 (0,63)	66 (0,69)	*	*
	Carreador A			1,35 (0,23)	1,21 (0,47)
	Carreador G			0,78 (0,73)	0,85 (0,81)
		n= 306	n=95		

OR - *odds ratio*

* categoria referência

** valores calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular

PB – pacientes paucibacilares

MB – pacientes multibacilares

Tabela Sup.3 - Frequências de alelos, genótipos e carreadores em pacientes e controles para o SNP rs9277341 do gene *HLA-DPA1* e dados sem significância estatística para hanseníase *per se*, no estado de São Paulo

SNP	Alelos e Genótipos	Frequências em controle	Frequências em pacientes	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs9277341	A	0,72	0,73	*	*
	G	0,28	0,27	0,93 (0,67)	0,86 (0,37)
	AA	232 (0,62)	309 (0,64)	*	*
	AG	74 (0,20)	89 (0,18)	0,93 (0,71)	0,84 (0,38)
	GG	69 (0,18)	86 (0,18)	0,90 (0,67)	0,59 (0,43)
	Carreador A			1,04 (0,81)	0,85 (0,28)
	Carreador G			0,91 (0,55)	1,04 (0,81)
		n= 375	n= 484		

OR - *odds ratio*

* categoria referência

** valores calculados com correção para as covariáveis etnia e sexo

Tabela Sup 4 - Frequência de alelos, genótipos e carreadores em pacientes PB e MB para o SNP rs9277341 do gene *HLA-DPA1* e dados sem significância estatística para forma clínica da hanseníase no estado de São Paulo

SNP	Alelos e Genótipos	MB (%)	PB (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs9277341	A	0,73	0,72	*	*
	G	0,27	0,28	0,64 (0,73)	1,11 (0,69)
	AA	213 (0,63)	56 (0,65)	*	*
	AG	67 (0,20)	11 (0,13)	0,62 (0,18)	0,64 (0,23)
	GG	56 (0,17)	19 (0,22)	29 (0,40)	1,30 (0,38)
	Carreador A			0,70 (0,24)	0,70 (0,24)
	Carreador G			0,92 (0,76)	0,94 (0,84)
		n= 336	n= 86		

OR - odds ratio

* categoria referência

** valores calculados com correção para as covariáveis etnia e sexo

PB – pacientes paucibacilares

MB – pacientes multibacilares

Tabela Sup 5 - Frequências dos alelos e genótipos HLA-DPA1* em pacientes e controles e dados sem significância estatística para hanseníase *per se* em Rondonópolis-MT

Alelos	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
DPA1*01	0,65	0,67	*	*
DPA1*02	0,31	0,30	0,93 (0,71)	0,92 (0,67)
DPA1*03	0,04	0,03	0,83 (0,67)	0,69 (0,10)
Genótipos				
DPA1*01/01	0,43	0,46	*	*
DPA1*01/02	0,38	0,37	0,91 (0,62)	0,90 (0,57)
DPA1*01/03	0,05	0,04	0,81 (0,62)	0,72 (0,43)
DPA1*02/02	0,10	0,10	0,88 (0,67)	0,87 (0,64)
DPA1*02/03	0,03	0,03	1,02 (0,96)	0,73 (0,54)
	n=385	n=306		

OR - odds ratio

* categoria referência

** OR e p-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular

Tabela Sup 6 - Frequências dos alelos e genótipos HLA-DPA1* em pacientes PB e MB e dados sem significância estatística para forma clínica de hanseníase em Rondonópolis-MT

Alelos	PB (%)	MB (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
DPA1*01	0,66	0,67	*	*
DPA1*02	0,32	0,29	0,90 (0,75)	0,98 (0,95)
DPA1*03	0,02	0,04	1,62(0,58)	1,57(0,62)
Genótipos				
DPA1*01/01	0,39	0,48	*	*
DPA1*01/02	0,50	0,34	0,55 (0,04)	0,59 (0,10)
DPA1*01/03	0,03	0,03	1,13 (0,87)	0,98 (0,98)
DPA1*02/02	0,06	0,011	1,46 (0,50)	1,83 (0,35)
DPA1*02/03	0,02	0,03	1,80 (0,58)	2,03 (0,52)
	n= 306	n=385		

OR - odds ratio

* categoria referência

** OR e p-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular

MB-pacientes multibacilares

PB-paciente paucibacilares

Tabela Sup 7- Frequências de alelos, genótipos e carreadores em pacientes e controles para os SNPs do gene *HLA-DPB1* e dados sem significância estatística para hanseníase *per se* em Rondonópolis-MT

SNP	Alelos e Genótipos	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
rs2071353	A	0,71	0,69	*	*
	G	0,29	0,31	1,09 (0,55)	1,08 (0,63)
	AA	179 (0,50)	189 (0,47)	*	*
	AG	143 (0,40)	179 (0,44)	1,18 (0,26)	1,16 (0,33)
	GG	33 (0,09)	38 (0,09)	1,09 (0,73)	1,06 (0,82)
	Carreador A			0,99 (0,97)	1,01 (0,96)
	Carreador G			1,16 (0,28)	1,14 (0,36)
rs3135021	A	0,35	0,38	1,13 (0,40)	1,11 (0,46)
	G	0,65	0,62	*	*
	AA	50 (0,14)	57 (0,14)	1,15 (0,52)	1,13 (0,59)
	AG	150 (0,42)	195 (0,48)	1,31 (0,07)	1,28 (0,12)
	GG	156 (0,44)	154 (0,38)	*	*
	Carreador A			1,27 (0,09)	1,24 (0,14)
	Carreador G			1,00 (0,99)	1,00 (0,97)
		n=356	n=406		

OR - odds ratio

* categoria referência

** valores calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular

Tabela Sup 8 – Frequência de alelos, genótipos e carreadores em pacientes PB e MB para os SNPs do gene *HLA-DPB1* e dados sem significância estatística para forma clínica de hanseníase na população de Rondonópolis-MT.

SNP	Alelos e Genótipos	MB (%)	PB (%)	OR (<i>p</i> -valor)	OR (<i>p</i> -valor)**
rs1431402	A	0,80	0,83	*	*
	T	0,20	0,17	0,91 (0,76)	1,00 (0,98)
	AA	197(0,63)	60 (0,68)	*	*
	TA	101 (0,35)	31 (0,31)	0,99 (0,97)	0,96 (0,90)
	TT	8 (0,02)	4 (0,01)	0,60 (0,43)	1,24 (0,79)
	Carreador A			1,63 (0,42)	0,79 (0,78)
	Carreador T			0,94 (0,82)	0,98 (0,95)
rs2071353	A	0,70	0,65	*	*
	G	0,30	0,35	0,80 (0,37)	0,84 (0,52)
	AA	150 (0,49)	38 (0,40)	*	*
	GA	129 (0,42)	48 (0,51)	0,68 (0,12)	0,63 (0,08)
	GG	27 (0,09)	9 (0,09)	0,76 (0,51)	1,03 (0,94)
	Carreador A			1,08 (0,84)	0,76 (0,56)
	Carreador G			0,69 (0,12)	0,68 (0,13)
s9277469	A	0,36	0,43	0,74 (0,22)	0,77 (0,31)
	C	0,64	0,57	*	*
	AA	36 (0,12)	15 (0,16)	0,56 (0,11)	0,63 (0,27)
	CA	150 (0,49)	52 (0,55)	0,67 (0,13)	0,63 (0,10)
	CC	120 (0,39)	28 (0,29)	*	*
	Carreador A			0,64 (0,08)	0,63 (0,09)
	Carreador C			1,40 (0,30)	1,19 (0,63)
		n= 95	n= 95		

OR - *odds ratio*

* categoria referência

** valores calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular.

Tabela Sup 9 - Frequências dos alelos e genótipos HLA-DPB1* em pacientes e controles e dados sem significância estatística para hanseníase *per se* na população de Rondonópolis-MT

Alelos	Controles (%)	Pacientes (%)	OR (<i>p</i> -valor)	OR (<i>p</i> -valor)**
DPB1*04	0,43	0,36	*	*
DPB1*01	0,12	0,12	1,20 (0,50)	1,315(0,61)
DPB1*02	0,14	0,18	1,47 (0,12)	1,48 (0,12)
DPB1*05	0,02	0,02	8,33 (0,77)	8,80 (0,84)
DPB1*09	0,01	0,01	3,39 (0,50)	3,82 (0,55)
DPB1*10	0,02	0,03	2,03 (0,25)	1,95(0,29)
DPB1*13	0,02	0,03	1,91 (0,30)	1,80 (0,36)
DPB1*14	0,02	0,02	1,22 (0,74)	1,33 (0,65)
DPB1*17	0,04	0,03	8,73 (0,77)	8,80(0,84)
DPB1*27	0,01	0,01	5,09(0,58)	5,47(0,62)
DPB1*33	0,01	0,01	1,42 (0,67)	1,52(0,61)
DPB1*131	0,01	0,01	1,52 (0,74)	1,78 (0,65)
DPB1*105	0,001	0,03	1,29(0,98)	1,27 (0,98)
DPB1*179	0,04	0,02	0,002 (0,89)	0,002 (0,89)
DPB1*274	0,10	0,001	0,001 (0,83)	0,001(0,83)
Genótipos				
DPB1*04/04	0,43	0,39	*	*
DPB1*04/02	0,11	0,12	1,55 (0,17)	1,41 (0,30)
DPB1*04/01	0,07	0,09	1,73 (0,13)	1,65 (0,18)
DPB1*04/03	0,07	0,09	1,93 (0,77)	2,00 (0,71)
DPB1*04/13	0,02	0,04	2,23 (0,14)	2,34 (0,14)
DPB1*04/17	0,05	0,02	6,55 (0,14)	6,15 (0,35)
DPB1*04/10	0,01	0,01	1,21 (0,81)	1,35 (0,72)
DPB1*04/11	0,01	0,03	3,65 (0,06)	3,75 (0,06)
DPB1*02/02	0,03	0,04	2,26 (0,11)	2,30 (0,10)
DPB1*02/01	0,04	0,03	1,08 (0,87)	9,44 (0,91)
DPB1*02/13	0,02	0,001	2,43 (0,47)	3,61 (0,37)
DPB1*02/10	0,01	0,02	2,43 (0,22)	2,26 (0,27)
DPB1*02/14	0,01	0,01	2,43 (0,31)	2,52 (0,30)
DPB1*03/03	0,01	0,01	8,13 (0,82)	9,46 (0,95)
DPB1*03/13	0,01	0,01	2,43 (0,31)	2,07 (0,42)
DPB1*04/05	0,01	0,01	4,05 (0,44)	3,79 (0,41)
DPB1*02/05	0,01	0,01	1,21 (0,81)	0,84 (0,79)
DPB1*01/05	0,02	0,01	8,13 (0,82)	0,94 (0,91)
DPB1*105/33	0,001	0,02	1,41 (0,99)	1,34 (0,99)
DPB1*01/105	0,01	0,001	1,41 (0,99)	9,54 (0,99)
DPB1*04/05	0,001	0,01	1,41 (0,99)	1,10 (0,99)
DPB1*10/105	0,001	0,01	1,41 (0,99)	1,26 (0,99)

OR - *odds ratio*

* categoria referência

** OR e *p*-valor calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular.

Tabela Sup 10 - Frequências dos alelos e genótipos HLA-DPB1* em pacientes PB e MB e dados sem significância estatística para forma clínica da hanseníase na população de Rondonópolis-MT

Alelos	PB (%)	MB (%)	OR (p-valor)	OR (p-valor)**
DPB1*04	0,31	0,38		
DPB1*01	0,12	0,12	0,82 (0,68)	0,81 (0,68)
DPB1*02	0,21	0,17	0,69 (0,68)	0,69 (0,38)
DPB1*03	0,12	0,11	0,79 (0,63)	0,77 (0,60)
DPB1*05	0,01	0,01	0,75 (0,80)	0,55 (0,62)
DPB1*06	0,01	0,01	0,25 (0,49)	0,16 (0,36)
DPB1*10	0,02	0,03	1,08 (0,93)	1,46 (0,69)
DPB1*11	0,03	0,02	0,62 (0,58)	0,90 (0,91)
DPB1*13	0,04	0,02	0,90 (0,88)	0,93 (0,93)
DPB1*14	0,01	0,02	1,25 (0,84)	1,60 (0,68)
DPB1*17	0,04	0,02	0,55 (0,45)	0,76 (0,75)
DPB1*20	0,01	0,01	0,25 (0,49)	0,17 (0,38)
DPB1*33	0,02	0,01	0,62 (0,69)	0,59 (0,68)
DPB1*105	0,02	0,03	1,25 (0,80)	1,14 (0,88)
DPB1*131	0,01	0,01	0,65 (0,99)	0,73 (0,99)
Genótipos				
DPB1*04/04	0,10	0,15		
DPB1*04/02	0,12	0,13	8,05 (0,71)	6,14 (0,43)
DPB1*04/03	0,06	0,10	1,03 (0,96)	9,6 (0,96)
DPB1*04/17	0,03	0,02	6,01 (0,60)	5,27 (0,51)
DPB1*04/13	0,01	0,04	1,90 (0,57)	1,46 (0,74)
DPB1*04/10	0,01	0,01	4,63 (0,55)	5,35 (0,64)
DPB1*04/14	0,01	0,02	1,22 (0,86)	9,67 (0,97)
DPB1*04/11	0,03	0,03	6,15 (0,60)	5,91 (0,58)
DPB1*04/05	0,001	0,01	3,18 (0,99)	3,97 (0,99)
DPB1*01/01	0,01	0,03	1,19 (0,87)	1,14 (0,90)
DPB1*01/13	0,01	0,01	5,76 (0,66)	6,07 (0,71)
DPB1*01/10	0,001	0,01	3,41 (0,99)	2,31 (0,99)
DPB1*01/105	0,01	0,01	1,41 (0,78)	3,73 (0,51)
DPB1*01/14	0,001	0,01	3,41 (0,99)	2,67 (0,99)
DPB1*01/05	0,001	0,01	1,82 (0,99)	1,26 (0,99)
DPB1*01/27	0,001	0,01	1,82 (0,99)	1,42 (0,99)
DPB1*02/01	0,06	0,02	2,59 (0,120)	2,19 (0,08)
DPB1*02/02	0,04	0,04	8,43 (0,83)	7,74 (0,75)
DPB1*02/17	0,001	0,01	2,12 (0,99)	1,51 (0,99)
DPB1*02/13	0,001	0,001	5,45 (0,99)	3,60 (0,99)
DPB1*02/10	0,01	0,02	1,24 (0,85)	1,37 (0,79)
DPB1*02/05	0,001	0,01	1,82 (0,99)	1,39 (0,99)
DPB1*0206	0,01	0,01	1,2 (0,11)	1,20 (0,15)
DPB1*02/14	0,01	0,01	7,85 (0,84)	8,94 (0,93)
DPB1*02/105	0,001	0,001	2,44 (0,99)	1,56 (0,99)
DPB1*03/03	0,001	0,01	2,45 (0,99)	2,51 (0,99)
DPB1*03/17	0,01	0,001	2,72 (0,39)	2,13 (0,31)
DPB1*03/13	0,001	0,02	1,91 (0,99)	2,13 (0,99)
DPB1*03/10	0,01	0,01	6,87 (0,77)	4,02 (0,54)
DPB1*03/11	0,01	0,01	6,55 (0,73)	5,27 (0,61)
DPB1*03/26	0,03	0,001	0,01(0,99)	0,01(0,99)
DPB1*05/20	0,01	0,01	0,001(0,99)	0,001(0,99)
DPB1*17/14	0,01	0,01	1,82 (0,99)	1,34 (0,99)
DPB1*17/11	0,01	0,01	3,60 (0,49)	4,26 (0,99)
DPB1*105/10	0,001	0,01	2,85 (0,99)	2,94 (0,99)

DPB1*105/33	0,03	0,02	4,9 (0,460)	4,64 (0,44)
-------------	------	------	-------------	-------------

OR - *odds ratio*

* categoria referência

** OR e *p-valor* calculados para covariáveis sexo e ancestralidade molecular.