

# Estudo comparativo entre reação de Mitsuda e antígenos leucocitários humanos em pacientes hansenianos

## Comparative study between the Mitsuda test and the human leukocyte antigens in leprosy patients

Fabiana Covolo de Souza<sup>1</sup>, Elaine Valim Camarinha Marcos<sup>1</sup>, Somei Ura<sup>2</sup>,  
Paula Araújo Opromolla<sup>3</sup> e Maria Esther Salles Nogueira<sup>1</sup>

### RESUMO

Neste estudo, propomos comparar o teste cutâneo de Mitsuda e os alelos HLA-DR2/HLA-DR3 e HLA-DQ1 relacionados com as formas clínicas da hanseníase em 176 pacientes (50 TT, 50 LL e 76 B). Os resultados obtidos não revelaram associação entre reação de Mitsuda e os alelos HLA nas formas clínicas isoladas; no entanto, quando analisados de acordo com a resposta ao teste de Mitsuda, associação significativa foi encontrada entre os pacientes Mitsuda negativos e HLA-DQ1 ( $p=0,002$ ). Não foi observada associação entre reação de Mitsuda positiva e alelos HLA-DR2/DR3. Concluimos que existe importante participação do alelo HLA-DQ1 na ausência de resposta ao teste de Mitsuda. Sugerimos estudos mais específicos para este alelo.

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

### ABSTRACT

In this study, we aimed to compare the Mitsuda skin test with the alleles HLA-DR2/HLA-DR3 and HLA-DQ1, in relation to the clinical forms of leprosy in 176 patients (50 TT, 50 LL and 76 B). The results obtained did not reveal any association between the Mitsuda reaction and the HLA alleles in the clinical forms isolated. However, when analyzed according to Mitsuda test response, a significant association was found between patients with negative Mitsuda reaction and HLA-DQ1 ( $p=0.002$ ). No association was observed between positive Mitsuda reaction and the HLA-DR2/DR3 alleles. We concluded that the allele HLA-DQ1 has an important participation when there is no response to the Mitsuda test. We suggest that more specific studies should be developed on this allele.

**Key-words:** Leprosy. HLA. Mitsuda antigen. Mycobacterium leprae.

Hanseníase é doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*)<sup>5,20</sup>, com incidência anual de aproximadamente 400.000 casos no mundo<sup>27</sup> e 30.000 no Brasil<sup>18</sup>. É considerada grave problema de saúde pública e social, devido às seqüelas físicas e deformidades permanentes que o paciente manifesta<sup>23</sup>.

As diferentes formas clínicas da doença expressam o grau de imunidade específica do hospedeiro contra o bacilo<sup>14</sup>. Fundamentado nos critérios estabelecidos por Ridley & Jopling<sup>21</sup>, é classificada em cinco formas polares e interpolares: a forma tuberculóide (TT) com resposta imune eficiente e a virchoviana (LL) com resposta ineficaz. As formas interpolares representam o grupo dimorfo (BB, BT, BL), que apresentam manifestações clínicas e imunológicas variáveis entre os pólos TT e LL<sup>7</sup>.

A reação cutânea de Mitsuda consiste em um teste oficialmente aceito como critério de classificação e prognóstico da hanseníase e constitui parâmetro imunológico para avaliar a resposta tardia a uma seqüência de eventos que se seguem à fagocitose dos bacilos contidos na suspensão, pelos histiócitos<sup>10</sup>. Através deste, é possível avaliar a resposta imune celular nos indivíduos, resposta esta, que está intimamente relacionada à progressão e manifestação clínica da doença<sup>2,13</sup>.

No consenso geral, pacientes TT são definidos como Mitsuda positivos e LL como Mitsuda negativos. Os grupos interpolares apresentam reações variáveis dependendo do grau de imunidade do paciente.

O complexo HLA, na hanseníase, começou a ser estudado na tentativa de elucidar os mecanismos de suscetibilidade ou

1. Equipe Técnica de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. 2. Divisão de Ensino e Pesquisa, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. 3. Núcleo de Apoio e Pesquisa, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP.

**Endereço para correspondência:** Ms Fabiana Covolo de Souza. Instituto Lauro de Souza Lima. Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 225/226, Caixa Postal 3021, 17034-971 Bauru, SP.

Tel: 55 14 3103-5913, Fax: 55 14 3103-5914

e-mail: fsouza@ilsl.br

Recebido para publicação em 13/3/2006

Aceito em 2/4/2007

de resistência para a doença, uma vez que estes alelos atuam de forma direta na resposta imune, através da apresentação do peptídeo antigênico ao linfócito T<sup>6,8</sup>. Associações positivas entre TT e alelos HLA-DR2, HLA-DR3 e entre LL e o alelo HLA-DQ1 têm sido descritas em diferentes populações do mundo<sup>4,9,17,24,25,26</sup>.

Estudos<sup>15,19</sup> têm demonstrado que o complexo HLA, na hanseníase, participa na modulação e manifestação das formas clínicas da doença, e não influencia na suscetibilidade para a infecção propriamente dita. Assim, tanto a reação de Mitsuda como o complexo HLA atuam no prognóstico da hanseníase, ou seja, indivíduos Mitsuda positivos portadores do alelo HLA-DR2 ou HLA-DR3 teriam maior probabilidade de desenvolver a forma TT; e os Mitsuda negativos portadores do alelo HLA-DQ1, a forma LL.

Fundamentado na premissa supracitada e na falta de dados na literatura, este estudo foi proposto, com o objetivo de verificar a concordância entre os resultados da reação de Mitsuda comparados aos alelos HLA de classe II (lócus DRB1\* e DQB1\*) nas diferentes formas clínicas da hanseníase visando à melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na patogenia desta doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Pacientes.** Participaram do estudo 176 pacientes, classificados de acordo com os critérios estabelecidos por Ridley & Jopling<sup>21</sup>, distribuídos em TT (n=50), BT (n=22), BB (n=29), BL (n=25) e LL (n=50) diagnosticados no Serviço de Dermatologia do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) de Bauru-SP.

**Aspectos éticos.** Todos os pacientes foram informados e concordaram em participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ILSL, sob nº 0202.

**Teste de Mitsuda<sup>12</sup>.** Suspensão injetada na face anterior do braço, por via intradérmica, 0,1ml na concentração de  $6,0 \times 10^7$  *M. leprae*/ml, preparada na própria instituição. A leitura clínica da reação foi realizada 28 dias após a injeção do antígeno. Calculou-se a média aritmética dos dois maiores diâmetros do nódulo, conforme critérios propostos pelo Congresso Mundial de Leprologia<sup>10</sup>, descritos a seguir: Negativo (-) ausência de resposta; Duvidoso ( $\pm$ ) infiltração com diâmetro < 3mm; Positivo (+) infiltração com diâmetro entre 3 e 5mm; Positivo (++) infiltração com diâmetro > 5mm; Positivo (+++) infiltração com diâmetro  $\geq$  10mm e ulcerado.

**Tipificação dos antígenos leucocitários humanos.** HLA de classe II lócus DRB1\* (DRB1\*01-16) e DQB1\* (DQB1\*01-09) foram realizadas através da extração de DNA pela técnica de *Salting out*<sup>11</sup> e pelo método de PCR-SSP, utilizando-se kits comerciais de baixa resolução da marca *One-Lambda-USA*.

**Análise estatística.** Teste do Qui-quadrado foi utilizado para detecção de associação entre os resultados do teste de Mitsuda e alelos HLA. As análises estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de significância com o emprego do pacote estatístico SPSS 11.0 para Windows.

## RESULTADOS

O grupo TT revelou 100% de positividade para o teste de Mitsuda, o padrão de leitura foi positivo<sup>+</sup> (16%); positivo<sup>++</sup> (68%) e positivo<sup>+++</sup> (16%). O diâmetro da induração variou entre 4,0mm a 18,0mm e o valor médio dos resultados 7,5mm ( $\pm 2,6$ ). Os alelos HLA-DR2 e HLA-DR3 neste grupo representaram 46% ( $p \geq 0,005$ ) da amostra (Tabela 1).

Pacientes LL demonstraram 100% de negatividade ao teste de Mitsuda. O alelo HLA-DQ1 representou 74% ( $p \geq 0,005$ ) nesta forma (Tabela 2).

**Tabela 1 - Distribuição da presença de alelo HLA-DR2 (HLA-DRB1\*15 e HLA-DRB1\*16) e HLA-DR3 (HLA-DRB1\*17 e HLA-DRB1\*18) em 50 pacientes TT com reação de Mitsuda positivos.**

Fenótipo	Alelo HLA	Presença do alelo	
		pacientes com o alelo	
		nº	%
DR2	DRB1*15	12	24,0
	DRB1*16	2	4,0
DR3	DRB1*17	4	8,0
	DRB1*18	4	8,0
DR2+DR3	DRB1*15 + DRB1*17	1	2,0
Outros marcadores		27	54,0
Total		50	100,0

**Tabela 2- Distribuição da presença de alelos HLA-DQ1(HLA-DQB1\*05 e HLA-DQB1\*06) nos 50 pacientes LL com reação de Mitsuda negativa.**

Fenótipo	Alelo HLA	Presença do alelo	
		pacientes com o alelo	
		nº	%
DQ1	DQB1*05	17	34,0
	DQB1*06	14	28,0
	DQB1*05 e DQB1*06	6	12,0
Outros marcadores		13	26,0
Total		50	100,0

No grupo B, o padrão da leitura clínica do teste foi negativo (48,7%); duvidoso (5,2%); positivo<sup>+</sup> (30,3%) e positivo<sup>++</sup> (15,8%). O diâmetro da induração variou entre negativo a 7,5mm, representando uma média de 2,4mm. ( $\pm 2,5$ ). Neste grupo, não foi possível realizar a comparação entre reação de Mitsuda e alelos HLA uma vez que não foi encontrado nenhum alelo HLA associado a esta forma clínica da doença.

Quando a análise dos resultados foi realizada, segundo a resposta ao teste de Mitsuda e independente da forma clínica, dos 176 pacientes estudados, verificou-se positividade para o teste de Mitsuda em 85 (48,3%), destes, 43,5% possuíam o alelo HLA-DR2 ou HLA-DR3 não confirmando associação entre reação de Mitsuda positivo e alelo HLA-DR2/DR3 pelo teste do Qui-quadrado ( $p \geq 0,05$ ). Contudo, 91 pacientes (51,7%) que demonstraram negatividade ao teste de Mitsuda, 65,9% possuíam o alelo HLA-DQ1. Verificou-se associação entre reação de Mitsuda negativo e alelo HLA-DQ1 em nível descritivo de 0,002, pelo teste do Qui-quadrado (Tabela 3).

**Tabela 3- Distribuição de 85 pacientes hansenianos Mitsuda positivos quanto à presença de alelo HLA-DRB1\*15 ou HLA-DRB1\*16 (HLA-DR2), HLA-DRB1\*17 ou HLA-DRB1\*18 (HLA-DR3) e de 91 pacientes Mitsuda negativos quanto à presença do alelo HLA-DQB1\*05 ou HLA-DQB1\*06 (HLA-DQ1).**

Reação de Mitsuda	Presença de alelo HLA nos pacientes				p*	Total
	sim		não			
	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%		
Positivo <sup>1</sup>	37	43,5	48	56,5	0,233	85
Negativo <sup>2</sup>	60	65,9	31	34,1	0,002	91
Total						176

\* teste de Qui-quadrado, gl = 1.

1. em relação a HLA-DR2 e HLA-DR3

2. em relação a HLA-DQ1.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a concordância entre a reação de Mitsuda e alelos HLA-DR2/DR3 e HLA-DQ1 em 176 pacientes portadores de hanseníase classificados segundo os critérios estabelecidos por Ridley & Jopling<sup>21</sup>.

Os resultados da reação de Mitsuda, no grupo de pacientes estudados, concordaram com a descrição da literatura na qual evidencia que pacientes TT são Mitsuda positivos, LL Mitsuda negativos e os B, geralmente, fracamente positivos ou negativos<sup>22</sup>.

Quando comparados os resultados da reação de Mitsuda com os alelos HLA-DR2 e HLA-DR3 na forma TT, assim como HLA-DQ1 na forma LL, não foi possível estabelecer relação significativa entre estes resultados.

Cabe ressaltar que no grupo B, até o momento, não existe descrito na literatura nenhum alelo HLA associado a esta forma da doença, portanto para este grupo, inicialmente foi realizado um estudo de associação entre alelos HLA e B. O resultado deste estudo não demonstrou nenhuma associação dos alelos HLA neste grupo, impossibilitando a comparação com a reação de Mitsuda.

Baseado nas descrições de Ottenhoff<sup>17</sup> e Britton<sup>3</sup> que postularam o alelo HLA-DR2 e/ou HLA-DR3 relacionado à indução de uma resposta imune celular eficiente contra o *M. leprae* e reação de Mitsuda positiva, o alelo HLA-DQ1 relacionado a resposta imune deficiente e reação de Mitsuda negativa, e a falta de concordância observada nos resultados descritos inicialmente neste estudo, uma nova análise foi proposta, na qual os pacientes foram separados de acordo com a resposta ao teste de Mitsuda.

No grupo de pacientes com a reação de Mitsuda positiva persistiu a falta de relação com os alelos HLA, discordando da literatura que sugere a participação dos alelos HLA-DR2 e HLA-DR3 na resposta positiva da reação de Mitsuda<sup>3 17</sup>.

Ottenhoff e cols<sup>16</sup> em estudo envolvendo pacientes BT reacionais e não reacionais, verificaram associação do HLA-DR3 com a resposta fortemente positiva da reação de Mitsuda no grupo reacional. Segundo os autores, a frequência elevada do HLA-DR3 sugere a participação deste na imunidade celular dos pacientes

que sofrem o surto reacional, fato também observado por Marcos e cols<sup>8</sup>, em estudo com pacientes TT e BB reacionais.

A discordância entre os resultados obtidos em nosso estudo com os dados da literatura pode ser justificada nas características peculiares que envolvem o complexo HLA, como o polimorfismo, herança genética, a variação da frequência dos alelos observada entre as diferentes etnias<sup>15</sup>, além do pequeno número de pacientes envolvidos. Sendo assim, estudos neste contexto devem ser analisados individualmente para que suas particularidades sejam percebidas<sup>1</sup>.

Quando analisados os grupos de acordo com a resposta ao teste de Mitsuda, no grupo com reação de Mitsuda negativa, foi possível detectar associação estatisticamente significativa em nível descritivo de 0,002, pelo teste do Qui-quadrado, sugerindo o envolvimento do alelo HLA-DQ1 na resposta imune deficiente contra o *M. leprae*, corroborando os dados da literatura<sup>3 15</sup>.

Considerando que antígenos iguais são reconhecidos tanto por indivíduos que adoece quanto por indivíduos que nunca irão desenvolver a doença e que diferenças são observadas na habilidade desses indivíduos em responder aos mesmos antígenos<sup>17</sup> infere-se que possa ser o peptídeo antigênico apresentado pelo alelo HLA-DQ1 o responsável pela ausência de imunidade celular observada nos pacientes não respondedores ao teste de Mitsuda.

Fundamentado nos resultados obtidos, foi possível verificar o perfil de resposta imune celular específica para o *M. leprae* e a distribuição dos alelos HLA sob os aspectos considerados: formas clínicas e positividade ao teste de Mitsuda. Todavia, os estudos devem ser ampliados para que se possa avaliar e compreender, com maior fidelidade, mecanismos como os de imunoregulação, fisiopatologia e evidenciar a participação destes componentes na infecção hanseniana, para que diagnósticos mais precisos sejam firmados e novas terapêuticas sejam instituídas.

## REFERÊNCIAS

1. Alves C, Vieira N, Meyer I, Alves CO, Toralles MBP, Oliveira MFSP. Antígenos de histocompatibilidade humanos e dermatologia: da pesquisa para a prática clínica. Anais Brasileiros de Dermatologia 81: 65-73, 2006.
2. Beiguelman B. A reação de Mitsuda oitenta anos depois. Hansenologia Internationalis 24:144-161, 1999.
3. Britton WJ. Leprosy 1962-1992: immunology of leprosy. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 87:508-514, 1993.
4. Izumi S, Sugiyama K, Matsumoto Y, Ohkawa S. Analysis of the immunogenetic background of Japanese leprosy patients by the HLA system. Vox sanguinis 42: 243-247, 1982.
5. Jopling WH, McDougall AC, Bakos L. Manual da Hanseníase. 4ª edição, Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 1991.
6. Lagrange PH, Abel L. Susceptibilité génétique à la lèpre chez l'homme. Acta Leprologica 10: 11-27, 1996.
7. Lastória JC, Opromolla DVA, Fleury RN, Rabermann F, Curi PR. Serial Mitsuda tests for identification of reactional tuberculoid and reactional borderline leprosy forms. International Journal of Leprosy 66: 190-200, 1998.
8. Marcos EVC. Imunogenética. In: Noções de Hansenologia. 2ª edição, Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato". Instituto Souza Lima, Bauru, p.43-46, 2000.

9. Marcos EVC, Souza FC, Ura S, Opromolla DVA. Estudo de associação entre antígenos HLA e reação hansênica tipo 1 ulcerada. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 75: 283-290, 2000.
10. **Memória Association International de la Lepre**. In: Congresso Internacional de Leprologia 6, Madrid p.1344, 1953.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HE. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215, 1988.
12. **Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Guia para Utilização de Medicamentos e Imunobiológicos na área de Hanseníase**. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, Brasília, 2000.
13. Mitsuda K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. *International Journal of Leprosy* 21:347-358, 1953.
14. **Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações**. In: *Noções de Hansenologia*. 2ª edição, Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato". Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, p.51-58, 2000.
15. Ottenhoff THM. Immunology of leprosy. New developments. *Tropical Geographical Medicine* 46: 72-80, 1994.
16. Ottenhoff THM, Converse GB, Vries RRP. HLA Antigens and Neural Reversal Reaction in Ethiopian Boderline Tuberculoid Leprosy Patients. *International Journal of Leprosy* 55: 261-66, 1987.
17. Ottenhoff THM, Gonzalez NM, Vries RR, Convitj, Van Rood JJ. Association of HLA specificity LB-E12 (MB1, DC1, MT1) with lepromatous leprosy in a Venezuelan population. *Tissue antigens* 24: 25-29, 1984.
18. Pan American Health Organization. Status of Leprosy in the Region of the Americas. Disponível em: <http://www.paho.org>. Acesso em 16 de fevereiro de 2007.
19. Petzel-Erler ML. Genetics of the immune response and disease susceptibility. *Ciência e Cultura* 51: 199-211, 1999.
20. Rees RJW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed) *Leprosy*. 4<sup>th</sup> edition Churchill. Livingstone, Edinburg, p.49-83, 1994.
21. Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. A five-group system. *International Journal of Leprosy* 34: 255-273, 1966.
22. Rothberg A. Some aspects of immunity on leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis and classification of forms of the disease. Based on 1529 lepromin-tested cases. *Revista Brasileira de Leprologia* 5:45-97, 1937.
23. **Talhari S, Neves RG. Hansenologia**. Calderaro Ltda, Manaus, 1984.
24. Van Eden W, Mehra NK, Vaidya MC, D'Amaro J, Schreuder GMTh, Van Rood JJ. HLA and sporadic tuberculoid leprosy: a population study in Maharashtra, India. *Tissue antigens* 18: 189-194, 1981.
25. Van Eden W, Vries RR, D'Amaro J, Schreuder I, Leiker DL, Van Rood JJ. HLA-DR associated genetic control of the type of leprosy in a population from Surinam. *Human Immunology* 4: 343-350, 1982.
26. **Visentainer JEL, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzel-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 51-59, 1997.
27. World Health Organization. Elimination of Leprosy as a Public Health Problem. Disponível em: <http://www.who.int/lep/>. Acesso em 16 de fevereiro de 2007.