

RICARDO ALBERTO MOLITERNO

HLA E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA

À HEPATITE VIRAL A

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em **Genética Humana** do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, na área de **Genética**.

Orientador:
Prof. Dr. Bento Arce-Gomez

Curitiba
1984

RICARDO ALBERTO MOLITERNO

HLA E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA

À HEPATITE VIRAL A

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em **Genética Humana** do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, na área de **Genética**.

Orientador:

Prof. Dr. Bento Arce-Gomez

Curitiba
1984

Este trabalho é carinhosamente dedicado à minha esposa Chris, pelo amor e doação, e ao meus filhos Ricardo e Caroline, os quais, mesmo sem saber, foram os que mais contribuíram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a significativa colaboração das seguintes pessoas, às quais expressamos a nossa gratidão: Ana Lúcia Rodrigues, Jackson Barbosa e Cleudes Colla, do Laboratório de Imunogenética da UFPr; Dr^ª Maria do Rocio Peixoto do Nascimento e Dr. José Carlos Silva Abreu, da Secretaria de Estado da Saúde e do Bem Estar Social; Dr^ª Wilmera Speck do Nascimento, do Laboratório de Pesquisas João Xavier Vianna de Curitiba; Dr^ª Maria da Graça Sasaki, do Distrito Sanitário de Paranaguá; Dr^ª Lia de Abreu Fachetta, da Fundação Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Agradecemos, ainda, ao CNPq, pelo estímulo à pesquisa e pelo apoio financeiro; ao Prof. Dr. Bento Arce-Gomez, pela amizade e pelos ensinamentos transmitidos e, de uma maneira especial, aos meus pais, irmãos e demais familiares, pelo constante incentivo à minha formação moral e profissional.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Sistema de Histocompatibilidade HLA	1
1.1.1.	Definição	1
1.1.2.	Histórico	2
1.1.3.	Bioquímica dos antígenos HLA	6
1.1.4.	Localização tecidual	7
1.1.5.	Polimorfismo do sistema HLA	8
1.1.6.	Distribuição racial	9
1.1.7.	Haplótipo	10
1.1.8.	Desequilíbrio de ligação	10
1.2.	HLA e Doença	12
1.3.	Hepatite Viral A	16
1.3.1.	Histórico	16
1.3.2.	Etiologia	18
1.3.3.	Epidemiologia	19
1.3.4.	Aspectos clínicos e evolução	20
1.3.5.	Diagnóstico	22
1.3.6.	Tratamento	24
1.4.	Objetivos	24
2.	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1.	Aspectos Demográficos e Sócio-econômicos da Popu-	

lação de Paranaguá	26
2.2. Caracterização do Território de Paranaguá	27
2.3. Surto de Hepatite em Paranaguá	28
2.3.1. Caracterização do surto	28
2.3.2. Aspectos epidemiológicos da hepatite A em Para- naguá	28
2.4. Caracterização da Amostra	33
2.4.1. Pacientes	33
2.4.2. Controles	34
2.5. Coleta de Material	38
2.6. Técnicas Sorológicas	38
2.6.1. Separação de linfócitos	38
2.6.2. Tipagem dos antígenos HLA	40
2.6.3. Tipagem dos antígenos ABO	42
2.6.4. Preparo de complemento	42
2.7. Análise Estatística	43
2.7.1. Qui-Quadrado(χ^2).....	43
2.7.2. Risco Relativo	44
3. RESULTADOS	45
3.1. Frequência dos Antígenos ABO	45
3.2. Frequência dos Antígenos HLA-A e HLA-B	45
3.3. Risco Relativo	49
4. DISCUSSÃO	51
4.1. Associação HLA-A9 e Hepatite Viral A	51
4.2. Associação HLA-A3 e Hepatite Viral A	62
5. CONCLUSÕES	65
6. APÊNDICE 1 - Projeto HLA-Hepatite Viral A	66
7. BIBLIOGRAFIA	67

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1	- Casos de hepatite viral A em Paranaguá por bairro de 27/02/83 a 31/03/83	30
TABELA 2	- Casos de hepatite viral A, segundo idade e sexo, no período de 27.02.83 a 31.03.83 em Paranaguá - Paraná	32
TABELA 3	- Caracterização do grupo paciente segundo idade e sexo	35
TABELA 4	- Caracterização do grupo paciente segundo grupo étnico e sexo	35
TABELA 5	- Distribuição de sexo entre pacientes com hepatite viral A e controles normais	36
TABELA 6	- Distribuição de idade entre pacientes com hepatite viral A e controles normais	36
TABELA 7	- Distribuição de grupo étnico entre pacientes com hepatite viral A e controles normais	36
TABELA 8	- Caracterização do grupo controle segundo idade e sexo	37
TABELA 9	- Caracterização do grupo controle segundo grupo étnico e sexo	37
TABELA 10	- Freqüência dos grupos sanguíneos "A", "B", "AB" e "O" em pacientes com hepatite viral A e	

	controles normais	46
TABELA 11 -	Freqüência dos antígenos HLA-A em pacientes com hepatite viral A e controles normais...	47
TABELA 12 -	Freqüência dos antígenos HLA-B em pacientes com hepatite viral A e controles normais...	48

RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Níveis de anticorpos IgM e IgG na evolução da hepatite viral A 23
- FIGURA 2 - Localização do município de Paranaguá em relação ao estado e sua capital..... 27
- FIGURA 3 - Casos de hepatite segundo data de início dos sintomas em Paranaguá-Pr. (27.02.83-31.03.83) 29
- FIGURA 4 - Reta interpolatriz correspondente à relação entre o "número de indivíduos HLA-A9 (n) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo paciente 56
- FIGURA 5 - Reta interpolatriz correspondente à relação entre o "número de indivíduos HLA-A9 (n) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle 56
- FIGURA 6 - Linha interpolatriz correspondente à relação entre "frequência fenotípica do an-

- tígeno HLA-A9 (%) e total de indivíduos estudados (N)" no grupo paciente 59
- FIGURA 7 - Linha interpolatriz correspondente à relação entre frequência fenotípica do antígeno HLA-A9 (%) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle 59
- FIGURA 8 - Reta interpolatriz correspondente à relação entre "número de indivíduos HLA-A3 (n) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle 63
- FIGURA 9 - Linha interpolatriz correspondente à relação entre "frequência fenotípica do antígeno HLA-A3 (%) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle 63

RESUMO

A hepatite viral A se caracteriza por um processo inflamatório agudo das células hepáticas, causado por um RNA enterovírus de 27nm após um período de incubação de 26 ± 10 dias. A transmissão deste vírus se dá pela via fecal-oral, atingindo principalmente crianças entre 5 e 14 anos. Não foram notificados casos crônicos desta doença. Sintomas como anorexia, náusea, febre, dor abdominal e icterícia, associados a níveis elevados de transaminase glutâmico oxalacética (GOT), transaminase glutâmico pirúvica (GPT) e bilirrubina sérica são sugestivos de hepatite viral. Especificamente, esta doença pode ser diagnosticada pela pesquisa do anticorpo anti-vírus da hepatite A (HAV-M).

Com o objetivo de definir um componente genético para a susceptibilidade e/ou resistência à hepatite viral A, foram tipados, para os antígenos HLA, 47 indivíduos acometidos por esta doença durante um surto epidêmico ocorrido no mês de março de 1983 em Paranaguá, Paraná. O diagnóstico foi estabelecido através de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O grupo controle consiste de 53 indivíduos normais, residentes na mesma localidade dos paci-

entes e pareados com estes em termos de sexo, idade, grupo étnico e classe social.

Para a realização das tipagens, foram isolados linfócitos do sangue venoso, basicamente de acordo com a técnica de BÖYUM (1968). As especificidades HLA foram definidas através de uma bateria de antisoros do National Institute of Health dos E.E.U.U. (NIH), os quais permitiram a detecção de 8 especificidades HLA-A e 15 especificidades HLA-B, pelo teste de microlinfocitotoxicidade dependente de complemento (TERASAKI & Mc CLELLAND, 1964; TERASAKI et al., 1978). A atividade citotóxica dos antisoros foi avaliada pelo método de citofluorocromasia, descrito por BODMER & BODMER (1977).

Os resultados obtidos mostram uma freqüência mais alta do antígeno HLA-A9 nos pacientes (44,7%) em relação aos controles (15,1%) e, conseqüentemente, uma associação positiva entre o antígeno HLA-A9 e hepatite viral A ($\chi^2 = 10,59$; $P < 0,05$). O cálculo do Risco Relativo (RR) mostra que os indivíduos HLA-A9 positivos apresentam 4,5 vezes maior chance de desenvolver hepatite A, em relação aos indivíduos não HLA-A9. Além desta associação positiva, observou-se uma associação negativa entre o antígeno HLA-A3 e a doença em estudo (2,1% vs 22,6%). No entanto, esta associação deixa de ser significativa quando é feita a correção do valor de P ($\chi^2 = 7,54$; $P > 0,05$).

A partir destes resultados, ficou demonstrada a ação de um componente genético para a susceptibilidade à hepati-

te viral A, bem como a possibilidade da resistência a esta doença também estar sob controle genético.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema de Histocompatibilidade HLA

1.1.1. Definição

O principal sistema de histocompatibilidade no homem, designado HLA (H= humano, L= leucócito, A= primeiro locus) é determinado por um grupo de loci intimamente ligados, os quais estão situados no braço curto do cromossomo 6 (JONGSMA et al., 1973; LAMM et al., 1974; FRANCKE & PELLEGRINO, 1977) entre as bandas 6p.21 - 6p.22 (POLACEK et al., 1983).

Diversas propriedades biológicas relacionadas entre si são controladas por este sistema genético: resposta imune a antígenos timo-dependentes, susceptibilidade genética a diversas doenças e rejeição a transplante de tecidos e órgãos (cf.: BACH et al., 1979).

As propriedades biológicas atribuídas ao sistema HLA podem ser consequência da influência direta dos seus anti-

genos sobre o sistema imune (RYDER et al., 1981). Esta influência seria resultado do papel das moléculas desse sistema no controle das interações celulares, quando da resposta do organismo contra antígenos (MUNRO & WALDMANN, 1978). Outro mecanismo seria a ação dos componentes do sistema complemento, alguns ligados ao sistema HLA, como efetores inespecíficos das funções dos anticorpos.

1.1.2. Histórico

A primeira especificidade HLA, designada MAC, foi detectada através de um estudo sistemático de anticorpos obtidos após transfusões sanguíneas (DAUSSET, 1958).

VAN ROOD et al. (1958) e PAYNE & ROLFS (1958) descobriram, independentemente, a alta freqüência dos anticorpos contra os leucócitos do recém-nato no soro de mulheres múltiparas, da mesma maneira que ocorre com o grupo sanguíneo Rh. Ainda hoje é esta a fonte de antisoros mais utilizada para a tipagem dos antígenos HLA.

A análise, através de computadores, de reações imunológicas de soros de mulheres múltiparas contra leucócitos de indivíduos normais, não relacionados, capacitou VAN ROOD & VAN LEEUWEN (1963), a descrever duas especificidades (4a e 4b), que se comportavam basicamente como alelos de um locus designado "grupo four". Atualmente estas especificidades são designadas, respectivamente, Bw4 e Bw6 e parecem

representar variantes alélicas de um epítoto da molécula HLA-B diferente dos epítotoes responsáveis pelas, aproximadamente, 40 especificidades deste locus já descritos.

Da mesma forma PAYNE et al. (1964) descreveram as especificidades LA1 e LA2 (esta última idêntica à especificidade MAC) como pertencentes ao locus LA (L= leucócito, A= primeiro locus), distinto do locus four. Atualmente, o locus LA é chamado HLA-A, e as especificidades LA1 e LA2, respectivamente, HLA-A1 e HLA-A2.

O conhecimento do sistema HLA foi grandemente aumentado a partir de 1964, com a realização do 1º Workshop Internacional de Histocompatibilidade, organizado por B. Amos da Universidade de Duke, Durham.

A partir deste Workshop, outros oito se seguiram, os quais permitiram a comparação de resultados, troca de materiais e idéias e padronização de técnicas entre laboratórios de todo o mundo. Através deste esforço conjunto, além da caracterização definitiva dos loci já descritos, durante o 4º Workshop em 1970, e a determinação de maior número de alelos em cada locus, outros loci foram descritos no sistema.

Desta forma é que em 1970 surgiram as primeiras evidências de um terceiro locus (SANDBERG et al., 1970), definitivamente confirmado durante o 6º Workshop em 1975, com o nome de AJ. Atualmente este locus é chamado HLA-C.

Também durante o 6º Workshop foi confirmada a existência do quarto locus no sistema, designado MLC ("Mixed Lymphocyte Culture Reaction"), hoje chamado HLA-D. Os antígenos deste locus são identificados por técnica de cultura mista de linfócitos (BACH & VOYNOW, 1966) e não por sorologia.

Devido à enorme variedade de nomes dados às diferentes especificidades, o que dificultava a comunicação entre os pesquisadores, fez-se necessária a reunião de uma "Comissão de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde", a qual rapidamente estabeleceu as seguintes normas ("WHO-IUIS TERMINOLOGY COMMITTEE", 1975 - "ANNOUNCEMENT", 1976):

- a) os loci pertencentes ao sistema seriam designados por uma ou mais letras, precedidas da sigla "HLA".
- b) os alelos de cada locus seriam designados por números após a letra que designa o locus.
- c) especificidades não bem caracterizadas seriam designadas por um "w" minúsculo (Workshop), entre a letra que designa o locus e o número que designa o alelo. Ex.: HLA-Bw22.

Dessa forma, os loci LA, four, AJ e MLC foram designados, respectivamente, HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-D. As especificidades HLA-C, quando bem definidas, continuaram com a notação "Cw", para que não se fizesse confusão com a designação do sistema complemento. Obviamente, especificidades em fase de definição continuaram com suas denominações locais.

Com o intuito de detectar sorologicamente os produtos do locus HLA-D foi confirmada durante o 7º Workshop em 1977, a existência de um quinto locus no sistema, então designado HLA-DRw (D-related Workshop). Atualmente este locus é designado apenas HLA-DR. A relação entre os loci HLA-D e DR se deve à correspondência quase total entre as especificidades definidas sorologicamente (antígenos DR) e aquelas definidas por MLC, além do fato de antisoros anti-especificidades DR bloquearem reação de cultura mista de linfócitos (cf.: BODMER, 1978; BODMER, 1980).

Ainda não está definitivamente estabelecido se os loci HLA-D e DR são idênticos, embora detectados por diferentes métodos, ou se são diferentes loci intimamente ligados e cujos alelos se encontram em forte desequilíbrio de ligação. A interpretação mais recente apresentada no 9º Workshop, no entanto, é a de que o locus HLA-D representa uma ampla região, a qual abrange diversos loci, entre os quais o locus HLA-DR.

Outros loci pertencentes ao sistema HLA foram descritos e confirmados durante os 8º e 9º Workshop (SB, MB, MT ou DC, Te).

A técnica recente de DNA recombinante, a qual permite a determinação da estrutura molecular do DNA, possibilitará a definição da relação molecular entre os diferentes loci HLA já descritos, como também a definição de novos loci.

Além desses loci acima relacionados, o sistema HLA

contêm outros que codificam componentes do sistema complemento como: C2 (FU et al., 1974), Fator B (ALLEN, 1974; HAUPTMANN et al., 1976) e C4 (RITTNER et al., 1975); componentes do C4 (C4A e C4B), correspondentes aos grupos sanguíneos eritrocitários Chido e Rodgers (O'NEILL et al., 1978), receptores para C3b e C3d (cf.: MCKUSICK & RUDDLE, 1977).

1.1.3. Bioquímica dos antígenos HLA

As estruturas químicas dos antígenos HLA foram determinadas em células B linfoblastóides, as quais apresentam diversas vantagens em relação a outras células: podem ser cultivadas, indefinidamente, "in vitro", expressam densidades relativamente altas dos antígenos e constituem fonte reproduzível do mesmo alótipo (BARNSTABLE et al., 1978).

1.1.3.1. Antígenos HLA-A, -B, -C

Consistem de uma molécula glicoproteica de peso molecular 43.000 daltons, responsável pelo polimorfismo (BARNSTABLE et al., 1978), complexada com uma molécula monomorfa de peso molecular 12.000 daltons, chamada β_2 - microglobulina (CRESSWELL et al., 1973; CRESSWELL et al., 1974). Esta última é codificada no cromossomo 15 (GOODFELLOW, 1975), sendo essencial à atividade antigênica (ARCE-GOMEZ et al., 1978; LANCET et al., 1979).

A semelhança estrutural entre os antígenos HLA-A, -B

e -C, aliado ao fato dos três grupos de antígenos se associarem à β_2 - microglobulina e de estarem proximamente ligados, permite levantar a hipótese de uma origem comum a esses três loci, por duplicação gênica (cf.: BARNSTABLE et al., 1978).

1.1.3.2. Antígenos HLA-DR

Consistem de duas subunidades moleculares complexadas entre si (HUMPHREYS et al., 1976; BARNSTABLE et al., 1978): uma glicoproteína de peso molecular 28.000 daltons (cadeia β), responsável pelo polimorfismo (cf.: BODMER, 1981), associada a outra glicoproteína de peso molecular 33.000 daltons (cadeia α). Devido à semelhança dos antígenos HLA-DR com os antígenos Ia do camundongo e mais recentemente por estudos a nível de DNA, postula-se que ambas as cadeias (α e β) sejam codificadas na região HLA (STROMINGER, 1980).

1.1.4. Localização tecidual

Os antígenos HLA-A, -B e -C foram detectados na membrana de todas as células nucleadas estudadas (COOK, 1974), através do teste de citotoxicidade dependente de complemento, embora em diferentes concentrações nos diferentes tecidos (GOODFELLOW et al., 1976; BROWN et al., 1979). Por serem ricos em antígenos HLA e devido à sua facilidade de obtenção, os linfócitos do sangue periférico têm sido o principal material utilizado nas tipagens desses antígenos.

Os antígenos HLA-DR, por outro lado, apresentam distribuição tecidual mais restrita: linfócitos B, macrófagos, espermatozóides e células endoteliais (RYDER et al., 1981). Mais recentemente foi possível a detecção destes antígenos em linfócitos T ativados (MANN & SHARROW, 1979; ZIMMERMANN et al., 1979).

1.1.5 Polimorfismo do sistema HLA

Uma das principais características do sistema HLA é o seu extremo polimorfismo. Cada locus desse sistema possui múltiplos alelos, sendo que a maioria deles ocorre com frequência entre 1% e 15% (BODMER, 1980). Apesar de já serem conhecidos mais de 80 alelos abrangendo apenas os loci HLA-A, -B, -C e -D/DR (cf.: WHO-IUIS TERMINOLOGY COMMITTEE, 1980), outros alelos deverão ser definidos num futuro próximo, já que ainda é alta a frequência de "Blank" nos loci HLA-C e -D/DR (BODMER & BODMER, 1978).

No sentido de dar uma idéia da variabilidade do sistema, ao considerarmos apenas os alelos dos loci HLA-A e HLA-B atualmente conhecidos, têm-se, aproximadamente 170.000 possíveis fenótipos e 370.000 possíveis genótipos. Se outros loci forem incluídos nos cálculos, o número de combinações alélicas alcançaria a casa dos milhões (MATTIUZ et al., 1970). Por outro lado, 75% e apenas 2% dos indivíduos caucásicos são respectivamente, duplamente heterozigotos e duplamente homozigotos, considerando-se apenas os loci HLA-A e HLA-B (BODMER, 1972).

Estes dados deixam bem claro que a variabilidade genética do sistema HLA é bem maior que a de qualquer outro sistema polimórfico já descrito no homem.

1.1.6 Distribuição racial

O sistema HLA, a exemplo de outros polimorfismos genéticos, apresenta variação da frequência de um determinado alelo em diferentes populações ou grupos étnicos (JOYSEY & WOLF, 1978). Sob este aspecto, os alelos deste sistema podem ser agrupados em três categorias principais (BODMER & BODMER, 1978):

a) alelos que aparecem com frequência relativamente alta em todas as populações. Ex.: HLA-A2.

b) alelos presentes em quase todas as populações, mas raros em um ou mais grupos étnicos. Ex.: HLA-A11 e HLA-Bw22 em negros africanos.

c) alelos que aparecem quase exclusivamente em uma ou outra população. Ex.: HLA-Bw42 em negros africanos.

Deve-se ter em mente, portanto, a variabilidade na frequência das diferentes especificidades, nos diferentes grupos étnicos, quando da escolha dos grupos controle em estudos populacionais sobre HLA e doença.

O extraordinário polimorfismo do sistema, aliado à variação geográfica da frequência de suas especificidades, torna-o um poderoso marcador para estudos antropológicos, pos-

sibilitando a determinação da distância genética entre diferentes populações (DEGOS et al., 1972), construção de árvores filogenéticas, avaliação de efeito de deriva genética e efeito de fundador. Além disso, também devido ao seu polimorfismo e juntamente com a expressão codominante de seus alelos, o sistema HLA pode ser considerado um poderoso marcador para estudos de ligação genética e de associações (cf.: MCKUSICK & RUDDLE, 1977).

1.1.7. Haplótipo

Entende-se por haplótipo, um grupo de genes proximalmente ligados num cromossomo, os quais são usualmente transmitidos em bloco. O padrão de transmissão desses genes pode ser alterado por permuta, embora pouco freqüente no sistema HLA.

1.1.8. Desequilíbrio de ligação

Define-se o desequilíbrio de ligação, pela ocorrência de certos alelos, de loci distintos, mais freqüentemente juntos do que o esperado pelo acaso. Por exemplo, a freqüência do haplótipo A1-B8 é da ordem de 8,8% em populações caucasóides, enquanto que o esperado seria o produto da freqüência do alelo A1 (17%) pela freqüência do alelo B8 (11%) nesta população, ou seja, 1,9% (BODMER & BODMER, 1978).

O sistema HLA apresenta algumas características pe-

culiars, quanto ao desequilíbrio de ligação (BODMER & BODMER, 1978); associação entre os loci B e C são mais comuns do que entre outros pares de loci; existem associações características de determinados grupos étnicos (B13-Cw6 em caucasóides, Bw35-Cw3 em japoneses, B7-Cw4 em negros africanos); alelo de um locus pode estar associado a dois ou mais alelos de outro locus (Cw6 com B13, B17 e B37); podem aparecer associações secundárias devido a dois grupos de associações primárias (primária - A1-B8 e B8-Dw3; secundária - A1-Dw3).

A proximidade entre os loci HLA e o grande número de alelos em cada locus podem ser os responsáveis por alguns dos desequilíbrios de ligação observados no sistema. Assim, se considerarmos " Δ " (delta) como a medida do grau de desequilíbrio de ligação (frequência observada diminuída da frequência esperada de determinado haplótipo) tem-se, segundo a teoria de genética de populações, $\Delta = 0$ na ausência de migrações diferenciais, endocruzamento, casamentos preferenciais, seleção natural e outros fatores que perturbem o equilíbrio genético.

Caso Δ seja diferente de zero, o equilíbrio será atingido numa taxa $1-r$ por geração (r = frequência de recombinação entre os loci). Logo, quanto mais proximamente ligados dois loci, mais tempo persistirá o desequilíbrio, o que explicaria a sua maior frequência entre os loci HLA-B e HLA-C, os quais estão separados por uma distância de apenas 0,2cM ou 0,2% de recombinação (BODMER & BODMER, 1978; RYDER *et al.*, 1981).

Contudo, os desequilíbrios de ligação observados en-

tre os loci HLA-A e HLA-B são muito proeminentes para serem explicados por fatores outros que não a seleção natural. Isto porque, com 0,8% de recombinação (SVEJGAARD et al., 1971) e considerando os alelos destes loci tão antigos quanto a humanidade, haveria tempo suficiente para que o equilíbrio fosse atingido. Esta seleção natural poderia atuar em favor de combinações particulares de alelos, ou ainda, em favor de um alelo de um outro locus ligado ao haplótipo em questão (BODMER & BODMER, 1978).

1.2. HLA e Doença

Com o objetivo de detectar efeito da seleção natural que pudesse explicar o polimorfismo do grupo sanguíneo ABO, bem como outros polimorfismos, foram realizados diversos estudos de associações entre polimorfismos e doença. Apesar de grandes esforços, os resultados obtidos foram limitados; sendo, contudo, confirmadas algumas associações: grupo sanguíneo "O" e úlcera duodenal, grupo sanguíneo "A" e câncer do estômago (AIRD et al., 1953; MUSCHEL, 1966). Se por um lado, as associações ABO e doença não comprovaram a ação da seleção natural como causa do polimorfismo do sistema, por outro lado estes estudos mostraram um componente genético na etiologia de algumas doenças sob estudo.

Os estudos de associações entre doenças e o sistema HLA foram estimulados com a descoberta de associações entre o sistema H-2 (principal sistema de histocompatibilidade do camundongo) e várias formas de leucemia induzidas por vírus

(LILLY, 1968). Outro fator importante foi a demonstração da existência de genes para resposta imune no sistema H-2 (McDEVITT & BENACERRAF, 1969), o qual é homólogo ao sistema HLA.

No homem, a primeira associação significativa foi demonstrada entre a doença de Hodgkin e a especificidade originalmente conhecida como "4c" (AMIEL, 1967). No entanto, apesar de demonstrada a heterogeneidade desta especificidade (B5, Bw35, B18, B15) (ALLEN et al., 1970), ainda não se chegou a uma conclusão definitiva a respeito de uma associação entre doença de Hodgkin e HLA.

A partir do primeiro estudo realizado por AMIEL, inúmeros outros se seguiram, trazendo importantes contribuições no campo da etiologia e patogenia de muitas doenças, bem como permitindo uma melhor avaliação do papel biológico do sistema HLA. Alguns estudos, por exemplo, confirmaram a heterogeneidade de doenças anteriormente consideradas homogêneas, como é o caso da associação dos antígenos HLA com a diabetes dependente de insulina, mas não com a não-dependente de insulina (RYDER et al., 1981).

Entre as associações HLA e doença (TERASAKI & MICKEY, 1975; SVEJGAARD & RYDER, 1977; RYDER et al., 1979) destaca-se a associação entre espondilite anquilosante e HLA-B27, onde mais de 90% dos pacientes apresentam este antígeno, contra apenas 5 a 9% dos controles (KASTELAN et al., 1980).

Diversas são as causas que poderiam explicar a as-

sociação dos antígenos HLA com doenças (cf.: SCHALLER & OMENN, 1976; BODMER & BODMER, 1978; TIILIKAINEN, 1980):

a) reflexo de desequilíbrio de ligação entre genes para resposta imune (Ir), os quais poderiam determinar susceptibilidade a diversas doenças, e genes do sistema HLA. Neste caso, os antígenos HLA serviriam apenas como marcadores dos genes Ir.

b) o próprio antígeno HLA seria o responsável, direta ou indiretamente, pela susceptibilidade à doença. Isto poderia ocorrer, caso a estrutura antigênica de determinada especificidade HLA fosse semelhante à do agente infeccioso ou funcionasse como receptor para um determinado agente infeccioso.

c) alteração da estrutura antigênica dos antígenos HLA, por fatores ambientais químicos ou infecciosos, o que levaria à produção de auto-anticorpos (doenças auto-imunes).

Por outro lado, as doenças relacionadas aos antígenos HLA poderiam ser explicadas pela ação direta desses antígenos como mediadores da cooperação entre linfócitos T e macrófagos, quando da apresentação de substâncias estranhas. Variações na eficiência de apresentação destas substâncias poderiam desencadear doenças (MUNRO & BRIGHT, 1976; BODMER, 1980). Obviamente, diferentes fatores podem ser responsáveis por diferentes associações.

As associações HLA e doença até hoje descritas, não se apresentaram absolutas, ou seja, apenas uma certa proporção de indivíduos com determinado alelo, associado a deter-

minada a doença, a desenvolvem. Por outro lado, existem muitos pacientes que não apresentam o alelo HLA relacionado à doença.

Esta falta de associação completa pode ser explicada basicamente pelos seguintes motivos (cf.: SCHALLER & OMENN, 1976; BODMER & BODMER, 1978):

a) ação de fatores ambientais distintos sobre indivíduos susceptíveis, fazendo com que apenas uma proporção destes indivíduos entre em contato com o agente causador da doença.

b) ação de outros fatores genéticos não associados ao sistema HLA. Como exemplo, pode-se citar a ação conjunta dos antígenos HLA e sistema Gm das imunoglobulinas, na determinação da susceptibilidade à hepatite auto-imune crônica ativa (WHITTINGHAM et al., 1981).

c) associações incompletas ocorreriam se a frequência do alelo para susceptibilidade a uma doença, em desequilíbrio de ligação com um alelo HLA-X, fosse menor do que a frequência deste alelo HLA. Deste modo, apenas uma certa proporção de cromossomos com este alelo HLA apresentaria, também, o alelo para susceptibilidade.

d) efeito de heterogeneidade da doença, fazendo com que a associação ocorra apenas com um grupo de indivíduos, apresentando um sub-tipo particular da doença. Neste caso, as associações com os antígenos HLA podem ser um bom meio de definir esta heterogeneidade.

No entanto, não há uma explicação única para todas as associações não absolutas. Diferentes associações podem

ser explicadas por diferentes fatores, ou ainda, por diferentes combinações destes fatores.

1.3. Hepatite Viral A

1.3.1. Histórico

Pode-se definir hepatite como um processo inflamatório agudo das células hepáticas, o qual pode ser ocasionado por agentes infecciosos, tóxicos, imunológicos ou indeterminados.

As hepatites virais, únicas a possuírem importância epidemiológica, são doenças infecciosas primárias, de transmissibilidade inter-humana, com evolução aguda ou crônica e que, pela alta morbidade e distribuição endêmica mundial, representam um importante problema de saúde pública. Com exceção da gripe, as hepatites são as doenças virais que mais atingem o homem. No entanto, sua gravidade imediata e seu potencial evolutivo são muito maiores do que as da gripe. Um estudo feito em Lyon, França, determinou que a incidência da hepatite viral é da ordem de um caso sintomático para cada 1.000 indivíduos por ano. Acrescentam-se a estes dados os casos assintomáticos, que são 10 vezes mais frequentes (cf.: TREPO et al., 1982).

A icterícia epidêmica foi descrita, pela primeira vez, no segundo século a.C. Foram também descritos surtos epidêmicos de icterícia em tropas, durante operações bélicas,

tanto no século XVII como nas 1ª e 2ª Guerras Mundiais.

A compreensão da etiologia viral da hepatite, no entanto, foi muito lenta. Até 1960, devido a estudos em voluntários humanos nas décadas de 1940-50, só se sabia que pareciam existir duas formas de hepatite viral: uma com longo e outra com curto período de incubação e, indiretamente, da existência de pelo menos dois vírus causadores da doença. Posteriormente, esses vírus foram designados, respectivamente, HAV (vírus da hepatite A) e HBV (vírus da hepatite B).

Devido à transmissão dos vírus das hepatites A e B a saguis e chipanzês e à detecção desses vírus por microscopia eletrônica e sorologia, é que se pôde identificar, em 1970, um marcador específico de laboratório para hepatite por vírus B ou hepatite B, denominado antígeno Austrália. Mais tarde, foi determinado que o antígeno Austrália corresponde ao antígeno de superfície HBV (HBsAg). O vírus da hepatite A, também chamada hepatite infecciosa, epidêmica, HBsAg negativo, hepatite MS1 foi reconhecido somente cinco anos mais tarde, nas fezes de voluntários infectados com HAV.

Mais recentemente, foi encontrada uma 3ª forma de hepatite, denominada hepatite "não A - não B", a qual também parece estar distribuída mundialmente. Além desses agentes virais que acometem o fígado predominantemente, existem outros que causam sintomas mais generalizados (cytomegalovírus, vírus epstein-barr, vírus herpético, vírus cocksackie). Nestes casos, a hepatite é considerada apenas uma conseqüência secundária da infecção.

Após a infecção aguda, as hepatites evoluem ocasio-

nalmente para a forma crônica ou fulminante. A hepatite crônica, de evolução favorável, chamada hepatite crônica persistente (HCP), caracteriza-se por uma sintomatologia discreta (anorexia, náusea, vômitos) ou mesmo ausente. Já a hepatite crônica de prognóstico reservado, chamada hepatite crônica ativa (HCA), pode evoluir para a cirrose. A HCA pode, ainda, ser ocasionada pelo HBV (HCA - HBsAg +), por auto-anticorpos (hepatite autoimune crônica) ou por agentes indeterminados (hepatite criptogênica). A hepatite fulminante, por outro lado, evolui invariavelmente para a cirrose e morte em poucos dias.

1.3.2. Etiologia

Antes da metade da década de 60, também devido a estudos em voluntários humanos, só se sabia que o HAV sobrevivia a 56°C durante 30 minutos, era inativo a 98°C por 1 minuto e mantinha sua infectividade após armazenamento a -70°C por vários anos, sendo mais resistente ao cloro do que muitas bactérias encontradas na água potável.

O HAV foi melhor caracterizado a partir de 1975, como sendo uma partícula RNA de 27nm, a qual possui características físico-químicas e biológicas, além de um comportamento epidemiológico e imunológico, bastante semelhante ao grupo dos enterovírus (cf.: KRUGMAN et al., 1979).

1.3.3. Epidemiologia

A hepatite A apresenta distribuição geográfica mundial, acreditando-se que a maior parte da população adulta esteja imunizada naturalmente, através de formas subclínicas ou anictéricas da doença (NATH *et al.*, 1981). Esta particularidade torna difícil a determinação exata da incidência mundial da doença.

Embora nenhuma idade esteja imune, a faixa etária mais afetada está entre 5 e 14 anos. Sob condições de saneamento básico ideais, como ocorre em países desenvolvidos, observa-se um deslocamento da incidência da doença até faixas etárias mais altas. A susceptibilidade à infecção é idêntica entre sexos e raças e sem indícios de prevalência sazonal.

A administração oral ou parenteral do vírus causa hepatite após um período de incubação, que varia de 2 a 6 semanas, com uma média de 26 dias (*cf.*: CARBONE *et al.*, 1984).

O HAV pode ser detectado no sangue ou fezes de pacientes com doença aguda, durante um curto período de tempo, desde duas semanas finais do período pré-ictérico até alguns dias após o surgimento da icterícia. Após o 3º dia de icterícia não há mais viremia, sendo que em 45% e 10% dos casos, pode-se encontrar vírus nas fezes, respectivamente, até o 8º e 14º dia após o início da icterícia. A urina obtida no 1º dia de icterícia é infectante. Esses dados mostram que normalmente a infecção desaparece na fase pré-ictérica da doença e que raramente é transmissível poucos dias após a icte-

rícia (cf.: KRUGMAN et al., 1979).

A transmissão do HAV se dá pela via fecal-oral, tanto por contato direto como por intermédio da água e alimentos contaminados. Sendo assim, epidemias são freqüentes em áreas de condições sócio-higiênicas deficientes e de congestionamento humano. Surtos epidêmicos são também freqüentes em instituições para crianças (creches, orfanatos, sanatórios). A infecção através de animais susceptíveis (chipanzês e sa-guís) pode ser desprezada, a não ser talvez, para pessoas que com eles mantenham contato. Parece provável, ainda, a transmissão pelo contato sexual. Levando-se em conta o curto período de transmissibilidade da doença e ausência de portadores crônicos, deve-se considerar o contágio por via parenteral, se existente, um evento raro.

A prevalência de anticorpos para o HAV (anti-HAV), também se encontra fortemente correlacionada com a situação sócio-econômica e cultural da população. Assim, em comunidades desprovidas de saneamento básico e educação sanitária, o número de indivíduos susceptíveis à infecção vai decrescendo.

1.3.4. Aspectos clínicos e evolução

A hepatite A apresenta, geralmente, evolução favorável, com recuperação total, tanto sob aspectos clínicos quanto histológicos. Não foram observados casos de hepatite A crônica e a forma fulminante é bastante rara (\pm 0,5% dos ca-

sos).

Existe uma correlação muito grande entre a idade de exposição ao vírus e o aspecto clínico. Deste modo, aproximadamente 2/3 das infecções são reconhecíveis em crianças com idade acima de 10 anos, em contraposição a apenas 1/5 dos casos em crianças menores de 5 anos. A frequência da hepatite A fulminante está relacionada, da mesma forma, à idade, chegando a 2% nos indivíduos com idade acima de 45 anos (cf.: SKINHOJ, 1981).

A gravidade da doença é determinada pela intensidade da agressão às células hepáticas, o que determina as suas diferentes formas clínicas, desde anictéricas até fulminantes. Pode-se dividir o curso da doença, em uma fase pré-ictérica e outra ictérica; embora, em alguns casos, o primeiro sinal da doença é dado pela icterícia (KRUGMAN et al., 1979).

- Fase pré-ictérica: Pode apresentar febre entre 38°C e 40°C, acompanhada de cefaléia, anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal, fígado aumentado e dolorido. Tanto a duração, quanto a intensidade dos sintomas estão diretamente relacionados com a idade do indivíduo.

- Fase ictérica: Em geral, a icterícia surge logo após o desaparecimento da febre e aparecimento de colúria (fezes escuras). Esta fase é normalmente caracterizada, nas crianças, pelo desaparecimento dos sintomas da fase inicial. Já em adolescentes e adultos, estes sintomas podem ser exacerbados, observando-se ainda, dor abdominal, depressão mental e bradicardia.

Os níveis de anticorpos se elevam rapidamente após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, alcançando um valor máximo dentro de 2 a 3 meses após o contágio. Os anticorpos da classe IgG se mantêm por muitas décadas, conferindo imunidade sólida, durável e específica. Já os anticorpos da classe IgM surgem precocemente, começam a declinar após a segunda semana de icterícia e desaparecem após alguns meses (Figura 1).

1.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (CARBONE et al., 1984). Icterícia associada com episódio prévio de anorexia, náusea e dor abdominal é sugestivo de hepatite viral. Esta hipótese é corroborada pela presença de níveis elevados de GOT, GPT e bilirrubina sérica. Além disso, dados epidemiológicos como faixa etária, contato com hemoderivados e condições higiênicas podem indicar infecção por HAV ou HBV.

Testes sorológicos específicos (radioimunoensaio, hemaglutinação imunoaderente, método imunoenzimático), usados para a pesquisa de anticorpos IgM para o vírus da hepatite A (HAV-M), podem ser feitos com amostras do soro durante o curso da doença, tanto na fase aguda quanto na convalescença.

O diagnóstico laboratorial da hepatite A também pode ser feito indiretamente, através da pesquisa do HBsAg. Desse

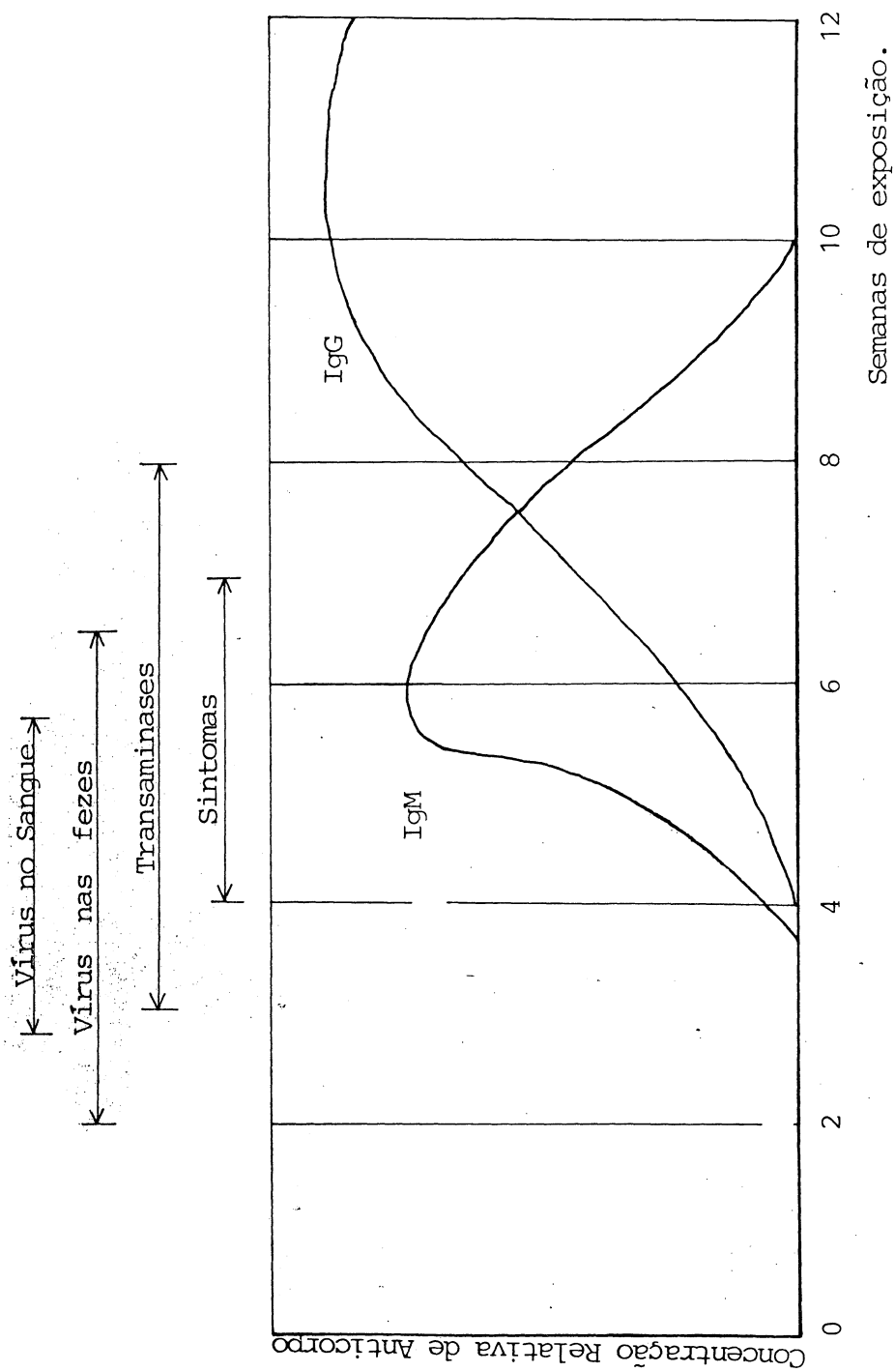


FIGURA 1 - Níveis de anticorpos IgM e IgG na evolução da hepatite viral A.

Fonte: MEINICK et al., 1976.

modo, a possibilidade da infecção hepática ter sido ocasionada pelo HBV é menor em pacientes HBsAg negativo. A pesquisa do HBsAg, aliada a dados epidemiológicos, é muito usada para a caracterização da hepatite A, já que poucos laboratórios localizados nos grandes centros, têm condições de realizar a pesquisa do HAV-M.

1.3.6. Tratamento

A prevenção permanente é baseada em medidas simples de higiene e eliminação sanitária dos excrementos, com o objetivo de prevenir infecções do trato intestinal (tratamento da água de beber, educação sanitária, saneamento básico, higiene dos alimentos). Num sentido individual, a prevenção pode ser alcançada pela administração de gama-globulina hiper-imune, tanto em indivíduos sujeitos a alto risco de adquirir a infecção como naqueles em fase inicial da doença (cf.: MARINHO, 1978). Não existe tratamento curativo, apenas sintomático (dietas leves, descanso, abstenção de álcool e outras substâncias tóxicas).

1.4. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo investigar uma associação, positiva ou negativa, entre uma ou mais especificida-

des HLA e hepatite viral A. Desta forma, visando a definir um componente genético para a susceptibilidade e/ou para a resistência a doença acima referida.

O estudo de associação entre os antígenos HLA e hepatite viral A é plenamente justificado, em primeiro lugar, pela total ausência de investigações neste sentido, como também, pela sugestão de associações entre estes antígenos e outras formas de hepatite viral: hepatite crônica ativa (PAGE et al., 1975; OPELZ et al., 1977; MACKAY & TAIT, 1978), hepatite crônica ativa Ag HBs + (MAZZILLI et al., 1977; PENNER et al., 1977), hepatite crônica ativa criptogênica (LINDBERG et al., 1975; SCOTT et al., 1977), hepatite autoimune crônica (FREUDENBERG et al., 1973; FREUDENBERG et al., 1977; TAIT et al., 1980; MACKAY & TAIT, 1980; LEPAGE et al., 1981; WHITTINGHAM et al., 1981). Dentre estas, somente a hepatite autoimune crônica se apresenta consistentemente associada com os antígenos HLA (HLA-A1, -B8, -DR3).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos Demográficos e Sócio-econômicos da População de Paranaguá

Localizado no litoral do Paraná, o município de Paranaguá foi criado em 29 de julho de 1648, tendo sido desmembrado do Estado de São Paulo. Sua instalação deu-se em 26 de dezembro de 1648.

Suas principais atividades econômicas estão voltadas à extração mineral, pesca, indústria de produtos alimentares, indústria de derivados de madeira, indústria de adubos e fertilizantes (IBGE, 1982).

Dados referentes a 1980 mostram uma população total de 82.067 habitantes, sendo que 72.132 residem na zona urbana. A freqüência de homens e mulheres é semelhante, tanto na zona urbana quanto rural. Quanto ao grupo étnico, aproximadamente 78% são brancos, 19% pardos (mulato, mestiço, índio, caboclo, mameluco, cafuzo), 2% negros e 1% amarelos (IBGE, 1982).

2.2. Caracterização do Território de Paranaguá¹

Área (km ²)	655,410
Altitude (m)	5,00
Latitude Sul	25°31'15''
Longitude W. GR.....	48°30'34''
Distância à Capital (km).....	87,00
Densidade Demográfica (hab/km ²).....	125,21 (1980)

Limites do Município: Antonina, Guaraqueçaba, Guaratuba, Matinhos e Morretes.

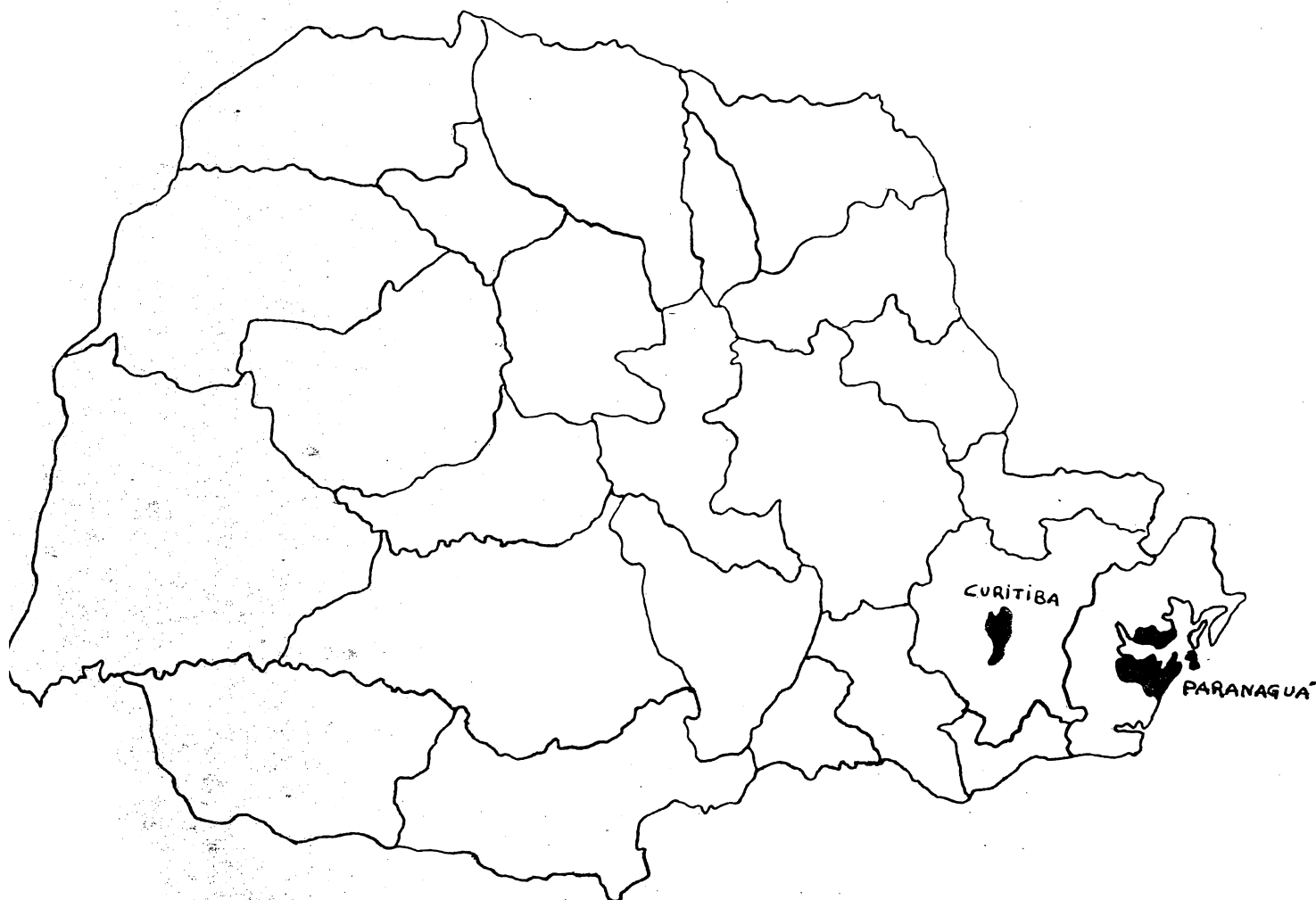


FIGURA 2 - Localização do município de Paranaguá em relação ao estado e sua capital.

(1) Departamento Estadual de Estatística.

2.3. Surto de Hepatite em Paranaguá

2.3.1. Caracterização do surto

A partir da semana epidemiológica nº 9 (27.02.83, a 05.03.83) foi constatado um aumento do número de notificações de hepatite no município de Paranaguá.

A investigação epidemiológica realizada nos 273 casos notificados até o final de março de 1983, caracterizou um surto de hepatite A. Destes 273 casos, 217 foram confirmados e 56 descartados, com base em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Estes dados determinam uma incidência, no mês de março de 1983, de 25 casos por 10.000 habitantes, enquanto que no mesmo período em todo o Paraná, inclusive Paranaguá, a incidência de hepatite A foi de apenas 1 caso por 10.000 habitantes.

2.3.2. Aspectos epidemiológicos da hepatite A em Paranaguá

O surto teve início no dia 27 de fevereiro com 4 casos, atingindo seu pico máximo no dia 4 de março com 23 casos e declinando gradativamente até o dia 31 do mesmo mês, quando cessou. A Figura 3 mostra a evolução da epidemia, com caracterização do número de casos segundo data de início dos sintomas. Todos os 217 pacientes moram na zona urbana, sendo a distribuição por bairros apresentada na Tabela 1. Não foram notificados casos de hepatite crônica.

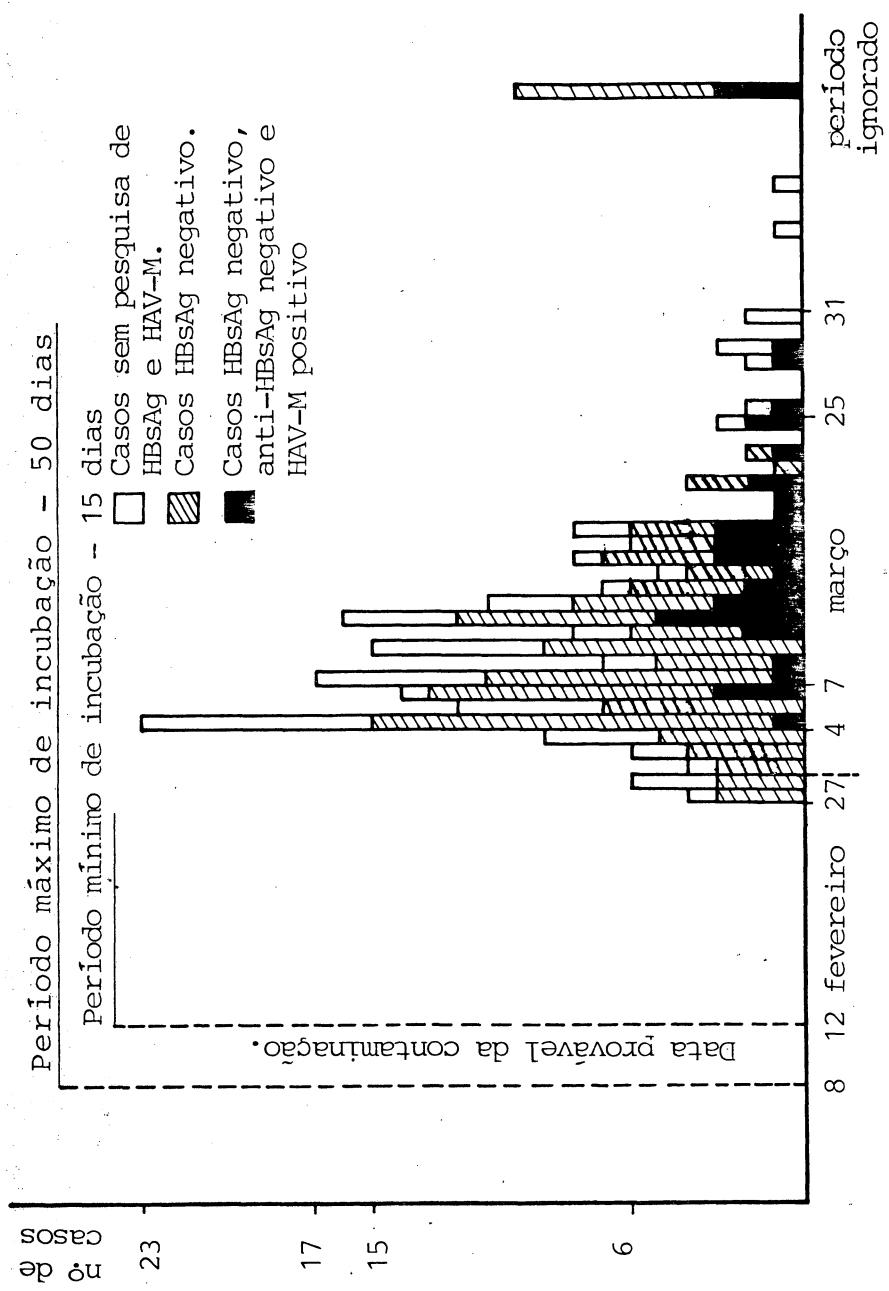


FIGURA 3 - Casos de hepatite segundo data de início dos sintomas em Paranaíba-Pr. (27.02.83 - 31.03.83).

Fonte: Secretaria de Estado da Saúde e do Bem Estar Social - SESB.

TABELA 1 - Casos de hepatite viral A em Paranaguá por bairro
de 27.02.83 a 31.03.83

BAIRRO	TOTAL	%
01. Palmital	11	5,07
02. Araçá	11	5,07
03. Centro	10	4,61
04. Estradinha	07	3,23
05. 29 de Julho	04	1,84
06. Alto São Sebastião	08	3,69
07. Alboit	03	1,38
08. São Vicente	02	0,92
09. Tuiuti	03	1,38
10. Vila Guarani	16	7,37
11. Porto dos Padres	09	4,15
12. Vila Paranaguá	07	3,23
13. Eldorado	17	7,83
14. Samambaia	10	4,61
15. Santos Dumont	14	6,45
16. Guaraituba	03	1,38
17. Vila Cruzeiro	11	5,07
18. Alvorada	12	5,53
19. Divinéia	01	0,46
20. Costeira	11	5,07
21. Leblon	01	0,46
22. Beckman	03	1,38
23. Raia	09	4,15
24. Guadalupe	01	0,46
25. Rocio	04	1,84
26. Portuária	01	0,46
27. São José	01	0,46
28. Posto Fiscal	01	0,46
29. Serraria do Rocha	01	0,46
30. Vila Industrial	01	0,46
31. Campo Grande	01	0,46
32. Emboguaçu	01	0,46
33. Il. de Cotinha	01	0,46
34. Alexandra	01	0,46
35. Colonias	04	1,84
36. Ignorado	16	7,37
TOTAL	217	100

Além dos exames de transaminases e bilirrubinas, foram realizados exames específicos para confirmação laboratorial das hepatites A e B. Estes exames demonstraram que o surto de hepatite foi ocasionado pelo HAV, já que a pesquisa de HAV-M só não foi positiva em duas das amostras analisadas, enquanto a pesquisa do HBsAg e do anti-HBs foram negativas, respectivamente, em 97% e 100% das amostras analisadas.

Dos 217 indivíduos que desenvolveram a doença, 116 (53,5%) foram submetidos à pesquisa do HBsAg nos laboratórios Adolfo Lutz de São Paulo e João Xavier Vianna de Curitiba. Outros 41 pacientes (18,9%) foram submetidos às pesquisas do HBsAg, anti-HBs e HAV-M, as quais foram realizadas pela FIOCRUZ (Fundação Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro). As pesquisas do HBsAg e anti-HBs foram realizadas, respectivamente, pelas técnicas de hemaglutinação passiva reversa (R-PHA) e hemaglutinação passiva (PHA). Já a pesquisa de HAV-M foi realizada pela técnica de radioimunoensaio, denominada HAVAB-M (DECKER et al., 1981).

Com relação à distribuição etária, 84,8% dos casos ocorreram em menores de 15 anos, sendo que destes, 90 casos (48,9%) ocorreram na faixa etária de 5 a 9 anos. Não houve diferença significativa quanto à distribuição por sexo, sendo 54,4% dos pacientes do sexo masculino e 45,6% do sexo feminino ($0,20 > P > 0,10$). A Tabela 2 mostra a distribuição dos casos de hepatite segundo grupo etário e sexo.

Diversos fatores apontam a água como fonte provável de infecção. Esta hipótese foi levantada pela detecção de

TABELA 2 - Casos de hepatite viral A, segundo idade e sexo, no período de 27.02.83 a 31.03.83 em Paranaguá-Paraná.

IDADE	MASCULINO		FEMININO		TOTAL		% ACUM.
	n	%	n	%	n	%	
00-04	23	10,6	26	12,0	49	22,6	22,6
05-09	44	20,3	46	21,2	90	41,5	64,1
10-14	23	10,6	22	10,1	45	20,7	84,8
15-19	08	3,7	01	0,5	09	4,1	88,9
20-24	04	1,8	01	0,5	05	2,3	91,2
25-29	04	1,8	01	0,5	05	2,3	93,5
≥ 30	05	2,3	-	-	05	2,3	95,8
Ignorado	07	3,2	02	0,9	09	4,1	100
TOTAL	118	54,4	99	45,6	217	100	

Fonte: Secretaria de Estado da Saúde e do Bem Estar Social-
SESB.

problemas de ordem técnica na rede de abastecimento de água (cloro residual nulo, presença de coliformes fecais, falta de H₂O na rede), numa época de altos níveis de precipitação pluviométrica, o que facilitaria a contaminação da referida rede. Este período coincide, ainda, com a suposta data de início de infecção dos doentes, considerando os períodos máximos e mínimos de incubação do HAV em relação ao início e término do surto. Soma-se a estes dados, o da não notificação de casos na zona rural.

Todos os dados epidemiológicos, além de laboratoriais e clínicos, os quais foram fornecidos pela Secretaria de Estado da Saúde e do Bem Estar Social (SESB), caracterizam indubitavelmente este surto como ocasionado pelo HAV.

2.4. Caracterização da Amostra

2.4.1. Pacientes

Dos 217 pacientes acometidos de hepatite viral A, durante o surto epidêmico ocorrido no mês de março em Paranaguá, 47 (21,7%) foram tipados para os antígenos HLA. Estes indivíduos foram selecionados ao acaso, evitando-se, porém, crianças muito jovens (< 3 anos), devido à dificuldade de coleta de material.

Os diagnósticos clínico e laboratorial foram estabelecidos como descrito no item 1.3.5. Todos os 47 pacientes apresentaram níveis elevados de GOT e GPT. Além dis-

so, 17 deles (36,2%) foram submetidos à pesquisa do HBsAg. Outros 8 (17,0%) foram submetidos à pesquisa de HAV-M, HBsAg e anti-HBs. O número restrito de indivíduos, submetidos à pesquisa de HAV-M, se deve ao alto custo da técnica.

A média de idade neste grupo é de $8,2 \pm 4,0$ anos, apresentando extremos entre 04 e 28 anos. Dados referentes à faixa etária, sexo e distribuição racial destes indivíduos são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

2.4.2. Controles

O grupo controle, por sua vez, consiste de 53 indivíduos normais, residentes nas vizinhanças dos doentes e pareados com estes em termos de sexo (Tabela 5), idade (Tabela 6) e grupo étnico (Tabela 7). Tanto os pacientes, como os controles pertencem à mesma classe social. Todos os indivíduos controle foram submetidos à pesquisa do HBsAg, com a finalidade de eliminar possíveis portadores crônicos da hepatite B.

A média de idade neste grupo é de $8,3 \pm 4,0$ anos, apresentando extremos entre 02 e 30 anos. Dados referentes à faixa etária, sexo e distribuição racial destes indivíduos são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

TABELA 3 - Caracterização do grupo paciente segundo idade e sexo.

IDADE	MASCULINO		FEMININO		TOTAL		% ACUM.
	n	%	n	%	n	%	
00-04	02	4,26	03	6,38	05	10,64	10,64
05-09	15	31,91	16	34,04	31	65,95	76,59
10-14	03	6,38	06	12,77	09	19,15	95,74
≥ 15	-	-	02	4,26	02	4,26	100
TOTAL	20	42,55	27	57,45	47	100	

TABELA 4 - Caracterização do grupo paciente segundo grupo étnico e sexo.

GRUPO ÉTNICO	MASCULINO		FEMININO		TOTAL		% ACUM.
	n	%	n	%	n	%	
Branco	15	31,91	17	36,17	32	68,08	68,08
Não Branco	04	8,51	10	21,28	14	29,79	97,87
Ignorado	01	2,13	-	-	01	2,13	100
TOTAL	20	42,55	27	57,45	47	100	

Não Branco = mulato, mestiço, índio, caboclo, mameluco, cafuzo.

TABELA 5 - Distribuição de sexo entre pacientes com hepatite viral A e controles normais.

SEXO	PACIENTES (47)		CONTROLES (53)	
	n	%	n	%
Masculino	20	42,55	25	47,17
Feminino	27	57,45	28	52,83

$$\chi^2 = 0,21, \quad \text{G.L.} = 1, \quad 0,70 > P > 0,50$$

TABELA 6 - Distribuição de idade entre pacientes com hepatite viral A e controles normais.

IDADE	PACIENTES (47)		CONTROLES (53)	
	n	%	n	%
00 - 04	05	10,64	05	9,43
05 - 09	31	65,95	33	62,26
10 - 14	09	10,15	14	26,42
≥ 15	02	4,26	01	1,89

$$\chi^2 = 1,13, \quad \text{G.L.} = 3, \quad 0,80 > P > 0,70$$

TABELA 7 - Distribuição de grupo étnico entre pacientes com hepatite viral A e controles normais.

GRUPO ÉTNICO	PACIENTES (47)		CONTROLES (53)	
	n	%	n	%
Branco	32	68,08	37	69,81
Não Branco	14	29,79	14	26,42
Ignorado	01	2,13	02	3,77

$$\chi^2 = 0,34, \quad \text{G.L.} = 2, \quad 0,90 > P > 0,80$$

Não Branco = mulato, mestiço, índio, caboclo, mameluco, cafuzo.

TABELA 8 - Caracterização do grupo controle segundo idade e Sexo.

IDADE	MASCULINO		FEMININO		TOTAL		% ACUM.
	n	%	n	%	n	%	
00-04	03	5,66	02	3,77	05	9,43	9,43
05-09	17	32,08	16	30,19	33	62,26	71,69
10-14	05	9,43	09	16,98	14	26,42	98,11
≥ 15	-	-	01	1,89	01	1,89	100
TOTAL	25	47,17	28	52,83	53	100	

TABELA 9 - Caracterização do grupo controle segundo grupo étnico e sexo.

GRUPO ÉTNICO	MASCULINO		FEMININO		TOTAL		% ACUM.
	n	%	n	%	n	%	
Branco	18	33,96	18	33,96	36	67,92	67,92
Não Branco	05	9,43	09	16,98	14	26,41	94,33
Ignorado	02	3,77	01	1,89	03	5,66	100
TOTAL	25	47,17	28	52,83	53	100	

Não Branco = mulato, mestiço, índio, cabloco, mameluco, cafuzo.

2.5. Coleta de Material

Entre os meses de agosto e outubro de 1983 foram coletadas amostras, tanto do grupo controle quanto dos pacientes, na própria residência dos indivíduos e por punção venosa, de aproximadamente 10ml de sangue, com seringa descartável. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em tubos previamente heparinizados e esterilizados, tomando-se cuidado especial no sentido de prevenir formação de coágulos, através de inversões múltiplas do tubo.

Terminada a coleta, todo o material foi encaminhado para o Laboratório de Imunogenética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde, no mesmo dia, foi realizada a tipagem dos antígenos HLA.

Os dados de cada indivíduo, tanto do grupo controle quanto dos pacientes, foram registrados numa ficha (Apêndice 1).

2.6. Técnicas Sorológicas

2.6.1. Separação de linfócitos

Os linfócitos foram separados em um gradiente de densidade em ficoll-hypaque (F-H), basicamente de acordo com a técnica de BÖYUM (1968) que, resumidamente, consiste no seguinte:

- diluir sangue total heparinizado em PBS ("Phosphate Buffered Saline"; Solução Salina Tamponada), pH 7,4 na proporção aproximada de 1:1.

- passar o sangue diluído em PBS, através de uma seringa contendo 0,5 a 1g de algodão de nylon, para um tubo de centrífuga contendo 2 ml de F-H (d= 1,077 - 1,079). O sangue deve permanecer sobre a camada de F-H.

A finalidade do algodão de nylon é eliminar as plaquetas do material, as quais, expressando antígenos HLA, poderiam agir competitivamente com os antígenos HLA da membrana dos linfócitos. Esta competição prejudicaria a reação citotóxica dos linfócitos com os anticorpos anti-HLA específicos.

- centrifugar o tubo a 2.500 rpm durante 20 minutos.

- remover os linfócitos, os quais formam um anel distinto na interfase entre o plasma e o F-H, com pipeta Pasteur e transferí-los para um tubo limpo.

- lavar as células pela adição de PBS até que se complete o volume total do tubo e centrifugar a 1.500 rpm durante 10 minutos.

- desprezar o sobrenadante e ressuspender as células em 1 ml de PBS.

- ajustar a concentração das células em aproximadamente 2×10^6 células/ml em câmara de Neubauer.

Parte destes linfócitos foi imediatamente utilizada para as tipagens, sendo o restante guardado em meio de cul-

tura RPMI 1640 a 4°C para, caso necessário, confirmação posterior dos resultados da primeira tipagem.

2.6.2. Tipagem dos antígenos HLA

As tipagens dos linfócitos do sangue periférico foram realizadas, através da técnica padrão de microlinfocitotoxicidade mediada por complemento, introduzida por TERASAKI & Mc CLELLAND (1964), sendo a atividade citotóxica dos antissoros avaliada pelo método da citofluorocromasia, descrito por BODMER & BODMER (1977).

Cada indivíduo foi tipado por uma bateria de 56 antissoros, cedidos pelo NIH, os quais permitiram a detecção de 8 especificidades HLA-A e 15 especificidades HLA-B.

Esta tipagem pode ser resumida no seguinte:

a) Preparação das células:

- transferir células frescas, separadas segundo a técnica de Böyum, para microtubo Beckman de 1,5 ml.
- Acrescentar 1 µl de diacetato de fluoresceína (FDA-5µg/ml) a uma suspensão de aproximadamente 1 ml de linfócitos e incubar por 10-15 minutos à temperatura ambiente. A finalidade do FDA é marcar as células vivas.
- lavar duas vezes com PBS, pela ultracentrifugação em microcentrífuga (11.000 rpm) durante 15 segundos, e ressuspender em meio de cultura RPMI 1640.

- conferir a viabilidade e a concentração das células em placa de Terasaki, de modo a obter uma concentração da ordem de 10^3 a 2×10^3 células/ μ l.

Obs.: Caso as células tenham sido guardadas em meio de cultura a 4°C por mais de 6 horas, deve-se lavá-las uma vez com PBS antes de marcá-las com FDA.

b) Técnica de microlinfocitotoxicidade propriamente dita:

- descongelar, à temperatura ambiente, placas Terasaki previamente carregadas com a bateria de antisoro (1 μ l de antisoro por cavidade).
- colocar 1 μ l da suspensão de células sobre os antisoros e incubar a 22°C por 1/2 hora.
- adicionar 5 μ l de complemento a cada cavidade da placa, exceto o controle negativo que contém 5 μ l de diluente (RPMI 1640 + 15% de soro bovino fetal inativado), e incubar a 22°C por 1 hora.
- dispensar o excesso de complemento e adicionar 1 μ l de brometo de Etídio a 40 μ g/ml, com a finalidade de marcar as células mortas.

c) Avaliação da atividade citotóxica dos antisoros

- proceder a leitura em um microscópio Leitz Dialux 20, equipado com filtro BG-12 para fluorescência, com aumento de 150 vezes. As células vivas aparecem verdes, devido ao FDA, e as células mortas, vermelhas, devido ao Brometo de Etídio.
- reler a placa 30 minutos após a primeira leitura, com o objetivo de verificar possível morte celular tardia.

- registrar o resultado de cada leitura em fichas, atribuindo os seguintes escores para frequência de morte celular (recomendado pelo NIH):

FREQUÊNCIA DE MORTE CELULAR ALÉM DO CONTROLE NEGATIVO (%)	ESCORE	RESULTADO
0 - 10	1	Negativo
11 - 20	2	Negativo duvidoso
21 - 50	4	Positivo duvidoso
51 - 90	6	Positivo
91 - 100	8	Fortemente positivo
-	0	Leitura prejudicada

2.6.3. Tipagem dos antígenos ABO

A tipagem para o grupo sanguíneo ABO foi realizada em lâmina, com reagentes da Johnson & Johnson em todos os indivíduos controles e pacientes. O objetivo desta tipagem foi unicamente obter uma variável, não submetida a pareamento, que demonstre a homogeneidade étnica dos controles em relação aos pacientes.

2.6.4. Preparo de complemento

O complemento utilizado para as tipagens dos antígenos HLA foi preparado em nosso laboratório, segundo a seguinte técnica:

- coletar sangue total de coelhos jovens, imediatamente após abate em fazenda de coelhos.

- incubar o material obtido em banho-maria (BM) a 37°C durante 15 minutos.

- centrifugar o soro obtido em centrífugas refrigeradas (4°C) a 1.500 rpm durante 20 minutos.

- conferir a toxicidade e a titulação do soro de cada coelho em linfócitos de indivíduos normais.

- desprezar os soros tóxicos e fazer um "pool" dos não tóxicos, os quais são congelados em alíquotas de 1,5 ml e 400 μ l em nitrogênio líquido (-170°C).

2.7. Análise Estatística

2.7.1. Qui-Quadrado (χ^2)

Qualquer diferença na frequência fenotípica de um dado antígeno do sistema HLA, entre controles e pacientes, foi determinada pelo teste de χ^2 , através de uma tabela de contingência 2 x 2. Nos casos em que o número esperado de um determinado antígeno HLA foi muito pequeno (menor que 10), recorreu-se à correção de Yates (LEVIN, 1978).

Nas comparações que mostraram diferença significativa ao nível de 5%, o valor da probabilidade P foi multiplicado pelo número de antígenos testados, com o objetivo de obter uma probabilidade corrigida, P_c (SVEJGAARD & RYDER, 1977).

Quando valores de P se mostraram tão baixos, que não

puderam ser determinados em tabelas convencionais de χ^2 ou, quando da incerteza da significância de P, recorreu-se à tabela de valores de χ^2 críticos, já corrigidos pelo número de antígenos testados (HAWKINS, 1981).

2.7.2. Risco Relativo

Em estudos populacionais, a força da associação entre uma doença e um determinado antígeno HLA é dada pelo Risco Relativo (RR), o qual indica quantas vezes é maior a frequência da doença em indivíduos portadores deste antígeno, em relação aos que não o apresentam. Como proposto por CURIE-COHEN (1977), o RR pode ser expresso da seguinte maneira:

$$RR = \frac{a \times d (a + b) - a (ad - bc) \times p}{b \times c (a + b) + b (ad - bc) \times p}$$

a = número de pessoas com a doença e com antígeno HLA

b = número de pessoas com a doença e sem antígeno HLA

c = número de pessoas sem a doença e com o antígeno HLA

d = número de pessoas sem a doença e sem o antígeno HLA

p = probabilidade de ser um paciente na população.

No entanto, quando a doença for relativamente de baixa frequência e, conseqüentemente, o valor de P muito baixo, é possível a utilização de uma fórmula simplificada para o cálculo do RR (WOOLF, 1955): $RR = a \times d / b \times c$.

3. RESULTADOS

3.1. Freqüência dos Antígenos ABO

A Tabela 10 mostra a freqüência dos grupos sanguíneos A, B, AB e O em pacientes e controles.

A análise estatística dos dados desta tabela mostra que estes tipos sanguíneos apresentam uma distribuição semelhante em pacientes e controles. Estes dados estão de acordo com a homogeneidade destes dois grupos de indivíduos, em relação a grupo étnico.

3.2. Freqüência dos Antígenos HLA-A e HLA-B

As Tabelas 11 e 12 apresentam as freqüências, respectivamente, de 8 especificidades HLA-A e 15 especificidades HLA-B, em pacientes e controles.

A análise estatística destes dados, revela uma fre-

TABELA 10 - Frequência dos grupos sanguíneos "A", "B", "AB" e "O" em pacientes com hepatite viral A e controles normais.

GRUPOS SANGÜÍNEOS	PACIENTES (47)		CONTROLES (53)	
	n	%	n	%
A	21	44,68	24	45,28
B	05	10,64	03	5,66
AB	-	-	01	1,89
O	21	44,68	25	47,17

$$\chi^2 = 1,69, \text{ G.L.} = 3, 0,70 > P > 0,50$$

TABELA 11 - Freqüência dos antígenos HLA-A em pacientes com hepatite viral A e controles normais.

ANTÍGENOS	PACIENTES (47)		CONTROLES (53)		χ^2
	n	%	n	%	
HLA-A1	03	6,38	08	15,09	n.s.
A2	19	40,43	23	43,40	n.s.
A28	03	6,38	01	1,89	n.s.
A3	01	2,13	12	22,64	7,54 ¹
A9	21	44,68	08	15,09	10,59 ²
A10	08	17,02	11	20,75	n.s.
A11	02	4,26	02	3,77	n.s.
AW19	08	17,02	06	11,32	n.s.

n.s. = não significativo ao nível de 5%.

(1) $P_c > 0,05$

(2) $P_c < 0,05$

TABELA 12 - Freqüência dos antígenos HLA-B em pacientes com hepatite viral A e controles normais.

ANTÍGENOS	PACIENTES (47)		CONTROLES (53)		χ^2
	n	%	n	%	
HLA-B5	07	14,89	11	20,75	n.s.
B7	04	8,51	09	16,98	n.s.
B8	02	4,26	04	7,55	n.s.
B12	16	34,04	12	22,64	n.s.
B13	01	2,13	-	-	n.s.
B14	06	12,77	02	3,77	n.s.
B15	01	2,13	03	5,66	n.s.
BW16	05	10,64	07	13,21	n.s.
B17	02	4,26	04	7,55	n.s.
BW21	01	2,13	06	11,32	n.s.
BW22	-	-	01	1,89	n.s.
B27	03	6,38	02	3,77	n.s.
BW35	10	21,28	17	32,08	n.s.
B40	03	6,38	04	7,55	n.s.
BW42	02	4,26	01	1,89	n.s.

n.s. = não significativo ao nível de 5%.

qüência mais alta do antígeno HLA-A9 no grupo paciente (44,7% vs 15,1%). Esta diferença permanece significativa, ao nível de 5%, mesmo quando o valor de P é corrigido pelo número de antígenos testados (χ^2 crítico = 9,55; χ^2 obs. = 10,59).

Estes dados revelam, ainda, uma associação negativa entre a especificidade HLA-A3 e hepatite viral A (2,1% vs 22,6%). Esta diferença, no entanto, deixa de ser significativa, quando da correção do valor de P (χ^2 crítico = 9,55; χ^2 obs. = 7,54).

Todas as outras especificidades HLA-A e HLA-B apresentaram distribuição semelhante em pacientes e controles.

3.3. Risco Relativo

Considerando que, a maioria dos casos de hepatite A (85%) se refere a crianças menores de 15 anos, é possível estimar a probabilidade de um indivíduo qualquer da população urbana de Paranaguá, com idade entre 0 e 14 anos e escolhido ao acaso, ter desenvolvido a doença em estudo, no período de 27.02.83 a 31.03.83 (MORGENSTERN et al., 1980).

$$p = \frac{I}{No} = \frac{184}{26.753} = 0,007$$

p = probabilidade de um indivíduo ser doente;

I = número de casos de hepatite em crianças menores de 15 anos;

No = total de indivíduos menores de 15 anos, da zona urbana de Paranaguá (IBGE, 1982).

Como esta probabilidade é muito baixa, pode-se utilizar a fórmula simplificada para o cálculo do RR.

$$RR = \frac{a \times d}{b \times c} = \frac{21 \times 46}{26 \times 8} = 4,54$$

A determinação do Risco Relativo mostra que os indivíduos HLA-A9 positivos apresentam 4,5 vezes maior chance de desenvolver hepatite viral A, em relação aos indivíduos HLA-A9 negativos.

4. DISCUSSÃO

4.1. Associação HLA-A9 e Hepatite Viral A

Os dados apresentados neste estudo mostram uma associação positiva e uma sugestão de associação negativa, entre os antígenos HLA e hepatite viral A. No entanto, existem muitos fatores que podem levar a falsas ou confusas associações, entre HLA e doença, em estudos populacionais (BODMER, 1973; SVEJGAARD *et al.*, 1975).

Um fator muito importante a ser considerado é o número de especificidades HLA testadas com hepatite viral A, as quais poderiam levar à rejeição da hipótese nula, quando esta é verdadeira. Este falso resultado pode ocorrer, porque quando são comparados muitos antígenos HLA, por exemplo 20, seria esperado encontrar, ao nível de 5%, ao menos uma associação significativa mesmo que não exista associação real entre os antígenos e a doença.

A melhor maneira de confirmar uma associação entre

HLA e doença é através da realização de um segundo estudo, independente do primeiro. No entanto, com o objetivo de obter maior rigorosidade já no primeiro estudo, deve-se multiplicar o valor de "P" obtido pelo número de antígenos testados. A probabilidade corrigida, assim obtida, representa uma aproximação do verdadeiro nível de significância para uma determinada comparação.

Pelo que sabemos, o estudo de associação HLA e hepatite viral A é um trabalho pioneiro. Esta característica tornou necessária a correção de "P", para evitar uma falsa rejeição de uma hipótese nula.

Um segundo fator importante, que poderia levar a uma falsa associação, seria a escolha inadequada dos controles. Obviamente, qualquer diferença na frequência dos antígenos HLA em controles e pacientes, devido a variações de composição racial, poderia levar a uma falsa associação. Como não são conhecidas variações na frequência destes antígenos em consequência de fatores como idade e sexo, estas variáveis não precisam ser consideradas, a menos que a doença em estudo apresente maior predisposição por um dos sexos, alta incidência em faixas etárias mais baixas ou os seus sintomas só se expressem em faixas etárias mais altas. Pelo fato da doença em estudo ter afetado uma população de forma epidêmica, esta dificuldade foi mais facilmente contornada. Deste modo, além de grupo étnico, pacientes e controles foram pareados com respeito à idade, visto que 85% dos casos de hepatite A ocorreram em crianças menores de 15 anos, e

também pelo padrão de habitação, com o objetivo de homogeneizar os dois grupos de indivíduos em relação ao ambiente. Além disso, pareamos pacientes e controles com respeito ao sexo, com o intuito de tornar ainda mais homogêneo esses dois grupos.

Um outro fator que poderia ser o responsável pela associação HLA-A9 e hepatite A, causado direta ou indiretamente pela própria doença, seria uma reatividade anormal dos linfócitos dos pacientes, devido a uma maior susceptibilidade a reações cruzadas. No entanto, como a maioria das reações dos antisoros anti-HLA-A9 com linfócitos dos pacientes, caracterizados como HLA-A9 positivos, foi fortemente positiva (96%) é improvável que a associação deste antígeno com hepatite viral A se deva a este tipo de reações cruzadas.

Além destes problemas acima avaliados, a designação incorreta dos escores para frequência da morte celular observada, juntamente com número insuficiente de antisoros para uma determinada especificidade e a má qualidade destes antisoros, poderiam ocasionar uma falsa determinação da frequência desta especificidade, especialmente para alelos pouco frequentes (DICK, 1978). Os antisoros usados para definição da especificidade HLA-A9 (FARRAR E BASLER) foram fornecidos pelo NIH dos E.E.U.U. e caracterizados como monoespecíficos e de excelente qualidade, por diversos laboratórios de referência internacional (HARE et al., 1977). Por outro lado, a tipagem dos indivíduos da nossa amostra foi realizada, independentemente, por dois investigadores, com

o objetivo de confirmar os resultados obtidos. Sendo assim, a boa qualidade dos antisoros utilizados, a freqüência relativamente alta da especificidade HLA-A9 em pacientes (45%) e controles (15%) e os cuidados referentes à padronização da avaliação de morte celular, descartam a possibilidade dos resultados obtidos serem conseqüência de problemas técnicos.

Finalmente, para que se possa estabelecer uma associação segura, é imprescindível que as freqüências observadas dos antígenos, nas amostras paciente e controle, representem as freqüências reais destes antígenos na população. Esta condição pode, contudo, não ser atingida em amostras pequenas. No entanto, o tamanho ideal de uma amostra para determinação da freqüência de um antígeno qualquer, em uma população qualquer, é inversamente proporcional à freqüência deste antígeno na população. Desse modo, o tamanho ideal de uma amostra para comparação das especificidades HLA em pacientes e controles não é fixa, mas varia bastante de acordo com a freqüência de cada antígeno a ser comparado.

Embora a freqüência fenotípica seja suficiente para que se possa comparar pacientes e controles, com relação a um determinado antígeno, não se pode ter, apenas com este índice, uma visão mais dinâmica desta freqüência. Ou seja, não se pode determinar se a tendência desta freqüência é aumentar, diminuir ou se manter constante com o aumento da amostra. Esta informação pode ser de relevante importância, pois uma vez que, a freqüência de um dado antígeno, em uma dada população, permaneça constante com o aumento da amostra, pode-se inferir que aquela é a freqüência real do mesmo antí-

geno em toda a população. Qualquer resultado obtido, antes de alcançada a estabilidade, pode não representar a realidade, seja em relação à presença e/ou em relação à força de associação.

Com o objetivo de determinar a tendência de aumento, diminuição ou estabilização da frequência do antígeno HLA-A9 com o aumento da amostra, foi realizada uma análise de regressão linear do diagrama de dispersão das variáveis X (número de indivíduos estudados = N) e Y (número de indivíduos HLA-A9 = n) em pacientes (Fig. 4) e controles (Fig. 5).

A reta que melhor representa os pontos deste diagrama, chamada reta interpolatriz, foi obtida a partir da equação " $Y = a + bX$ ", onde:

$$Y = \text{número de indivíduos HLA-A9} = n$$

$$X = \text{número de indivíduos estudados} = N$$

$$b = \frac{\eta \sum XY - (\sum X) \cdot (\sum Y)}{\eta \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$a = \frac{\sum Y}{\eta} - \frac{b \cdot \sum X}{\eta}$$

$$\eta = \text{número de pares XY.}$$

Como a frequência fenotípica do antígeno HLA-A9, ou outro qualquer, é calculada, dividindo-se o número de indivíduos HLA-A9 (n), pelo número de indivíduos estudados (N) e como " $n = Y = a + bX$ " e " $N = X$ ", a equação geral da curva de frequência fenotípica acumulada pode ser representada pe-

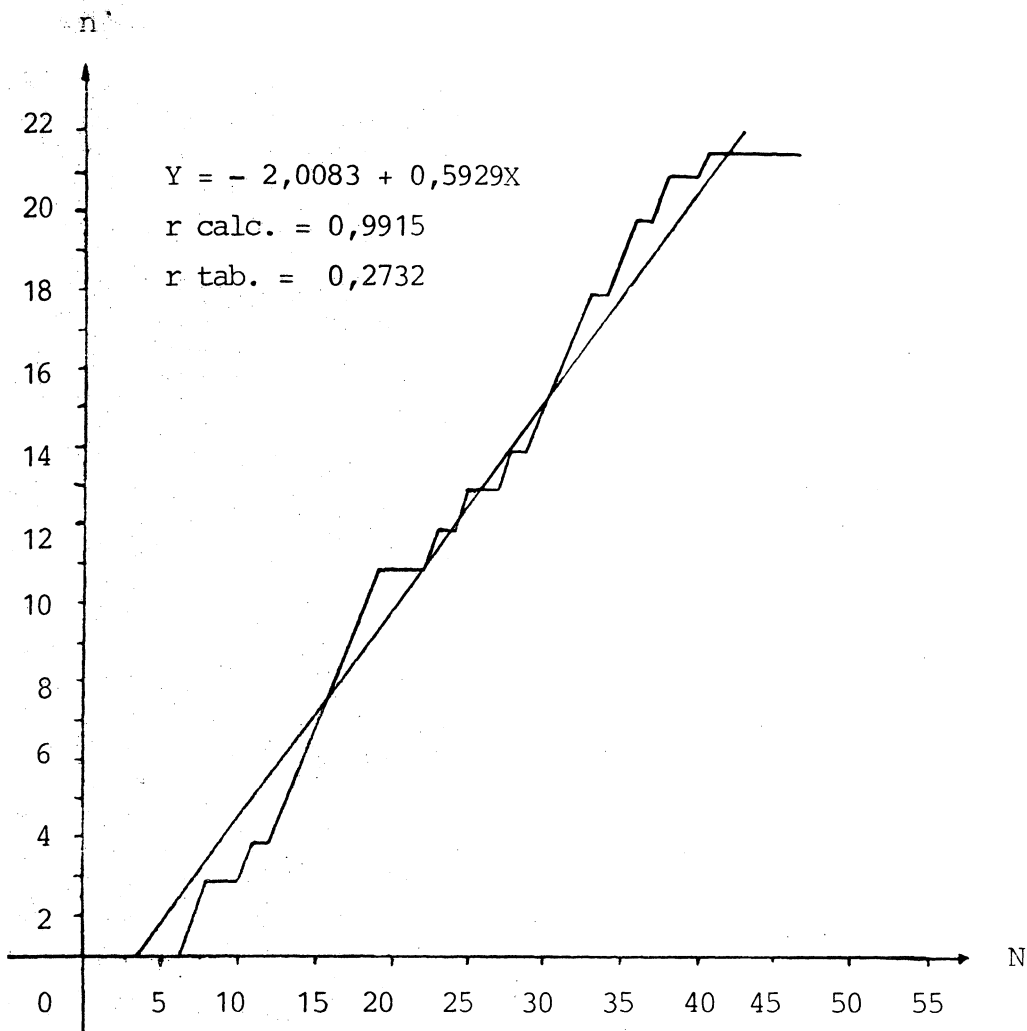


FIGURA 4 - Reta interpolatriz correspondente à relação entre o "número de indivíduos HLA-A9 (n) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo paciente.

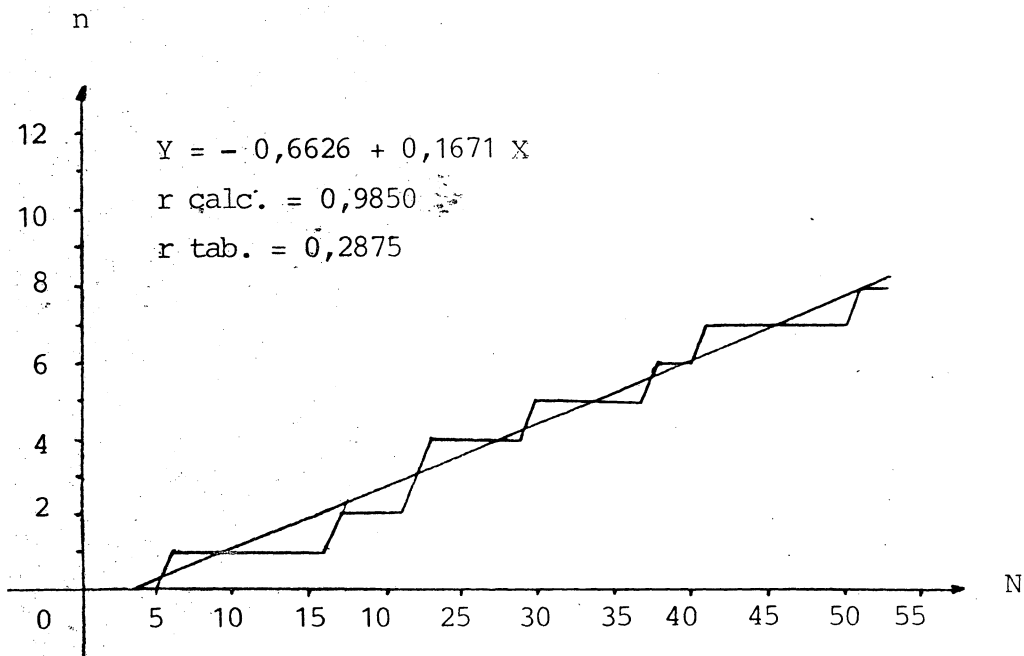


FIGURA 5 - Reta interpolatriz correspondente à relação entre o "número de indivíduos HLA-A9 (n) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle.

la seguinte fórmula:

$$Y' = \frac{Y}{X} = \frac{a + bX}{X} = \frac{a}{X} + b \quad \text{onde:}$$

$$Y' = \text{freqüência fenotípica}$$

Como esta equação permite estimar um valor qualquer de Y' (freqüência do antígeno HLA-A9 = %), a partir de um valor particular de X (número de indivíduos estudados = N), pode-se, facilmente, prever a tendência de aumento, diminuição ou estabilização desta freqüência com o aumento da amostra. Note-se que, embora só seja aconselhável estender esta previsão para o dobro da amostra, ela pode ser realizada para uma amostra de tamanho infinito.

No entanto, para que se possa extrapolar a correlação entre as variáveis X e Y' da amostra para a população e, conseqüentemente, obter previsões confiáveis de Y' a partir de X , deve-se testar a significância de r a um determinado nível de significância.

$$\text{Se o } r \text{ calculado (} r \text{ calc.} = \frac{n \sum XY' - \sum Y \sum X}{\sqrt{n \sum X^2 - (\sum X)^2} \cdot \sqrt{n \sum Y'^2 - (\sum Y')^2}}),$$

for maior que o r crítico tabelado (r tab), para um nível de significância de 0,05 (FISCHER & YATES, 1971) e para $n - 2$ graus de liberdade, aceitamos a hipótese experimental ($r \neq 0$). Caso contrário, aceitamos a hipótese nula ($r = 0$).

Quanto mais o r calculado se aproximar de 1 ou -1,

maior será a força de correlação, positiva ou negativa, entre X e Y' e, conseqüentemente, maior será a precisão na previsão de Y' a partir de X.

As Figuras 6 e 7 apresentam, respectivamente, em pacientes e controles, os diagramas de dispersão da freqüência fenotípica acumulada do antígeno HLA-A9, as linhas interpolatrizes destes diagramas, as fórmulas destas linhas e previsões destas freqüências para amostras de 100 indivíduos.

Estes dados permitem concluir que, nos pacientes, a freqüência do antígeno HLA-A9 deve estabilizar entre 50% e 52%, que é próxima à freqüência observada (45%). Já nos controles, a freqüência do antígeno HLA-A9 deve estabilizar entre 15% e 16%, não diferente da observada (15,1%).

Os cuidados aplicados ao presente estudo, descartam, portanto, a possibilidade da associação HLA-A9 e hepatite viral A ser conseqüência de problemas metodológicos.

A força da associação entre o antígeno HLA-A9 e hepatite A, foi avaliada por duas fórmulas diferentes (WOOLF, 1955; CURIE-COHEM, 1977), através das quais foram obtidos valores semelhantes para o RR, respectivamente 4,54 e 4,47.

A fórmula que realmente expressa, quantas vezes é maior a freqüência da doença em indivíduos portando o antígeno HLA-A9, em relação aos HLA-A9 negativos, necessita, para o seu cálculo, a probabilidade de um indivíduo qualquer

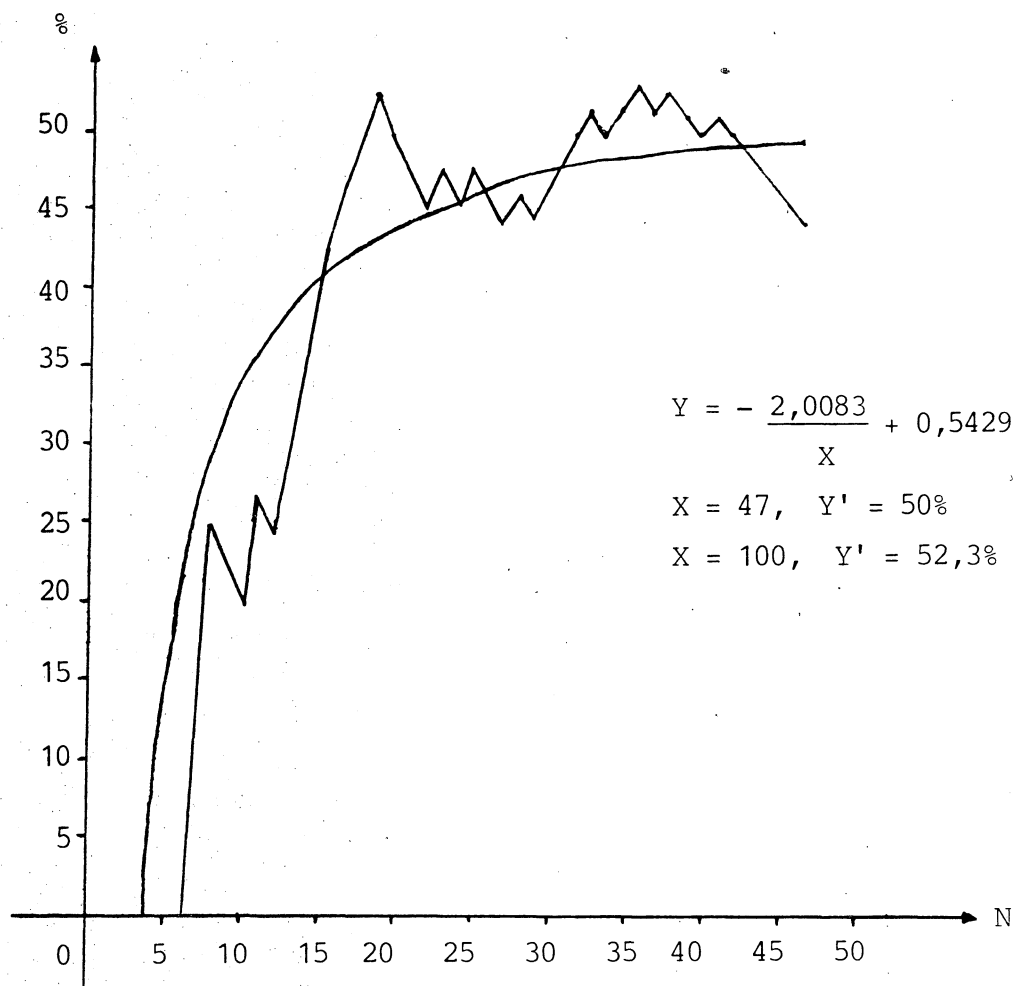


FIGURA 6 - Linha interpolatriz correspondente à relação entre "frequência fenotípica do antígeno HLA-A9 (%) e total de indivíduos estudados (N)" no grupo paciente.

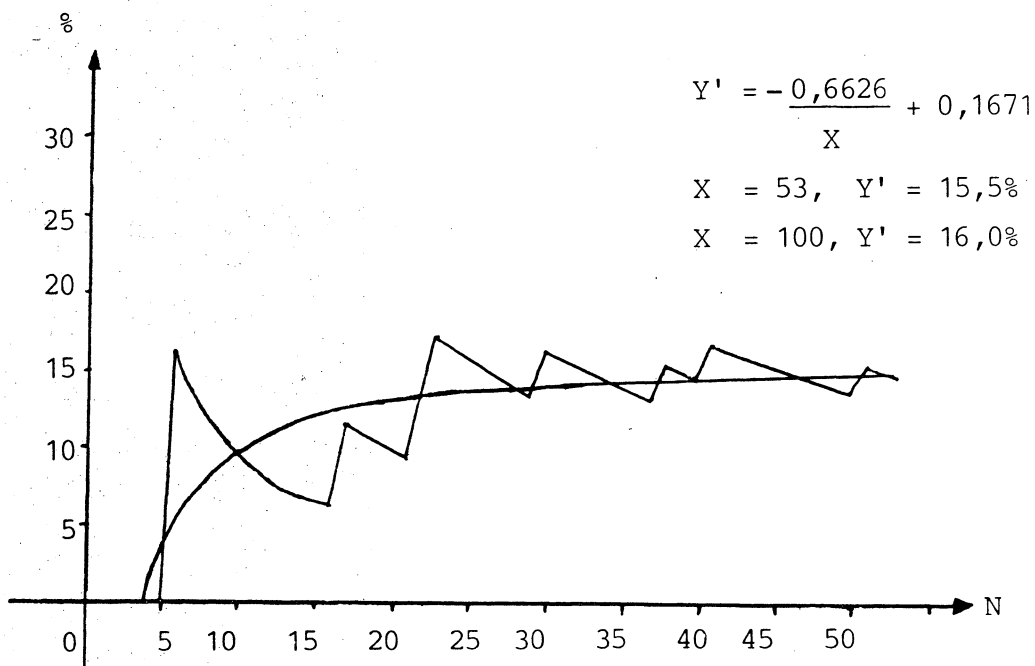


FIGURA 7 - Linha interpolatriz correspondente à relação entre "frequência fenotípica do antígeno HLA-A9 (%) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle.

da população ser um doente, o que nem sempre pode ser determinado com precisão. No entanto, como a hepatite A de Paranaguá ocorreu de forma epidêmica e por um período de tempo curto (33 dias), aliado ao fato de tanto a população quanto as instituições médicas e escolares estarem alertas, foi possível obter uma estimativa confiável desta probabilidade.

Note-se que para esta estimativa foram computados casos entre 0 e 14 anos da zona urbana de Paranaguá, que representam 85% dos pacientes investigados. Dessa forma, possíveis casos não detectados da zona rural, não interferiram no valor de p obtido ($p = 0,007$). Este valor pode, contudo, representar uma superestimativa, já que os dados da população de Paranaguá são referentes a 1980.

Considerando que, o RR mede quantas vezes é maior a frequência de uma doença, em indivíduos portando um determinado marcador, em relação aos que não o apresentam, não teria sentido a sua determinação para antígenos que não mostraram diferença significativa entre pacientes e controles.

A associação HLA-A9 e hepatite viral A, apesar de verdadeira, pode não ser confirmada em outras populações, caso a especificidade A9 funcione simplesmente como marcador de um gene para susceptibilidade à hepatite A. Neste caso, esta associação só será confirmada em populações que apresentem o gene para a susceptibilidade em questão, em desequilíbrio de ligação com a especificidade HLA-A9. Além disso, as associações causadas por desequilíbrio de ligação são caracterizadas como não absolutas, no sentido de que apenas uma certa fração de pacientes apresenta o marcador

relacionado à doença (MUNRO & BRIGHT, 1976).

A associação apresentada neste estudo enquadra-se, precisamente, na categoria de associação não absoluta, já que 45% dos pacientes apresentam este antígeno. Estes dados permitem, portanto, levantar a hipótese desta associação ser consequência de desequilíbrio de ligação de um gene para susceptibilidade à hepatite A com a especificidade HLA-A9.

Alternativamente, apesar de não absoluta, esta associação poderia ser explicada pelo próprio antígeno HLA-A9. O fato de 55% dos pacientes não apresentarem este antígeno, seria explicado pela ação de múltiplos fatores, genéticos e ambientais, como desencadeantes da hepatite A, sendo o antígeno HLA-A9 apenas um deles. Neste caso, esta associação deve ser caracterizada, senão em todas, mas na maioria das populações estudadas, o que, no entanto, não acontece com a maior parte das associações não absolutas descritas.

Futuros estudos poderão demonstrar, ainda, que esta associação é secundária à associação com um outro antígeno do sistema HLA, o qual estaria em desequilíbrio de ligação com o antígeno HLA-A9 em populações caucasóides.

Seja esta associação causada direta ou indiretamente pelo antígeno HLA-A9, os dados apresentados demonstram um componente genético para a susceptibilidade à hepatite viral A.

4.2. Associação HLA-A3 e Hepatite Viral A

Diversos fatores podem ser responsáveis pela sugestão de associação negativa entre o antígeno HLA-A3 e hepatite A, seja ela verdadeira ou não.

Além dos fatores comuns à associação com o antígeno HLA-A9 já discutidos, a heterogeneidade da doença poderia diluir uma verdadeira associação negativa com o antígeno HLA-A3. No entanto, como não foram descritos variantes etiológicos causadores de hepatite A e como as manifestações clínicas desta doença são semelhantes em todo o mundo, parece provável ser esta doença uma entidade homogênea.

Apesar de bem caracterizada, por análise de regressão, a estabilização da frequência do antígeno HLA-A3 nos controles, em torno de 22% (Figs. 8 e 9), a amostra de pacientes é pequena demais para que se possa tirar conclusões definitivas a respeito da frequência real deste antígeno neste grupo de indivíduos ($Y = -0,0204 + 0,0735X$, $r \text{ tab. } 0,2428 > r \text{ calc. } 0,1814$).

A sugestão de associação negativa HLA-A3 e hepatite viral A pode representar apenas um efeito de compensação da associação positiva com o antígeno HLA-A9, já que o aumento da frequência de uma especificidade deve acarretar, necessariamente, a diminuição da frequência de uma ou mais especificidades no mesmo locus.

No entanto, não se pode descartar a hipótese desta

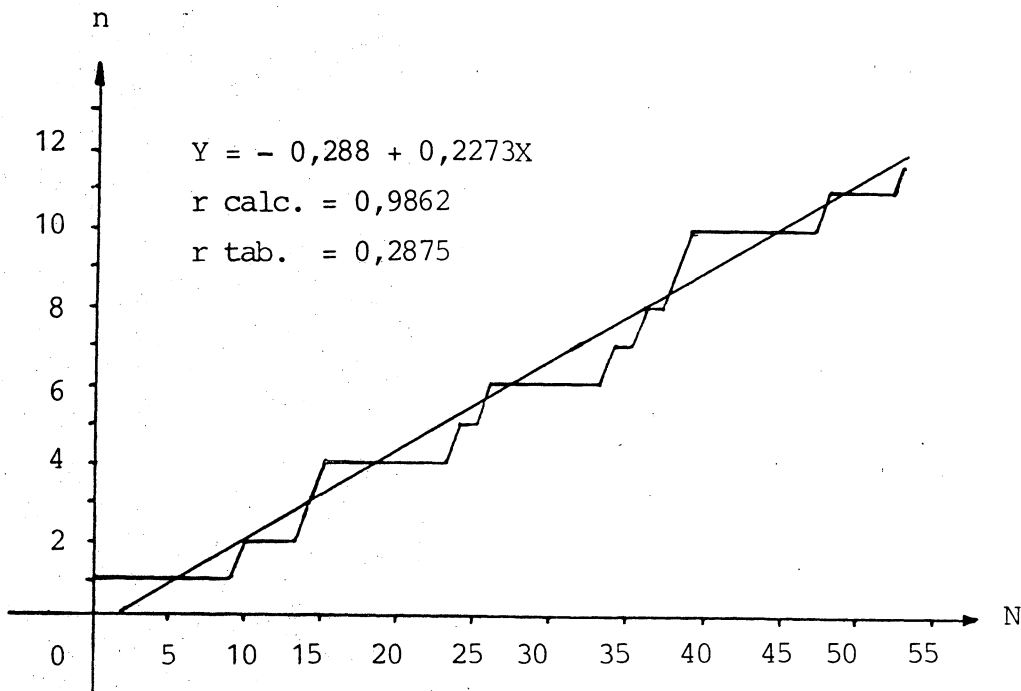


FIGURA 8 - Reta interpolatriz correspondente à relação entre "número de indivíduos HLA-A3 (n) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle.

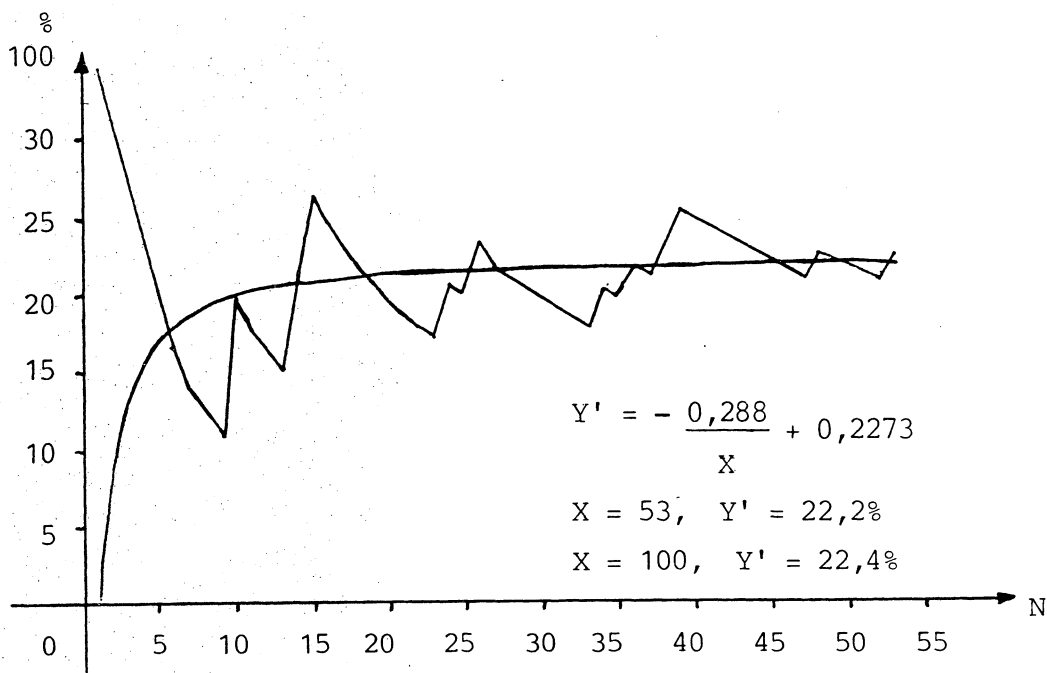


FIGURA 9 - Linha interpolatriz correspondente à relação entre "frequência fenotípica do antígeno HLA-A3 (%) e o total de indivíduos estudados (N)" no grupo controle.

associação ser verdadeira, já que associações negativas são mais difíceis de serem caracterizadas, por necessitarem de um grande número de pacientes (SVEJGAARD et al., 1975). Se confirmada, esta associação poderia ser explicada pela participação de um gene para resistência à hepatite A, em desequilíbrio de ligação com o antígeno HLA-A3.

Resumindo, se por um lado este estudo caracterizou uma associação do antígeno HLA-A9 com hepatite viral A, por outro lado, levantou inúmeras questões, as quais devem ser respondidas pela realização de um ou mais estudos independentes:

- a) A associação observada deve-se ao próprio antígeno HLA-A9 ou a um gene para susceptibilidade, em desequilíbrio de ligação com esta especificidade?
- b) Seria este suposto gene para susceptibilidade, detectável em estudo de família?
- c) A possível associação negativa com o antígeno HLA-A3 é consequência da associação positiva com o antígeno HLA-A9, ou se deve a desequilíbrio de ligação com um gene, que confere resistência à hepatite viral A?

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem obter as seguintes conclusões:

5.1. A associação positiva entre o antígeno HLA-A9 e hepatite viral A, demonstra a participação de um componente genético para a susceptibilidade a esta doença.

5.2. A força desta associação positiva, que é dada pelo RR, mostra que os indivíduos HLA-A9 positivos possuem 4,5 vezes maior chance de desenvolver hepatite viral A, em relação aos indivíduos HLA-A9 negativos.

5.3. A associação negativa do antígeno HLA-A3 com hepatite viral A, caso confirmada, pode sugerir a ocorrência de fator ou fatores genéticos para a resistência a esta doença.

APÊNDICE 1

PROJETO HLA-HEPATITE VIRAL A

DOENTE CONTROLE

PROJETO HLA/HEPATITE VIRAL

DATA:.....

1. Nome:..... 2. Idade:.....
 3. Sexo:..... 4. Grupo étnico:..... 5. Naturalidade:
 6. Tempo de moradia na casa:.....
 7. nº de irmãos:..... 8. Época provável da exposição:.....
 9. Início dos sintomas: 10. Antígeno HBs:.....
 11. Anticorpos HBs:..... 12. Parentesco entre os pais:

 13. Hepatite ou outra doença na família:

	Nome	Grupo étnico	Nac.	Inst.	Profis.
14. Pai					
15. Mãe					

6. BIBLIOGRAFIA

- AIRD, I.; BENTALL, H.H. & FRASER, R.J.A. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. Brit med. J., 1:799-801, 1953.
- ALLEN, F.H. Linkage of HL-A and GBG. Vox Sang. 27:382-4, 1974.
- ALLEN, F.H.; AMOS, D.B.; BATCHELOR, R.; BODMER, W.F.; CEPPELLINI, R.; DAUSSET, J.; ENGELFRIET, C.; JEANNET, M.; KISSMEYER-NIELSEN, F.; MORRIS, P.; PAYNE, R.; TERASAKI, P.; VAN ROOD, J.J.; WALFORD, R.; ZMIJEWSKI, C.; ALBERT, E.; MATTIUZ, P.; MICKEY, M.R. & PIAZZA, A. Joint report of fourth international histocompatibility workshop. IN: TERASAKI, P. I. Histocompatibility Testing 1970. Munksgaard, Copenhagen, 1970, p.17-47
- AMIEL, J.L. Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease: IN. CURTONY, E.S.; MATTIUZ, P.L. & TOSI, R.M. Histocompatibility Testing 1967. Munksgaard, Copenhagen, 1967.p.79-81.
- ANNOUNCEMENT. New nomenclature for the HLA system. J. Immunol., 116(2):573-4, 1976.
- ARCE-GOMEZ, B.; JONES, E.A.; BARNSTABLE, C.J.; SOLOMON, E. & BODMER, W.F. The genetic control of HLA-A and B antigens in somatic cell hybrids: requirement for β_2 -microglobulin. Tissue Antigens, 11:96-112, 1978.
- BACH, F.H.; GOSE, J.E.; ALTER, B.J.; SONDEL, P.M. & BACH, M. L. Past, present and future aspects of histocompatibility. Transplant. Proc., 11(1):1207-11, 1979.
- BACH, F.H. & VOYNOW, N.K. One-way stimulation in mixed leucocyte cultures. Science, 153:545-7, 1966.
- BARNSTABLE, C.J.; JONES, E.A. & CRUMPTON, M.J. Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. Brit. med. Bull., 34(3):241-6, 1978.
- BODMER, J.G. Ia antigens definition of the HLA-DRw specificities. Brit. med. Bull., 34(3):233-40, 1978.
- BODMER, W.F. Evolutionary significance of the HL-A system. Nature, 237:139-45, 1972.

- BODMER, W.F. Genetic factors in Hodgkin's disease: association with a disease-susceptibility locus (DSA) in the HL-A region. Nat. Canc. Inst. Monogr., 36:127-34, 1973.
- BODMER, W.F. Models and mechanisms for HLA and disease associations. J. exp. Med., (Suppl.) 152:353-7, 1980.
- BODMER, W.F. HLA structure and function: a contemporary view. Tissue Antigens, 17:9-20, 1981.
- BODMER, W.F. & BODMER, J.G. Cytofluorocromasia. In: RAY, J. G.; HARE, D.B. & KAYHOE, D.E. Manual of Tissue Typing Techniques. DHEW Publ. No. (NIH) 78-545, 1977. p.31-4.
- BODMER, W.F. & BODMER, J.G. Evolution and function of the HLA system. Brit. med. Bull., 34(3):309-16, 1978.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 (Suppl 97):77-89, 1968.
- BROWN, G.; BIBERFELD, P.; CHRISTENSSON, B. & MASON, D. Y. The distribution of HLA on human lymphoid, bone marrow and peripheral blood cells. Eur. J. Immunol., 9:272-5, 1979.
- CARBONE, J.F.; KNAUER, C.M.; BRANDBORG, L.L. & SILVERMAN, S. Alimentary tract & liver. In: KRUPP, M.A. & CHATTON, M. J. Current medical diagnosis & treatment 1984. Los Altos, Lange. 1984. p.349-428.
- COOK, K. M. Distribution of HL-A antigens on blood cells. Tissue Antigens, 4:202-9, 1974.
- CRESSWELL, P.; SPRINGER, T.; STROMINGER, J.L.; TURNER, M. J.; GREY, H.M. & KUBO, R.T. Immunological identity of the small subunit of HL-A antigens and β_2 -microglobulin and its turnover on the cell membrane. Proc. nat. Acad. Sci. USA. 71(5):2123-7, 1974.
- CRESSWELL, P.; TURNER, M.J. & STROMINGER, J.L. Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. Proc. nat. Acad. Sci. USA, 70(5):1603-7, 1973.
- CURIE-COHEN, M. A note on relative risks. Tissue Antigens, 9:59-61, 1977.
- DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. Acta Haemat., 20:156-66, 1958.
- DECKER, R.H., KOSAKOWSKI, S.M., VANDERBILT, A.S.; LING, C.; CHAIREZ, R. & OVERBY, L.R. Diagnosis of acute hepatitis A by HAVAB-M, a direct radioimmunoassay for IgM anti-HAV. Am. J. Clin. Path., 76(2):140-7, 1981.
- DEGOS, L.; JACQUARD, A.; LANDRE, M.F.; SALMON, D. & VALAT, M.TH. Study of distances between populations from the variation of HL-A

- gene frequencies. In: DAUSSET, J. & COLOMBANI P. J. Histocompatibility Testing 1972. Munksgaard, Copenhagen, 1972. p.739-44.
- DICK, H.M. HLA and disease: Introductory review. Brit. med. Bull., 34(3):271-4, 1978.
- FISCHER, A.R. & YATES, F. Tabelas estatísticas para pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura. São Paulo, Polígono, 1971, 150p.
- FRANCKE, U. & PELLEGRINO, M.A. Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6. Proc. nat. Acad. Sci. USA., 74:1147-51, 1977.
- FREUDENBERG, J.; BAUMANN, H.; ARNOLD, W.; BERGER, J. & BÜSCHENFELDE, K.H. HLA in different forms of chronic active hepatitis. Digestion, 15:260-70, 1977.
- FREUDENBERG, J.; ERDMANN, K.; BÜSCHENFELDE, K.H.; FORSTER, E. & BERGER, J. HL-A bei lebererkrankungen. Klin. Wschr., 51:1075-6, 1973.
- FU, S.M.; KUNKEL, H.G.; BURSMAN, H.P.; ALLEN, F.H. & FOTINO M. Evidence for linkage between HLA histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement. J. exp. Med., 140:1108-12, 1974.
- GOODFELLOW, P.N.; BARNSTABLE, C.J.; BODMER, W.F.; SNARY, D. & CRUMPTON, M.J. Expression of HLA system antigens on placenta. Transplantation., 22(6):595-603, 1976.
- GOODFELLOW, P.N.; JONES, E.A.; VAN HEYNINGEN, V.; SOLOMON, E. BOBROW, M.; MIGGIANO, V. & BODMER, W.F. The β_2 - microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. Nature, 254:267-9, 1975.
- HARE, B.D.; RAY, J.G.; PEDERSEN, P.D. & NUTTER, J.E. Catalog of tissue typing antisera, DHEW Publ. n° (NIH) 76-97, 1977. 1223p.
- HAUPTMANN, G.; SASPORTES, M.; TONGIO, M.M.; MAYER, S. & DAUSSET, J. The localization of the Bf locus within the MHS region on chromosome n° 6. Tissue Antigens, 7:52-4, 1976.
- HAWKINS, B.R. Table of critical chi-square values for investigations involving multiple comparisons. Tissue Antigens, 17:243-4, 1981.
- HUMPHREYS, R.E.; McCUNE, J.; CHESS, L.; HERRMAN, H.; MALENKA, D.; MANN, D.; PARHAM, P.; SCHLOSSMAN, S. & STROMINGER, J. Isolation and immunologic characterization of human B-lymphocyte-specific, cell surface antigen. J. exp. Med., 144:98-112, 1976.
- IBGE, Censo demográfico: dados distritais. Rio de Janeiro, 1982. 415p.

- JONGSMA, A.; SOMEREN, H.; WESTERVELD, A.; HAGEMEIJER, A. & PEARSON, P. Localization of genes on human chromosomes by studies of human-chinese-hamster somatic cell hybrids. Humangenetik, 20:195-202, 1973.
- JOYSEY, V.C. & WOLF, E. HLA-A, -B and -C antigens, their serology and crossreaction. Brit. med. Bull., 34(3):217-22, 1978.
- KASTELAN, A.; DURINOVIC-BELO, I. & JAJIC, I. The HLA genes and haplotypes in ankylosing spondylitis. Period. Biol., 82(2):57-63, 1980.
- KRUGMAN, S.; WARD, R. & KATZ, S.L. Doenças infecciosas em pediatria. 6ª ed. São Paulo, Atheneu, 1979. 540p.
- LAMM, L.U.; FRIEDRICH, U.; PETERSEN, G.B.; JORGENSEN, J.; NIELSEN, J.; THERKELSEN, A.J. & KISSMEYER-NIELSEN, F. Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome n° 6. in a family with a pericentric inversion. Hum. Hered., 24:273-84, 1974.
- LANCET, D.; PARHAM, P. & STROMINGER, J.L. Heavy chain of HLA-A and HLA-B antigens is conformationally labile: a possible role for β_2 - microglobulin. Proc. nat. Acad. Sci. USA., 76(8):3844-8, 1979.
- LEPAGE, V.; DEGOS, F.; CARELLA, G.; LIMA, M.; GIRAUD, M.C. & DEGOS, L. HLA-Cw7 and HBsAg negative chronic active hepatitis. Tissue Antigens, 18:105-7, 1981.
- LEVIN, J. Estatística aplicada às ciências humanas. São Paulo, Harbra, 1978. 310p.
- LILLY, F. The effect of histocompatibility-2 type on response to the friend leukemia virus in mice. J. exp. Med., 127:465-73, 1968.
- LINDBERG, J.; LINDHOLM, A.; LUNDIN, P. & IWARSON, S. Trigger factors and HL-A antigens in chronic active hepatitis. Brit. med. J., 4:77-9, 1975.
- MACKAY, U.R. & TAIT, B.D. HLA association with chronic active hepatitis In: ROSE, N.R.; BIGAZZI, P.E. & WARNER, N.L. Genetic control of autoimmune disease. North Holland, Elsevier, 1978. p.27-42.
- _____. HLA associations with autoimmune-type chronic active hepatitis: identification of B8-DRw3 haplotype by family studies. Gastroenterology, 79:95-8, 1980.
- MANN, D.L. & SHARROW, S.O. B-cell alloantigens on T lymphocytes. Transplant Proc., 11(4):1774-5, 1979.
- MARINHO, R.P. Hepatites viróticas. In: NEVES, J. Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Koogan, 1978. p.217-29.
- MATTIUZ, P.L.; IHDE, D.; PIAZZA, A.; CEPPELLINI, R. & BODMER W.F. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In: TERASAKI, P.

- I. Histocompatibility Testing 1970. Munksgaard, Copenhagen, 1970. p.193-205.
- MAZZILLI, M.C.; TRABACE, S.; DI RAIMONDO, F.; VISCO, G. & GANDINI, E. HLA and chronic active hepatitis. Digestion, 15:278-85, 1977.
- McDEVITT, H.O. & BENACERRAF, B. Genetic control of specific immune responses. Adv. Immunol., 11:31-74, 1969.
- McKUSICK, V.A. & RUDDLE, F.H. The status of the gene map of the human chromosomes. Science, 196:390-405, 1977.
- MELNICK, J.L.; DRESSMAN, G.R.; HOLLINGER, F.B. Approaching the control of viral hepatitis type B. J. infec. Dis. 133:210-29, 1976.
- MORGENSTERN, H.; KLEINBAUM, D.G. & KUPPER, L.L. Measures of disease incidence used in epidemiological research. Intl. J. Epidemiol., 9:97-104, 1980.
- MUNRO, A. & BRIGHT, S. Products of the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response. Nature, 264 (11):145-52, 1976.
- MUNRO, A. & WALDMANN, H. The major histocompatibility system and the immune response. Brit. med. Bull., 34(3): 253-8, 1978.
- MUSCHEL, L.H. Blood groups, disease, and selection. Bact. Rev., 30(2):427-41, 1966.
- NATH, N.; MAZZUR, S.; FRANG, C.; BASTIAANS, M.J.; MOLINARIS, J.L.; BALCASER, M.; BEKER, S.; BRUNINGS, E.A.; CAMERON, A. E.; FARREL, V.; FAY, O.H.; LABRADOR-GONZÁLEZ, G.; GONZÁLEZ, G.; GUTIÉRREZ, A.; JARAMILLO, C.; KATZ, R.; LEME, M.B.; LEVY-KOENIG, E.; MORALES-AYALA, F.; RODRÍGUES AMAYA, J.; RODRIGUES-MOYADO, H.; de TORRES, R.A. & VELASCO, M. Prevalencia de los anticuerpos contra el virus A de la hepatitis (VAH) en donantes de sangre de 13 países y territorios del hemisferio occidental. Bol. of Sanit. Panam, 90(5):425-9, 1981.
- O'NEILL, G.J.; YANG, S.Y.; TEGOLI, J.; BERGER, R. & DUPONT, B. Chido and Rodgers blood groups are distinct antigenic components of human complement C4. Nature, 273:668-70, 1978.
- OPELZ, G.; VOGTEN, A.M.; SUMMERSKILL, W.J.; SCHALM, S. W. & TERASAKI, P.I. HLA determinants in chronic active liver disease: possible relation of HLA-Dw3 to prognosis. Tissue Antigens, 9:36-40, 1977.
- PAGE, A.R.; SHARP, H.L.; GREENBERG, L.J. & YUNIS, E.J. Genetic analysis of patients with chronic active hepatitis. J. clin. Invest., 56:530-5, 1975.
- PAYNE, R. & ROLFS, M.R. Fetomaternal leucocyte incompatibility. J. clin. Invest., 37:1756-63, 1958.
- PAYNE, R.; TRIPP, M.; WEIGLE, J.; BODMER, W. & BODMER, J. A new leukocyte isoantigen system in man. Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 29:285-95, 1964.

- PENNER, E.; GRABNER, G.; DITTRICH, H. & MAYR, W.R. HLA antigens in HBs antigen positive chronic active hepatitis. Tissue Antigens, 10:63-4, 1977.
- POLACEK, L.A.; PHILLIPS, R.B.; HACKBARTH, S.A. & DUQUESNOY, R.J. A linkage study of the HLA region using C-band heteromorphisms. Clin. Genet., 23:177-85, 1983.
- RITTNER, C.; HAUPTMANN, G.; GROSSE-WILDE, H.; GROSSHANS, E.; TONGIO, M.M. & MAYER, S. Linkage between HL-A (major histocompatibility complex) and genes controlling the synthesis of the fourth component of complement. In: KISSMEYER-NIELSEN, F. Histocompatibility Testing 1975. Munksgaard, Copenhagen, 1975, p.945-53.
- RYDER, L.P.; ANDERSEN, E. & SVEJGAARD, A. HLA and disease registry. third report. Munksgaard, Copenhagen, 1979. 61p.
- RYDER, L.P.; SVEJGAARD, A. & DAUSSET, J. Genetics of HLA disease association. In: ROMAN, H.L.; CAMPBELL, A. & SANDLER, L.M. Annu. Rev. Genet. California, Palo Alto, 1981. p.169-85.
- SANDBERG, L.; THORSBY, E.; KISSMEYER-NIELSEN, F. & LINDHOLM, A. Evidence of a third sublocus within the HL-A chromosomal region. In: TERASAKI, P.I. Histocompatibility Testing 1970. Munksgaard, Copenhagen, 1970. p.165-9.
- SCHALLER, J.G. & OMENN, G.S. The histocompatibility system and human disease. J. Pediat., 88(6):913-25, 1976.
- SCOTT, B.B.; RAJAH, S.M. & LOSOWSKY, M.S. Histocompatibility antigens in chronic liver disease. Gastroenterology, 72:122-5, 1977.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE E DO BEM ESTAR SOCIAL - SESB. Boletim epidemiológico nº 27. Curitiba, 1983, 1p.
- SKINHOJ, P. Epidemiological aspects of viral hepatitis A and B infections. Danish med. Bull., 28(5):177-92, 1981.
- STROMINGER, J.L. Structure of products of the major histocompatibility complex in man and mouse. In: FOUGEREAU, M. & DAUSSET, J. Progress in Immunology IV. London, Academic Press, 1980. p.541-54.
- SVEJGAARD, A.; BRATLIE, A.; HEDIN, P.J.; HOGMAN, C.; JERSILD, C.; KISSMEYER-NIELSEN, F.; LINDBLOM, B.; LINDHOLM, A. LÖW, B.; MESSETER, L.; MOLLER, E.; SANDBERG, L.; STAUB-NIELSEN, L. & THORSBY, E. The recombination fraction of the HL-A system. Tissue Antigens, 1:81-8, 1971.
- SVEJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYDER, L.P.; NIELSEN, L.S. & THOMSEN, M. HL-A and disease associations - a survey. Transplant

Rev., 22:3-43, 1975.

- SVEJGAARD, A. & RYDER, L.P. Association between HLA and disease: notes on methodology and a report from the HLA and disease registry. In: DAUSSET, J. & SVEJGAARD, A. HLA and disease. Munksgaard, Copenhagen, 1977. p.46-71.
- TAIT, B.D.; MACKAY, I.R.; KASTELAN, A.; DAUSSET, J.; MAYER, S. & OKOCHI, K. Chronic liver disease including chronic active hepatitis. In: TERASAKI, P. I. Histocompatibility Testing 1980. Munksgaard, Copenhagen, 1980, p.657-61.
- TERASAKI, P.I. & Mc CLELLAND, J.D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature, 204:998-1000, 1964.
- TERASAKI, P.I.; BERNOCO, D.; PARK, M.S.; OZTURK, G. & IWAKI, Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am. J. Clin. Path., 69:103-20, 1978.
- TERASAKI, P.I. & MICKEY, M.R. HL-A haplotypes of 32 diseases. Transplant. Rev., 22:105-19, 1975.
- TIILIKAINEN, A. On the way to understanding the pathogenesis of HLA associated diseases. Med. Biol., 58:53-6, 1980.
- TREPO, C.; COUROUCE, A.M. & SEPETJAN, M. Imunoprofilaxia das hepatites virais. Nouv. Press. Médicale, 1(6):389-91, 1982.
- VAN ROOD, J.J.; EERNISSE, J.G. & VAN LEEUWEN, A. leukocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature, 181:1735-6, 1958.
- VAN ROOD, J.J. & VAN LEEUWEN, A. Leukocyte grouping. a method and its application. J. clin. Invest., 42(9):1382-90, 1963.
- WHITTINGHAM, S.; MATHEWS, J.D.; SCHANFIELD, M.S.; TAIT, B.D. & MACKAY, I.R. Effect of gene interaction on susceptibility to disease. Tissue Antigens, 17:252-4, 1981.
- WHO-IUIS TERMINOLOGY COMMITTEE. Nomenclature for factors of the HLA system. In: KISSMEYER-NIELSEN, F. Histocompatibility Testing 1975. Munksgaard, Copenhage, 1975, p.5-20.
- _____. Nomenclature for factors of the HLA system. In: TERASAKI, P.I. Histocompatibility Testing 1980. Munksgaard, Copenhagen, 1980. p.18-20.
- WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. Ann. Hum. Genet., 19:251-3, 1955.
- ZIMMERMANN, R.; OZER, H.; WOLF, W.C.; EVANS, R.L.; YUNIS, E. J. & SCHLOSSMAN, S.F. The detection of Ia - like and DRw antigens on activated T cells. Transplant. Proc. 11(4):1770-3, 1979.