

Noemi Farah Pereira

**Estudo de Associação de Antígenos HLA-A, B, C
DR e DQ e Leishmaniose Tegumentar Americana.**

**Dissertação aprovada no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas - área de
concentração em Genética para o nível de
Mestrado. Universidade Federal do Paraná.**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Luíza Petzl-Erler

Curitiba

1994

Noemi Farah Pereira

**Estudo de Associação de Antígenos HLA-A, B, C
DR e DQ e Leishmaniose Tegumentar Americana.**

**Dissertação aprovada no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas - área de
concentração em Genética para o nível de
Mestrado. Universidade Federal do Paraná.**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Luíza Petzl-Erler

Curitiba

1994

Dedico este trabalho

aos meus pais Suria e Antônio Carlos,

ao meu companheiro Luso Mario

e ao Dr. Eurípides Ferreira.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Luíza Petzl-Erler, a quem admiro pela sua integridade e competência, meu agradecimento muito especial pela orientação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Eurípides Ferreira, pela confiança e por ter proporcionado o meu desenvolvimento profissional na área de histocompatibilidade.

À Professora Enilze Maria Ribeiro, pelo incentivo e generosidade auxiliando-me nos estudos para a realização da prova de ingresso no Curso de Pós-Graduação.

Ao Professor Dr. Iglenir Cavalli, pelo estímulo e pelos ensinamentos de genética humana.

Ao Carlos A. Martinez Alonso, meu agradecimento muito especial pelo apoio, pelos ensinamentos de informática, e pela realização de desenhos apresentados neste trabalho.

Ao Professor Dr. Lodércio Culpí e a todos os professores que ministraram aulas no Curso de Pós-Graduação em Genética, por terem contribuído na minha formação.

Aos meus colegas de trabalho: Alexandra Senegaglia, Carlos A. Martinez Alonso, Carmem Lúcia Rebellato, Marina Ohashi e Sueli Galvão de Oliveira, pela generosa colaboração referente ao recebimento e manipulação das amostras de sangue, durante a fase de coleta na área endêmica.

À Denise Cristine Coutinho da Costa e ao Marcelo Irajá Mion pelo auxílio recebido em várias etapas deste trabalho.

Às minhas colegas de turma, Alice S. Tokutake e Cynthia Fadel Picheth, pelo apoio e por compartilharem comigo os momentos de estudo em todas as disciplinas que cursamos juntas.

À Professora Maria Gerbase de Lima, pelo seu desprendimento e auxílio na análise estatística e pela sugestões relevantes.

Ao Professor Dr. Flávio Telles Filho, pelas informações fornecidas, pelas fotografias de lesões de leishmaniose e pelo apoio constante.

Ao Dr. Airton Pereira de Lima, por ter colocado à minha disposição os prontuários e endereços, assim como pelas informações referentes aos pacientes afetados por Leishmaniose.

Aos funcionários e motoristas, do Centro de Saúde e da 13^a Regional de Saúde de Cianorte, pelo apoio e colaboração.

À Professora Luiza Tsuneto, pelo apoio e auxílio na coleta de material de indivíduos residentes nas cidades próximas a Maringá.

Ao Dr. Paulo de Moraes Barros Neto, diretor da Companhia Melhoramentos do Paraná, por deixar seus motoristas à minha disposição para a realização da coleta do material dos pacientes envolvidos neste estudo.

Ao Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR pelo apoio referente ao meu afastamento temporário para a realização dos créditos do Curso de Pós-Graduação.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas, que realizaram temporariamente parte do meu trabalho para que eu pudesse concluir o Curso de Pós-Graduação.

Aos pacientes, pelo seu desprendimento permitindo a retirada de amostras de sangue para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 LEISHMANIOSE.....	1
1.1.1 Definição	1
1.1.2 Espectro de manifestações clínicas da doença.....	1
1.1.3 Resposta imune na leishmaniose	5
1.1.4 Regulação genética na leishmaniose	12
1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO.....	16
1.2.1 Histórico	16
1.2.2 Proteínas HLA de classe I: estrutura e função.....	17
1.2.3 Proteínas HLA de classe II: estrutura e função	21
1.2.4 Metodologia para identificação dos genes e proteínas HLA	24
1.2.5 Nomenclatura.....	26
1.2.6 Mapa genético e físico	27
1.2.7 Herança dos antígenos do CPH	32
1.2.8 Genética de populações e desequilíbrio de ligação	33
1.2.9 Polimorfismo	34
1.2.10 HLA e doenças	36
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	46

3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 AMOSTRA POPULACIONAL PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO : CASO-CONTROLE.....	48
3.2 FAMÍLIAS PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO : CO-SEGREGAÇÃO	53
3.3 INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO	53
3.4 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO	54
3.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	55
3.6 CONTAGEM E AJUSTE DA CONCENTRAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES	56
3.7 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	57
3.8 DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	58
3.9 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	58
3.10 LISE DE ERITRÓCITOS CONTAMINANTES.....	59
3.11 SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T E B: MÉTODO DO COTONETE DE FIBRA DE NÁILON	59
3.12 DETERMINAÇÃO DOS ANTÍGENOS HLA: MÉTODO DE MICRO- LINFOCITOTOXICIDADE MODIFICADO POR AMOS	61
3.13 PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES	63
3.13.1 Meio de cultivo celular RPMI 1640	63
3.13.2 Hepes 1M.....	64
3.13.3 Azul de <i>trypan</i> 0,16g%.....	64
3.13.4 Azul de <i>trypan</i> 1g%.....	64
3.13.5 EDTA dissódico 2g%	65
3.13.6 Solução salina balanceada (PBS) 10X.....	65
3.13.7 Solução salina balanceada (PBS) 1X.....	65
3.13.8 <i>Pool</i> de soros de coelho como fonte de complemento	65
3.13.9 Soro bovino fetal	66
3.13.10 Tampão hemolítico	67
3.13.11 Preparo do <i>pool</i> de plaquetas.....	67
3.13.12 Adsorção de soros anti-HLA com um <i>pool</i> de plaquetas	68

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3.14.1 Análise de associação (caso-controle) em amostras populacionais.....	69
3.14.2 Análise de associação (co-segregação) em amostras de irmandades com múltiplos casos	70
4 RESULTADOS.....	72
4.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE ANTÍGENOS HLA E LTA EM AMOSTRA POPULACIONAL (CASO-CONTROLE).....	72
4.2 ESTUDO DE CO-SEGREGAÇÃO DE HAPLOTIPOS HLA E LTA	92
5 DISCUSSÃO	101
6 RESUMO E CONCLUSÕES	110
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

L	= <i>Leishmania</i>
CPH	= Complexo Principal de Histocompatibilidade
HLA	= <i>Human Leukocyte Antigens</i>
IFN- γ	= Interferon - gama
IL	= Interleucina
LCD	= Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	= Leishmaniose Cutânea Localizada
LMC	= Leishmaniose Mucocutânea
LTA	= Leishmaniose Tegumentar Americana

LISTA DE TABELAS

1. Listagem de especificidades HLA reconhecidas pelo Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde, 1994.	28
2. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LTA e controles analisados para HLA-A, B e C	51
3. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LTA e controles analisados para HLA-DR e DQ	51
4. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LCL e controles analisados para HLA-A, B e C	51
5. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LCL e controles analisados para HLA-DR e DQ	52
6. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LMC e controles analisados para HLA-A, B e C	52
7. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LMC e controles analisados para HLA-DR e DQ	52
8a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes afetados por LTA e controles.....	74
8b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes afetados por LTA e controles.....	75
8c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes afetados por LTA e controles.....	76
9a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes brancos afetados por LTA e controles brancos.....	77
9b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes brancos afetados por LTA e controles brancos.....	78
9c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes brancos afetados por LTA e controles brancos.....	79
10a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes afetados por LCL e controles.....	80
10b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes afetados por LCL e controles.....	81

10c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes afetados por LCL e controles.....	82
11a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes brancos afetados por LCL e controles brancos	83
11b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes brancos afetados por LCL e controles brancos	84
11c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes brancos afetados por LCL e controles brancos	85
12a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes afetados por LMC e controles.....	86
12b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes afetados por LMC e controles.....	87
12c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes afetados por LMC e controles.....	88
13a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes brancos afetados por LMC e controles brancos	89
13 b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes brancos afetados por LMC e controles brancos	90
13 c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes brancos afetados por LMC e controles brancos	91
14a. Fenótipos e genótipos HLA dos membros das famílias de números 1 a 5 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA.....	97
14b. Fenótipos e genótipos HLA dos membros das famílias de números 6 a 10 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA.....	98
14c. Fenótipos e genótipos HLA dos membros das famílias de números 11 a 15 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA.....	99
15. Genótipos HLA dos irmãos afetados por LTA em 15 famílias	100
16. Análise estatística do compartilhamento de haplotipos HLA em 42 irmãos afetados por leishmaniose tegumentar americana (LTA)	100

LISTA DE FIGURAS

1. Lesão de Leishmaniose Cutânea Localizada	4
2. Lesão de Leishmaniose Mucocutânea	4
3. Diagrama esquemático de uma molécula CPH de classe I.....	18
4. Diagrama esquemático de uma molécula CPH de classe II	22
5. Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano	31
6. Diagrama da câmara de contagem de Neubauer.....	56
7a. Genealogias das famílias de números 1 a 4 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA	93
7b. Genealogias das famílias de números 5 a 8 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA	94
7c. Genealogias das famílias de números 9 a 11 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA	95
7d. Genealogias das famílias de números 12 a 15 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA	96

LISTA DE ANEXOS

1. Conjunto de anti-soros utilizados para tipificação das especificidades HLA-A, B e C	113
2. Conjunto de anti-soros utilizados para tipificação das especificidades HLA-DR e DQ ...	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

1.1.1 Definição

A leishmaniose é uma zoonose endêmica causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, sendo o homem o hospedeiro secundário (Pessôa e Martins, 1988). A doença é transmitida ao homem por meio da inoculação de flagelados promastigotas, na epiderme ou na camada superior da derme, pelo vetor flebótomo dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, também conhecido como mosquito palha, birigui, asa branca etc. Uma vez dentro do hospedeiro, os promastigotas invadem e multiplicam-se dentro dos macrófagos da pele, membranas mucosas e vísceras, onde se transformam em formas amastigotas. As *Leishmanias* são, portanto, parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos. Eventualmente as células infectadas rompem-se, e os amastigotas reinvadem outros macrófagos. Os reservatórios animais das espécies patogênicas ao homem são geralmente roedores silvestres, porém em áreas endêmicas animais domésticos também podem estar infectados propiciando a infecção peri-domiciliar.

1.1.2 Espectro de manifestações clínicas da doença

A infecção humana pela *Leishmania* resulta num amplo espectro de perfis da doença, que é determinado primariamente pela espécie dos parasitas, com tropismo por tecidos

específicos, cutâneo ou visceral (Pessoa e Martins, 1988). Contudo, é influenciado também pelas variações na habilidade de o hospedeiro controlar o crescimento da população de parasitas no início da infecção ou montar uma resposta imune mediada por células efectoras no decorrer da doença (Ridley *et al.*, 1989; Convit *et al.*, 1993).

As infecções por *L. major* e *L. tropica*, espécies encontradas no Velho Mundo, causam uma forma de leishmaniose cutânea designada "botão do oriente", na qual as úlceras de pele cicatrizam-se espontaneamente. As lesões de pele causadas pela *L. aethiopica* (Velho Mundo) e *L. mexicana* (Novo Mundo) são difusas e não se cicatrizam espontaneamente. As lesões fatais na leishmaniose visceral ou calazar são causadas pela *L. donovani* (Velho Mundo) e pela *L. chagasi* (Novo Mundo).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), encontrada na América Central e América do Sul, é geralmente resultante da infecção pela *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. mexicana*. No entanto, estas espécies distintas de *Leishmania* implicam diferenças marcantes na evolução clínica da leishmaniose (Convit *et al.*, 1993).

A doença, quando causada pela *L. braziliensis*, pode manifestar-se somente através da forma cutânea localizada ou pode evoluir para a forma mucocutânea ou espúndia, devido à presença concomitante ou tardia de lesões metastáticas em mucosas da região naso-faríngeo-laríngea. A lesão cutânea é geralmente auto-limitante e cicatriza-se espontaneamente após o período de alguns meses; porém a lesão mucosa é um processo progressivo que geralmente é interrompido apenas com terapia específica (Ridley *et al.*, 1980).

Quando a infecção é causada por algum membro dos complexos *Leishmania mexicana* ou *Leishmania amazonensis*, geralmente manifesta-se através da forma cutânea localizada (LCL). Todavia, pode ocorrer também uma forma mais rara, a leishmaniose cutânea difusa

(LCD). Na LCD, as lesões são disseminadas e em número elevado e, algumas vezes, restritas a determinadas áreas. Os granulomas são constituídos por macrófagos indiferenciados com pouquíssimos elementos linfóides e número elevado de parasitas intracelulares.

As lesões da leishmaniose cutânea localizada (LCL), que inicialmente apresentam-se sob a forma de pápulas vesiculosas e contêm um número elevado de parasitas, geralmente evoluem para lesões ulceradas, de bordos elevados e eritematosos com aspecto de moldura (fig.1). Estas lesões geralmente cicatrizam-se espontaneamente dentro de alguns meses. Histologicamente, os granulomas iniciais da LCL são constituídos de um infiltrado proeminente de linfócitos, números variáveis de células epitelióides e poucos parasitas. O padrão histológico das lesões ulceradas é alterado em decorrência de infecção bacteriana secundária e do processo necrotizante.

Na leishmaniose mucocutânea (LMC), as lesões da mucosa nasal iniciam-se com hiperemia e infiltração da mucosa e evoluem para lesões mutilantes devido à ulceração progressiva, que atinge a cartilagem, resultando em perfuração do septo e destruição do sub-septo, acabando por atingir toda a estrutura cartilaginosa do nariz, podendo atingir palato, faringe, laringe e lábios. Estas lesões conferem o aspecto conhecido por "nariz de tapir" ou "nariz de anta" e se não tratadas acabam deformando completamente a fisionomia do indivíduo (fig.2). Nos casos mais graves, além da mutilação, ocorre deterioração do estado geral de saúde e mesmo a morte, se o sistema respiratório estiver muito comprometido.

O granuloma da LMC é constituído por uma mistura de linfócitos e macrófagos, poucos parasitas e modificações moderadas da epiderme. O mecanismo de invasão das mucosas pela *Leishmania* não está esclarecido, porém existem as hipóteses de auto-inoculação exógena e de os parasitas atingirem o foco metastático pela via hematogênica.



Figura 1. Lesão de Leishmaniose Cutânea Localizada



Figura 2. Lesão de Leishmaniose Mucocutânea

1.1.3 Resposta imune na leishmaniose

1.1.3.1 Imunidade celular

Está bem fundamentado que o curso da infecção por *Leishmania* é primariamente dependente da população de linfócitos T, pois a resolução da infecção e a imunidade à re-infecção estão associadas com a imunidade celular específica.

Essa resposta celular pode ser identificada *in vivo* através de reações de hipersensibilidade tipo tardia ao antígeno de *Leishmania* (Montenegro, 1926), sendo positiva na maioria dos pacientes portadores de LCL e LMC, porém mais forte nos pacientes com LMC (Castes *et al.*, 1983; Saravia *et al.*, 1989). Foi constatado que a imunidade celular na LCL pode ser detectada antes da cicatrização das lesões e permanecer positiva por muitos anos (Guirges, 1971). Alguns pesquisadores estudaram a resposta celular *in vitro* por meio da estimulação de linfócitos de indivíduos infectados ou recuperados da doença, com antígenos de *Leishmania* e com mitógenos inespecíficos (Tremonti e Walton, 1970; Wyler *et al.*, 1979; Green *et al.*, 1983). De modo geral, os linfócitos de pacientes com LMC mostraram uma reatividade mais elevada tanto *in vitro* quanto *in vivo* quando comparados aos pacientes com LCL.

Vários estudos foram realizados para avaliar os componentes imunológicos, em sangue periférico e nas lesões, de pacientes afetados por LCL e LMC. Os resultados demonstraram que as populações de células T presentes nos tecidos são significativamente diferentes das encontradas no sangue periférico.

As freqüências de células T reativas à *Leishmania braziliensis* foram significativamente mais elevadas nas lesões cutâneas e mucosas do que em sangue periférico, sendo as

freqüências nas lesões mucosas ainda mais elevadas do que nas lesões cutâneas (Conceição-Silva *et al.*, 1990). A caracterização dos componentes do infiltrado inflamatório nas lesões de LCL e de LMC demonstrou um quadro bastante similar nos dois tipos de lesões: as células T constituíam aproximadamente 75% do total de células, as taxas CD4⁺/CD8⁺ eram normais, aproximadamente 5% de células expressavam receptor para interleucina 2, células T de memória predominavam sobre células T virgens, e constatou-se a presença de RNAm para IFN- γ . As células T, extraídas de ambos os tipos de lesões, proliferaram frente aos antígenos de *Leishmania in vitro*, indicando estimulação prévia *in vivo* (Pirmez *et al.*, 1990). Estes resultados sugerem que as células T de memória sejam componentes da resposta de hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania*, participando na patogênese destas lesões.

Aproximadamente 38% das células presentes em lesões de LCL expressavam o fenótipo de *natural killer* (NK) (Ridel *et al.*, 1988). Contudo o grau de envolvimento destas células na leishmaniose humana não está esclarecido, pois nenhum ensaio funcional foi realizado. O trabalho de Scharon e Scott (1993) em camundongos forneceu a primeira evidência direta de que as células NK, durante a fase inata da resposta imune, influenciam a diferenciação das células Th1 *in vivo* através da produção inicial de IFN- γ .

Foi constatado que as células T $\gamma\delta$ estavam presentes em porcentagens significativamente mais elevadas nas lesões cutâneas que nas lesões mucosas, nas lesões de hipersensibilidade tipo tardia (Montenegro) e no sangue periférico (Modlin *et al.*, 1989). Estes dados associados ao fato de as células T $\gamma\delta$ liberarem algum fator, que sinergiza com GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) para induzir a adesão, agregação e proliferação de macrófagos, são sugestivos de uma possível contribuição destas células na

formação do granuloma. Pode-se especular que as células T $\gamma\delta$ mediem a formação do granuloma organizado que precede a resolução das lesões primárias, e a sua ausência nas lesões mucosas permita a progressão da reposta imune em consequência da desorganização dos granulomas. A análise de regiões micro-anatômicas das lesões revelaram a diversidade limitada das células, indicando uma expansão oligoclonal após seleção pelo antígeno específico dentro de microregiões (Uyemura *et al.*, 1992). Os níveis de células T $\gamma\delta$ em sangue periférico de pacientes com leishmaniose ativa e indivíduos já curados da infecção, comparados aos de pacientes infectados com *Trypanosoma cruzi* e indivíduos normais, também sugerem uma associação destas células com a leishmaniose (Russo *et al.*, 1993). Contrastando com estes resultados, trabalhos anteriores em camundongos não indicam o envolvimento das células T $\gamma\delta$ na patogênese da leishmaniose cutânea (Lohoff *et al.*, 1991; Titus *et al.*, 1993).

Apesar de vários indícios sobre o envolvimento das células T CD8⁺ no combate à leishmaniose murina (Milon *et al.*, 1986; Titus *et al.*, 1987; Farrell *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1989), dos experimentos de Smith *et al.* (1991) que demonstraram a lise de macrófagos infectados por células T CD8⁺ humanas, e de sua presença em porcentagens elevadas dentro das lesões de LCL e LMC (Modlin *et al.*, 1985; Pirmez *et al.*, 1990), a extensão de sua participação no controle desta infecção ainda não está claramente determinada.

Os linfócitos T CD4⁺ são, sem dúvida, as células de maior importância na mediação da imunidade protetora à leishmaniose (Titus *et al.*, 1987). A relevância de sua função foi demonstrada principalmente por meio de modelos experimentais de leishmaniose murina. A recuperação da resistência à infecção por *Leishmania* foi demonstrada tanto em camundongos deficientes de células T, após a reconstituição com subpopulações de células CD4⁺ (Mitchell

et al., 1980; Moll *et al.*, 1988), como em experimentos de transferência adotiva destas subpopulações CD4⁺ para receptores singênicos infectados (Preston e Dumonde, 1976; Rezai *et al.*, 1980; Liew *et al.*, 1982; Liew *et al.*, 1984).

Os clones CD4⁺ de células T murinas foram divididos em duas subpopulações, designadas Th1 e Th2, de acordo com as linfocinas produzidas após estimulação antigênica (Liew, 1989; Mosmann e Coffman, 1987,1989). As evidências de que a estimulação diferencial destas duas subpopulações influencia a resistência ou suscetibilidade à leishmaniose foram fornecidas por dois tipos de experimentos: pela demonstração de que células destes dois fenótipos, quando transferidas para camundongos normais, exercem um efeito diferente sobre o curso da infecção (Scott *et al.*, 1988; Holaday *et al.*, 1991; Varkila *et al.*, 1993), e por meio de análise das linfocinas produzidas por camundongos suscetíveis e resistentes (Heinzel *et al.*, 1989). O conjunto destes resultados permitiu associar a resistência à leishmaniose cutânea e cicatrização das lesões com resposta de células Th1 e IFN- γ , e também a suscetibilidade e doença progressiva com resposta de células Th2 e IL-4.

No homem, o padrão de citocinas secretadas pelas subpopulações Th1 e Th2 (Salgame *et al.*, 1991; Yamamura *et al.*, 1991; Miltenburg *et al.*, 1992) foi similar ao padrão encontrado em camundongos. Cáceres-Dittmar *et al.* (1993) determinaram os perfis de linfocinas secretadas pelas células T presentes nas lesões de pacientes afetados pelas diferentes formas clínicas de LTA. Eles observaram a expressão predominante de RNAm para IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, TNF- β e IL-2 (padrão de citocinas tipo 1) em lesões de LCL; uma mistura de padrões de citocinas tipo 1 e tipo 2 (caracterizado por abundância de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) nas lesões de LMC, e preponderância de citocinas tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10) nas lesões de LCD. Todos estes dados sugerem que a evolução das diferentes formas de leishmaniose

humana também pode ser determinada pela subpopulação de células T preferencialmente estimulada e pelo padrão de citocinas produzido.

No entanto, não se sabe exatamente como ocorre a estimulação preferencial das células Th1 e Th2 e de que modo as linfocinas por elas secretadas controlam a resistência ou suscetibilidade à leishmaniose.

Alguns trabalhos sugerem que o tipo de célula apresentadora de antígeno determina o fenótipo das células T respondedoras (Chang *et al.*, 1990; Gajewski *et al.*, 1991; Schmitz *et al.*, 1993). As células de Langerhans estão presentes em números elevados nas lesões de LCL e virtualmente ausentes nas lesões de LMC (Tapia *et al.*, 1994). Existem evidências de que as células de Langerhans sejam as principais células apresentadoras de antígeno da epiderme, sendo responsáveis pela captura dos parasitas na pele e pelo seu transporte ao linfonodo que drena o sítio da infecção, onde devem apresentá-los com eficiência para as células T específicas (Moll, 1993). Defeitos nas propriedades de sinalização da epiderme, em nível de deficiência de expressão de moléculas de classe II e de secreção de linfocinas, estão implicados na incapacidade de eliminar o parasita e em dano tecidual, levando à anergia seletiva na LCD e ao estado inflamatório crônico na LMC (Tapia *et al.*, 1994). Devido ao caráter mais grave e à evolução progressiva das lesões mucosas, pode-se levantar a hipótese de que as células apresentadoras de antígeno dominantes nas lesões de LMC estimulem preferencialmente células Th2. Esta hipótese é apoiada pelos experimentos que demonstram que as células T dos órgãos linfóides que drenam tecidos mucosos produzem IL-4, enquanto as que drenam sítios de tecidos não mucosos produzem IL-2.

1.1.3.2 Imunidade humoral

Anticorpos específicos foram detectados no soro da maioria dos pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea (Walton *et al.*, 1972; Behforouz *et al.*, 1976; Anthony *et al.*, 1980; Roffi *et al.*, 1980; Ávila *et al.*, 1992) e, também, em lesões cutâneas (Ridley e Ridley, 1984; Magalhães *et al.*, 1986).

Níveis significantes de anticorpos, similares ou mais elevados do que os níveis iniciais, persistem em alguns pacientes afetados por LCL após o tratamento e aparente cura clínica, o que sugere a persistência de parasitas e pode ser um critério prognóstico para a ocorrência de recaída ou desenvolvimento de lesões secundárias (Convit *et al.*, 1993).

O'Neil *et al.* (1993) demonstraram níveis elevados de anticorpos da classe IgE no soro de pacientes com LCL crônica, o que é consistente com a participação de resposta linfocitária do tipo Th2, e níveis elevados de IgA em pacientes com doença mucocutânea.

No entanto, não existem evidências de que a imunidade humoral exerça uma função protetora e participe na determinação do curso da infecção por *Leishmania*.

1.1.3.3 Mecanismo efetor na leishmaniose

Os macrófagos são as células efetoras finais que limitam a disseminação deletéria dos parasitas. Portanto, a sua ativação é essencial para que a sua atividade microbicida seja intensificada durante a resistência à infecção.

As atividades antimicrobicidas do macrófago e de outros fagócitos, como os polimorfonucleares, podem ser divididas em duas categorias: a) os sistemas dependentes de oxigênio incluem a produção de intermediários de oxigênio reativo e a produção de óxido nítrico, que é um intermediário de nitrogênio reativo, sendo que este segundo mecanismo tem

sido bem demonstrado no sistema murino, porém sua atuação no homem ainda não está bem definida; b) e os sistemas independentes de oxigênio que envolvem múltiplos mecanismos: a acidificação do vacúolo fagolisossomal, a ação de enzimas lisossomais hidrolíticas, a privação de nutrientes, como o seqüestro de ferro e degradação do triptofano, a permeabilização celular e formação de canais, e a ação de diversas proteínas antimicrobianas ainda não identificadas.

Os ativadores mais potentes das atividades funcionais dos macrófagos são os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), os peptídeos quimiotáticos, os fatores estimuladores de colônias (CSFs) e as citocinas, principalmente o IFN- γ .

Existem várias evidências de que as *Leishmanias* podem ocasionar a desativação dos macrófagos, tornando-se desta forma resistentes às atividades efetoras microbidas dos mesmos (Reiner, 1994). Os defeitos de sinalização celular que conduzem à desativação dos macrófagos podem ser atribuídos diretamente às moléculas codificadas pela *Leishmania*, como o lipofosfoglicano (LPG), uma das principais moléculas de superfície da *Leishmania*. Foi demonstrado que o LPG inibe tanto a atividade da proteína quinase K (PKC) como os mecanismos de sinalização regulados pelos íons cálcio. Por outro lado, estes defeitos de sinalização podem ser induzidos pela produção de moléculas inibidoras autócrinas, como a prostaglandina E₂ e o fator de transformação de crescimento β (TGF- β), embora as propriedades de desativação destas citocinas não sejam totalmente compreendidas.

A infecção dos macrófagos por *Leishmania* resulta no decréscimo da produção de IL-1, na diminuição da expressão do gene *c-fos*, em deficiência na indução da expressão de antígenos de classe II pelo IFN- γ , em diminuição da atividade de queima oxidativa e na apresentação deficiente do antígeno.

1.1.4 Regulação genética na leishmaniose

As distintas formas de leishmaniose, cutânea e visceral, são determinadas principalmente pela espécie do parasita. Porém, uma mesma espécie de *Leishmania* produz infecções que variam de subclínicas à doença fatal na leishmaniose visceral, e de lesões primárias autocicatrizantes a lesões disseminadas na leishmaniose cutânea. A ocorrência dessas diferentes formas de manifestação clínica decorrentes de infecção pela mesma espécie de parasita sugere que a variabilidade da resposta imunológica do hospedeiro está sob controle genético.

A disponibilidade de camundongos endocruzados, suscetíveis a várias linhagens de *Leishmania* patogênicas ao homem, permitiu o estudo da leishmaniose em modelos experimentais e possibilitou a identificação de genes que controlam os mecanismos de imunidade atuantes nas infecções murinas. Foi de fundamental importância a utilização de camundongos congênicos, cujas características são extremamente úteis na determinação da influência de genes específicos após uma infecção.

Experimentos em camundongos infectados por *Leishmania donovani* levaram à descoberta do gene Lsh, que é regulador da suscetibilidade inata (Bradley, 1977), e de sua localização no cromossomo 1 (Bradley *et al.*, 1979). Crocker *et al.* (1984, 1987) observaram que a expressão do fenótipo de resistência, demonstrada pela inibição da multiplicação do parasita dentro do macrófago, ocorre dois a três dias após a infecção. Este gene está associado com o aumento da expressão dos genes do CPH (Zwilling *et al.*, 1987), da resposta ao interferon γ , e da produção do fator de necrose tumoral e de interleucina-1 (Kaye *et al.*, 1988; Blackwell *et al.*, 1989; Kaye e Blackwell, 1989). Macrófagos de camundongos resistentes (Lsh^r), quando estimulados por interferon gama e LPS, produzem níveis aumentados de óxido

nítrico se comparados aos macrófagos de camundongos suscetíveis (Lsh^S) (Blackwell *et al.*, 1991; Roach *et al.*, 1991). Tanto as linhagens de camundongos Lsh^r quanto as linhagens Lsh^S foram igualmente suscetíveis à infecção por *L. major*, o que levou à sugestão de que este gene não está envolvido no controle da leishmaniose cutânea (Mock *et al.*, 1985).

Os estudos iniciais referentes ao controle genético da fase aguda da infecção, que levaram à descoberta do gene *Lsh* e permitiram a classificação de diversas linhagens de camundongos em dois fenótipos distintos, com base na resistência e na suscetibilidade inata à infecção por *L. donovani*, despertaram o interesse dos pesquisadores para investigar a habilidade dessas linhagens de montar uma resposta imune dependente de células T. Dessa forma foram identificados genes que exercem controle em nível de suscetibilidade adquirida às infecções por *Leishmania*.

Quando linhagens de camundongos homozigotos recessivos para o gene Lsh^S , infectados por *L. donovani*, foram monitorados por tempo prolongado, três perfis diferentes da doença com base na quantidade de parasitas no fígado foram observados (Blackwell *et al.*, 1980; Ulczak e Blackwell, 1983). Estes perfis eram dependentes do haplotipo H-2 das linhagens analisadas e foram definidos com base na "cura precoce" ($H-2^S$, $H-2^r$), "cura" ($H-2^b$) e "incurável" ($H-2^d$, $H-2^q$ e $H-2^f$). Os genes controladores dessas respostas foram designados *Rld-1* (*Recovery from L. donovani*) e estão localizados na região de classe II do CPH murino (Blackwell, 1983). Entretanto, o perfil da doença é dependente do tamanho do inóculo infectante e o efeito pode ser revertido pela alteração da dose (Ulczak e Blackwell, 1983). Tanto o fenótipo curável, determinado geneticamente, como a manipulação deste fenótipo para obtenção de uma resposta similar às do fenótipo incurável parecem ser mediados pelas células T $CD4^+$ (Blackwell e Ulczak, 1984; Ulczak *et al.*, 1989). Ao contrário de seu efeito

sobre a infecção por *L. donovani*, os genes Rdl-1 têm um efeito bem menos pronunciado nas infecções por *L. major*, embora diferenças na gravidade do desenvolvimento das lesões tenham sido observadas (Howard *et al.*, 1980a; Mitchell *et al.*, 1981).

DeTolla *et al.* (1980) demonstraram que um gene ligado ao *locus* Ir-2, localizado no cromossomo de número 2, pode modificar o tempo de recuperação dos camundongos B10 (H-2^b) infectados por *L. donovani*. Esses autores observaram que os camundongos congênicos B10.LP-H-3^b, portadores de um alelo alternativo do *locus* Ir-2, curavam-se precocemente quando comparados aos camundongos B10, revertendo portanto o fenótipo "cura" para o fenótipo "cura precoce".

Estudos com linhagens congênicas B10.129 (10M), que são portadoras de alelos alternativos no *locus* H-11, demonstraram que o fenótipo curável dos camundongos B10 revertem para um fenótipo incurável (DeTolla *et al.* 1980; Blackwell *et al.*, 1985a). A expressão do gene ligado ao *locus* H-11 influencia tanto a leishmaniose cutânea como a visceral (Blackwell *et al.*, 1985a), ao contrário do que ocorre com os genes Lsh e Rdl-1.

A regulação genética das respostas imunológicas inata e adquirida na leishmaniose cutânea está menos esclarecida do que na leishmaniose visceral. Além do gene ligado ao H-11, foram identificados dois outros genes de suscetibilidade, designados Scl-1 e Scl-2 (Blackwell *et al.*, 1985b). A comparação do crescimento das lesões em muitas linhagens endocruzadas de camundongos infectados com *L. major* demonstrou diferenças significativas nos perfis da doença. Os camundongos BALB/c e SWR apresentavam lesões enormes não cicatrizáveis. Muitas outras linhagens, dentre elas os camundongos C57BL/6, desenvolviam lesões pequenas e geralmente autocicatrizáveis. Os camundongos DBA/2 apresentavam lesões não cicatrizáveis, porém de crescimento retardado, quando comparadas às lesões dos

camundongos BALB/c. Howard *et al.* (1980b) examinaram os padrões de herança para estes diferentes fenótipos nas progênes F1, F2 e de retrocruzamentos obtidas de BALB/c x C57BL/6, sugerindo que os fenótipos de resistência (portadores de lesões cicatrizáveis) e de suscetibilidade (portadores de lesões não cicatrizáveis) estavam sob o controle de um único gene, designado Scl-1 (*susceptibility to cutaneous Leishmaniasis-1*). A expressão deste gene está relacionada a um defeito primário dos macrófagos, que resulta em aumento da multiplicação parasitária nos macrófagos da pele de camundongos suscetíveis, e em diferenças na capacidade de os macrófagos processar e apresentar antígenos (Handman e Burgess, 1979; Gorczynsky e MacRae, 1982). A inoculação subcutânea de amastigotas de *L. mexicana* em camundongos DBA/2 produz um fenótipo de resistência qualitativamente e quantitativamente diferente do fenótipo cicatrizante normal observado em camundongos resistentes à infecção por *L. major*. A análise das gerações F1, F2 e de retrocruzamentos de camundongos DBA/2 x C57BL/6 sugere que este mecanismo distinto de resistência está sob o controle de um único gene, que foi provisoriamente designado de Scl-2 (*susceptibility to cutaneous Leishmaniasis-2*) (Roberts *et al.*, 1990).

Apesar de vários componentes envolvidos na regulação genética da leishmaniose murina terem sido identificados, pouco se conhece acerca do controle genético da resposta imune à leishmaniose nas infecções humanas. Isto se deve ao fato de os estudos experimentais em camundongos serem facilitados pela possibilidade de realização de cruzamentos planejados. Também a utilização de linhagens congênicas, as quais diferem apenas em relação àquele segmento cromossômico onde está situado o gene da resistência/suscetibilidade, permite uma melhor elucidação do controle genético da resposta imune à leishmaniose murina. No homem, a diversidade genética associada às uniões ao acaso, no que diz respeito

aos genes envolvidos nessa regulação, dificulta a identificação desses genes e dos mecanismos que regulam o desenvolvimento dos parasitas dentro do hospedeiro.

Na leishmaniose mucocutânea existem sugestões da influência da variabilidade genética no desenvolvimento das lesões a partir de observações em populações negras e índias que co-habitam uma determinada região da Bolívia (Walton e Valverde, 1979). Os pacientes negros apresentavam lesões mucocutâneas de evolução rápida com mutilações faciais graves, e freqüentemente respondiam de forma exacerbada ao antígeno de Montenegro, apresentando uma área de necrose no centro da pápula. Por outro lado, os pacientes indígenas desenvolviam lesões crônicas não destrutivas e respondiam com menor intensidade ao antígeno de Montenegro.

1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO

1.2.1 Histórico

O complexo HLA foi primeiramente reconhecido através da definição da especificidade sorológica “Mac” (atualmente HLA-A2) por Dausset (1958), em decorrência de seu trabalho com antígenos leucocitários humanos iniciado em 1954. E também pelos trabalhos de Payne e Rolfs (1958) e de van Rood *et al.* (1958) que levaram ao reconhecimento de duas séries segregantes de especificidades sorológicas, as quais foram chamadas de 4a/4b (atualmente Bw4 e Bw6) por van Rood e Van Leeuwen (1963), e de LA1/LA2 (atualmente HLA-A2 e A3) por Payne *et al.* (1964).

A definição das duas séries segregantes, o progresso na definição sorológica dos antígenos HLA e o reconhecimento do seu significado clínico e biológico devem-se à intensa colaboração internacional firmada através dos *Workshops* Internacionais de Histocompatibilidade. O primeiro deles foi organizado em 1964, por Bernard Amos, e teve como objetivo principal a comparação das técnicas de tipificação dos antígenos HLA utilizadas por laboratórios de várias partes do mundo. Foi nesse *workshop* que Terasaki e McClelland introduziram a técnica de microlinfocitotoxicidade. Já foram realizados onze desses *workshops* (Terasaki, 1990), e o décimo segundo, cuja organização, a cargo de um grupo de pesquisadores, está sendo coordenada pelo Professor Dominique Charron, será realizado na França em 1996.

Esse complexo gênico humano foi inicialmente chamado de Sistema Hu-1 (first human system) por Jean Dausset e colaboradores. Após o terceiro *workshop*, em 1967, o comitê de nomenclatura designou o termo HL-A (H = human, L = leucocyte, A = primeiro *locus* descrito). Pelo fato de este sistema genético representar um conjunto de vários *loci*, o comitê de nomenclatura, em 1975, decidiu eliminar o hífen e cunhar o termo HLA.

1.2.2 Proteínas HLA de classe I: estrutura e função

As moléculas HLA de classe I são glicoproteínas heterodiméricas constituídas por uma cadeia pesada α , de 44 kD, que atravessa a membrana celular, associada por ligação não covalente a uma cadeia leve, a β_2 -microglobulina (β_2m), de 12 kD (fig.3).

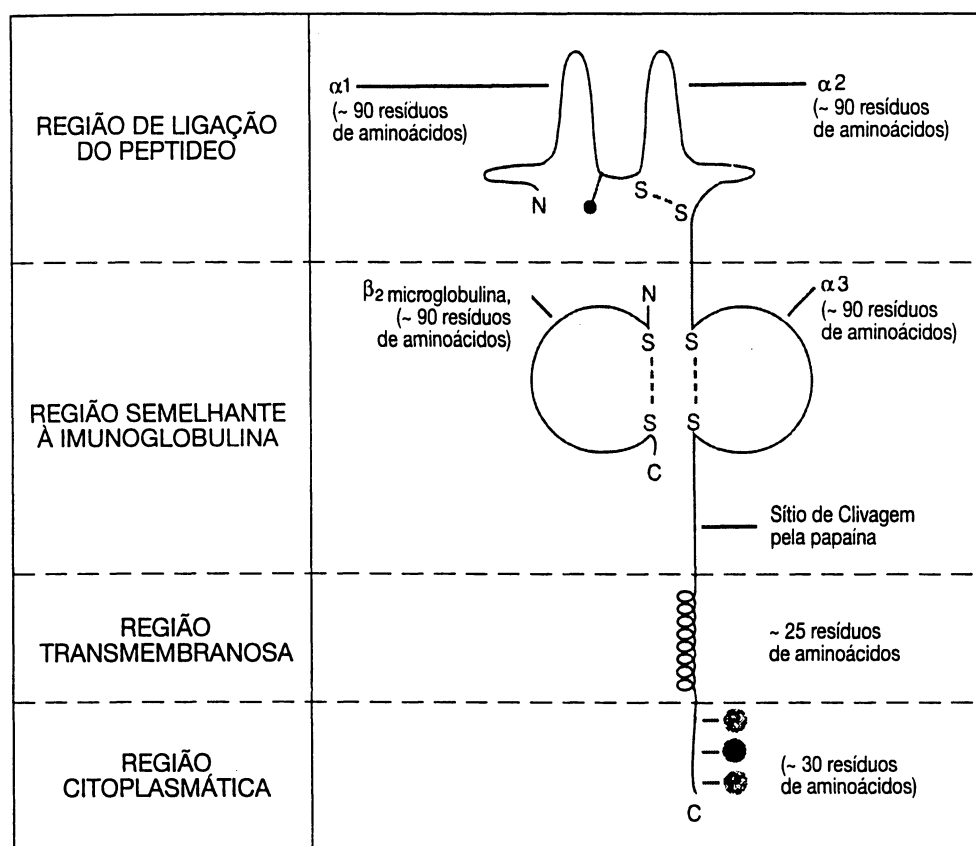


Fig. 3 - Diagrama esquemático de uma molécula de classe I. N e C referem-se aos radicais amino e carboxi terminais das cadeias polipeptídicas, respectivamente; S-S refere-se as ligações dissulfeto, o sinal $\uparrow$ refere-se ao carboidrato e P aos sítios de fosforilação (modificado de Abbas *et al.*, 1994).

Os produtos de classe I são expressos na membrana citoplasmática de praticamente todas as células nucleadas do organismo (Amos e Ward, 1975) e nas plaquetas (Albert e Goetze, 1977), sendo também encontrados sob a forma solúvel em vários fluidos biológicos (Pellegrino *et al.*, 1974; Billing *et al.*, 1977). Diversos trabalhos apresentados durante o I e o II *Workshops* Internacionais sobre antígenos HLA solúveis indicam potenciais funções fisiológicas para estas moléculas (Pouletty *et al.*, 1993; Grumet *et al.*, 1994).

A cadeia leve não apresenta diversidade na espécie humana e é codificada por um gene localizado no cromossomo 15. Esta cadeia é imprescindível para o processamento intracelular e para a expressão, assim como para a antigenicidade destas glicoproteínas, por contribuir na conformação da cadeia pesada.

No entanto, a cadeia α é caracterizada por extenso polimorfismo. Sua estrutura é constituída por três domínios extracelulares, designados de $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, com 90, 92 e 92 aminoácidos, respectivamente. Após o domínio $\alpha 3$ há uma extensão de cerca de 25 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, que constituem a porção transmembranosa, seguidos de uma sequência de aproximadamente 30 aminoácidos que compõem a porção citoplasmática da molécula.

A análise da molécula HLA-A2 por cristalografia de raios-X, feita por Bjorkman *et al.* (1987a; 1987b), propiciou grande avanço na correlação das variações estruturais com diferenças funcionais.

Esta determinação da configuração tridimensional do antígeno HLA-A2 revelou a presença de dois pares de domínios estruturalmente homólogos, sendo o par proximal à membrana celular constituído pelos domínios $\alpha 3$ e $\beta 2m$ e o par distal constituído pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$.

O polimorfismo das proteínas de classe I resulta de diferenças na estrutura primária, as quais localizam-se quase que totalmente nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ destas moléculas. Estes dois domínios são responsáveis pela formação da fenda de ligação do fragmento peptídico. Os peptídeos acomodam-se em sulcos existentes dentro desta fenda (Guo *et al.*, 1992; Madden *et al.*, 1991, 1992; Matasmura *et al.*, 1992) e parecem ser parte integrante deste complexo protéico conferindo estabilidade à molécula. O sequenciamento do *pool* de peptídeos, eluídos de moléculas HLA de classe I, indica que cada produto alélico tem suas próprias regras para seus ligantes (Falk *et al.*, 1991).

O modelo atualmente mais aceito, com respeito ao processamento e transporte intracelular de peptídeos, considera que as proteínas citosólicas são cortadas em fragmentos peptídicos por proteassomos, e que produtos dos genes TAP1 e TAP2 são responsáveis pelo transporte destes peptídeos, do citoplasma para o retículo endoplasmático, onde eles ligam-se à fenda disponível das moléculas CPH de classe I (Deverson *et al.*, 1990; Spies *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1993). O complexo proteína CPH de classe I/peptídeo é então transportado através do aparelho de Golgi para a superfície celular (Neefjes e Ploegh, 1988) onde será exposto às células T, que interagem com esse complexo através de seus receptores específicos.

O reconhecimento de uma configuração estranha no complexo CPH/peptídeo desencadeia uma série de interações envolvendo receptor do linfócito T, CPH de classe I, CD8 e demais moléculas de adesão, culminando com a diferenciação e ativação das células T citotóxicas CD8+. Estas últimas são responsáveis pela detecção e eliminação de células infectadas por vírus e por outros organismos de parasitismo citosólico.

1.2.3 Proteínas HLA de classe II: estrutura e função

As moléculas HLA de classe II são glicoproteínas transmembranosas, constituídas por heterodímeros de uma cadeia α (33 kD) associada por ligação não covalente a uma cadeia β (28 kD) (fig.4). No interior da célula há uma associação transitória deste heterodímero $\alpha\beta$ com um polipeptídeo invariável, designado cadeia γ , que é codificado por um gene do cromossomo 5.

As cadeias α e β possuem dois domínios extracelulares, $\alpha1$, $\alpha2$ e $\beta1$, $\beta2$, respectivamente. Os domínios $\alpha2$ e $\beta2$, proximais à membrana celular, são altamente conservados e contêm uma ligação dissulfeto. Dos domínios distais a membrana, o $\beta1$ é mais longo e contém uma ligação dissulfeto e o domínio $\alpha1$ é mais curto e não contém ligação dissulfeto. Ambas contêm uma extensão de aminoácidos hidrofílicos que conecta o domínio proximal à porção hidrofóbica transmembranosa, seguidas de uma cauda citoplasmática. Tanto a cadeia α quanto a β são glicosiladas, porém a cadeia α contém dois carboidratos, que contribuem para seu maior peso molecular. Os domínios polimórficos $\alpha1$ e $\beta1$ formam a fenda de ligação dos peptídeos.

As moléculas HLA de classe II apresentam expressão tissular mais restrita que as de classe I, e são predominantemente encontradas em células imunocompetentes como linfócitos B, macrófagos/monócitos, células dendríticas, e linfócitos T ativados.

A estrutura tridimensional da glicoproteína HLA-DR1, determinada por Brown *et al.* (1993), demonstrou similaridade às moléculas HLA de classe I. A análise cristalográfica, de moléculas HLA-DR1 complexadas com um único peptídeo antigênico HA, realizada por Stern *et al.* (1994), permitiu uma melhor interpretação das interações entre o peptídeo e sua fenda de ligação nesta molécula de classe II. As moléculas HLA de classe II apresentam para

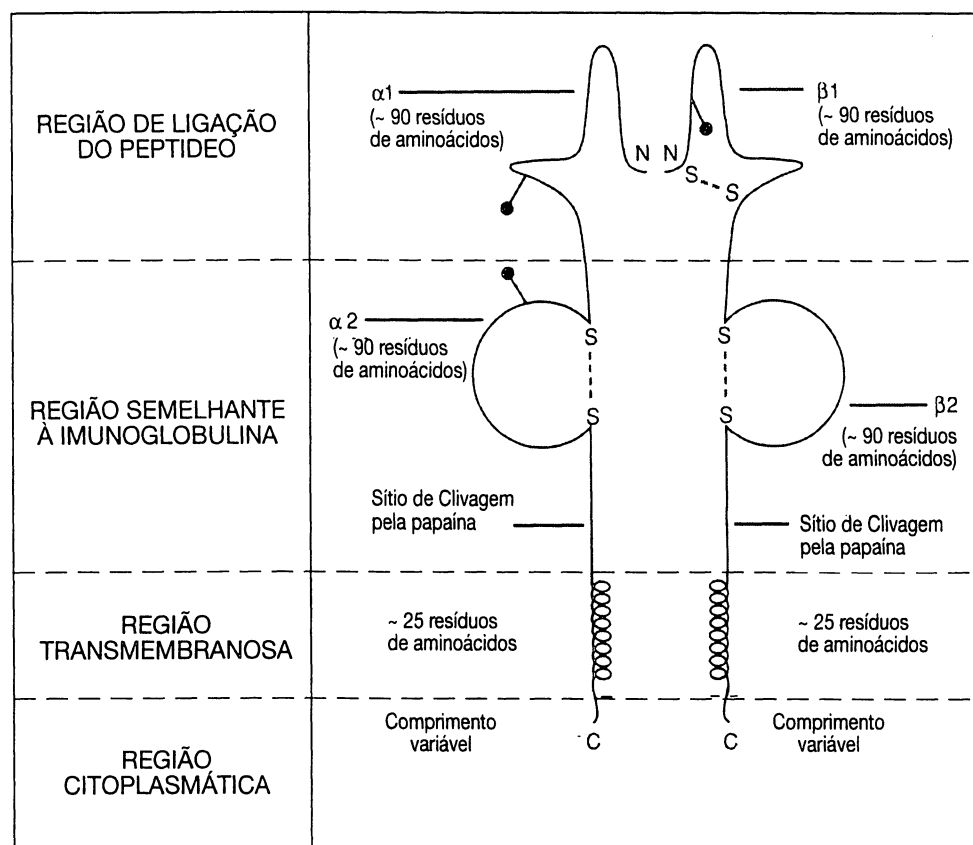


Fig. 4 - Diagrama esquemático de uma molécula CPH de classe II. N e C referem-se aos radicais amino e carbóxi terminais das cadeias polipeptídicas, respectivamente; S-S referem-se as ligações dissulfeto, e o sinal $\uparrow$ refere-se ao carboidrato (modificado de Abbas *et al.*, 1994).

o receptor dos linfócitos T CD4+ preferencialmente peptídeos provenientes do compartimento endossômico/ lisossômico da célula. Estes peptídeos podem ser oriundos de proteínas extracelulares capturadas por endocitose ou de proteínas endógenas direcionadas diretamente do citoplasma a este compartimento, possivelmente por um processo designado de autofagia, no qual materiais citosólicos são englobados formando vacúolos que podem fundir-se com lisossomos.

O tráfico intracelular das moléculas de classe II difere do tráfico das moléculas de classe I. As cadeias α e β interagem para formar o heterodímero no retículo endoplasmático, porém a fenda é inacessível neste ponto, devido à ligação com a cadeia invariável. As moléculas de classe II parecem ser liberadas do retículo endoplasmático como monômeros, constituídos por três cadeias invariáveis e três dímeros $\alpha\beta$, em direção ao complexo de Golgi, e de lá ao trans-Golgi, de onde são encaminhadas ao compartimento endossômico/ lisossômico. Neste compartimento a cadeia invariável é degradada, deixando a fenda disponível para ser preenchida por um dos peptídeos aí presentes. O complexo HLA de classe II/peptídeo é então transportado para a superfície da célula, por via intracelular ainda desconhecida.

Quando o peptídeo apresentado for imunogênico promoverá uma série de interações que envolvem as moléculas CD3, receptor do linfócito T, peptídeo, HLA, CD4 e demais moléculas de adesão, levando à ativação das células T auxiliares CD4+. Estas células, uma vez ativadas, promovem a diferenciação e ativação de linfócitos B e de linfócitos T citotóxicos específicos para o antígeno.

1.2.4 Metodologia para identificação dos genes e proteínas HLA

Dausset (1958) inicialmente detectou anticorpos dirigidos aos antígenos HLA utilizando um teste simples de leuco-aglutinação. Da mesma forma van Rood e van Leeuwen (1963) reconheceram a série alélica 4a e 4b e Payne *et al.* (1964) descreveram os antígenos LA1 e LA2 utilizando esses testes de leuco-aglutinação. Devido as suas limitações quanto à reprodutibilidade e precisão, ele foi posteriormente substituído pelo **teste de linfocitotoxicidade dependente de complemento**. Este, descrito primeiramente por Terasaki *et al.* (1964), é ainda o teste de escolha para a determinação sorológica dos antígenos HLA-A, B, C, DR e DQ.

Bach e Hirschorn (1964) observaram que linfócitos de indivíduos não consanguíneos quando misturados e mantidos em cultura por alguns dias estimulavam um ao outro. Este fenômeno foi chamado de **reação mista de linfócitos** e o **teste de cultura mista de linfócitos**. Baseando-se na observação de que esta reação segregava com o complexo HLA em famílias, Amos e Bach (1968) postularam o *locus* HLA-D, atualmente reconhecido como uma região constituída por vários genes que codificam produtos HLA de classe II. Esta técnica é utilizada para avaliar se existe compatibilidade ou diferenças de antígenos HLA de classe II entre dois indivíduos, sendo os antígenos HLA-DR e HLA-DQ os principais responsáveis pela estimulação e proliferação dos linfócitos T auxiliares na reação mista de linfócitos. A microtécnica ainda empregada pela maioria dos laboratórios foi estabelecida por Hartzmann *et al.* (1971).

A determinação das especificidades Dw é realizada por este mesmo método de co-cultivo de linfócitos (Dupont *et al.*, 1973), sendo as células respondedoras de um indivíduo misturadas em cultura com um painel de células homozigotas estimuladoras irradiadas, cujas

especificidades Dw são conhecidas. A ausência de resposta por parte das células respondedoras indica que a célula teste compartilha a especificidade Dw com a célula estimuladora.

Os antígenos HLA-DP são definidos por cultura secundária de linfócitos, pelo método designado de **PLT** (*Primed Lymphocyte Typing*) (Shaw *et al.*, 1980).

Nesta última década, várias técnicas de biologia molecular para a identificação de alelos HLA têm sido desenvolvidas. Os métodos moleculares possivelmente substituirão os métodos sorológicos e celulares nos próximos anos por apresentarem inúmeras vantagens: são mais precisos e reprodutíveis, não dependem da expressão dos antígenos HLA e permitem a utilização de reagentes sintetizados quimicamente possibilitando uma melhor padronização.

Inicialmente a genotipagem HLA era realizada pelo método de **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), no qual o polimorfismo do comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição era analisado em *Southern blots* (Bignon *et al.*, 1989). A análise do RFLP é baseada na presença ou ausência de sítios de restrição polimórficos, localizados principalmente nas regiões não codificadoras que estão em desequilíbrio de ligação com a variabilidade alélica das seqüências codificadoras. A complexidade dos padrões dos fragmentos muitas vezes dificulta a correlação dos mesmos com alelos específicos. Este método permite a identificação de vários alelos HLA de classe II, porém não de todos, e por esta razão tem sido substituído por metodologias mais adequadas.

Dentre as metodologias atualmente mais utilizadas na identificação dos alelos HLA de classe II estão a **PCR-SSO** (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide*) e a **PCR-SSP** (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers*). A primeira consiste na amplificação pela PCR utilizando um conjunto de iniciadores (*primers*) cujas seqüências

são específicas de alelos ou grupos, seguida de uma corrida eletroforética para identificação das bandas específicas de alelos ou grupos (Olerup e Zetterquist, 1991). A segunda, também conhecida como oligotipificação HLA, emprega a reação em cadeia da polimerase e hibridação com sondas de oligonucleotídeos de seqüências específicas (Erlich *et al.*, 1991).

No entanto, o método capaz de discriminar todo o polimorfismo dos genes do complexo HLA consiste no seqüenciamento direto de DNA (Santamaria *et al.*, 1992).

1.2.5 Nomenclatura

O comitê de nomenclatura para fatores do sistema HLA da Organização Mundial de Saúde é responsável pela reavaliação e atualização da nomenclatura das especificidades HLA definidas por métodos sorológicos, celulares e moleculares. A nomenclatura oficial dita as seguintes normas (Bodmer *et al.*, 1992):

a) As especificidades sorológicas são denominadas pela sigla HLA seguida por uma ou mais letras maiúsculas referentes aos *loci* e pelos algarismos arábicos que as identificam particularmente.

b) A letra "w" anteriormente incluída na denominação de certas especificidades, indicando caráter provisório, deve ser eliminada com a ressalva de três exceções:

1°. Bw4 e Bw6 por serem epítomos, ficando desta forma distinguidos dos alelos do *locus* B.

2°. As especificidades do *locus* C devem manter o "w" para distingui-las dos componentes do sistema complemento.

3°. As especificidades D e DP também devem manter o "w", por terem sido definidas através de métodos que se baseiam em culturas mistas de linfócitos.

- c) Novas especificidades sorológicas devem ser designadas somente se elas identificarem um produto cujo alelo tenha a sequência de DNA reconhecida. Os nomes das novas especificidades deverão estar associados com o nome da sequência do alelo.
- d) Os produtos do *locus* DRB1 identificados sorologicamente devem ser designados simplesmente pelo nome do alelo, omitindo-se o B1.
- e) Os produtos dos *loci* DRB3 e DRB4 identificados sorologicamente serão referidos como DR52 e DR53, respectivamente, assim como os produtos do *locus* DRB5 serão designados de DR51. Se variantes definidas sorologicamente e correspondentes aos genes DRB5, DRB3 e DRB4 forem encontradas, elas serão designadas DR5101, DR5201, DR5301 etc., respectivamente.

Todas as especificidades HLA reconhecidas por sorologia e por cultura mista de linfócitos estão relacionadas na Tabela 1 (Bodmer *et al.*, 1994).

1.2.6 Mapa genético e físico

Este complexo gênico foi localizado no braço curto do cromossomo 6, através de experimentos de hibridação somática (Jongsma *et al.*, 1973) e da segregação de rearranjos cromossômicos em famílias (Breuning *et al.*, 1977; Lamm *et al.*, 1974). Estudos de hibridação *in situ*, utilizando sondas genômicas de HLA-A, B, e C, permitiram localizá-lo com maior precisão em 6p21 (Morton *et al.*, 1984). No ano seguinte, sua posição foi finalmente definida em 6p21.3 (Lamm e Olaisen, 1985; Spring *et al.*, 1985; Ziegler *et al.*, 1985).

Tabela 1. Listagem de especificidades HLA reconhecidas pelo Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde, 1994

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A2	B5	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A203	B7	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A210	B703	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A3	B8	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A9	B12	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A10	B13	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A11	B14	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A19	B15	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A23(9)	B16	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A24(9)	B17	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A2403	B18		Dw11(w7)	DR10		
A25(10)	B21		Dw12	DR11(5)		
A26(10)	B22		Dw13	DR12(5)		
A28	B27		Dw14	DR13(6)		
A29(19)	B35		Dw15	DR14(6)		
A30(19)	B37		Dw16	DR1403		
A31(19)	B38(16)		Dw17(w7)	DR1404		
A32(19)	B39(16)		Dw18(w6)	DR15(2)		
A33(19)	B3901		Dw19(w6)	DR16(2)		
A34(10)	B3902		Dw20	DR17(3)		
A36	B40		Dw21	DR18(3)		
A43	B4005		Dw22			
A66(10)	B41		Dw23	DR51		
A68(28)	B42					
A69(28)	B44(12)		Dw24	DR52		
A74(19)	B45(12)		Dw25			
	B46		Dw26	DR53		
	B47					
	B48					
	B49(21)					
	B50(21)					
	B51(5)					
	B5102					
	B5103					
	B52(5)					
	B53					
	B54(22)					
	B55(22)					
	B56(22)					
	B57(17)					
	B58(17)					
	B59					
	B60(40)					
	B61(40)					
	B62(15)					
	B63(15)					
	B64(14)					
	B65(14)					
	B67					
	B70					
	B71(70)					
	B72(70)					
	B73					
	B75(15)					
	B76(15)					
	B77(15)					
	B7801					
	Bw4					
	Bw6					

O mapa genético do complexo HLA foi inicialmente determinado por estudos de genética clássica, através da identificação de indivíduos que herdaram haplotipos recombinantes (Belvedere *et al.*, 1975; Hansen *et al.*, 1975; Keuning *et al.*, 1975; Netzel *et al.*, 1975; Nielsen *et al.*, 1975; Bijnen *et al.*, 1976; Lamm *et al.*, 1978). A análise de ligação em famílias tornou possível estabelecer a ordem relativa dos genes HLA assim como estimar a distância genética entre os mesmos.

No entanto, a metodologia empregada em genética clássica não permitiu o mapeamento completo da região HLA, devido à ausência de eventos de recombinação informativos ou de variabilidade alélica em determinados *loci*. O advento da biologia molecular permitiu não somente o estudo da estrutura individual como a orientação e a exata localização dos genes dentro deste complexo.

Os primeiros estudos utilizando técnicas de genética molecular envolveram a análise de clones de cosmídeos, obtidos de bibliotecas genômicas através de sondas específicas para sub-regiões de classe II. Mapas de cosmídeos que foram obtidos para os haplotipos DR3 e DR4 revelaram diferenças no número de genes DRB nos diferentes haplotipos (Rollini *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1987). Em ambos haplotipos DR3 e DR4 foram identificados um gene DRA e dois genes DRB funcionais, sendo os demais pseudogenes (Spies *et al.*, 1985). A análise de cosmídeos obtidos da sub-região DQ demonstrou a presença de dois genes A e de dois genes B (Okada *et al.*, 1985; Jonsson *et al.*, 1987). E o mapa de ligação da sub-região DP demonstrou dois pseudogenes (A e B) centroméricos a dois genes funcionais (A e B) (Trowsdale *et al.*, 1984).

Devido à grande distância entre as sub-regiões, para ordená-las, foi utilizada a técnica de eletroforese em campo alternado (PFGE = *pulsed-field gel electrophoresis*) em combinação

com várias endonucleases de restrição. Esses fragmentos, analisados em *Southern blots* com sondas específicas para genes do complexo HLA, tornaram possível ordenar as sub-regiões deste complexo e fornecer uma estimativa da distância física entre elas (Hardy *et al.*, 1986; Carroll *et al.*, 1987; Dunham *et al.*, 1987; Lawrence *et al.*, 1987).

O mapa do CPH humano foi resumido por Campbell e Trowsdale (1993) com base na compilação de dados referentes ao mapeamento físico e à clonagem com seqüenciamento de DNA (fig. 5). Apesar de os limites não serem precisos, os mapeamentos moleculares indicam que este complexo gênico abrange uma extensão de aproximadamente 4000 kb.

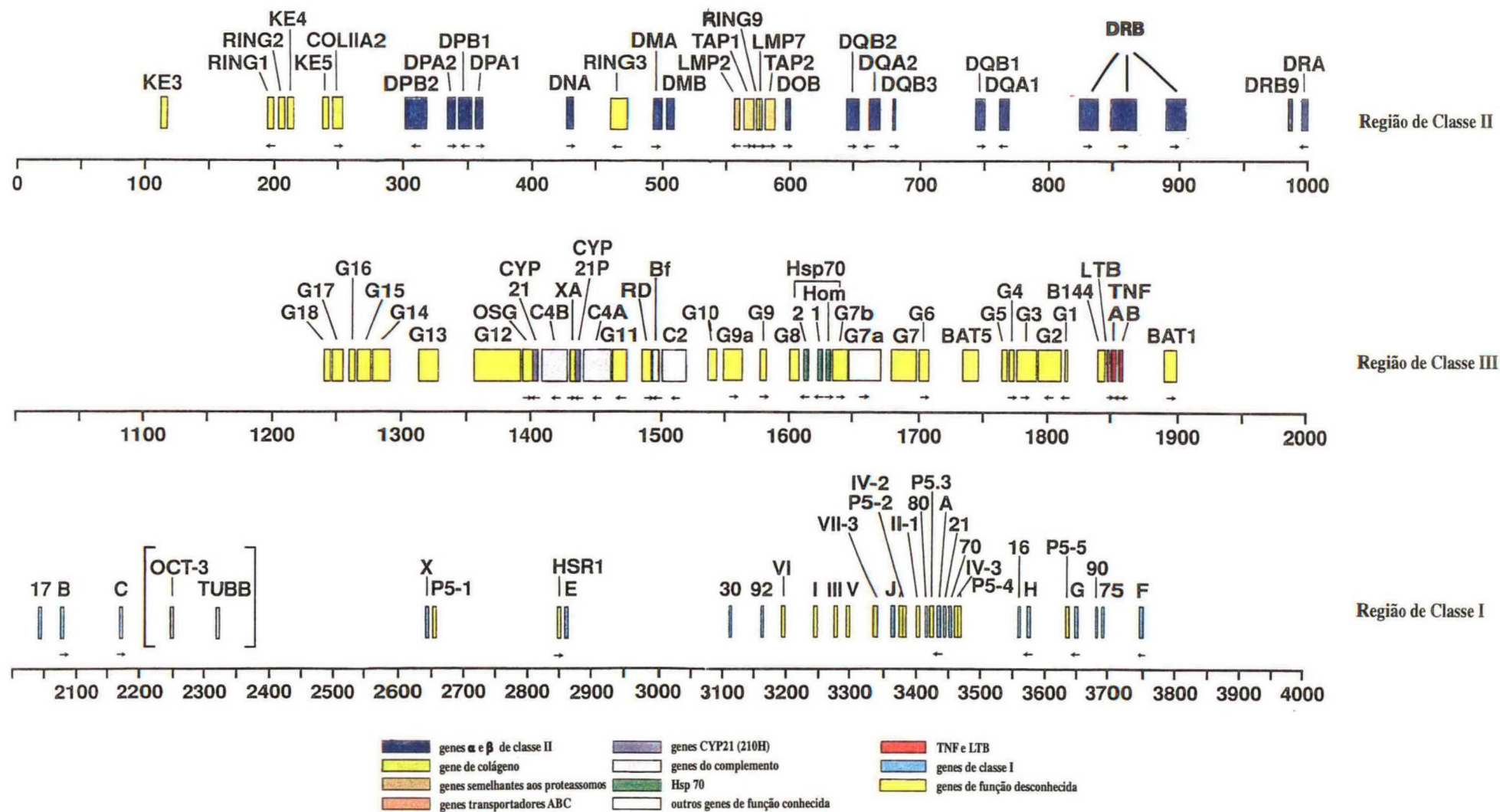
Dentro do CPH humano existem três agrupamentos principais de genes, designados de regiões de classe I, de classe II e de classe III.

Na região de classe I, além dos genes estruturais para as moléculas HLA-A, B e C clássicas, foram identificados e mapeados os genes HLA de classe I não-clássicos, HLA-E, F e G.

A região HLA-D abrange três sub-regiões, DR, DQ e DP, que codificam os produtos HLA de classe II "clássicos". Nesta região, também foram identificados os genes TAP1 e TAP2 (Kelly *et al.*, 1993), que são responsáveis pelo transporte de fragmentos peptídicos do citoplasma para o retículo endoplasmático onde eles se ligam as moléculas HLA de classe I; e os genes LMP2 e LPM7 (Monaco e McDevitt, 1982), que se acredita codificarem subunidades de proteassomos, possivelmente envolvidos no processamento de antígenos; e também os genes DNA e DOB, de função ainda não definida (Kavathas *et al.*, 1980; Tonelle *et al.*, 1985). A sub-região DR (Andersson *et al.*, 1994) inclui um único gene DRA, porém caracteriza-se pela variabilidade isotípica dos genes DRB. Os produtos dos genes DPA1 e DPB1 associam-se para formar as moléculas HLA-DP e similarmente, DQA1 e DQB1 codificam as moléculas

Fig. 5 - Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humana

Modificado de Campbell e Trowsdale, 1993



HLA-DQ. Os genes DNA, DOB, DQA2 e DQB2 são potencialmente funcionais e os genes DPA2 e DPB2 são pseudogenes.

A região de classe III, localizada entre as regiões de classe I e II, contém os genes C2, C4A, C4B e BF que codificam para proteínas do sistema complemento, além de genes que codificam a enzima 21-hidroxilase, os fatores de necrose tumoral α (TNF- α) e β (TNF- β), assim como vários outros genes, a maioria deles de funções desconhecidas e muitos pseudogenes.

1.2.7 Herança dos antígenos do CPH

Os genes do CPH são geralmente transmitidos para a descendência como uma unidade, por segregação mendeliana simples, e seus alelos são expressos de forma codominante. O termo haplotipo refere-se ao conjunto de alelos HLA localizados num dos cromossomos do par homólogo. Portanto, o genótipo de um indivíduo é constituído por dois haplotipos, um de origem paterna (*a* ou *b*) e outro de origem materna (*c* ou *d*), e as quatro combinações parentais possíveis são: *a/c*, *a/d*, *b/c*, *b/d*.

Apesar da proximidade entre os genes do CPH, a ligação genética não é absoluta: existe a possibilidade de recombinação entre os diferentes *loci* deste complexo gênico. Foi demonstrado que a frequência de recombinação entre os *loci* A e B e entre os *loci* B e DR é de aproximadamente 1% (Belvedere *et al.*, 1975; Keuning *et al.*, 1975; Netzel *et al.*, 1975; Bijnen *et al.*, 1976; Lamm *et al.*, 1978; Dyer, 1988).

1.2.8 Genética de populações e desequilíbrio de ligação

Os primeiros estudos de amostras populacionais já demonstraram que certas especificidades características de uma população podem estar ausentes em outras. Em consequência destas observações, o V Workshop Internacional de Histocompatibilidade (Dausset e Colombani, 1973) teve como objetivo principal a determinação dos antígenos HLA em várias populações de diversas partes do mundo.

Assim, por exemplo, alguns antígenos como HLA-A2 e HLA-B35 são encontrados em quase todas as populações; os antígenos HLA-A1, A3, B8 e B27 são encontrados em caucasóides e negros, porém raramente em orientais. Outros, como o HLA-A43, são encontrados quase exclusivamente em negros, e o HLA-B46 principalmente em chineses. Da mesma forma, certos haplotipos são característicos de algumas populações (Bodmer *et al.*, 1987). Por exemplo, HLA-A1-B8-DR3 em caucasóides, HLA-A2-B35-DR4 em mongolóides e HLA-A28-B38-DR6 em negros africanos.

O fato de certas combinações de alelos serem encontradas com uma frequência significativamente diferente da frequência esperada, a qual corresponde ao produto da frequência dos alelos, deve-se ao fenômeno do desequilíbrio de ligação. O desequilíbrio de ligação é definido como a diferença (Δ) entre a frequência observada de uma determinada combinação de alelos em *loci* ligados e a frequência esperada.

Algumas hipóteses foram propostas para explicar este fenômeno. A coexistência de determinados alelos num mesmo haplotipo, com frequência superior à esperada, poderia ser decorrente da co-evolução dos vários *loci* envolvidos. O desequilíbrio de ligação poderia também ser resultante de migração e miscigenação de populações com frequências haplotípicas distintas, da deriva genética e do endocruzamento. Deve-se considerar também a

hipótese de não ter havido tempo evolucionário suficiente para que um alelo mais recente tenha atingido o equilíbrio.

1.2.9 Polimorfismo

O CPH apresenta extenso polimorfismo, de vários de seus genes de classes I, II e III, caracterizado por um número incomumente elevado de alelos polimorfos, os quais podem diferir entre si em múltiplos pontos da sequência. Nesses aspectos, o polimorfismo HLA difere do polimorfismo de outros genes ou sistemas genéticos.

A sub-região HLA-DR caracteriza-se pela peculiaridade de exibir tanto o polimorfismo alélico como o polimorfismo isotípico. O primeiro é decorrente de várias diferenças de aminoácidos entre os alelos e o segundo decorre da existência de números variáveis de genes DRB, sendo alguns funcionais (DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5) e outros pseudogenes. Os haplotipos DR do complexo HLA dividem-se em cinco grupos, com base na clonagem genômica e na análise das sequências, os quais correlacionam-se com as especificidades sorológicas expressas pelo *locus* DRB1: grupo DR1 (DR1, 10 e 103); grupo DR51 (DR15 e 16); grupo DR52 (DR3, 11, 12, 13, 14, 1403 e 1404); grupo DR8 (DR8); e o grupo DR53 (DR4, 7 e 9) (Andersson *et al.*, 1994).

Já foram identificados 50 alelos do *locus* HLA-A, 97 do *locus* HLA-B, 34 do *locus* HLA-C, 2 do *locus* DRA, 106 do *locus* HLA-DRB1, 4 do *locus* DRB3, 5 do *locus* DRB4, 5 do *locus* DRB5, 15 do *locus* HLA-DQA1, 26 do *locus* DQB1, 8 do *locus* DPA1 e 59 do *locus* HLA-DPB1 (Bodmer *et al.*, 1994).

Vários mecanismos contribuem para a geração do polimorfismo dos genes do CPH: duplicações, deleções, mutações de ponto, recombinações, conversões intragênicas e

intergênicas. A extraordinária diversidade dos genes do CPH humano e do CPH murino é o resultado do acúmulo gradual de mudanças nas espécies ancestrais ao longo da evolução (Lawlor *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1993).

Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar a manutenção do polimorfismo. A possibilidade de um polimorfismo neutro, sendo então a grande variabilidade alélica atribuída à alta taxa de mutação ou conversão gênica, foi uma das hipóteses consideradas. Contudo, sabe-se atualmente que a taxa de mutação dos genes HLA polimórficos não difere da apresentada por outros genes. Acredita-se atualmente que algum tipo de seleção balanceadora seja necessária para explicar o padrão e a extensão do polimorfismo do CPH. Dentre as hipóteses mais consideradas estão a seleção sobredominante (Doherty e Zinkernagel, 1975; Klein e Figueroa, 1986) e a seleção dependente de frequência (Bodmer, 1972). Há também a hipótese de que a deriva genética contribui para a manutenção do polimorfismo (Klein, 1987).

A seleção sobredominante é uma das hipóteses mais aceitas por explicar vários aspectos concernentes ao polimorfismo, como: alta heterozigose, elevado número de alelos numa população, alto grau de diversidade de nucleotídeos e o polimorfismo transespecífico. Considerando-se a função biológica das moléculas do CPH e o fato de diferentes moléculas ligarem-se a diferentes peptídeos antigênicos, espera-se que, de modo geral, heterozigotos sejam mais resistentes a doenças infecciosas do que os homozigotos, por serem capazes de apresentar uma gama maior de peptídeos aos linfócitos T (Doherty e Zinkernagel, 1975). Hughes e Nei (1988, 1989) estudando os padrões de substituição de nucleotídeos, tanto entre alelos dos mesmo *loci* como de diferentes *loci*, constataram um valor mais elevado de substituições não-sinônimas em relação ao valor de substituições sinônimas nos sítios de

ligação do peptídeo e sítios de interação com o receptor do linfócito T, fornecendo desta forma evidência indireta de que os genes do CPH estão sob seleção balanceadora.

A hipótese da seleção dependente de frequência (Bodmer, 1972), do ponto de vista teórico, também explica várias características do polimorfismo, tornando-se difícil distingui-la da seleção sobredominante apenas através da análise estatística de dados do polimorfismo (Hughes e Nei, 1992).

Klein (1987) propõe que o polimorfismo HLA é transespecífico e que os alelos seriam seletivamente neutros, porém estando sujeitos à deriva genética. No entanto, períodos de evolução neutra seriam alternados com períodos nos quais os efeitos da seleção natural seriam pronunciados, como no caso da espécie ocupar um nicho ecológico distinto, com um espectro diferente de parasitas.

As diferentes hipóteses propostas não são necessariamente excludentes, pois existe a possibilidade de diferentes mecanismos contribuírem para a manutenção do polimorfismo do CPH.

1.2.10 HLA e doenças

1.2.10.1 Histórico

A demonstração por McDevitt e Sela (1965) de que o sistema H-2 do camundongo controla diferenças genéticas na resposta imune, e por Lilly *et al.* (1964) de que este mesmo sistema controla a suscetibilidade a leucemias induzidas por vírus, assim como o interesse pelo significado biológico e a evolução de polimorfismos genéticos, estimulou o início de uma série de estudos de associação entre HLA e doenças no homem.

O estudo pioneiro para a espécie humana, de associação de HLA com doença de Hodgkin, foi realizado por Amiel (1967). Desde então, a suscetibilidade aumentada a uma variedade de doenças tem sido associada com genes do complexo HLA. Por exemplo, o antígeno HLA-B27 ocorre com uma frequência de 89% no grupo de pacientes afetados por espondilite anquilosante e de apenas 9% no grupo controle, sendo essa uma das associações positivas mais fortes já encontradas (Tiwari e Terasaki, 1985).

Tem sido sugerido o envolvimento do complexo HLA tanto na proteção como na suscetibilidade a muitas doenças infecciosas e parasitárias. Os trabalhos realizados para o 9º Workshop Internacional de Histocompatibilidade demonstraram associação entre o antígeno HLA-DQ1e a lepra lepromatosa (de Vries *et al.*, 1984). Foram encontradas associações positivas entre HLA-DR3 e lepra tuberculóide em uma população mestiça (negros e caucasóides) do Suriname (van Eden *et al.*, 1982), e em uma população de mestiços mexicanos (índios e espanhóis) (Gorodesky *et al.*, 1987). E associações positivas entre DR2 e lepra tuberculóide em diferentes estudos realizados na Índia, na Tailândia e no Japão (van Eden e de Vries, 1984). A análise de alelos HLA de classe II, numa população da Índia, resultou em associação positiva dos alelos DRB1*1501 e 1502 com a lepra lepromatosa e tuberculóide, respectivamente (Rani *et al.*, 1993). Vários estudos de segregação de haplotipos HLA em famílias sugerem que a suscetibilidade à infecção ao *Mycobacterium leprae* não está associada ao HLA, mas que a suscetibilidade individual às formas de manifestação da doença, lepra tuberculóide ou lepra lepromatosa, é em parte controlada por genes ligados a este complexo gênico (de Vries *et al.*, 1984; 1988).

A tuberculose pulmonar apresenta um espectro de manifestações clínicas, que do ponto de vista imunológico assemelha-se à lepra, variando de indivíduos com imunidade

celular intacta a indivíduos com ausência de imunidade celular específica. Nos estudos realizados em indivíduos afetados por esta enfermidade foram verificadas associações positivas com HLA- DR2 em pacientes da Índia (Singh *et al.*, 1983), e com HLA-DR2 e com HLA-DQ1 em pacientes da Indonésia (Bothamley *et al.*, 1989).

Em paralelo às associações positivas de antígenos HLA com doenças, as quais aumentam a suscetibilidade às mesmas, também podem ocorrer associações negativas, com diminuição significativa das frequências de determinados antígenos no grupo de pacientes afetados por uma determinada patologia quando comparados ao grupo controle. Como exemplos, tem-se o HLA-DR2 que confere resistência a *diabetes mellitus* insulino dependente (Bertrams e Bauer, 1984) e à leishmaniose mucocutânea (Petzl-Erler *et al.*, 1991), o DR7 ao pênfigo foliáceo (Petzl-Erler e Santamaria, 1989), o DQ2 à neurocisticercose (Del Brutto *et al.*, 1991), o DQ3 à tuberculose pulmonar (Bothamley *et al.*, 1989), B40 e Cw3 à cardiopatia chagásica (Llop *et al.*, 1988), e o B53 com a forma grave de malária (Hill *et al.*, 1991).

A força de uma associação é comumente expressa pelo termo "risco relativo" (RR), que indica quantas vezes mais freqüentemente a doença ocorre em indivíduos que expressam um determinado marcador HLA do que em indivíduos que não expressam o marcador. Um RR acima de 1 indica uma associação positiva e abaixo de 1, uma associação negativa.

1.2.10.2 Identificação dos genes e alelos associados à doença

A dificuldade em identificar os genes e alelos HLA primariamente associados à doença são decorrentes do fenômeno de desequilíbrio de ligação, do desconhecimento de muitos dos genes do CPH e de sua variabilidade, além das limitações dos métodos sorológicos

empregados por muito tempo na identificação das proteínas HLA, os quais não discriminam determinadas diferenças alélicas.

As pesquisas iniciais sobre HLA e doenças envolviam os antígenos codificados pelos *loci* HLA-A e B, sendo que a maioria das associações detectadas eram associações positivas com antígenos do *locus* B. Com a descoberta dos genes da região HLA-D, e com o desenvolvimento de métodos de identificação de seus produtos, verificou-se para muitas das doenças inicialmente associadas com antígenos HLA de classe I estarem mais fortemente associadas aos produtos de classe II. As associações iniciais com antígenos HLA-B são justificadas pelo desequilíbrio de ligação entre os alelos de HLA-B e dos *loci* de classe II. Por exemplo, verificou-se inicialmente que a *diabetes mellitus* insulino dependente está associada com HLA-B15 (Singal e Blajchmann, 1973) e HLA-B8 (Nerup *et al.*, 1974). Mais tarde, descreveu-se a associação positiva dessa mesma doença com HLA-DR3 e DR4 (Svejgaard *et al.*, 1980). As definições dos haplotipos DR3 e DR4 demonstraram que a associação mais forte era de fato com o antígeno HLA-DQ3.2, atualmente conhecido como HLA-DQ8 (Owerbach *et al.*, 1984; Cohen-Haguenauer *et al.*, 1985). São exceções a espondilite anquilosante e a hemocromatose, que confirmaram as associações inicialmente detectadas com HLA-B27 e HLA-A3, respectivamente.

A utilização de métodos celulares para identificação das especificidades Dw e DPw, de métodos bioquímicos e, mais recentemente, de métodos moleculares para a determinação dos alelos HLA e de seus produtos, tem permitido a subdivisão de muitas especificidades sorológicas, proporcionando avanços na identificação dos verdadeiros alelos de suscetibilidade. A amplificação de genes pela reação em cadeia da polimerase (PCR) facilitou a análise da sequência dos alelos de classe II, derivados de pacientes e de controles, e a

comparação de sua distribuição nos dois grupos pela hibridação com sondas de oligonucleotídeos. Desde que as especificidades sorológicas demonstraram ser geneticamente heterogêneas, a análise das seqüências das proteínas e/ou dos genes revelou que certos alelos estão mais fortemente associados a doenças. Por exemplo, a especificidade sorológica DR6, cuja cadeia polimórfica β é codificada pelo gene DRB1, confere um risco relativo de 2,5 para o pênfigo vulgar, enquanto o alelo DQB1.3 (atualmente DQB1*0503), presente em um dos haplotipos DR6-DQ1, confere um risco relativo de aproximadamente 100 (Scharf *et al.*, 1988). Por outro lado, a espondilite anquilosante que está associada à especificidade sorológica B27 não demonstrou associação preferencial com nenhum dos subtipos de HLA-B27. Dados mais atuais indicam determinadas seqüências de aminoácidos, presentes no sítio ativo das moléculas de classe II, como um dos elementos responsáveis pela predisposição a doenças. No caso da *diabetes mellitus* insulino dependente, que está associada não apenas a DR4, mas também a DR3 e DR1 em diferentes grupos raciais, foi procurada uma estrutura comum, através da comparação das seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos dos genes de classe II dos haplotipos predisponentes. Os dados desta análise permitiram constatar que a associação poderia ser com a ausência de ácido aspártico na posição 57 da cadeia DQ β (Todd *et al.*, 1987).

No entanto, existe a possibilidade de que a suscetibilidade a certas patologias não esteja necessariamente associada a epítomos formados por seqüências lineares de aminoácidos, mas à estrutura tridimensional (epítomos conformacionais). Isto foi sugerido por exemplo por experimentos empregando clones alloreativos de células T gerados contra HLA-Dw14, uma especificidade associada a DR4, que reconhecem um epítomo presente em todos os pacientes portadores de artrite reumatóide, independente de expressarem o antígeno DR4 (Goronszy *et*

al., 1986). Outro estudo demonstrou o reconhecimento, por clones de células T, de determinantes compartilhados entre haplotipos DR1 e DR4 (Weyand *et al.*, 1986). Devemos também ressaltar a relevância dos epítomos conformacionais exclusivos como possíveis determinantes de suscetibilidade, os quais são formados pelas moléculas HLA híbridas resultantes de interações intra ou inter-isotípicas. De fato, um efeito de heterozigose na *diabetes mellitus* insulino-dependente foi relatado por Svejgaard *et al.* (1983), havendo um risco relativo significativamente aumentado para indivíduos heterozigotos portadores dos haplotipos DR3 e DR4. Isto demonstra que a ausência do ácido aspártico na posição 57 da cadeia DQ β não é o único elemento responsável pela suscetibilidade a essa doença no que se refere ao CPH. A descoberta de que as cadeias α e β das moléculas DQ são polimórficas indicou a possibilidade de formação de moléculas híbridas a partir dos polipeptídeos codificados por alelos de DQA1 e de DQB1 localizados em trans, explicando-se desta forma o efeito observado para os heterozigotos (Nepom *et al.*, 1987). Este efeito da heterozigose também foi observado na doença celíaca (Betuel *et al.*, 1980) e na artrite reumatóide juvenil (Nepom *et al.*, 1984).

1.2.10.3 Mecanismos de associação

Em alguns casos de doenças de herança monogênica e de etiologia conhecida, a associação observada não envolve as moléculas de classe I ou de classe II propriamente ditas, mas é devida a um gene intimamente ligado cujo(s) alelo(s) encontram-se em desequilíbrio de ligação com o alelo HLA associado com a doença. Por exemplo, as associações positivas da forma clássica de hiperplasia adrenal congênita com HLA-B47 (O'Neill *et al.*, 1979), da forma que apresenta estabelecimento tardio com HLA-B14 e DR1 (Pollack *et al.*, 1981), e da

deficiência de C2 com HLA-DR2 (Day *et al.*, 1975) são sem dúvida devidas ao desequilíbrio de ligação, não tendo os antígenos HLA qualquer influência na etiologia ou patogênese dessas doenças. A hiperplasia adrenal congênita, de herança autossômica recessiva, é devida a um defeito na enzima 21-hidroxilase codificada na região de classe III do CPH (Higashi *et al.*, 1988). De modo similar, a deficiência de C2 pode ser compreendida como um defeito num componente estrutural do complemento. A associação de HLA-A3 e hemocromatose idiopática (Walters *et al.*, 1975), outro distúrbio de herança autossômica recessiva, sugere que no CPH também possa existir um gene que regule a acumulação de ferro nos tecidos.

Por outro lado, muitas patologias associadas aos antígenos HLA são de herança multifatorial e de etiologia desconhecida, não apresentam segregação mendeliana simples, e tem o provável envolvimento de genes não HLA e fatores ambientais, na maioria das vezes ainda desconhecidos, influenciando a sua patogênese. A multiplicidade, assim como a evidente complexidade das interações entre os fatores predisponentes, dificulta a identificação dos vários elementos de predisposição à doença e principalmente a compreensão dos mecanismos através dos quais os genes do CPH conferem resistência ou suscetibilidade.

Devido ao conhecimento da estrutura e da função biológica das moléculas de histocompatibilidade, podemos especular que as moléculas de classe I ou de classe II associadas estejam diretamente envolvidas na etiologia e/ou patogênese de muitas enfermidades. No entanto, devemos considerar também a hipótese do envolvimento de outros genes do CPH cujos alelos predisponentes à doença estejam em desequilíbrio de ligação com os alelos HLA associados.

Essas duas hipóteses são plausíveis para as enfermidades que apresentam um componente de disfunção imunológica, onde foi demonstrada a participação de auto-

anticorpos e de células inflamatórias, como é o caso na miastenia gravis, lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide, dentre outras. Também o é para as doenças infecciosas, como a hanseníase e a tuberculose, e para as doenças parasitárias, como a leishmaniose, doença de Chagas, neurocisticercose, esquistossomose, malária etc.

Considerando-se que os antígenos HLA podem exercer o controle da resposta imune em vários níveis, os possíveis mecanismos para explicar seu envolvimento direto nas associações com doenças incluem: suas funções como genes da resposta imune, sua possível atuação como receptores para organismos patogênicos, eventuais modificações dos antígenos HLA próprios por agentes infecciosos, mimetismo molecular, expressão aberrante e interação com ligantes não imunológicos.

O fato de as moléculas HLA apresentarem peptídeos antigênicos para o receptor específico dos linfócitos T e influenciarem na seleção do repertório dessas células permite especular que a suscetibilidade a determinadas doenças possa resultar de qualquer disfunção nesses processos. O fato de cada especificidade HLA ter afinidade seletiva por um determinado grupo de peptídeos tem várias implicações referentes ao tipo de resposta imunológica elicitada e permite levantar algumas hipóteses. Algumas especificidades HLA podem ser mais eficientes do que outras na apresentação de determinados peptídeos antigênicos à subpopulação adequada de células T para eliminar um certo agente patogênico, influenciando dessa forma no curso da infecção. Outra possibilidade é de que apenas o sítio de ligação de certas moléculas HLA poderia aceitar o fragmento peptídico processado, que seria na verdade o agente causador da doença. Por outro lado, o repertório de células T selecionado pelo conjunto de moléculas HLA de um indivíduo pode excluir receptores que possam

identificar um peptídeo crítico para o reconhecimento e eliminação de um determinado agente patogênico, levando à uma infecção crônica.

De acordo com o conceito de mimetismo molecular, um agente infeccioso que parece-se quimicamente com o complexo HLA/peptídeo próprio poderia, devido à reatividade cruzada, causar danos a tecidos específicos. As próprias células T podem ser responsáveis pelos sintomas da doença, em consequência de seu ataque aos tecidos, ou podem estimular uma resposta de anticorpos dirigidos a outros determinantes deste complexo. Isto pode ocorrer no caso de algumas especificidades HLA apresentarem maior afinidade por peptídeos autólogos e consequentemente por peptídeos provenientes de agentes patogênicos que mimetizem um peptídeo autólogo, assim conferindo suscetibilidade à doença auto-imune. Por outro lado, um indivíduo portador de um certo haplotipo HLA poderia ser incapaz de montar uma resposta celular a um epítopo de um agente infeccioso, devido aos complexos peptídeo/HLA próprios terem induzido tolerância. Deste modo, a resposta imune seria prejudicada e a infecção progrediria resultando em doença.

Outra hipótese é de que a expressão aberrante de moléculas HLA de classe II, em células que normalmente expressam apenas moléculas de classe I, podem levá-las a apresentar antígenos tecido específicos, tornando-as alvo de um processo auto-imune. Uma possível justificativa seria a produção de interferon- γ por células infectadas por vírus, e consequente indução da expressão dessas moléculas de classe II nas células alvo e demais células adjacentes.

É evidente que os genes do Complexo HLA estão envolvidos na suscetibilidade a várias doenças e/ou na modulação e patogênese das mesmas. Portanto, é de fundamental importância a elucidação dos mecanismos através dos quais eles atuam como fatores

predisponentes, inclusive pelo fato de as moléculas HLA serem alvos em potencial para a elaboração de estratégias terapêuticas. Há perspectivas futuras de desenvolver-se anticorpos ou peptídeos bloqueadores, direcionados ao elemento de suscetibilidade, os quais poderão controlar com alta especificidade a resposta imune associada à doença.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O presente estudo pretende verificar se as associações positivas entre HLA-DQ3 e as formas mucocutânea (Petzl-Erler *et al.*, 1991) e cutânea de LTA (Gorodezky *et al.*, 1989; Lara *et al.*, 1991) são válidas também para a população da área endêmica de *Leishmania braziliensis* localizada ao Norte do Estado do Paraná. O objetivo é investigar, no caso de haver associação, se a mesma ocorre tanto para a LCL como para a LMC ou apenas para a LMC. No primeiro caso, ter-se-ia uma sugestão da participação dos genes do CPH na suscetibilidade à infecção pela *Leishmania*, possivelmente já nos primeiros estádios de desenvolvimento da doença.

O fato de apenas uma fração dos indivíduos afetados pela LCL devido à infecção por *Leishmania braziliensis* desenvolver LMC, caso a associação observada for apenas com a forma mucocutânea, seria indicativo de que os genes do CPH não estão envolvidos na fase inicial da infecção, mas apenas na patogênese das lesões metastáticas da mucosa oro-faringo-laríngea. Isto sugeriria que a maior predisposição desses indivíduos para lesão secundária teria um componente genético ligado ao CPH.

Os estudos de leishmaniose experimental no camundongo indicam que genes não ligados ao Complexo H-2 estão envolvidos na suscetibilidade inata à infecção por *Leishmania*, e que genes do Complexo H-2, homólogos aos genes do CPH humano, atuam na regulação da resposta imune adquirida modulando as diversas formas de manifestação da doença. Contudo, não se sabe até que ponto esses resultados podem ser extrapolados à doença humana.

Esta investigação foi abordada através de um estudo de associação de HLA e leishmaniose em nível de população. As frequências antigênicas dos *loci* HLA-A, B, C, DR e DQ foram comparadas entre grupos de pacientes e de controles não consangüíneos. O primeiro grupo é constituído por pacientes afetados pela leishmaniose cutânea localizada; o segundo, por pacientes afetados pela leishmaniose mucocutânea e o terceiro engloba todos os pacientes, independente da forma de manifestação da doença.

O outro objetivo foi o de investigar se existe co-segregação de genes do CPH e suscetibilidade à leishmaniose tegumentar americana através da análise de segregação dos haplotipos HLA, em famílias com dois ou mais indivíduos afetados. A leishmaniose é uma zoonose endêmica encontrada em várias partes do mundo e constitui um grave problema de saúde pública e social. Sua incidência é de aproximadamente 400 mil novos casos por ano, e prevalência mundial está estimada em aproximadamente 12 milhões de casos. O conhecimento das bases genéticas subjacentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro, em resposta às infecções causadas pelas *Leishmania sp.*, tem importantes implicações no esclarecimento da patogênese da doença, condição essencial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e de terapia mais eficazes no combate a esta parasitose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA POPULACIONAL PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO : CASO - CONTROLE

Foi averiguado um total de 99 pacientes afetados por leishmaniose tegumentar americana e 99 controles; 62 pacientes apresentavam a forma cutânea e 37 pacientes a forma mucocutânea da doença. A determinação dos antígenos HLA-A, B e C foi realizada em 62 pacientes afetados pela forma cutânea, 36 pacientes pela forma mucocutânea e 97 controles; não foi possível tipificar os antígenos de classe I em um dos 37 pacientes com LMC e dois dos 99 indivíduos controles. Já a determinação dos antígenos HLA-DR e DQ foi efetuada em 58 pacientes dentre os 62 portadores da forma cutânea, 36 pacientes dentre os 37 portadores da forma mucocutânea e 86 indivíduos dentre os 99 controles. Os pacientes e controles analisados neste estudo eram não consangüíneos.

Todos os indivíduos residiam em área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, localizada ao norte do Estado do Paraná, incluindo os seguintes municípios: Cianorte, Jussara, Terra Boa, Dr. Camargo, Japurá, Castelo Branco, Ourizona, Engenheiro Beltrão, Sarandi, Terra Roxa e Jaguapitã. Tanto os pacientes como os controles eram, em sua maioria, trabalhadores e /ou habitantes de sítios e fazendas localizadas nos municípios já mencionados.

Os nomes e endereços de pacientes portadores de leishmaniose, selecionados para este estudo, foram obtidos nos registros do Posto de Saúde de Cianorte, com a colaboração do dermatologista responsável.

A seleção dos pacientes foi baseada em três critérios, sendo eles: diagnóstico clínico, positividade para a intradermoreação de Montenegro e resposta positiva ao tratamento com antimoniato de N-metilglucamina. Embora fosse ideal incluir o resultado das biópsias das lesões cutâneas e ou mucosas, não havia naquela região laboratório especializado para realizar este tipo de análise.

O diagnóstico clínico da forma cutânea da leishmaniose foi baseado nos seguintes critérios: aspecto clínico das lesões, localização das lesões em áreas descobertas pelo vestuário, presença de lesões ulceradas de bordos elevados e eritematosos com aspecto e moldura. O diagnóstico clínico da forma mucosa da doença foi baseado na presença isolada ou associada dos seguintes critérios: presença de eritema e infiltração da pirâmide nasal, ulcerações da mucosa nasal e/ou perfuração do septo cartilaginoso do nariz, presença da lesão "nariz de anta" ou "nariz de tapir".

Para integrar o grupo controle foram escolhidos indivíduos residentes na mesma área endêmica e sujeitos às mesmas condições de exposição ao vetor flebótomo que os referidos pacientes. Foi realizada a intradermoreação de Montenegro em todos os controles.

A idade média dos pacientes com leishmaniose cutânea localizada foi de $36,0 \pm 14,4$, variando entre 10 e 65 anos; dos pacientes com leishmaniose mucocutânea foi de $43,2 \pm 17,2$, variando entre 8 e 85 anos; e dos controles foi de $40,3 \pm 12,8$, variando entre 15 e 77 anos.

A proporção sexual entre os pacientes afetados pela forma cutânea de LTA, analisados para antígenos HLA de classe I, foi de 14 mulheres (22,6%) e 48 homens (77,4%); nos controles é de 21 mulheres (21,7%) e 76 homens (78,4%). Dentre os indivíduos analisados para classe II havia 13 mulheres (22,4%) e 45 homens (77,6%) no grupo de pacientes e 16 mulheres (18,6%) e 70 homens (81,4%) nos controles.

No grupo de pacientes afetados pela forma mucocutânea de LTA, analisados para antígenos HLA de classe I, havia 14 mulheres (38,9%) e 22 homens (61,1%) e nos controles 21 mulheres (21,9%) e 75 homens (78,1%). Dentre os indivíduos analisados para antígenos de classe II havia 13 mulheres (36,1%) e 23 homens (63,9%) no grupo de pacientes e 16 mulheres (18,8%) e 69 homens (81,2%) nos controles.

A distribuição dos indivíduos quanto à composição étnica, entre os grupos de pacientes e respectivos controles está demonstrada nas Tabelas de números 2, 3, 4, 5, 6, e 7.

Tabela 2. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LTA e controles analisados para HLA-A, B e C

Grupo étnico	Pacientes		Controles	
	N=93	%	N=97	%
Branco	64	68,8	66	68,0
Mulato claro	15	16,1	17	17,5
Mulato médio	8	8,6	7	7,2
Mulato escuro	5	5,4	4	4,1
Negro	0	0	1	1,0
Branco x índio	1	1,1	2	2,1
Não branco	29	31,2	31	32,0

Tabela 3. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LTA e controles analisados para HLA-DR e DQ

Grupo étnico	Pacientes		Controles	
	N=89	%	N=86	%
Branco	62	69,7	60	69,8
Mulato claro	14	15,7	14	16,3
Mulato médio	7	7,9	6	7,0
Mulato escuro	5	5,6	3	3,5
Negro	0	0	1	1,2
Branco x índio	1	1,1	2	2,3
Não branco	27	30,3	26	30,2

Tabela 4. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LCL e controles analisados para HLA-A, B e C

Grupo étnico	Pacientes		Controles	
	N=62	%	N=97	%
Branco	42	67,7	66	68,0
Mulato claro	10	16,1	17	17,5
Mulato médio	7	11,3	7	7,2
Mulato escuro	2	3,2	4	4,1
Negro	1	1,6	1	1,0
Branco x índio	0	0	2	2,1
Não branco	20	32,3	31	32,0

Tabela 5. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LCL e controles analisados para HLA-DR e DQ

Grupo étnico	Pacientes		Controles	
	N=58	%	N=86	%
Branco	39	67,2	60	69,8
Mulato claro	10	17,2	14	16,3
Mulato médio	6	10,3	6	7,0
Mulato escuro	2	3,5	3	3,5
Negro	1	1,7	1	1,2
Branco x índio	0	0	2	2,3
Não branco	19	32,8	26	30,2

Tabela 6. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LMC e controles analisados para HLA-A, B e C

Grupo étnico	Pacientes		Controles	
	N=36	%	N=96	%
Branco	25	69,4	66	68,8
Mulato claro	6	16,7	17	17,7
Mulato médio	1	2,8	7	7,3
Mulato escuro	3	8,3	4	4,2
Negro	0	0	0	0
Branco x índio	1	2,8	2	2,1
Não branco	11	30,6	30	31,3

Tabela 7. Distribuição quanto à etnia em pacientes afetados por LMC e controles analisados para HLA-DR e DQ

Grupo étnico	Pacientes		Controles	
	N=36	%	N=85	%
Branco	26	72,2	60	70,6
Mulato claro	5	13,9	14	16,5
Mulato médio	1	2,8	6	7,1
Mulato escuro	3	8,3	3	3,5
Negro	0	0	0	0
Branco x índio	1	2,8	2	2,4
Não branco	10	27,8	25	29,4

3.2 FAMÍLIAS PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO : CO-SEGREGAÇÃO

Foram selecionadas 15 famílias com dois ou mais irmãos afetados por leishmaniose tegumentar americana, todas elas residentes na mesma área endêmica descrita no estudo de população. Destas famílias foram selecionados todos os irmãos afetados, com base no diagnóstico clínico e na intradermoreação de Montenegro, havendo 40 irmãos portadores da forma cutânea e 2 irmãos portadores da forma mucocutânea de LTA.

Os antígenos HLA de classe I e de classe II foram determinados nos 42 irmãos afetados, em 7 pais, 7 mães e 1 irmão não afetado. A identificação dos haplotipos HLA parentais (*a*, *b*, *c* e *d*) foi possível mesmo nas famílias cujos pais não foram analisados, com base nos fenótipos HLA dos irmãos, possibilitando desta forma a determinação dos genótipos HLA dos irmãos afetados incluídos neste estudo.

Dentre os irmãos afetados, 14 eram do sexo feminino e 28 do sexo masculino; quanto à etnia 4 eram negros, 17 eram mulatos e 21 eram brancos; a idade média foi de $25,24 \pm 13,12$ variando entre 8 e 69 anos.

3.3 INTRADERMOREAÇÃO DE MONTENEGRO

Este teste cutâneo, de hipersensibilidade tipo tardia (Montenegro, 1926), foi realizado injetando-se 3 µg de antígeno protéico solúvel de *Leishmania* em 0,1 ml de salina mertiolatada 1:10.000 por via intradérmica, na face anterior do antebraço esquerdo, e examinados para endureção após 72 horas. Os testes com diâmetro maior ou igual a 5 mm de endureção foram considerados positivos. Foi realizada a contra-prova injetando-se 0,1 ml do diluente do antígeno (salina mertiolatada 1:10.000) na face anterior do ante-braço direito.

O antígeno de Montenegro é procedente do Departamento de Parasitologia ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (Melo et al., 1977). Foi preparado com massas de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cultivadas em meio LIT, lavadas 3 vezes em solução fisiológica e centrifugadas a 2000 rpm à 4°C por 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em solução fisiológica e submetido à ação de ultra-som 10 vezes durante 1 minuto, com intervalo de quatro minutos durante uma e outra sonificação. A seguir o antígeno foi diluído com volume adequado de salina mertiolatada para se obter a concentração de 30µg de nitrogênio/ml.

3.4 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO

Foram utilizadas de 30 a 50 UI de heparina sódica, da marca Cristália (solução injetável contendo 5000UI/ml), para cada mililitro(ml) de sangue, sendo coletados 40 ml de sangue periférico de cada indivíduo. As seringas foram acondicionadas em caixa de isopor e enviadas de Cianorte para Curitiba por transporte rodoviário. O tempo entre a coleta do material e o processamento do mesmo no laboratório variou de 12 a 24 horas.

As amostras foram processadas diariamente, logo após sua chegada ao laboratório. O processamento consistiu na separação e congelamento das células mononucleares, e o armazenamento imediato das ampolas congeladas em tanque de nitrogênio líquido, até o momento de sua utilização para a determinação dos antígenos HLA pelo método de microlinfocitotoxicidade modificado por Amos *et al.* (1980).

3.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

O método utilizado, proposto por Boyum (1968), consiste na centrifugação em gradiente de densidade com solução de ficoll-hypaque (FH) densidade de 1,077 (Histopaque 1077 é o nome comercial do produto fornecido pela Sigma). O ficoll é um polímero de sacarose de alto peso molecular o qual, devido à sua viscosidade, propicia a formação de *roleaux* dos glóbulos vermelhos. O hypaque, que é o nome comercial para a solução de diatrizoato de sódio a 50% (Whintrop), é um composto orgânico iodado que aumenta a densidade da mistura.

Quando o sangue ou creme leucocitário diluído é colocado sobre a solução de FH e uma força centrífuga é aplicada durante um certo tempo, ocorre separação dos componentes celulares. Os glóbulos vermelhos são mais densos que o FH e passarão através do gradiente para o fundo do tubo. Os linfócitos e monócitos têm densidade próxima à do FH e ficarão localizados na interfase do FH e plasma. As plaquetas são menos densas que o FH e na sua maioria ficarão na camada do plasma.

O procedimento envolve os seguintes passos:

- Centrifugar 40 ml de sangue heparinizado a 1500 rpm por 15 minutos.
- Coletar o creme leucocitário e suspender em meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma R6504) até um volume de 9 ml.
- Colocar a suspensão de células sobre 3 ml da solução de FH e centrifugar a 1800 rpm por 30 minutos.
- Coletar o anel de células mononucleares e ressuspender em 3 volumes de meio de cultivo RPMI 1640.
- Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. Remover o sobrenadante e repetir a lavagem.

- Ressuspender o botão de células em 1 ml de meio de cultivo RPMI 1640 e proceder à contagem das mesmas.

3.6 CONTAGEM E AJUSTE DA CONCENTRAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

- Homogeneizar bem a suspensão celular e carregar a câmara de Neubauer (Fig.6).

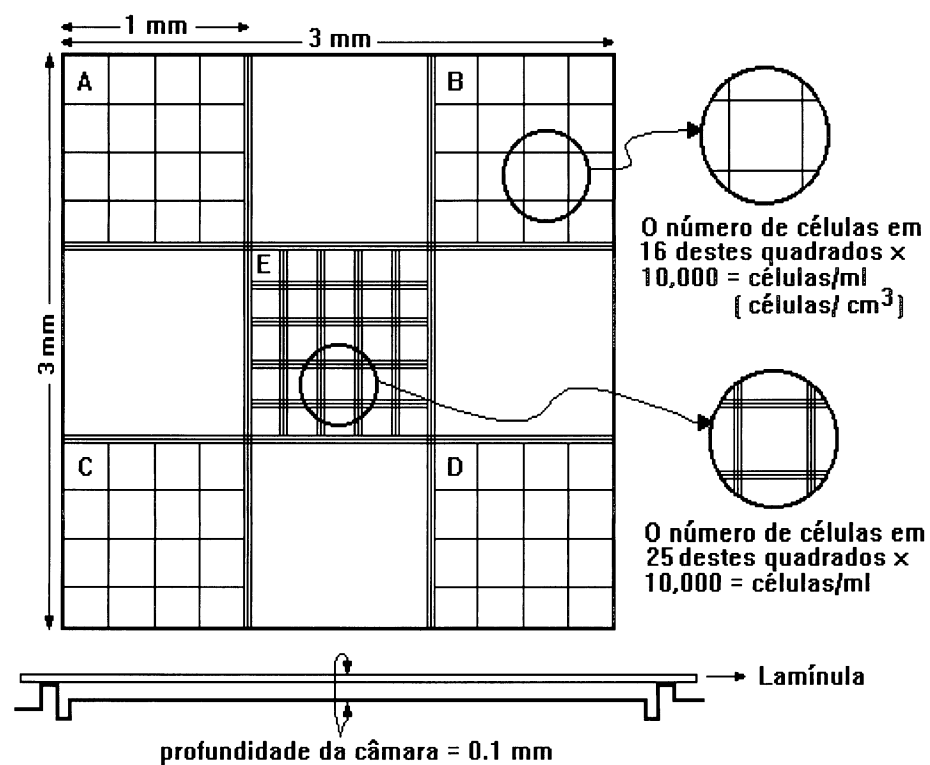


Fig. 6. Diagrama da câmara de contagem de Neubauer

- Utilizar um microscópio comum que permita diferenciar os linfócitos dos monócitos e dos eventuais eritrócitos e granulócitos contaminantes. A magnitude do aumento deve ser de 400 vezes (Objetiva 40X e Ocular 10 X).
- As contagens podem ser feitas nos retículos laterais A, B, C, D ou no retículo central E e os cálculos para determinação da concentração celular são feitos conforme exposto na figura 1.
- Ajuste da concentração celular

Cálculo do fator de diluição:

$$\text{fator} = \frac{\text{número de células / ml obtida}}{\text{número de células / ml desejada}}$$

Cálculo do volume final: multiplicar o fator de diluição pelo volume inicial da suspensão celular. Completar o volume inicial da suspensão celular para o valor do volume final calculado.

3.7 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

- Ressuspender as células (25×10^6 a 30×10^6) em 0,5 ml de meio de cultivo RPMI 1640 com 20% de soro bovino fetal (SBF), e colocar o tubo em recipiente contendo gelo moído.
- Preparar a solução de congelamento: meio de cultivo RPMI 1640 com 20% de SBF e 20% de dimetil-sulfóxido (DMSO). O DMSO é tóxico e gera calor ao ser diluído, por esta razão, gotejar inicialmente a quantidade adequada de DMSO sobre o meio de cultivo RPMI 1640, colocar em banho de gelo para atingir a temperatura de 4°C. A seguir adicionar a quantidade adequada de SBF. Manter esta solução a 4°C.

- Gotejar a solução de congelamento sobre a suspensão celular e transferir a suspensão final para uma ampola de congelamento.
- Congelar no Planner Biomed-Kryo 10 Series (congelador de células automático) utilizando o seguinte programa: -1°C por minuto até atingir a temperatura de -60°C.
- Armazenar as ampolas em tanque de nitrogênio líquido.

3.8 DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

- Retirar a ampola que contém a suspensão celular do tanque de nitrogênio líquido e descongelar imediatamente em banho-maria a 37°C fazendo movimentos circulares.
- Transferir a suspensão celular para um tubo de ensaio e gotejar 10 ml da solução de RPMI 1640 com 20% de SBF. Misturar.
- Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o botão de células em 1 ml de meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SBF. Proceder a contagem e ajuste da concentração das células, conforme descrito no item 3.6.

3.9 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

- Misturar volumes iguais da suspensão celular e da solução de azul de *trypan* 0,16g% (p/v).
- Colocar a mistura em câmara de Neubauer e deixar sedimentar por 2 minutos.
- Contar o número de linfócitos corados pelo azul de *trypan* em 200 linfócitos, dividir o número contado de células mortas por 2 para obter a porcentagem.

Foram utilizadas apenas as suspensões celulares com viabilidade >80% para a tipificação dos antígenos HLA de classe I e II.

3.10 LISE DE ERITRÓCITOS CONTAMINANTES

Quando a suspensão de células mononucleares estiver contaminada com eritrócitos, adotar o seguinte procedimento:

- Centrifugar a suspensão celular a 1500 rpm por 10 minutos.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar de 2 a 5 ml de tampão hemolítico conforme a quantidade de eritrócitos.
- Misturar bem e deixar em repouso por $\pm$ 2 minutos.
- Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender em meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SBF.

3.11 SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T E B: MÉTODO DO COTONETE DE FIBRA DE NÁILON

Este método fundamenta-se na propriedade de as células B aderirem às fibras de náilon. A separação é obtida introduzindo-se células mononucleares totais em colunas ou cotonetes de fibra de náilon e incubando-se a 37°C. A aderência das células B é um processo ativo a 37°C, porém é reduzida a 20°C ou 4°C. As células T não-aderentes são eluídas através da lavagem da fibra de náilon com meio de cultivo RPMI 1640 aquecido a 37°C. As células B são recuperadas pela agitação da fibra de náilon em meio de cultivo RPMI 1640 frio (4°C).

Proceder de acordo com os seguintes passos:

- Ajustar a concentração da suspensão celular, conforme item 3.6, para 20×10^6 a 25×10^6 células por ml em meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SBF.
- Preparo do cotonete: pesar 0,15 g de fibra de náilon, colocar com auxílio de uma pinça em um tubo cônico de centrífuga, e adicionar 10 ml de meio de cultivo RPMI 1640 com 5% de SBF. Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos. Incubar em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Introduzir um palito de madeira (aproximadamente 2 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento) no fundo do tubo e através de movimentos circulares fazer um cotonete, evitando compactar as fibras.
- Gotejar 1 ml da suspensão celular sobre o cotonete e acondicionar o mesmo em um tubo de ensaio vazio, vedar com parafilm.
- Incubar em estufa a 37°C por 30 minutos.
- Eluição dos linfócitos T: gotejar 30 ml de meio de cultivo RPMI 1640 com 5% de SBF sobre o cotonete e recolher a suspensão celular em um tubo de ensaio.
- Eluição dos linfócitos B: colocar o cotonete dentro de um tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de SBF e fazer movimentos circulares para liberar as células B.
- Centrifugar as suspensões de células T e B a 1500 rpm por 10 minutos.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender os botões celulares em 1 ml de meio de cultivo RPMI 1640 com 5% de SBF. Proceder a contagem de células em câmara de Neubauer e acertar as concentrações para 3×10^6 células por ml, conforme descrito no item 3.6.

3.12 DETERMINAÇÃO DOS ANTÍGENOS HLA: MÉTODO DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE MODIFICADO POR AMOS

O teste de linfocitotoxicidade modificado por Amos *et al.* (1980) é constituído por uma fase de sensibilização dos linfócitos com os anticorpos anti-HLA presentes nos anti-soros e uma fase de incubação com um *pool* de soros de coelho, como fonte de complemento, o qual causa lise das células sensibilizadas. A morte celular, a qual é indicativa de uma reação de linfocitotoxicidade mediada por complemento positiva, é evidenciada pela incorporação do corante azul de *trypan*.

A maioria dos anti-soros empregados na determinação dos antígenos de histocompatibilidade de classe I e de classe II foi doada pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética do "Blood Center of Southeastern Wisconsin", EUA. No entanto, anti-soros adicionais, de outras fontes, também foram utilizados para ampliar o número de anti-soros por especificidade HLA. Os soros anti-HLA de classe II foram adsorvidos com um *pool* de plaquetas antes de sua utilização (procedimento descrito no item 3.13.11).

A tipificação dos antígenos HLA-A, B, C (classe I) e HLA-DR, DQ (classe II) é executada através dos seguintes passos:

- Dispensar 1 µl da suspensão de linfócitos T em cada uma das escavações das microplacas Terasaki contendo os antisoros HLA-A,B e C; dispensar 1 µl da suspensão de linfócitos B em cada uma das escavações contendo os antisoros HLA-DR e DQ. As especificações dos 180 anti-soros utilizados para determinação dos antígenos HLA de classe I e dos 120 anti-soros utilizados para determinação dos antígenos HLA de classe II estão descritas nos apêndices I e II, respectivamente.

- Homogeneizar os anti-soros e os linfócitos com auxílio de um agitador. Incubar a 22°C por 30 minutos os anti-soros com os linfócitos T e por 60 minutos os anti-soros com os linfócitos B.
- Dispensar 5 µl de meio de cultivo RPMI 1640 em cada uma das escavações e deixar em repouso a 22° C por 10 minutos. Retirar o sobrenadante por inversão da microplaca com movimento brusco.
- Dispensar 5 µl de soro de coelho, como fonte de complemento, em cada uma das escavações. Incubar a 22°C por 60 minutos as placas contendo anti-soros para determinar os antígenos HLA de classe I e a 22°C por 120 minutos as placas contendo anti-soros para determinar os antígenos HLA de classe II. Retirar o sobrenadante por inversão da microplaca com movimento brusco.
- Dispensar 5 µl da solução do corante em cada uma das escavações e deixar em repouso a 22°C por 10 minutos. Retirar o sobrenadante por inversão da placa com movimento brusco. A solução do corante deve ser preparada, imediatamente antes do uso, na seguinte proporção: 3 ml de solução de azul de *trypan* a 1g% (p/v) para 7 ml da solução de EDTA dissódico a 2g% (p/v). Filtrar.
- Dispensar 5 µl de meio de cultivo RPMI 1640 em cada uma das escavações. Adicionar uma gota de formaldeído sobre as tiras de papel filtro umedecidas, que circundam as escavações da placa Terasaki. Deixar em repouso por 30 minutos para que ocorra a sedimentação das células.

- Proceder a leitura e interpretação das reações em microscópio ótico comum, registrando a porcentagem de linfócitos lisados de acordo com os seguintes escores:

Escore	% de linfócitos	Interpretação
1	0 a 10	Negativo
2	11 a 20	Negativo duvidoso
4	21 a 50	Positivo fraco
6	51 a 80	Positivo
8	81 a 100	Positivo forte

- A designação dos antígenos HLA é feita analisando-se o padrão de reatividade das células de cada indivíduo com o conjunto de anti-soros utilizados.

3.13 PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

3.13.1 Meio de cultivo celular RPMI 1640

- Dissolver 10,4g de RPMI 1640 (Sigma R6504), em pó, em 1 litro de H₂O destilada.
- Esterilizar por filtração: utilizar membrana de acetato de celulose de 0,22 μ .
- Adicionar 40 ml de Hepes 1M para cada litro de RPMI 1640. A concentração final de Hepes deve ser 0,04M.
- Armazenar a temperatura de 4°C.

3.13.2 Hepes 1M

Hepes ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	238,3g	(Sigma H 0891)
H ₂ O destilada qsp.	1000 ml	

- Dissolver 238,3g de Hepes em 700ml de H₂O destilada.
- Ajustar o pH para 7,3 com NaOH (Merck 6498) 10M.
- Completar o volume para 1000ml com H₂O destilada.
- Esterilizar por autoclavagem (20min/120°C/1atm).
- Armazenar a temperatura de 4°C.

3.13.3 Azul de *trypan* 0,16g%

Azul de <i>trypan</i>	0,16g	(Sigma T 0776)
Azida sódica	0,02g	
PBS qsp.	100ml	

- Homogeneizar.
- Filtrar em papel de filtro quantitativo faixa preta (Reagen R41).
- Armazenar a temperatura de 4°C.

3.13.4 Azul de *trypan* 1g%

Azul de <i>trypan</i>	1g	(Sigma T 0776)
PBS qsp.	100ml	

- Homogeneizar.
- Filtrar em papel de filtro quantitativo faixa preta (Reagen R41).
- Armazenar a temperatura de 4°C.

3.13.5 EDTA dissódico 2g%

EDTA dissódico	2g	(Titriplex III, Merck 8418)
PBS q.s.p.	100ml	

- Homogeneizar.
- Armazenar a temperatura de 4°C.

3.13.6 Solução salina balanceada (PBS) 10X

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	26,35g	(Merck 6579)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,58g	(Merck 6346)
NaCl	79,05g	(Merck 6498)
H_2O destilada qsp.	1000ml	

- Homogeneizar.
- Armazenar a temperatura ambiente.

3.13.7 Solução salina balanceada (PBS) 1X

- Diluir 100ml de PBS 10X em 900ml de H_2O destilada.
- Ajustar o pH para 7,2 a 7,4 com bicarbonato de sódio.
- Armazenar a temperatura de 4°C.

3.13.8 *Pool* de soros de coelho como fonte de complemento

A coleta de sangue foi realizada na Cooperativa Paranaense de Criadores de Coelho (Cooper Coelho), em Campina Grande do Sul , PR. Foram coletadas amostras de sangue de

100 coelhos durante o abate dos mesmos. O *pool* de soros foi obtido de acordo com os seguintes passos:

- Manter os tubos contendo sangue de coelho, à medida que são coletados, a temperatura de 4°C (gelo moído), até o momento de processá-los no laboratório.
- Centrifugar todos os tubos a 1500 rpm durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C.
- Coletar o soro de cada um dos tubos e transferir para um único frasco, de 5 litros de capacidade, tipo Erlenmeyer. Misturar o *pool* de soros, com auxílio de um agitador magnético.
- Aliquotar em volumes adequados para uso diário. A alíquotagem deve ser executada com rapidez, e tanto o recipiente contendo o *pool* como os frascos para as alíquotas devem estar submersos em gelo. Transferir as alíquotas imediatamente para um freezer a -20°C durante 1 hora, para solidificar. Logo após transferi-las para um freezer -80°C ou tanque de nitrogênio líquido.

Observações: Após o descongelamento, o complemento deve ser utilizado imediatamente ou mantido a temperatura de 4°C, sem diluições, por um máximo de 8 horas. O complemento excedente deve ser descartado. O lote de complemento após ter sido processado e congelado, deve ser testado para sua atividade citotóxica e para a determinação de seu título, segundo o procedimento descrito no *ASHI Laboratory Manual* (Tardif, 1990).

3.13.9 Soro bovino fetal

- O lote de soro bovino fetal (SBF), adquirido comercialmente deve ser testado para citotoxicidade.

- Separar o SBF em alíquotas de volume adequado para uso diário.
- Incubar os frascos contendo as alíquotas em banho-maria a 56°C durante 30 minutos para inativação das proteínas do sistema complemento.
- Deixar esfriar e armazenar em freezer a -20°C.

3.13.10 Tampão hemolítico

NH ₄ Cl	8,3g	
NaHCO ₃	1,0g	
EDTA dissódico	0,04g	(Titriplex III - Merck 8418)
H ₂ O q.s.p.	1000ml	

- Homogeneizar.
- Armazenar a temperatura de 4°C.

3.13.11 Preparo do *pool* de plaquetas

- Juntar em um frasco Erlenmeyer grande o conteúdo referente a 200 bolsas contendo unidades de plaquetas.
- Adicionar solução de EDTA a 5% em solução fisiológica, pH 7,5, em quantidade equivalente a 10% do volume total de plaquetas.
- Homogeneizar e distribuir em tubos de centrifuga (maior tamanho disponível).
- Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos. Utilizar centrífuga refrigerada a 4°C. Recuperar o sobrenadante rico em plaquetas e desprezar o sedimento. Repetir esta etapa por mais 2 vezes.

- Após recuperar o sobrenadante, carregar a câmara de Neubauer e levar ao microscópio ótico comum, para certificar-se de que não existem glóbulos brancos contaminantes.
- Centrifugar a 3600 rpm por 20 minutos. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em solução fisiológica.
- Centrifugar novamente a 3600 rpm por 20 minutos. Repetir esta etapa de lavagem por mais 2 vezes.
- Se houver presença de hemácias, ressuspender o sedimento em tampão hemolítico e incubar em banho-maria a 37°C por 3 minutos.
Centrifugar a 3600 rpm por 20 minutos. Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender em solução fisiológica para mais uma etapa de lavagem.
- Centrifugar a 3600 rpm por 20 minutos. Descartar o sobrenadante .
- Ressuspender todos os botões de plaquetas em solução fisiológica. Juntar o conteúdo de todos os tubos e completar com solução fisiológica para um volume final correspondente a 10% - 20% do volume inicial (resultante da mistura de todas as unidades de plaquetas).
Adicionar quantidade adequada de solução de azida sódica para obter uma concentração final de 0,1%.

3.13.12 Adsorção de soros anti-HLA com um *pool* de plaquetas

- Colocar 1 ml do *pool* de plaquetas, após tê-lo homogeneizado bem, em um tubo de microcentrífuga (tipo *eppendorf*).
- Centrifugar a 15000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga.

- Remover o sobrenadante com auxílio de uma microseringa acoplada a um dispensador (tipo *Hamilton*). Com auxílio de uma tira de papel filtro secar as paredes internas do microtubo, para remover todo o sobrenadante e evitar a diluição do soro .
- Colocar o soro a ser adsorvido em volume igual ao do botão de plaquetas.
- Homogeneizar bem e incubar a temperatura de 22°C por 30 minutos. Agitar o microtubo a cada intervalo de 10 minutos para garantir uma boa adsorção.
- Centrifugar a 15000 rpm por 30 minutos. Recuperar o soro adsorvido e armazená-lo em freezer -80°C.

Observação: O número de adsorções deve ser proporcional ao título de anticorpos de cada antisoro. Realizar adsorções seqüenciais, quantas vezes forem necessárias até que sejam eliminados todos os anticorpos anti-HLA de classe I, de acordo com o procedimento descrito acima.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.14.1 Análise de associação (caso - controle) em amostras populacionais

A frequência antigênica, de cada especificidade HLA testada, foi calculada pela simples divisão do número de indivíduos portadores de determinada especificidade pelo número total de indivíduos analisados em cada grupo. As frequências antigênicas dos dois grupos de pacientes (os afetados pela forma cutânea e aqueles afetados pela forma mucocutânea de LTA) assim como do terceiro grupo, constituído de pacientes afetados pelas

duas formas desta doença, foram comparadas às frequências antigênicas do grupo de controles saudáveis.

Os dados foram organizados em tabelas de contingência 2 x 2 para a realização da análise estatística, e a significância avaliada pelo teste do qui-quadrado, sendo empregada a correção de Yates quando necessário.

Foi aplicada a correção de *Bonferroni* para os valores de p (probabilidade) inferiores a 0,05; sendo o número de variáveis independentes analisadas igual a 52 para antígenos HLA de classe I e igual a 18 para os antígenos HLA de classe II. As correções foram feitas separadamente, para as especificidades de classe I e de classe II, porque a primeira hipótese do presente estudo refere-se à associação de HLA-DQ3 tanto com LCL quanto com LMC, e a segunda hipótese refere-se à associação de HLA-DQ3 apenas com LMC.

3.14.2 Análise de associação (co-segregação) em amostras de irmandades com múltiplos casos

Com a finalidade de averiguar a possibilidade de co-segregação de genes de predisposição à LTA eventualmente localizados no CPH ou ligados a este, foi analisada a segregação de haplotipos HLA em 15 irmandades. A seleção das famílias incluídas neste estudo baseou-se apenas no critério da existência de, no mínimo, dois irmãos afetados pela LTA. A análise estatística foi realizada pelo método dos irmãos para famílias com múltiplos casos, descrito por Green e Woodrow (1977), que consiste na comparação entre os números observados de haplotipos HLA compartilhados entre os irmãos afetados com o número esperado sob a hipótese nula de segregação independente do CPH e os supostos genes de suscetibilidade. Se numa irmandade de dois indivíduos afetados um certo haplotipo HLA é

herdado por ambos irmãos, é conferido o escore 1 referente a 1 repetição. Portanto, uma irmandade constituída por dois indivíduos pode apresentar 0, 1 ou 2 repetições. Para irmandades constituídas por mais de dois indivíduos afetados, em que um certo haplotipo HLA é herdado por n indivíduos, o escore é $(n - 1)$ repetições. Deve-se obter a média utilizando-se a fórmula $(2s - 4 + 2^{-s+2})$ e a variância $2^{-s+2} (1 - 2^{-s+1})$ para o total de haplotipos herdados de ambos os pais, onde s refere-se ao número de irmãos afetados por família. Para r grupos de s irmãos a média e a variância do escore total são $r(2s - 4 + 2^{-s+2})$ e $r 2^{-s+2} (1 - 2^{-s+1})$, respectivamente. As somas das médias e das variâncias de todos os r grupos de s irmãos sob a hipótese nula, são designadas μ e σ^2 , respectivamente. A distribuição de T , que é igual a $(S - \mu) / \sigma$, é aproximadamente a de uma variável normal padrão, onde S é o número total de escores obtidos de todas as famílias analisadas. O cálculo do valor de T foi modificado para $(S - 0,5 - \mu) / \sigma$, com o objetivo de corrigir a continuidade. A probabilidade é $1 - \phi$, onde ϕ representa a integral normal padrão, baseado no valor de T .

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE ANTÍGENOS HLA E LTA EM AMOSTRA POPULACIONAL (CASO - CONTROLE)

Os pacientes analisados neste estudo foram separados em grupos de acordo com a forma de manifestação da doença: o primeiro grupo reuniu todos os pacientes afetados por leishmaniose tegumentar americana (LTA), tanto os que apresentavam a forma cutânea como a mucocutânea; o segundo grupo foi constituído de pacientes afetados por leishmaniose cutânea localizada (LCL) e o terceiro grupo, por pacientes afetados por leishmaniose mucocutânea (LMC).

Com relação ao grupo total de pacientes afetados pela LTA e controles, a distribuição das frequências antigênicas HLA-A, C e B está demonstrada nas Tabelas 8a e 8b, e de HLA-DR e DQ na Tabela 8c. A comparação das frequências antigênicas de classes I e II, entre pacientes e controles, demonstrou não haver diferenças significantes. As diferenças entre as frequências de B15, B62, B60, Cw3, DR4, DR52 e DR53 foram não significantes após a correção dos valores de p . Os resultados da análise do subgrupo de brancos para as especificidades HLA de classe I (Tabelas 9a e 9b) e de classe II (Tabela 9c) foram similares aos encontrados no grupo total. As diferenças entre as frequências para B44, B15, B39, B60, Cw3 e DR52 foram não significantes após a correção dos valores de p . O subgrupo de não brancos não foi analisado, devido ao pequeno número de pacientes e controles.

A distribuição das frequências antigênicas HLA-A, C e B determinadas nos pacientes afetados pela LCL e controles está demonstrada nas Tabelas 10a e 10b, e das especificidades HLA-DR e DQ na Tabela 10c. As frequências dos antígenos de classes I e II analisados não

diferiu significativamente entre pacientes e controles. As diferenças entre as frequências de A3, B15, B62, B35, Cw4 e DR52 não foram significantes após a correção dos valores de p . Quando o subgrupo constituído apenas pelos pacientes e controles da raça branca foi comparado para os antígenos de classe I (Tabelas 11a e 11b) e de classe II (Tabela 11c), o resultado foi similar ao encontrado para o grupo total; e as diferenças entre as frequências de B44, B62, B38, B39, B27, B35, Bw4, Cw3, Cw4, DR6, DR10 e DR52 foram não significantes após a aplicação da correção de "Bonferroni" aos valores de p . Dado o pequeno número de indivíduos no subgrupo de não brancos, a análise estatística não foi realizada porque os resultados não seriam confiáveis.

O terceiro grupo de pacientes, afetados por LMC, e controles tem a distribuição dos antígenos HLA de classe I e de classe II apresentada nas Tabelas 12a, 12b e 12c. As diferenças entre as frequências de B18 e Cw3 não foram significantes após a correção dos valores de p . A análise entre o subgrupo de pacientes e de controles da raça branca, para os antígenos HLA de classe I (Tabelas 13a e 13b) e de classe II (Tabela 13c), demonstrou um padrão de associação similar àquele obtido para o grupo total. As diferenças entre as frequências de B18 e Cw7 foram não significantes após a correção dos valores de p . O subgrupo de não-brancos não foi analisado devido ao tamanho reduzido da amostra.

Tabela 8a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes afetados por LTA e controles

Especificidade	Pacientes n=93	Controles n=97	p	pc
HLA-A				
A1	12,9	11,3	ns	
A2	48,4	41,3	ns	
A3	15,1	25,8	ns	
A9	30,1	23,7	ns	
A23	10,8	6,2	ns	
A24	19,4	17,5	ns	
A10	14,0	12,4	ns	
A25	4,3	4,1	ns	
A26	9,8	4,1	ns	
A34	0	4,1	ns	
A11	6,5	11,3	ns	
A19	44,1	50,5	ns	
A29	7,5	9,3	ns	
A30	14,0	8,3	ns	
A31	8,6	11,3	ns	
A32	8,6	12,4	ns	
A33	5,4	9,3	ns	
A28	7,5	9,3	ns	
HLA-C				
	n=91	n=97		
Cw1	6,6	6,2	ns	
Cw2	17,6	12,4	ns	
Cw3	12,1	24,7	0,026	ns
Cw4	37,4	25,8	ns	
Cw5	7,7	4,1	ns	
Cw6	7,7	15,5	ns	
Cw7	16,5	20,6	ns	
Cw8	a3,4	a8,8	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para Cw8 = 88 pacientes e 80 controles

Tabela 8b. Distribuição das freqüências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes afetados por LTA e controles

Especificidade HLA	Pacientes n=93	Controles n=97	p	pc
B5	15,1	18,6	ns	
B51	12,9	13,4	ns	
B52	2,2	5,2	ns	
B7	10,8	18,6	ns	
B8	12,9	7,2	ns	
B12	25,8	19,6	ns	
B44	24,7	14,4	ns	
B45	1,1	5,2	ns	
B13	2,2	2,1	ns	
B14	9,7	10,3	ns	
B15	4,3	14,4	0,017	ns
B62	3,2	11,3	0,032	ns
B63	1,1	3,1	ns	
B16	9,7	14,4	ns	
B38	4,3	1,0	ns	
B39	5,4	13,4	ns	
B17	9,7	7,2	ns	
B57	5,4	6,2	ns	
B58	4,3	1,0	ns	
B18	15,1	7,2	ns	
B21	7,5	8,3	ns	
B49	5,4	4,1	ns	
B50	2,2	4,1	ns	
B22	1,1	4,1	ns	
B22 não 55	0	1,0	ns	
B55	1,1	3,1	ns	
B27	7,5	5,2	ns	
B35	25,8	17,5	ns	
B37	1,1	3,1	ns	
B40	8,6	12,4	ns	
B60	3,2	11,3	0,032	ns
B61	5,4	1,0	ns	
B41	5,4	2,1	ns	
B42	4,3	3,1	ns	
B53	5,4	7,2	ns	
Bw4	62,4	54,6	ns	
Bw6	80,7	86,6	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

Tabela 8c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes afetados por LTA e controles

Especificidade	Pacientes n=88	Controles n=86	p	pc
HLA-DR				
DR1	12,5	5,8	ns	
DR2	27,3	30,2	ns	
DR15	^a 14,0	^a 21,3	ns	
DR16	^a 14,0	^a 11,5	ns	
DR3	20,5	17,4	ns	
DR17	^a 18,6	^a 14,8	ns	
DR18	^a 1,2	^a 0	ns	
DR4	14,8	27,9	0,034	ns
DR5	33,0	24,4	ns	
DR11	30,7	24,4	ns	
DR12	2,3	0	ns	
DR6	37,5	26,7	ns	
DR7	19,3	24,4	ns	
DR8	11,4	9,3	ns	
DR9	2,3	5,8	ns	
DR10	6,8	9,3	ns	
DR52	80,7	66,3	0,031	ns
DR53	33,7	48,8	0,042	ns
HLA-DQ				
	n = 89	n = 86		
DQ1	68,5	68,6	ns	
DQ2	39,3	37,2	ns	
DQ3	55,1	53,5	ns	
DQ3 não 7	^b 10,2	18,6	ns	
DQ7	^b 44,3	34,9	ns	
DQ4	12,4	9,3	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para DR15, DR16, DR17 e DR18 = 86 pacientes e 61 controles

^b número de pacientes analisados para DQ3 não 7 e DQ7 = 88

Tabela 9a. Distribuição das freqüências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes brancos afetados por LTA e controles brancos

Especificidade	Pacientes n=64	Controles n=66	p	pc
HLA-A				
A1	10,9	15,2	ns	
A2	51,6	47,0	ns	
A3	14,1	25,8	ns	
A9	29,7	19,7	ns	
A23	9,4	1,5	ns	
A24	20,3	18,2	ns	
A10	17,2	13,6	ns	
A25	6,3	6,1	ns	
A26	10,9	4,6	ns	
A34	0	3,0	ns	
A11	6,3	12,1	ns	
A19	42,2	42,4	ns	
A29	7,8	7,6	ns	
A30	7,8	4,6	ns	
A31	10,9	10,6	ns	
A32	9,4	10,6	ns	
A33	6,3	9,1	ns	
A28	7,8	9,1	ns	
HLA-C				
	n=62	n=66		
Cw1	8,1	3,0	ns	
Cw2	22,6	13,6	ns	
Cw3	9,7	27,3	0,011	ns
Cw4	30,6	21,2	ns	
Cw5	8,1	4,6	ns	
Cw6	4,8	15,2	ns	
Cw7	19,4	18,2	ns	
Cw8	b3,3	b11,8	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para Cw8 = 61 pacientes e 51 controles

Tabela 9b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes brancos afetados por LTA e controles brancos

Especificidade HLA	Pacientes n=64	Controles n=66	p	pc
B5	17,2	21,2	ns	
B51	14,1	13,6	ns	
B52	3,1	7,6	ns	
B7	12,5	16,7	ns	
B8	14,1	10,6	ns	
B12	28,1	16,7	ns	
B44	28,1	12,1	0,023	ns
B45	0	4,6	ns	
B13	3,1	1,5	ns	
B14	12,5	10,6	ns	
B15	4,7	15,2	0,047	ns
B62	3,1	12,1	ns	
B63	1,6	3,0	ns	
B16	9,4	16,7	ns	
B38	6,3	0	ns	
B39	3,1	16,7	0,010	ns
B17	7,8	7,6	ns	
B57	3,1	7,6	ns	
B58	4,7	0	ns	
B18	18,8	9,1	ns	
B21	6,3	9,1	ns	
B49	6,3	4,6	ns	
B50	0	4,6	ns	
B22	1,6	6,1	ns	
B22 não 55	0	1,5	ns	
B55	1,6	4,6	ns	
B27	9,4	3,0	ns	
B35	23,4	13,6	ns	
B37	1,6	4,6	ns	
B40	9,4	13,6	ns	
B60	1,6	12,1	0,043	ns
B61	7,8	1,5	ns	
B41	1,6	1,5	ns	
B42	0	1,5	ns	
B53	3,1	1,5	ns	
Bw4	67,2	51,5	ns	
Bw6	76,6	89,4	ns	

p = probabilidade
pc = probabilidade corrigida
ns = não significante

Tabela 9c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes brancos afetados por LTA e controles brancos

Especificidade HLA	Pacientes n=61	Controles n=60	p	pc
DR1	9,8	8,3	ns	
DR2	24,6	23,3	ns	
DR15	^a 11,7	^a 12,5	ns	
DR16	^a 13,3	^a 12,5	ns	
DR3	19,7	18,3	ns	
DR17	^a 18,3	^a 17,5	ns	
DR18	^a 0	^a 0		
DR4	18,0	31,7	ns	
DR5	39,3	28,3	ns	
DR11	36,1	28,3	ns	
DR12	3,3	0	ns	
DR6	39,3	23,3	ns	
DR7	14,8	21,7	ns	
DR8	11,5	8,3	ns	
DR9	0	5,0	ns	
DR10	6,6	13,3	ns	
DR52	82,0	65,0	0,034	ns
DR53	30,6	46,7	ns	
HLA-DQ	n = 62	n = 60		
DQ1	66,1	66,7	ns	
DQ2	33,9	33,3	ns	
DQ3	62,9	60,0	ns	
DQ3 não 7	^b 9,8	20,0	ns	
DQ7	^b 50,8	40,0	ns	
DQ4	11,3	11,7	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para DR15, DR16, DR17 e DR 18 = 60 pacientes e 40 controles

^b número de pacientes analisados para DQ3 não 7 e DQ 7 = 61

Tabela 10a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes afetados por LCL e controles

Especificidade	Pacientes n=62	Controles n= 97	p	pc
HLA-A				
A1	9,7	11,3	ns	ns
A2	48,4	41,2	ns	
A3	11,3	25,8	0,026	
A9	32,3	23,7	ns	
A23	11,3	6,2	ns	
A24	21,0	17,5	ns	
A10	12,9	12,4	ns	
A25	3,2	4,1	ns	
A26	9,7	4,1	ns	
A34	0	4,1	ns	
A11	9,7	11,3	ns	
A19	50,0	50,5	ns	
A29	8,1	9,3	ns	
A30	14,5	8,3	ns	
A31	11,3	11,3	ns	
A32	12,9	12,4	ns	
A33	3,2	9,3	ns	
A28	6,5	9,3	ns	
HLA-C				
Cw1	9,7	6,2	ns	ns
Cw2	19,4	12,4	ns	
Cw3	14,5	24,7	ns	
Cw4	43,6	25,8	0,020	
Cw5	8,1	4,1	ns	
Cw6	6,5	15,5	ns	
Cw7	11,3	20,6	ns	
Cw8	a1,7	a8,8	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para Cw8 = 59 pacientes e 80 controles

Tabela 10b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes afetados por LCL e controles

Especificidade HLA	Pacientes n=62	Controles n=97	p	pc
B5	17,7	18,6	ns	
B51	16,1	13,4	ns	
B52	1,6	5,2	ns	
B7	9,7	18,6	ns	
B8	11,3	7,2	ns	
B12	27,4	19,6	ns	
B44	25,8	14,4	ns	
B45	1,6	5,2	ns	
B13	3,2	2,1	ns	
B14	6,4	10,3	ns	
B15	3,2	14,4	0,022	ns
B62	1,6	11,3	0,050	ns
B63	1,6	3,1	ns	
B16	11,3	14,4	ns	
B38	6,5	1,0	ns	
B39	4,8	13,4	ns	
B17	6,5	7,2	ns	
B57	3,2	6,2	ns	
B58	3,2	1,0	ns	
B18	9,7	7,2	ns	
B21	4,8	8,3	ns	
B49	4,8	4,1	ns	
B50	0	4,1	ns	
B22	0	4,1	ns	
B22 não 55	0	1,0	ns	
B55	0	3,1	ns	
B27	12,9	5,2	ns	
B35	32,3	17,5	0,032	ns
B37	0	3,1	ns	
B40	8,1	12,4	ns	
B60	4,8	11,3	ns	
B61	3,2	1,0	ns	
B41	3,2	2,1	ns	
B42	4,8	3,1	ns	
B53	8,1	7,2	ns	
Bw4	69,4	54,6	ns	
Bw6	80,7	86,6	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante.

Tabela 10c. Distribuição das freqüências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes afetados por LCL e controles

Especificidade	Pacientes n=57	Controles n=86	p	pc
HLA-DR				
DR1	14,0	5,8	ns	
DR2	31,6	30,2	ns	
DR15	^a 14,8	^a 21,3	ns	
DR16	^a 18,5	^a 11,5	ns	
DR3	17,5	17,4	ns	
DR17	^a 14,8	^a 14,8	ns	
DR18	^a 0	^a 0	0	
DR4	17,5	27,9	ns	
DR5	28,1	24,4	ns	
DR11	24,6	24,4	ns	
DR12	3,5	0	ns	
DR6	40,4	26,7	ns	
DR7	15,8	24,4	ns	
DR8	12,3	9,3	n	
DR9	1,8	5,8	ns	
DR10	3,5	9,3	ns	
DR52	82,5	66,3	0,033	ns
DR53	32,8	48,9	ns	
HLA-DQ				
	n = 58	n = 86		
DQ1	67,3	68,6	ns	
DQ2	34,5	37,2	ns	
DQ3	55,2	53,5	ns	
DQ3 não 7	10,3	18,6	ns	
DQ7	44,8	34,9	ns	
DQ4	12,1	9,3	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para DR 15, 16, 17 e 18 = 54 pacientes e 61 controles

Tabela 11a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes brancos afetados por LCL e controles brancos

Especificidade	Pacientes n=42	Controles n=66	p	pc
HLA-A				
A1	9,5	15,2	ns	
A2	52,4	47,0	ns	
A3	11,9	25,8	ns	
A9	31,0	19,7	ns	
A23	11,9	1,5	ns	
A24	19,1	18,2	ns	
A10	14,3	13,6	ns	
A25	4,8	6,1	ns	
A26	9,5	4,6	ns	
A34	0	3,0	ns	
A11	9,5	12,1	ns	
A19	50,0	42,4	ns	
A29	9,5	7,6	ns	
A30	9,5	4,6	ns	
A31	14,3	10,6	ns	
A32	14,3	10,6	ns	
A33	2,4	9,1	ns	
A28	4,8	9,1	ns	
HLA-C				
Cw1	11,9	3,0	ns	
Cw2	28,6	13,6	ns	
Cw3	9,5	27,3	0,026	ns
Cw4	40,5	21,2	0,031	ns
Cw5	9,5	4,6	ns	
Cw6	7,1	15,2	ns	
Cw7	9,5	18,2	ns	
Cw8	^a 2,4	^a 11,8	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para Cw8 = 41 pacientes e 51 controles

Tabela 11b. Distribuição das freqüências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes brancos afetados por LCL e controles brancos

Especificidade HLA	Pacientes n=42	Controles n=66	p	pc
B5	19,1	21,2	ns	
B51	16,7	13,6	ns	
B52	2,4	7,6	ns	
B7	11,9	16,7	ns	
B8	9,5	10,6	ns	
B12	31,0	16,7	ns	
B44	31,0	12,1	0,031	ns
B45	0	4,6	ns	
B13	4,8	1,5	ns	
B14	9,5	10,6	ns	
B15	2,4	15,2	ns	
B62	0	12,1	0,049	ns
B63	2,4	3,0	ns	
B16	11,9	16,7	ns	
B38	9,5	0	0,042	ns
B39	2,4	16,7	0,047	ns
B17	4,8	7,6	ns	
B57	2,4	7,6	ns	
B58	2,4	0	ns	
B18	11,9	9,1	ns	
B21	4,8	9,1	ns	
B49	4,8	4,6	ns	
B50	0	4,6	ns	
B22	0	6,1	ns	
B22 não 55	0	1,5	ns	
B55	0	4,6	ns	
B27	16,7	3,0	0,032	ns
B35	31,0	13,6	0,053	ns
B37	0	4,6	ns	
B40	7,1	13,6	ns	
B60	2,4	12,1	ns	
B61	4,8	1,5	ns	
B41	0	1,5	ns	
B42	0	1,5	ns	
B53	4,8	1,5	ns	
Bw4	76,2	51,5	0,010	ns
Bw6	76,2	89,4	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

Tabela 11c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes brancos afetados por LCL e controles brancos

Especificidade	Pacientes n=38	Controles n=60	p	pc
HLA-DR				
DR1	10,5	8,3	ns	
DR2	26,3	23,3	ns	
DR15	^a 10,8	^a 12,5	ns	
DR16	^a 16,2	^a 12,5	ns	
DR3	15,8	18,3	ns	
DR17	^a 13,5	^a 17,5	ns	
DR18	^a 0	^a 0		
DR4	21,1	31,7	ns	
DR5	31,6	28,3	ns	
DR11	26,3	28,3	ns	
DR12	5,3	0	ns	
DR6	44,7	23,3	0,026	ns
DR7	15,8	21,7	ns	
DR8	13,1	8,3	ns	
DR9	0	5,0	ns	
DR10	0	13,3	0,049	ns
DR52	84,2	65,0	0,038	ns
DR53	33,3	46,7	ns	
HLA-DQ				
	n = 39	n = 60		
DQ1	66,7	66,7	ns	
DQ2	30,8	33,3	ns	
DQ3	56,4	60,0	ns	
DQ3 não 7	10,3	20,0	ns	
DQ7	46,2	40,0	ns	
DQ4	12,8	11,7	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para DR15, DR16, DR17 e DR18 = 37 pacientes e 40 controles

Tabela 12a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes afetados por LMC e controles

Especificidade	Pacientes n=36	Controles n=96	p	pc
HLA-A				
A1	16,7	11,5	ns	
A2	44,4	41,7	ns	
A3	19,4	26,0	ns	
A9	27,8	24,0	ns	
A23	11,1	6,3	ns	
A24	16,7	17,7	ns	
A10	13,9	12,5	ns	
A25	5,6	4,2	ns	
A26	8,3	4,2	ns	
A34	0	4,2	ns	
A11	2,8	11,5	ns	
A19	41,7	50,0	ns	
A29	5,6	8,3	ns	
A30	19,4	8,3	ns	
A31	5,6	11,5	ns	
A32	2,8	12,5	ns	
A33	8,3	9,4	ns	
A28	8,3	8,3	ns	
HLA-C				
	n=34	n=96		
Cw1	5,9	6,3	ns	
Cw2	14,7	12,5	ns	
Cw3	5,9	25,0	0,017	ns
Cw4	20,6	25,0	ns	
Cw5	5,9	4,2	ns	
Cw6	8,8	15,6	ns	
Cw7	29,4	20,8	ns	
Cw8	a9,1	a8,9	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de indivíduos analisados para Cw8 = 33 pacientes e 79 controles

Tabela 12b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes afetados por LMC e controles

Especificidade HLA	Pacientes n=36	Controles n=96	p	pc
B5	11,1	17,7	ns	
B51	8,3	12,5	ns	
B52	2,8	5,2	ns	
B7	13,9	18,8	ns	
B8	19,4	7,3	ns	
B12	22,2	19,8	ns	
B44	22,2	14,6	ns	
B45	0	5,2	ns	
B13	0	2,1	ns	
B14	13,9	10,4	ns	
B15	5,6	14,6	ns	
B62	5,6	11,5	ns	
B63	0	3,1	ns	
B16	5,6	14,6	ns	
B38	0	1,0	ns	
B39	5,6	13,5	ns	
B17	13,9	7,3	ns	
B57	8,3	6,3	ns	
B58	5,6	1,0	ns	
B18	25,0	7,3	0,013	ns
B21	13,9	8,3	ns	
B49	8,3	4,2	ns	
B50	5,6	4,2	ns	
B22	2,8	4,2	ns	
B22 não 55	0	1,0	ns	
B55	2,8	3,1	ns	
B27	0	5,2	ns	
B35	11,1	17,7	ns	
B37	2,8	3,1	ns	
B40	8,3	12,5	ns	
B60	0	11,5	ns	
B61	8,3	1,0	ns	
B41	8,3	2,1	ns	
B42	2,8	3,1	ns	
B53	0	6,3	ns	
Bw4	52,8	54,2	ns	
Bw6	83,3	87,5	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns=não significante

Tabela 12c. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes afetados por LMC e controles

Especificidade	Pacientes n=36	Controles n=85	p	pc
HLA-DR				
DR1	11,1	5,9	ns	
DR2	16,7	30,6	ns	
DR15	11,1	^a 21,3	ns	
DR16	5,6	^a 11,5	ns	
DR3	27,8	16,5	ns	
DR17	25,0	^a 14,8	ns	
DR18	2,8	^a 0	ns	
DR4	13,9	28,2	ns	
DR5	38,9	24,7	ns	
DR11	38,9	24,7	ns	
DR12	0	0	0	
DR6	36,1	25,9	ns	
DR7	22,2	24,7	ns	
DR8	8,3	9,4	ns	
DR9	2,8	5,9	ns	
DR10	1,1	9,4	ns	
DR52	77,8	65,9	ns	
DR53	36,1	49,4	ns	
HLA-DQ				
DQ1	69,4	68,2	ns	
DQ2	47,2	36,5	ns	
DQ3	52,8	54,1	ns	
DQ3 não 7	^b 11,4	18,8	ns	
DQ7	^b 40,0	35,3	ns	
DQ4	11,1	9,4	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a número de controles analisados para DR15, DR16, DR17 e DR18 = 61

^b número de pacientes analisados para DQ3 não 7 e DQ7 = 35

Tabela 13a. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-A e C em pacientes brancos afetados por LMC e controles brancos

Especificidade	Pacientes n=25	Controles n=66	p	pc
HLA-A				
A1	12,0	15,2	ns	
A2	48,0	47,0	ns	
A3	16,0	25,8	ns	
A9	32,0	19,7	ns	
A23	8,0	1,5	ns	
A24	24,0	18,2	ns	
A10	20,0	13,6	ns	
A25	8,0	6,1	ns	
A26	12,0	4,6	ns	
A34	0	3,0	ns	
A11	4,0	12,1	ns	
A19	32,0	42,4	ns	
A29	4,0	7,6	ns	
A30	8,0	4,6	ns	
A31	4,0	10,6	ns	
A32	4,0	10,6	ns	
A33	12,0	9,1	ns	
A28	12,0	9,1	ns	
HLA-C				
	n=23	n=66		
Cw1	8,7	3,0	ns	
Cw2	13,0	13,6	ns	
Cw3	8,7	27,3	ns	
Cw4	8,7	21,2	ns	
Cw5	4,4	4,6	ns	
Cw6	0	15,2	ns	
Cw7	39,1	18,2	0,041	ns
Cw8	8,7	11,8	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

Tabela 13 b. Distribuição das frequências antigênicas (em porcentagem) de HLA-B em pacientes brancos afetados por LMC e controles brancos

Especificidade HLA	Pacientes n=25	Controles n=66	p	pc
B5	12,0	21,2	ns	
B51	8,0	13,6	ns	
B52	4,0	7,6	ns	
B7	16,0	16,7	ns	
B8	20,0	10,6	ns	
B12	24,0	16,7	ns	
B44	24,0	12,1	ns	
B45	0	4,6	ns	
B13	0	1,5	ns	
B14	16,0	10,6	ns	
B15	8,0	15,2	ns	
B62	8,0	12,1	ns	
B63	0	3,0	ns	
B16	4,0	16,7	ns	
B38	0	0		
B39	4,0	16,7	ns	
B17	12,0	7,6	ns	
B57	4,0	7,6	ns	
B58	8,0	0	ns	
B18	28,0	9,1	0,049	ns
B21	12,0	9,1	ns	
B49	12,0	4,6	ns	
B50	0	4,6	ns	
B22	4,0	6,1	ns	
B22 não 55	0	1,5	ns	
B55	4,0	4,6	ns	
B27	0	3,0	ns	
B35	8,0	13,6	ns	
B37	4,0	4,6	ns	
B40	12,0	13,6	ns	
B60	0	12,1	ns	
B61	12,0	1,5	ns	
B41	4,0	1,5	ns	
B42	0	1,5	ns	
B53	0	1,5	ns	
Bw4	56,0	51,5	ns	
Bw6	80,0	89,4	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

Tabela 13 c. Distribuição das freqüências antigênicas (em porcentagem) de HLA-DR e DQ em pacientes brancos afetados por LMC e controles brancos

Especificidade HLA	Pacientes n=26	Controles n=60	p	pc
HLA-DR				
DR1	11,5	8,3	ns	
DR2	19,2	23,3	ns	
DR15	11,5	^a 12,5	ns	
DR16	7,7	^a 12,5	ns	
DR3	23,1	18,3	ns	
DR17	23,1	^a 17,5	ns	
DR18	0	^a 0		
DR4	15,4	31,7	ns	
DR5	50,0	28,3	ns	
DR11	50,0	28,3	ns	
DR12	0	0		
DR6	34,6	23,3	ns	
DR7	11,5	21,7	ns	
DR8	7,7	8,3	ns	
DR9	0	5,0	ns	
DR10	15,4	13,3	ns	
DR52	76,9	65,0	ns	
DR53	26,9	46,7	ns	
HLA-DQ				
DQ1	65,4	66,7	ns	
DQ2	34,6	33,3	ns	
DQ3	65,4	60,0	ns	
DQ3 não 7	^b 8,0	20,0	ns	
DQ7	^b 56,0	40,0	ns	
DQ4	7,7	11,7	ns	

p = probabilidade

pc = probabilidade corrigida

ns = não significante

^a controles analisados para DR15, DR16, DR17 e DR18 = 40

^b pacientes analisados para DQ3 não 7 e DQ7 = 25

4.2 ESTUDO DE CO-SEGREGAÇÃO DE HAPLOTIPOS HLA E LTA

Para a realização deste estudo foram analisadas 7 famílias caucasóides e 8 famílias negróides, sendo que todas apresentavam dois ou mais irmãos afetados. Foram determinados os antígenos HLA de 42 irmãos afetados por LTA, 1 irmão não afetado, 7 pais e 7 mães; e os haplotipos HLA dentro de cada família foram deduzidos com base nos fenótipos HLA disponíveis (Tabelas 14a, 14b e 14c). Os quatro haplotipos parentais puderam ser identificados em 10 famílias, apenas 3 haplotipos parentais em 4 famílias, e somente dois haplotipos parentais em 1 família.

As genealogias dessas famílias e a segregação dos haplotipos HLA estão representadas nas figuras 7a, 7b, 7c e 7d. O indivíduo P100 (família 1) foi excluído da análise pela impossibilidade de determinar se o haplotipo herdado da mãe era parental (*c*) ou recombinante (*cd*) entre os *loci* HLA-A e B. Na família 11, foi excluído o irmão P109 por ter herdado da mãe um haplotipo recombinante entre os *loci* HLA-A e B; e o irmão P120 pelo haplotipo recombinante entre HLA-B e DR, herdado do pai. Os genótipos HLA dos irmãos afetados, que foram incluídos nesta análise, são indicados na Tabela 15. O resultado da análise estatística, de acordo com Green e Woodrow (1977), está representado na Tabela 16. O número observado de haplotipos HLA compartilhados entre os irmãos afetados foi igual a 36, enquanto o número médio esperado foi igual a 34,125. Esta diferença entre observado e esperado não foi estatisticamente significativa ($p = 0,2877$), indicando que não há distorção no padrão de segregação dos haplotipos HLA entre os irmãos portadores de leishmaniose tegumentar americana.

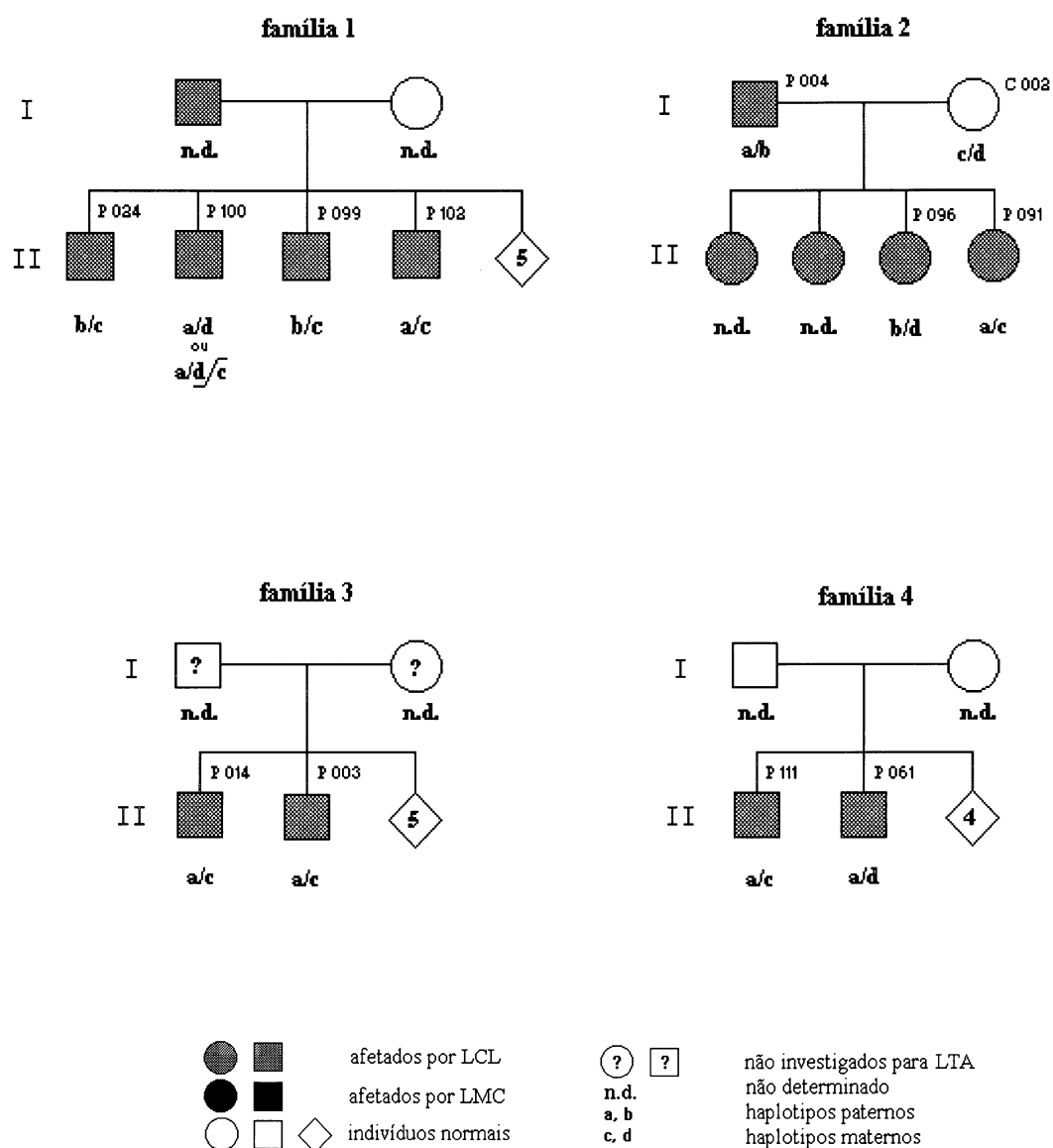


Fig. 7a. Genealogias das famílias de números 1 a 4 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA

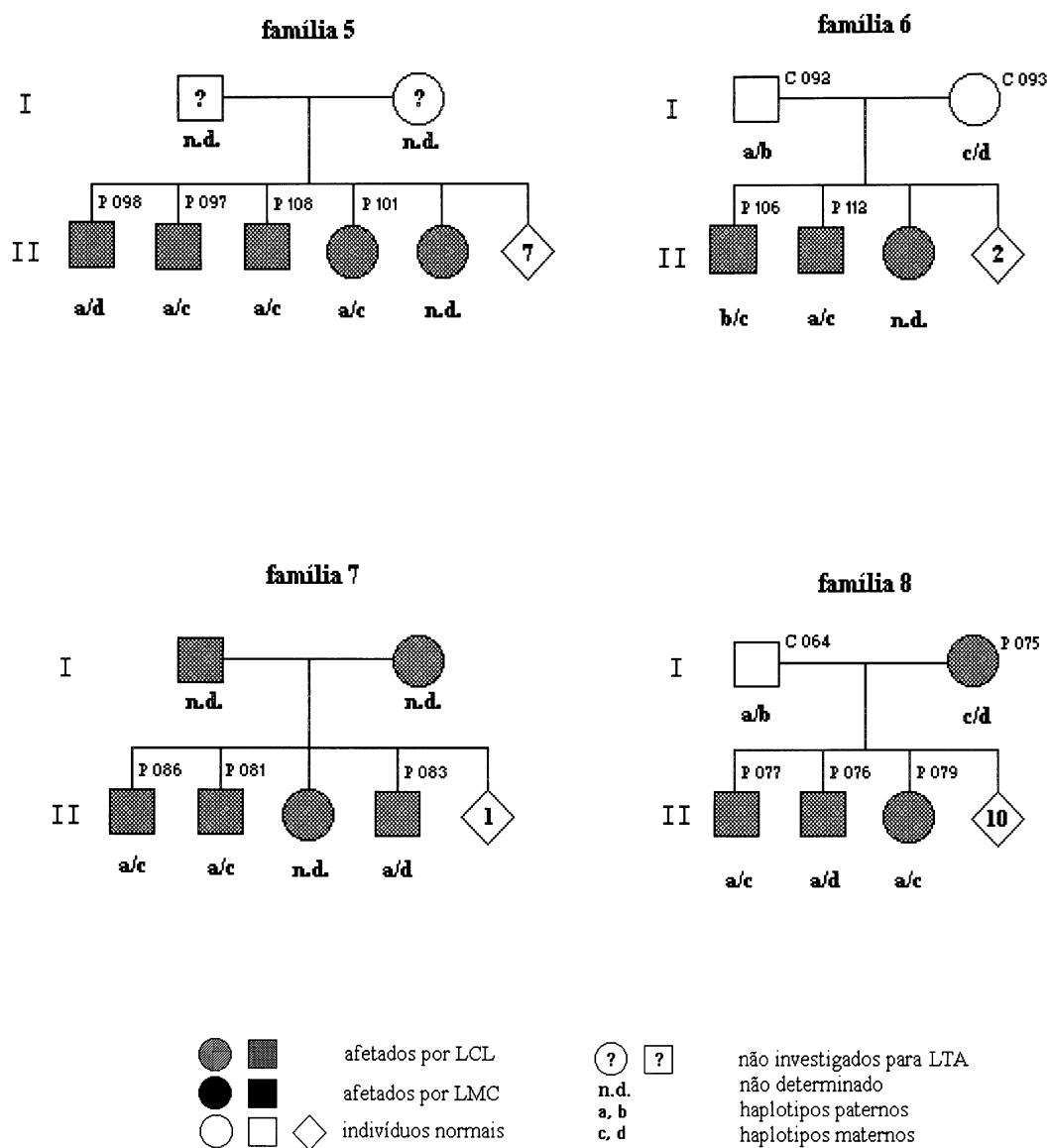


Fig. 7b. Genealogias das famílias de números 5 a 8 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA

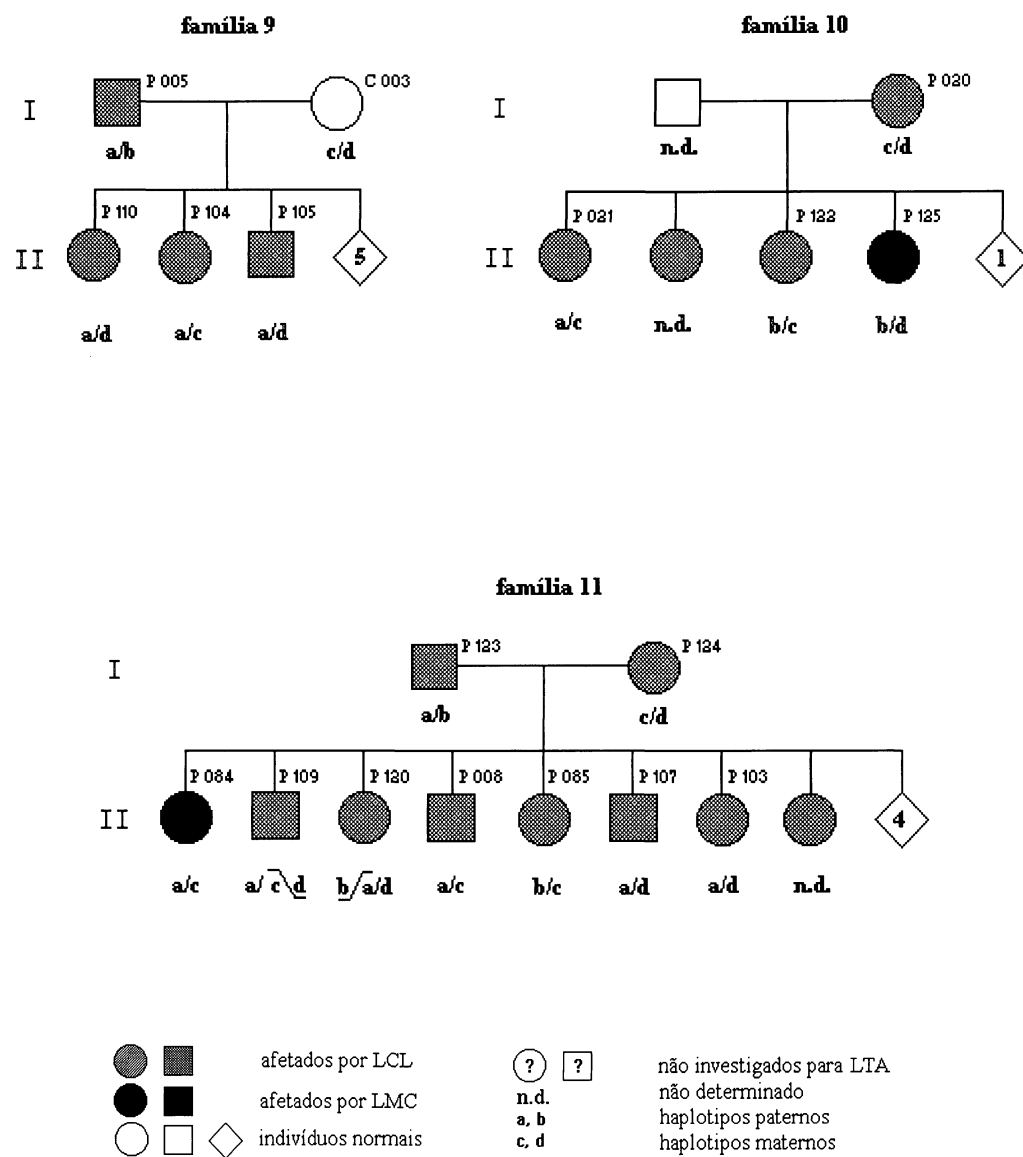


Fig. 7c. Genealogias das famílias de números 9 a 11 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA

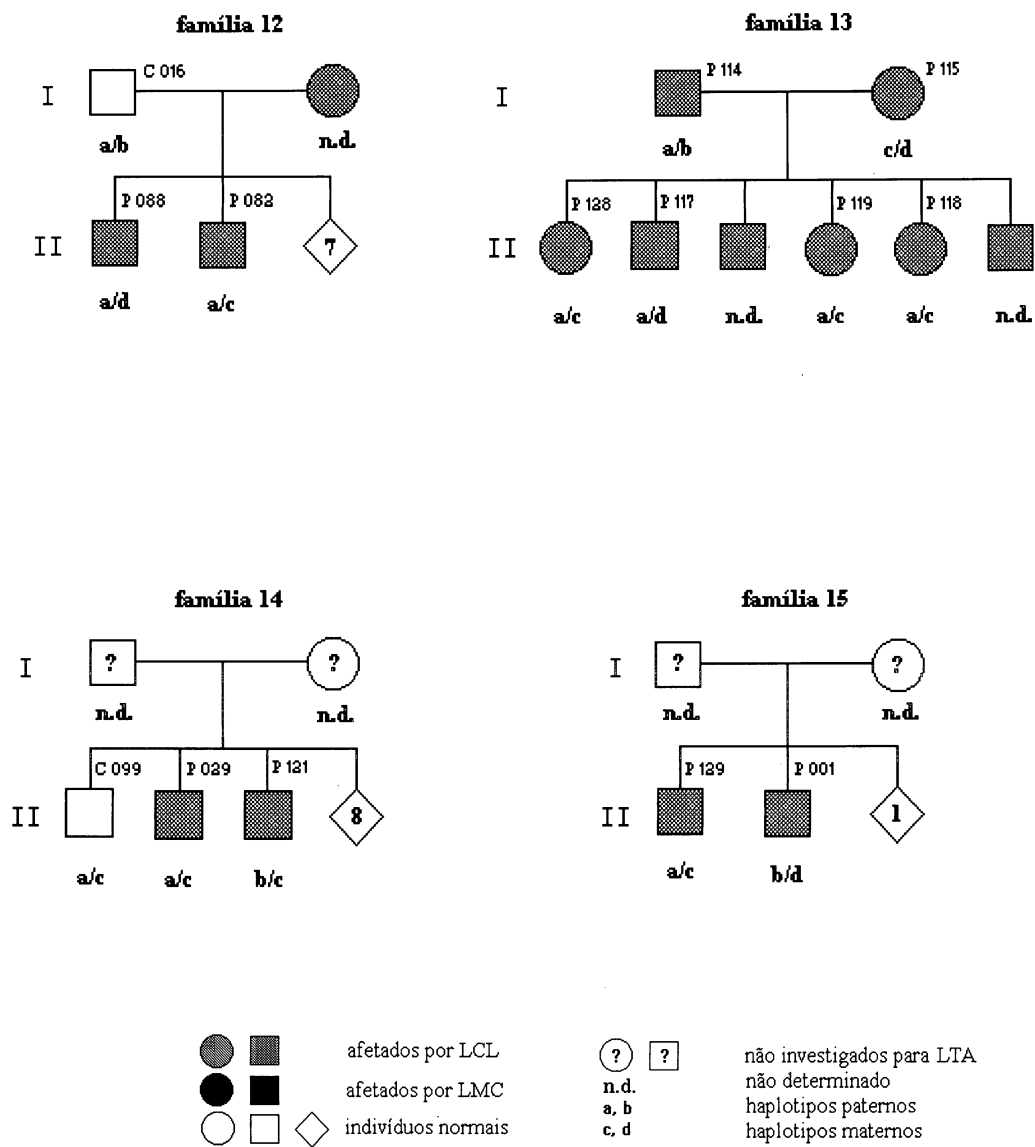


Fig. 7d. Genealogias das famílias de números 12 a 15 analisadas no estudo de co-segregação de haplotipos HLA e LTA

Tabela 14a. Fenótipos e genótipos HLA dos membros das famílias de números 1 a 5 analisadas no estudo de cosegregação de haplotipos HLA e LTA

Indivíduos	Genótipos	Fenótipos HLA					
		A	B	Cw	DR	DR52/53	DQ
Família 1							
P 024	b/c	1, 24	44, 52	5	11, 6	52	1, 7
P 100	a/d ou a/d-c	3, 28	44, 53	4, 5	6, 9	52, 53	1, 2
P 099	b/c	1, 24	44, 52	5	11, 6	52	1, 7
P 102	a/c	1, 3	44, 53	4, 5	6, 9	52, 53	1, 2
Família 2							
P 004	a/b	2, 25	18	3	1, 8	52	1, 4
C 002	c/d	2, 3	7, 60	3, 7	n.d.	n.d.	n.d.
P 096	b/d	2	60	3	6, 8	52	1, 4
P 091	a/c	3, 25	7, 18	3, 7	1, 2		1
Família 3							
P 014	a/c	3, 30	18, 35	4, 5	2, 3	52	1, 2
P 003	a/c	3, 30	18, 35	4, 5	2, 3	52	1, 2
Família 4							
P 111	a/c	2, 23	27, 44	1	1, 6	52	1
P 061	a/d	2, 23	27, 41	1	1, 7	53	1, 2
Família 5							
P 098	a/d	28, 30	18	3	6, 7	52, 53	1, 3
P 097	a/c	30	8, 18		17, 6	52	1, 2
P 108	a/c	30	8, 18		17, 6	52	1, 2
P 101	a/c	30	8, 18		17, 6	52	1, 2

n.d.= não determinado
a, b = haplotipos paternos
c, d = haplotipos maternos

Tabela 14b. Fenótipos e genótipos HLA dos membros das famílias de números 6 a 10 analisadas no estudo de cosegregação de haplotipos HLA e LTA.

Indivíduos	Genótipos	Fenótipos HLA					
		A	B	Cw	DR	DR52/53	DQ
Família 6							
C 092	a/b	2, 24	39, 60	3	4, 9	53	3
C 093	c/d	2	52	1, 3	15, 6	52	1, 7
P 106	b/c	2	52, 60	3	15, 9	53	1, 3
P 112	a/c	2, 24	39, 52	3	15, 4	53	1, 3
Família 7							
P 086	a/c	23, 32	35, 61	2, 4	n.d.	n.d.	n.d.
P 081	a/c	23, 32	35, 61	2, 4	6, 11	52	1, 7
P 083	a/d	1, 32	8, 61	2, 7	4, 11	52, 53	4, 7
Família 8							
C 064	a/b	1, 32	57, 60	6	4	53	1, 7
P 075	c/d	2, 32	27, 35	1, 4	12, 6	52	1, 7
P 077	a/c	2, 32	27, 60	1	12	52	1, 7
P 076	a/d	32	35, 60	4	6	52	1
P 079	a/c	2, 32	27, 60	1	12	52	1, 7
Família 9							
P 005	a/b	29, 32	44, 51		6, 7	52, 53	1, 2
C 003	c/d	2	27, 44	1, 4	15, 4	53	1, 3
P 110	a/d	2, 29	44	4	4, 7	53	2, 3
P 104	a/c	2, 29	27, 44	1	15, 7	53	1, 2
P 105	a/d	2, 29	44	4	4, 7	53	2, 3
Família 10							
P 020	c/d	2, 23	(41), 44	1, 8	11, 6	52	1
P 021	a/c	2	44	1	6, 7	52, 53	1, 2
P 122	b/c	2, 30	(42), 44	1	18,6	52	1, 4
P 125	b/d	23, 30	41, 42	8	18,11	52	1, 4

n.d. = não determinado
a, b = haplotipos paternos
c, d = haplotipos maternos

Tabela 14c. Fenótipos e genótipos HLA dos membros das famílias de números 11 a 15 analisadas no estudo de cosegregação de haplotipos HLA e LTA.

Indivíduos	Genótipos	Fenótipos HLA					
		A	B	Cw	DR	DR52/53	DQ
Família 11							
P 123	a/b	30, 31	8, 51	7	17, 4	52, 53	2, 3
P 124	c/d	11, 30	27	1, 2	1, 6	52	1
P 084	a/c	30	8	2, 7	17, 6	52	1, 2
P 109	a/c-d	30	8, 27	1, 7	1, 17	52	1, 2
P 120	b-a/d	11, 31	27, 51	1	1, 17	52	1, 2
P 008	a/c	30	8	2, 7	17, 6	52	1, 2
P 085	b/c	30, 31	51	2	4, 6	52, 53	1, 3
P 107	a/d	11, 30	8, 27	1, 7	1, 17	52	1, 2
P 103	a/d	11, 30	8, 27	1, 7	1, 17	52	1, 2
Família 12							
C 016	a/b	2, 26	8, 55	3, 7	17, 6	52	1, 2
P 088	a/d	2, 26	50, 55	3	n.d.	n.d.	n.d.
P 082	a/c	2, 26	14, 55	3, 8	6, 7	52, 53	1, 2
Família 13							
P 114	a/b	1, 23	7		n.d.	n.d.	n.d.
P 115	c/d	1, 3	7, 8		16, 7	53	1, 2
P 128	a/c	1	7, 8		1, 16		1
P 117	a/d	1, 3	7		1, 7	53	1, 2
P 119	a/c	1	7, 8		1, 16		1
P 118	a/c	1	7, 8		1, 16		1
Família 14							
C 099	a/c	2, 28	44, 52	4	4, 7	53	2, 3
P 029	a/c	2, 28	44, 52	4	4, 7	53	2, 3
P 121	b/c	2, 31	44, 39	4	7, 8	52, 53	2, 4
Família 15							
P 129	a/c	31, 32	27, 52	2	3, 4	52, 53	2, 3
P 001	b/d	1	41		6, 7	52, 53	2, 7

nd = não determinado
a, b = haplotipos paternos
c, d = haplotipos maternos

Tabela 15. Genótipos HLA dos irmãos afetados por LTA em 15 famílias

Famílias Caucasóides		Famílias Negróides	
N ^o da família	Genótipos	N ^o da família	Genótipos
2	a/c; b/d	1	b/c; b/c; a/c
3	a/c; a/c	4	a/c; a/d
6	a/c; b/c	5	a/d; a/c; a/c; a/c
7	a/c; a/c; a/d	9	a/c; a/d; a/d
8	a/c; a/c; a/d	10	a/c; b/c; b/d
12	a/c; a/d	11	a/c; a/c; a/d; a/d; b/c
14	a/c; b/c	13	a/c; a/c; a/c; a/d
		15	a/c; b/d

Tabela 16. Análise estatística do compartilhamento de haplotipos HLA em 42 irmãos afetados por leishmaniose tegumentar americana (LTA)

N ^o de afetados por família	N ^o de famílias	N ^o de haplotipos compartilhados		
		Observado	Esperado	
			Média	Variância
2	7	6	7	3,5
3	5	14	12,5	1,875
4	2	10	8,5	0,4375
5	1	6	6,125	0,1172
Total	15	36	34,125	5,9297

Estatística: $T = (36 - 0,5 - 34,125) / (5,9297)^{1/2} = 0,56466$; $p = 1 - \Phi$, onde Φ representa a integral normal padrão, baseado no valor calculado de T; $p = 0,2877$

5 DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar americana, mesmo quando causada por uma mesma espécie de parasita, é caracterizada por um espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas, que pode diferir de um paciente a outro, como já descrito na introdução.

A forma mais comum é a leishmaniose cutânea localizada (LCL), na qual ocorre uma resposta imunológica mediada por células capazes de restringir a doença a lesões de pele bem definidas. Os granulomas da LCL são constituídos de um infiltrado proeminente de linfócitos, números variáveis de células semelhantes às epiteliais e poucos parasitas. As lesões ulceradas apresentam graus variáveis de hiperplasia de células epidérmicas, que dependem do tempo de evolução e do tipo de lesão produzida.

Ao contrário, a leishmaniose cutânea difusa (LCD) ocorre infreqüentemente e é caracterizada por uma anergia seletiva da resposta imunológica celular, que resulta num envolvimento extenso da pele, da mucosa nasobucofaríngea e de alguns linfonodos. As lesões de LCD contêm numerosos macrófagos indiferenciados carregados de parasitas e poucos linfócitos.

Por sua vez, a leishmaniose mucocutânea é caracterizada por resposta imunológica celular exacerbada e por lesões destrutivas das cavidades oral e nasofaríngea, que podem ser concomitantes ou surgir muito depois de as lesões primárias da pele terem se cicatrizado. O granuloma da LMC é uma mistura de linfócitos e macrófagos, com poucos parasitas e alterações epidérmicas moderadas.

Essas diversas formas de manifestações clínicas levam a crer que as diferenças na capacidade de resposta imunológica estejam relacionadas à variabilidade genética do hospedeiro.

Os modelos de leishmaniose murina forneceram uma gama de informações sobre os mecanismos imunológicos que controlam a resistência ou suscetibilidade do hospedeiro a esta parasitose, com implicações para um número de outras doenças infecciosas. Vários estudos realizados em camundongos demonstraram que, além da espécie do parasita, existe uma regulação genética determinando a expressão das diferentes formas de leishmaniose (Blackwell *et al.*, 1991; Alexander e Russell, 1992).

Como já exposto na introdução, a suscetibilidade inata à infecção pela *Leishmania donovani* é controlada pelo gene Lsh (Bradley, 1974, 1977), porém o sistema H-2, que é homólogo ao sistema HLA humano, juntamente com outros genes não H-2 participam na modulação da disseminação e visceralização dos parasitas (Blackwell *et al.*, 1980, 1985a, 1985b). No entanto, o gene ligado ao H-2 tem um efeito menos pronunciado na leishmaniose cutânea (Howard *et al.*, 1980a; Mitchell *et al.*, 1980), onde a suscetibilidade à infecção pela *Leishmania major* é controlada principalmente pelo gene Scl-1 (Blackwell *et al.*, 1985a), e pelo gene ligado ao H-11 (Blackwell *et al.*, 1985b).

A infecção experimental por *Leishmania major* demonstrou que linhagens de camundongos resistentes desenvolvem lesões de pele que refletem a leishmaniose cutânea no homem, e que cicatrizam-se espontaneamente, enquanto nos camundongos suscetíveis à infecção torna-se disseminada e é fatal, de forma similar ao Calazar. Os camundongos suscetíveis e com doença progressiva montam uma forte resposta imune dominada pela produção de anticorpos e pela subpopulação de células Th2, as quais secretam IL- 4, IL-5 e

IL-10, e em sua maioria auxiliam as células B (Coffmann *et al.*, 1988). Por outro lado, os camundongos resistentes apresentam uma resposta imune vigorosa mediada por células, com pouca produção de anticorpos. Sua resposta celular é principalmente do tipo Th1, com secreção de IL-2 e IFN- γ , que estão mais envolvidas na resposta mediada por células do que no auxílio às células B.

A confirmação da correlação das subpopulações de células Th1 e Th2 com a evolução da doença resultou de estudos com linhagens de células T CD4⁺ específicas para *L. major* (Mosmann e Coffman, 1987; Scott *et al.*, 1988; Heinzel *et al.*, 1989; Liew, 1989; Holaday *et al.*, 1991; Varkila *et al.*, 1993). A associação entre os perfis de citocinas das células Th1 e Th2 humanas e suscetibilidade às diferentes formas de manifestações clínicas da leishmaniose é similar à do camundongo (Salgame *et al.*, 1991; Yamamura *et al.*, 1991; Miltenburg *et al.*, 1992; Caceres-Dittmar *et al.*, 1993).

Apesar de estar demonstrado que a estimulação diferencial das subpopulações de células CD4⁺ pode influenciar o curso da infecção, ainda não estão determinados os fatores que direcionam a estimulação preferencial das células Th1 ou Th2. Algumas hipóteses sobre os elementos responsáveis pela estimulação diferencial das subpopulações de células Th são consideradas.

Como a pele é a porta de entrada das *Leishmania sp.* nos mamíferos, é muito provável que a resposta imune cutânea no estágio inicial da infecção seja crucial no curso clínico da doença. Poucas horas após a inoculação do parasita ocorre infiltração celular com predominância de macrófagos, os quais atuam como células hospedeiras dos parasitas, além de serem responsáveis pela apresentação dos mesmos às células T específicas. Por sua vez, as

células T ativadas liberam linfocinas, como o IFN- γ dentre outras, que regulam o potencial antimicrobiano dos macrófagos e a sua capacidade de apresentação antigênica.

Porém, no estágio inicial da infecção por *Leishmania sp.*, há poucas células T no infiltrado dérmico e os macrófagos infectados têm baixa probabilidade de encontrar as células T específicas para a indução e modulação de uma eficiente resposta celular. Existem evidências de que as células de Langerhans da epiderme, distinguidas pelas suas propriedades migratórias, são as responsáveis pelo transporte e apresentação de antígenos aos linfócitos T específicos localizados nos linfonodos, possibilitando sua emigração via corrente sanguínea ao local de infecção (Moll, 1993).

Devido às variações na densidade dos complexos formados pelas moléculas CPH de classe II e peptídeos, na superfície de diferentes tipos de células apresentadoras, é possível que as frequências relativas dessas células no local da infecção possam influenciar o fenótipo de células T respondedoras. Um outro aspecto são os vários tipos de células acessórias que podem diferir quanto a sua capacidade de processamento, e dessa forma favorecer a apresentação de epítopos distintos de um determinado antígeno (Gajewski *et al.*, 1991; Moll, 1993; Schmitz *et al.*, 1993).

Uma outra hipótese que deve ser considerada é a da participação dos genes do CPH que, atuando como elementos de restrição ao apresentarem peptídeos antigênicos para o receptor dos linfócitos T, podem selecionar diferentes subpopulações funcionais de células T específicas. Murray *et al.* (1989) demonstraram que células T CD4⁺ ativadas pelo antígeno na resposta primária *in vivo* produzem padrões distintos de citocinas dependendo do haplotipo de classe II do CPH dos camundongos respondedores.

A compreensão dos efeitos da variabilidade genética sobre a leishmaniose humana depende da identificação dos genes, homólogos aos genes murinos, que controlam a resistência e a suscetibilidade às infecções pelas diversas espécies de *Leishmania*. No entanto, apenas alguns estudos envolvendo marcadores genéticos e leishmaniose tegumentar americana estão descritos na literatura.

A análise de grupos sanguíneos dos sistemas ABO e Rh em pacientes brasileiros demonstrou não haver associação destes marcadores com a leishmaniose mucocutânea (Sessa *et al.*, 1985).

Barbier *et al.* (1987) investigaram os antígenos HLA-A, B, C e os alotipos Km e Gm de imunoglobulinas numa população de refugiados Hmong, estabelecidos na Guiana Francesa. Tanto os pacientes com leishmaniose cutânea quanto os controles residiam em área endêmica desta parasitose devido a *Leishmania (V.) guyanensis*. A comparação das frequências antigênicas destes marcadores, entre controles e pacientes, demonstrou apenas uma diminuição significativa de Cw7 no grupo de afetados por leishmaniose cutânea ($p = 0,01$). A análise de sete pares e dois trios de irmãos afetados demonstrou segregação ao acaso dos haplotipos parentais.

Em outro estudo Lara *et al.* (1991) analisaram famílias com um ou mais casos de leishmaniose cutânea localizada, residentes em área de alta endemicidade na Venezuela. Os autores estudaram os antígenos HLA de classe I e de classe II e encontraram um aumento significativo de HLA-B22 ($pc = 0,048$) e de HLA-DQ3 ($pc = 0,036$) no grupo de pacientes quando comparados ao grupo controle. A análise da segregação dos haplotipos HLA em famílias sugeriu não haver ligação de um gene de suscetibilidade com LCL, contudo, os resultados não foram estatisticamente significantes. A associação positiva de HLA-DQ3 ($p =$

0,01; RR = 2,2) e de DR11 (pc = 0,02; RR = 3,5) com a forma cutânea de LTA e ausência de associação de antígenos HLA de classe I com essa mesma forma da doença também foi descrita por Gorodezky *et al.* (1989), que estudaram um grupo de mestiços mexicanos afetados por LCL.

Este mesmo antígeno HLA-DQ3 foi associado à forma mucocutânea de LTA (Petzl-Erler *et al.*, 1991). Os resultados deste estudo demonstraram um aumento significativo de HLA-DQ3 (pc = 0,006; RR = 4,2) e uma diminuição significativa de HLA-DR2 (pc = 0,004; RR = 0,07) nos pacientes quando comparados aos controles. Todos os indivíduos afetados eram residentes de área endêmica, sendo a maioria do sul do Brasil, quando desenvolveram a lesão primária.

A associação positiva de HLA-DQ3 com a forma cutânea de LTA (Gorodezky *et al.*, 1989; Lara *et al.*, 1991) sugere o envolvimento deste antígeno na suscetibilidade à lesão primária desta doença. Por outro lado, foi demonstrada a associação desta mesma especificidade sorológica com a forma mucocutânea de LTA (Petzl-Erler *et al.*, 1991), a qual portanto pode estar influenciando tanto a suscetibilidade à infecção pela *Leishmania* como o desenvolvimento das lesões metastáticas secundárias. É interessante notar também que o antígeno HLA-DQ3 parece estar associado à leishmaniose causada por diferentes espécies de *Leishmania*.

Considerando-se que os resultados de estudos anteriores sugerem a participação dos antígenos HLA na suscetibilidade à LTA, porém não esclarecem se eles conferem suscetibilidade à infecção pela *Leishmania* ou se atuam na modulação do curso da doença, o presente estudo teve como objetivo abordar esta questão não elucidada pelos trabalhos anteriores.

Para isto foi realizado um estudo em nível de população, no qual foram tipificados os antígenos HLA de classe I e de classe II de um grupo de pacientes afetados pela forma cutânea, de outro grupo de afetados pela forma mucocutânea de LTA e de um grupo de controles saudáveis. A composição étnica do grupo de pacientes afetados por LTA é de 68,8% de brancos e 31,2% de negróides, e do grupo controle é de 69,7% de brancos e 30,3% de negróides. Pelo fato de as diferentes espécies de parasitas influenciarem no curso clínico da doença, foram incluídos neste estudo apenas os pacientes que adquiriram a lesão primária dentro dos limites da área endêmica ao Norte do Estado do Paraná. Estudos epidemiológicos demonstram que a espécie encontrada ao Sul do Brasil restringe-se a *Leishmania (V.) braziliensis* (Lainson e Shaw, 1987). No entanto, o isolamento do parasita em 67 casos autóctones de LCL (Norte do Estado do Paraná) demonstrou que 66 casos foram decorrentes de infecção por *Leishmania (V.) braziliensis*, e apenas um caso por *Leishmania (L.) amazonensis* (comunicação pessoal de Thaís G. V. Silveira, UEM - PR.). A identificação das espécies de *Leishmania* foi realizada no Instituto Evandro Chagas em Belém, Pará.

Portanto, os critérios de seleção da amostra empregados neste estudo, como a escolha de grupos de pacientes e controles residentes na mesma área endêmica para *Leishmania (V.) braziliensis*, sujeitos às mesmas condições de exposição ao vetor, e o pareamento dos grupos quanto à composição étnica, conferiram homogeneidade à amostra populacional analisada e restringiram consideravelmente a possibilidade de inclusão de indivíduos afetados por LTA decorrente de infecção por outras espécies de *Leishmania*.

Os resultados do presente estudo demonstraram não haver associação dos antígenos HLA de classe I ou de classe II com a leishmaniose cutânea localizada e nem com a leishmaniose mucocutânea na população investigada. Estas discrepâncias com os resultados

de Lara *et al.* (1991) e de Gorodezky *et al.* (1989) poderiam ser explicadas pelas diferenças raciais das populações investigadas e pelas diferenças com relação aos agentes etiológicos. O trabalho de Lara *et al.* (1991), aparentemente, reuniu casos de mestiços venezuelanos afetados por LCL devido a *Leishmania (V.) guyanensis* e casos devido a *Leishmania (V.) braziliensis*. Gorodezky *et al.* (1989) investigaram mexicanos afetados por LCL em decorrência de infecção por parasitas do complexo *Leishmania mexicana*. A amostra era constituída principalmente de mestiços de índios e espanhóis .

Surpreendentemente, os dados deste trabalho também não corroboraram os resultados de Petzl-Erler *et al.* (1991). Neste trabalho os autores também estudaram indivíduos afetados por LMC, sendo que a maioria dos pacientes (86%) analisados adquiriu a lesão primária em áreas endêmicas para *Leishmania (V.) braziliensis* ao Sul do Brasil. A composição étnica da amostra foi similar a do presente estudo: 74% dos pacientes e 81% dos controles eram caucasoídes brasileiros e 26% dos pacientes e 19% dos controles eram negróides. No entanto, a discordância nos resultados pode ser decorrente de uma diferença epidemiológica importante nas duas amostras de pacientes com LMC, no que diz respeito à gravidade da doença. Neste estudo, a coleta das amostras foi realizada na área endêmica, onde a maioria dos pacientes já estava curada ou apresentando franca melhora ao tratamento com N-metilglucamina. Já o trabalho de Petzl-Erler *et al.* (1991) baseou-se em amostra hospitalar. Os pacientes foram selecionados no Hospital de Clínicas da UFPR, para onde dirigem-se geralmente os casos com lesões mais graves ou aqueles que não respondem ao tratamento tradicional, sugerindo que os antígenos HLA de classe II podem participar na evolução clínica da forma mucosa de LTA. Por outro lado, pode-se especular também sobre a possível

influência da variabilidade genética intra-específica da *Leishmania (V.) braziliensis* na patogênese das lesões metastáticas secundárias.

A abordagem da segunda etapa do presente estudo baseou-se na análise de uma amostra constituída de irmandades com múltiplos casos de indivíduos afetados por LTA. Foi investigado se havia distorção na segregação dos haplotipos HLA em sete pares, cinco trios, dois quartetos e um quinteto de irmãos afetados por leishmaniose tegumentar americana. Este tipo de análise de co-segregação acrescenta a possibilidade de identificar-se uma associação mesmo que o gene de suscetibilidade não codifique para nenhuma das especificidades HLA analisadas e nem esteja em desequilíbrio de ligação com um determinado alelo de algum gene do complexo HLA. No entanto, o resultado desta análise (Green e Woodrow, 1977) demonstrou que não há co-segregação de genes do CPH e suscetibilidade à forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana.

É de fundamental importância a continuidade das pesquisas que objetivam o estudo dos mecanismos imunorreguladores associados com a resistência e a suscetibilidade do hospedeiro à leishmaniose. O conhecimento desses mecanismos, e das etapas da infecção em que cada um dos genes envolvidos na suscetibilidade atuam, permitirá identificar os estádios do processo de imunorregulação nos quais intervenções terapêuticas poderiam controlar a progressão da doença no homem.

6 RESUMO E CONCLUSÕES

A leishmaniose tegumentar americana decorrente de infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* apresenta diferentes formas de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas (Convit *et al.*, 1993). Contudo, apenas uma fração dos indivíduos afetados pela forma cutânea (LCL) desenvolve as lesões metastáticas em mucosa naso-faringo-laríngea. O fato de a infecção por uma mesma espécie de parasita resultar em diferentes formas de manifestação da doença é sugestivo de que a variabilidade da resposta imunológica do hospedeiro esteja sob controle genético.

A leishmaniose experimental em camundongos permitiu a identificação de alguns genes reguladores da resposta inata e de outros envolvidos na resposta imunológica adquirida. Dentre eles, o gene Rdl-1, localizado dentro do complexo H-2, o qual é homólogo ao complexo HLA humano, e participa junto com outros genes não H-2 na modulação da disseminação e visceralização dos parasitas (Blackwell *et al.*, 1980, 1985a, 1985b).

A resposta imune protetora à infecção murina por *L. major* tem sido atribuída às células Th1, enquanto as células Th2 parecem facilitar a sobrevivência do parasita (Varkila *et al.*, 1993). A correlação entre os perfis de citocina das células Th1 e Th2 humanas com a evolução clínica da leishmaniose é similar à do camundongo (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993). Os experimentos de Murray *et al.* (1989) demonstraram que células T CD4⁺ ativadas pelo antígeno na resposta primária *in vivo* produzem padrões distintos de citocinas dependendo do haplotipo de classe II do CPH dos camundongos respondedores.

Estudos de associação de antígenos HLA e leishmaniose humana demonstraram uma associação positiva de DQ3 com LCL (Gorodesky et al., 1989; Lara et al., 1991) e com LMC (Petzl-Erler et al., 1991). Estes resultados sugerem a participação das moléculas de classe II na suscetibilidade individual a esta parasitose, contudo, não esclarecem se as proteínas HLA atuam no controle genético da suscetibilidade à infecção por *Leishmania* ou na modulação da doença, influenciando o desenvolvimento de lesões secundárias. O presente estudo teve como objetivo elucidar esta questão. Para isto foram determinadas as especificidades HLA-A, B, C, DR e DQ em 62 pacientes afetados por LCL, em 37 pacientes afetados por LMC e em 97 controles. O resultado da análise desta amostra populacional (caso-controle) não demonstrou qualquer associação dos antígenos HLA de classes I e II com as formas cutânea e mucocutânea de LTA. O fato de estes resultados não corroborarem os estudos de Gorodesky et al. (1989) e de Lara et al. (1991) pode ser explicado pelas diferenças de etnia e de espécie do parasita nas populações estudadas. A discrepância com os resultados de Petzl-Erler et al. (1991) podem ser decorrentes de diferenças quanto à procedência e características clínicas dos pacientes, pois estes autores analisaram amostra hospitalar e o presente estudo amostra de área endêmica. A segunda abordagem deste estudo consistiu na análise da segregação de haplotipos HLA em 15 irmandades com dois ou mais irmãos afetados (Green e Woodrow, 1977) e demonstrou que não há co-segregação de genes do CPH humano e suscetibilidade à LTA.

A leishmaniose, devido à sua alta incidência, constitui um grave problema de saúde pública e social, o que demonstra a importância das pesquisas de genes humanos, homólogos aos genes murinos já identificados, que controlam tanto os parasitas na fase inicial da infecção quanto a imunidade específica dependente de células T. O conhecimento das bases genéticas

subjacentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro, em resposta às infecções causadas pela *Leishmania sp.*, tem importantes implicações no desenvolvimento de estratégias mais eficazes para a prevenção e cura dessa parasitose.

Anexo 1. Conjunto de anti-soros utilizados para tipificação das especificidades

HLA-A, B e C.

	Leishmaniose/91	Placa "A"		
A	1 A0 1031 Zivney	A1		
	2 A0 1024 Chaney	A1 # 36 * B8		
	3 A0 1027 Awe	A1 + 36		
	4 RK 1843-3	A1		
	5 A0 2013 Frolkis	A2		
	6 A0 2009 Pedriana	A2		
	7 FER 87667	A2		
	8 A0 2281 Eisenmenger	A2, 28 * 24, 23		
	9 A 28022 Douville	A2, 28		
	10 A 28272 Gnadt	A28 B27 W1		
B	9 A 28026 Mgh 177	A28, 33, 34* 26		
	9 Lutringer	A28		
	8 A0 3027 Hemenway	A3		
	7 RK 1529/2	A3		
	6 Snyder	A3		
	5 A0 9023 Peschman	A23, 24 * A2		
	4 DMI 6/69 FD 194	A9 + B35		
	3 RK 943/2	A23		
	2 Wenderoth	A23		
	1 A 24013 Kettenis	A24 # A23		
C	1 Symkoviak 1/3	A24		
	2 A 24011 Jan	A24 * A11		
	3 Lepnik 1/3	A10		
	4 A 10007 Edelstein	A25, 26, 34 * 66		
	5 A 10022 Keyes	A25, 26, 34 # 66		
	6 A 25008 Kokta	A25		
	7 A 25002 Buchman	A25		
	8 A 26001 Bezold	A26 * 66		
	9 A 26141 Tilinski	A26 * B64, 65		
	10 A 26007 JR 50-368-3	A26		
D	10 A 11023 Ryanic	A11		
	9 A 11002 Dobbe	A11 * A1, 3, 26		
	8 FER 88626 1:2	A11		
	7 RK 1431-2 1/3	A29 + Rx		
	6 HU 44505/I	A29		
	5 FER 88308	A29		
	4 Mc Keever 12.8.85	A30 + 31		
	3 A 30320 Goggins	A30, 31 * 33 #26,34		
	2 Lavardiere 1:2	A30 + 31		
	1 Fe 144-Dez.86	A30 + Rx		
E	1 PF 384 RN	A30		
	2 A 19109 Johnson *B8	A25, 26, 34, 29, 31, 32, 33,74		
	3 A 28192 SS 052.1	A28, 33, 34, 25, 26		
	4 A 32101 Banaczak	A32 + 25		
	5 A 32441 Squire	A32 + B44		
	6 A 32511 Novak	A32 * 25 B49, 51, 52		
	7 Fe 78	A31		
	8 PF 133 XA	A32		
	9 PF 3180	A33		
	10 Biotest 0284	A33		
F	10 W6/32	Controle positivo		
	9 Haselow B05803	B51, 52, 98, 59, 77 * 63		
	8 B05805 Baker	B51, 52, 98 * 53		
	7 R. Schmitt B05004	B51, 52		
	6 B 51520 Kilian	B51, 52		
	5 B 51007 Thorn	B51		
	4 Jager. M	B51		
	3 HU 53848 1/7	B5 + 53		
	2 PF 406 RN	B53 + (35)		
	1 HU 70712 1/2	B35 + 53		

	Leishmaniose/91	Placa "B"		
A	1 B 35051 Vantaggi	B35, 51, 52, 53, * 49		
	2 B 35054 Beyer	B35, 51, 52, 53, 62, 70, 49, 50		
	3 B 35010 Fry	B35, 50, 98, 71		
	4 B 35013 Schmitz	B35		
	5 PF 175 RN	B15 + 57		
	6 B 15033 Malotky	B62, 63 * 57		
	7 B 12210-SS089	B62, 70, 45, 50		
	8 B 62004 - Leek	B62		
	9 VR 57467.5 (9w286)	B62		
	10 PF 3137	B63 + 57+ AW66		
B	10 Levers	B17 + 63		
	9 PF 363 RN	B57 + 63		
	8 B 17017 England	B57, 58		
	7 B 17017 Rintelman	B57, 58		
	6 FER 87110 1:2	B17		
	5 Heinrichs 1/2	B17, 57, 49, 53		
	4 PF 3138	B50, 56, 62, 70, (35)		
	3 PF 4996	B71, 72, 50		
	2 PF 3186 A	B62, 35, 5, 53, 18, 72		
	1 PF 404	B18		
C	1 Ind WR 83 1:2	B18		
	2 B 18022 Shellum	B18		
	3 B 14010 Barnes	B14 # 64, 65		
	4 B 14081 Ecsley	B14 * B8 # 64,65		
	5 Elinor Silva	B14		
	6 B 08011 Zivotsky	B8		
	7 B 08012 Richter	B8		
	8 FER 88687	B8		
	9 MGL 154	B16, 5, 35		
	10 PF 152 E	B16		
D	10 GSW 820394	B16		
	9 Pakdil	B38		
	8 PF 3275	B38		
	7 CLB 235	B39		
	6 LOM - LI	B39		
	5 Fe 142 (9w330) Dez 86	B37		
	4 PF 3104	B37		
	3 B 37030 Flick C	B37		
	2 Hart BD 1732	B37		
	1 BF 278 - A	B41		
E	1 CC 151.3 FD 203	B41 + A2		
	2 VR 58496.7 (9w381)	B41 FRACO		
	3 Ind - SC 76	B40 + A10		
	4 B 40131 Petted	B60, 61, 47, 13, 41		
	5 B 40134 Heinecke	B60, 61, 47, 48, 13 # 41		
	6 B 40021 Baudreau	B60, 61, 47, 48 * B7		
	7 B 40136 Klockow	B60, 61, 13		
	8 B 60009 Baumann	B60 - S		
	9 B 40 C 41 Gerrits	B60 Cw4 * Cw6		
	10 Kirwald	B60		
F	10 B 13014 Bachm	B13		
	9 B 13002 Gesvain	B13		
	8 FER 88426	B13		
	7 B 27002 Kressin	B27		
	6 B 27003 Held	B27		
	5 FER 88840	B27		
	4 B 07021 Swingen	B7		
	3 B 07733 Berres (2)	B7,73 * B42		
	2 B 07431 C.Vernon	B7, 42		
	1 Kappel	B7, 27, 22, 73		

	Leishmaniose/91	Placa "C"		
A	1 ED 234C Moraes	B42		
	2 CT 679	B42		
	3 B 22426 Scholz * B7	B55, 56, 42, 54. 67. 97 * 87		
	4 B 22430 Close * B57, 58	B55, 56, 54, 67, 77 * B17		
	5 B 22421 Miltenberger	B55, 42 * B7		
	6 HU27804/I 1/2	B54 + 55		
	7 B 55003 M. Neuman	B55		
	8 PF 195 RN	B55, 42		
	9 PF 297 RN	B56		
	10 Ctba 723	B21 + Rx		
B	10 Ind Stu 1:2	B21		
	9 PF 398 RN	B21		
	8 Booth H	B21		
	7 FER 88770 1:2	B12 + 21 + Rx		
	6 B 49010 Klaver	B49 * B50		
	5 PF 086 RN	B49		
	4 Simpkins	B49		
	3 B 50003 Schlevenski	B50, 62 * B35, 70, 41, 56		
	2 Barduk	B50 + 70		
	1 B 12002 Schueller	B44 + 45		
C	1 B 12010 Scheibl	B44, 45 * B13, 49, 50		
	2 B 12013 Rivera	B44, 45 * B13		
	3 Farmerie	B44		
	4 N 137 (9w 396)	B44		
	5 BW 4038 Ackley B	Bw4, B8 * B39, 14		
	6 BW 4032 Gillingham	Bw4 * A25, 32		
	7 RK 1701 - 2	BW4 + A32		
	8 PF 7104	Bw4		
	9 BW 6012 Simmons	Bw6		
	10 SFR 8 8.42.1.6	Bw6		
D	10 De luga	Bw6		
	9 VR 48068.4 (9w439)	Bw6		
	8 CW 1017 Kruepke	Cw1 * B60		
	7 Fe 124	Cw1		
	6 GSW 632 - 5 (9w453)	Cw1		
	5 CW 2024 Wioreck	Cw2		
	4 CW 2001 Steger	Cw2		
	3 Reimers	Cw2		
	2 HU 48962 / I 1/10	Cw3		
	1 HB 13882 - 3	Cw3		
E	1 Holt 1/6	Cw3		
	2 CW 4002 Sobczak	Cw4		
	3 Ctba 392	Cw4		
	4 Weingarten	Cw4		
	5 1234 MC Clain	Cw4 + 6		
	6 PF 063 RN	Cw4 + 6		
	7 1269 Winzer	Cw6		
	8 RK 993 - 5	Cw6		
	9 CW 6003 Boppre	Cw6 + 7		
	10 CW 7011 Purvis	Cw7		
F	10 PF 173 RN	Cw7		
	9 HU 62770 / I 1/18	Cw7		
	8 1167 Anderson	Cw5		
	7 Biotest 111616	Cw5		
	6 PF 073 RN	Cw5		
	5 CW 8052 Gotisha	Cw5 + 8 * B44		
	4 HU 53123 / I	Cw5 + 8		
	3 PF 293 D	Cw8		
	2 CW 3016 Zick	Cw9 + 10 # Cw3		
	1 Hu 54047 / I 1/6	Cw9 + B22		

Anexo 2. Conjunto de anti-soros utilizados para tipificação das especificidades HLA-DR e DQ.

	Leishmaniose/91	Placa "D"		
A	1 L 243-anti classe II	Controle positivo		
	2 W6/32 anti classe I	Controle positivo		
	3 Soro AB	Controle negativo		
	4 R0 1020 Laska	DR1 [A2 B51]		
	5 GH 3823 - P	DR1		
	6 Madryc 548	DR1 + Rx5		
	7 Gilbert	DR1 - FRACO		
	8 DR ROL - UKMD	DR1 + 2 + (6)		
	9 R0 1105 Wegner	DR1 + 10 [A10, 11]		
	10 Biotest 821037020	DR1 + 10		
B	10 R0 2025 Mitchell	DR15 + 16		
	9 R0 2024 Christiansen	DR15 + 16		
	8 R0 2023 Wheeler	DR15 + 16		
	7 R0 2020 Biedenberder	DR15 + 16 * DR1, 6		
	6 R0 2072 Schinker	DR15 + 7 * DR16, 1, 5		
	5 R0 2073 Spaeth	DR15 + 7 # DR2		
	4 PF 5110	DR15		
	3 Ziakis	DR2		
	2 E 1070	DR2		
	1 R0 3019 Duffy	DR17 + 18 [A29 B8 C7]		
C	1 R0 3003 Hearley	DR17 + 18 [B44]		
	2 R0 3017 Bree	DR17 + 18		
	3 R0 3020 Koch	DR17 + 18		
	4 R0 3015 Burja	DR17 + 18 * DR11, 13		
	5 PF 5113	DR3		
	6 Carroll	DR3		
	7 R0 3002 Goggins	DR17 # DR3 [A30, 31]		
	8 R0 3016 Eddy	DR16 * DR13 # DR3		
	9 R0 4001 NOHE	DR4 [A2]		
	10 R0 4027 Robinson	DR4		
D	10 R0 4005 Edelstein	DR4 [A10]		
	9 R0 4002 Curci	DR4 [A1, 11]		
	8 T 53011 Vaughn	DR4 [B44]		
	7 R0 4025 Moon	DR4		
	6 Q0 4002 Waukau	DR4		
	5 R0 4097 Tesch	DR4 + 9 [B44]		
	4 R0 4098 Gillingham	DR4 + 9 [Bw4]		
	3 PF 5171	DR5		
	2 Fe 134 (8w720)	DR5		
	1 R 11003 Grede	DR11 [B27]		
E	1 R 11005 Van Lare	DR11 [B5, 35]		
	2 R 11006 Aicher	DR11		
	3 R0 5004 Renzaglia	DR11		
	4 R0 5008 Robinson	DR11 * DQw7		
	5 R0 5005 Stiefvater	DR11 * DQw7		
	6 R0 05061 Schneck	DR11, 12, 13, 8 * DR1, 4		
	7 R0 5064 K. Walter	DR11, 12, 13, 14, 17		
	8 T 52004 Mehigan	DR11, 13, 14, 17, 18		
	9 R0 5081 Anderson	DR11, 13, 17, 8 # DR3, 12		
	10 R0 3062 Zivotski	DR11, 13, 17, 18 [B8]		
F	10 R0 5087 Pountain	DR8, 11 * DR13, 17 [B7,40]		
	9 Dando 10687	DR8 + (5)		
	8 PL 131	DR8 + 5		
	7 T 52006 Hessen	DR11, 13, 17 [B44]		
	6 R0 3626 Cavey	DR13, 17 # DR3, 18 [25,32]		
	5 R0 2068 Shea	DR13, 14, 15 # DR2		
	4 PL 102	DR3 + 6		
	3 R0 7005 Lochner	DR7		
	2 R0 7010 Voit	DR7		
	1 GH JMPC 5676 - P	DR7		

	Leishmaniose/91	Placa "E"		
A	1 R0 7011 - Merckell, C	DR7		
	2 R0 7012 - Moseley	DR7		
	3 R0 7910 - Fraser	DR7 + 9 [B17,49]		
	4 R0 7098 - Rogowski	DR7 + 9		
	5 GHVI EA 3376 - P	DR9		
	6 GH 2526 -A	DR9		
	7 CC 394.1	DR9		
	8 R0 10007 - Myszewski	DR10		
	9 R 10003 - Cartright	DR10 [PP]		
	10 DS 051 - RN	DR10		
B	10 R0 1023 - Weis	DR1, 10, 15, 16		
	9 R0 1071 - Kunz	DR1, 7, 10, 14, 15 [P]		
	8 R0 1061 - Bernstein	DR1, 13, 14 * 15 # 2		
	7 T 52016 Ackerman	DRw52		
	6 T 52015 Oleinik	DRw52 [B8C]		
	5 R0 3563 S. Nelson	DRw52 (DT52)		
	4 T 52013 Loomis	DRw52 (DT52)		
	3 T 52019 Barnes	DRw52 [B14] DT52		
	2 T 52012 Habersetzer	DRw52 [B8] DT52		
	1 Boff	DRw52		
C	1 T 53007 Amidon [PP]	DRw53 +DR7 #DR3		
	2 T 53005 Swift	DRw53 [A1]		
	3 T 53001 B. Jones	DRw53 * DR1 [A2]		
	4 T 53002 Wanta	DRW53 * DR1 DQ7,8,9		
	5 T 53004 Petelinsek	DRw53 +DR12 [B15]		
	6 Fe 200 - Dez. /86	DRw53		
	7 Q0 1015 Peer	DQw5, 6 [B7]		
	8 Q0 1012 Lipinski	DQw5, 6		
	9 Q0 1001 Shellum	DQw5, 6 [B18]		
	10 Q0 IR12 Dobbe	DQw5, 6 + DR1 [A11]		
D	10 R0 2007 Mc RAE	DQw5, 6		
	9 Firkus - UK	DQw1, 3, (6)		
	8 Fe mp1	DQw2		
	7 Q0 2033 Priebe	DQw2		
	6 Q0 2007 Zmuda	DQw2 [A29]		
	5 Q0 2018 Magnowski	DQw2 * DR7		
	4 Q0 2030 Poulsen	DQw2 + DR14 * DR11, 7		
	3 Q0 2022 Welch	DQw2		
	2 Fe mp4	TL 56		
	1 PL 119	<DQw3, TA10		
E	1 Fe mp2	Te22 +Ta10		
	2 Fe mp3	DQw7		
	3 Q0 7002 Fredricks	DQw6		
	4 Fe mp6	Ag Novo		
	5 Ingram - Bos / Ing	DQw3		
	6 Q0 4008 Rosinski	DQw7, 8, 9 * DR7		
	7 Q0 3R46 Mc Laughlin	DQw7, 8, 9 [B44]		
	8 Q 78901 Durchell	DQw7, 8, 9		
	9 Q0 3019 Stellberg	DQw7, 8, 9		
	10 Q0 3022 D. Wagner	DQw7, 8, 9		
F	10 L 243 anti classe II	Controle positivo		
	9 Q0 3007 England	DQw7, 8, 9 [B17]		
	8 Q0 3025 Baron	DQw7, 8, 9		
	7 Q0 4004 Simonis	DQw7, 8, 9		
	6 Q0 90001 Frederick	DQw9		
	5 Q0 3R45 Petfalski	DQw4, 7, 8, 9 * DR1		
	4 Q0 3006 Chucka	DQw4, 7, 8, 9 [A3,B5]		
	3 Braun - UK	DQw4		
	2 Q0 1014 Povolo	DQw4, 5, 6		
	1 PF 5164	DQw3		

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, E. D.; GOETZE, D. The major histocompatibility system in man. In: Goetze, D. (ed.). **The major histocompatibility system in man and animals**. New York: Springer-Verlag, 1977. p. 7 - 17.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. J. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology**, v. 31, p. 175 - 254, 1992.
- AMIEL, J. L. Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: Curtoni, E. S.; Mattiuz, P. L.; Tosi, R. M. (eds.). **Histocompatibility Testing 1967**. Copenhagen: Munksgaard, 1967. p. 79 - 81.
- AMOS, D. B.; BACH, F. H. Phenotypic expressions of the major histocompatibility locus in man (HL-A) : leukocyte antigens and mixed lymphocyte culture reactivity. **J. Exp. Med.**, v. 128, p. 623 - 637, 1968.
- AMOS, D. B.; WARD, F. E. Immunogenetics of the HLA system. **Physiol. Rev.**, v. 55, p. 206-246, 1975.
- AMOS, D.B.; POOL, P.; GRIER, J. HLA-A, HLA-B, HLA- C and HLA-D. In: Rose, N. R.; Friendman, H. (eds.). **Manual of Clinical Immunology**. 2 ed. Washignton, D.C.: American Society for Microbiology. 1980. p. 978 - 986.
- ANDERSSON, G.; LARHAMMAR, D.; WIDMARK, E.; SEVENIUS, B.; PETERSON, P. A.; RASK, L. Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DR β genes. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 8748 - 8758, 1987.
- ANDERSSON, G.; ANDERSSON, L.; LARHAMMAR, D.; RASK, L.; SIGURDARDÓTTIR, S. Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes. **Immunology Today**, v. 15, n. 2, p. 58 - 62, 1994.
- ANTHONY, R. L.; CHRISTENSEN, H. A.; JOHNSON, C. M. Micro enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 190 - 194, 1980.
- AVILA, J. L.; ROJAS, M.; RODAS, A.; CONVIT, J. Parasitic Oligosaccharide residues recognized by patients wuith mucocutaneous and localized cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 3 , p.284 - 290, 1992.
- BACH, F. H.; HIRSCHORN, K. Lymphocyte interaction: A potential histocompatibility test in vitro. **Science**, v. 143, p. 813 - 814, 1964.

- BARBIER, D.; DEMENAI, F.; LEFAIT, J. F.; DAVID, B.; BLANC, M.; HORS, J.; FEINGOLD, N. Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Km markers. **Tissue Antigens**, v. 30, p. 63 - 67, 1987.
- BEHFOROUZ, N.; REZAI, H. R.; GETTNER, S. Application of immunofluorescence to detection of antibody in *Leishmania* infections. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 70, p. 293 - 301, 1976.
- BELVEDERE, M. C. ; CURTONI, E. S. ; DAUSSET, J. ; LAMM, L. U. ; MAYR, W. ; VAN ROOD, J. J. ; SVEJGAARD, A. ; PIAZZA, A. On the heterogeneity of linkage estimations between La and FOUR of the HL-A system. **Tissue Antigens**, v. 5, p. 99 - 102, 1975.
- BERTRAMS, J.; BAUER, M. P. **Histocompatibility Testing 1984**. In: Albert, E. D.; Baur, M.P.; Mayr, W.R. (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 348 - 358.
- BETUEL, H.; GEBURHER, L.; DESCOS, L.; PERCEBOIS, H.; WINAIRE, Y.; BERTRAND, J. Adult Celiac Disease Associated with HLA-DRw3 and DRw7. **Tissue Antigens**, v. 15, p. 231-238, 1980.
- BIGNON, J. D.; SEMANA, G.; TIERCY, J. M., SIMONS, M.; LALOUEL, J. M.; COHEN, D. DNA-RFLP Analysis: HLA-DR β Workshop Report. In: Dupont, B. (ed.). **Immunobiology of HLA**, v. I. New York: Springer-Verlag, 1989. p. 851 - 860.
- BIJNEN, A. B. ; SCHREUDER, I. ; MEERA KHAN, P. ; ALLEN, F. H. ; GILES, C. M. ; LOS, W. R. T. ; VOLKERS, W. S. ; VAN ROOD, J. J. Linkage relationships of the *loci* of the major histocompatibility complex in families with a recombination in the HLA region. **J. Immunogenet.**, v. 3, p. 171 - 183, 1976.
- BILLING, R. J.; SAFANI, M.; PETERSON, P. Soluble HLA antigens present in normal human serum. **Tissue Antigens**, v. 10, p. 75 - 82, 1977.
- BJORKMAN, P. J. ; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B. ; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. Structure of the human class I Histocompatibility antigen HLA-A2. **Nature**, v. 329, p. 506 - 512, 1987a.
- BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. **Nature**, v. 329, p. 512 - 518, 1987b.
- BLACKWELL, J. M. *Leishmania donovani* infection in heterozygous and recombinant H-2 haplotype mice. **Immunogenetics**, v. 18, p. 101 - 109, 1983.
- BLACKWELL, J. M.; FREEMAN, J.; BRADLEY, D. J. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. **Nature**, v. 283, p. 72 - 74, 1980.

- BLACKWELL, J. M.; ULCZAK, O. M. Immunoregulation of genetically controlled acquired responses to *Leishmania donovani* infection in mice: demonstration and characterization of suppressor T cells in noncure mice. **Infection and Immunity**, v. 44, p. 97 - 102, 1984.
- BLACKWELL, J. M.; HALE, C.; ROBERTS, M. B.; ULCZAK, O. M.; LIEW, F. Y.; HOWARD, J. G. An H-2 linked gene has a parallel effect on *Leishmania major* and *Leishmania donovani* infections in mice. **Immunogenetics**, v. 21, p. 385 - 395, 1985a.
- BLACKWELL, J. M.; ROBERTS, M. B.; ALEXANDER, J. Response of BALB/c mice to leishmanial infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 122, p. 97 - 106, 1985b.
- BLACKWELL, J. M.; ROACH, T. I. A.; KIDERLEN, A.; KAYE, P. M. Role of Lsh in regulating macrophage priming/activation. **Research in Immunology**, v. 140, p. 798 - 805, 1989.
- BLACKWELL, J. M.; ROACH, T. I. A.; ATKINSON, S. E.; AJIOKA, J. W.; BARTON, C. H.; SHAW, M. A. Genetic regulation of macrophage priming/activation: the Lsh gene story. **Immunology Letters**, v. 30, p. 241 - 248, 1991.
- BODMER, W. F. Evolutionary significance of the HLA system. **Nature**, v. 237, p. 139 - 145, 1972.
- BODMER, J.G.; KENNEDY, L.J.; LINDSAY, J.; WASIK, A.M. Applications of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. **Br. Med. Bull**, v. 43, p. 94, 1987.
- BODMER, J.G.; MARSH, S. G. E.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A.; MACH, B.; MAYR, W. R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G. M. TH.; STROMINGER, J. L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA system. 1991. **Tissue Antigens**, v. 39, p. 161 - 173, 1992.
- BODMER, J. G.; MARSH, S. G. E.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A.; MACH, B.; MAYR, W. R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G. M. TH.; STROMINGER, J. L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. **Tissue Antigens**, v. 44, p. 1 - 18, 1994.
- BOTHAMLEY, G. H.; BECK, J. S.; SCHREUDER, G. M. T.; D'AMARO, J.; DE VRIES, R. R. P.; KARDJITO, T.; IVANYI, J. Association of Tuberculosis and *M. tuberculosis* - Specific Antibody levels with HLA. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 3, p. 549 - 555, 1989.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 21, p. 77 - 89, 1968. Suplemento.
- BRADLEY, D. J. Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. **Nature**, v. 250, p. 353 - 354, 1974.

- BRADLEY, D. J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. II. Genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 30, p. 130 - 140, 1977.
- BRADLEY, D. J.; TAYLOR, B. A.; BLACKWELL, J.; EVANS, E. P.; FREEMAN, J. Regulation of *Leishmania* population within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 37, p. 7 - 14, 1979.
- BREUNING, M. H. ; VAN DEN BERG - LOONEN , E. M. ; BERNINI , L. F.; BJILSMAS , J. B.; VAN LOGHEM, E. ; KHAN , P. M. ; NIJENHUIS, L. E. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6 . **Human Genet.**, v. 37, p. 131 - 139, 1977.
- BROWN, J. H.; JARDETZKI, T. S.; GORGA, J. C.; STERN, L. J.; URBAN, R. G.; STROMINGER, J. L.; WILEY, D. C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, v. 364, p. 33 - 39, 1993.
- CÁCERES-DITTMAR, G.; TAPIA, F. J.; SÁNCHEZ, M. A. ; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Determination of the cytokine profile in American Cutaneous Leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clin. Exp. Immun.**, v. 91, p. 500 - 505, 1993.
- CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 349 - 352, 1993.
- CARROLL, M.; KATZMAN, P.; ALICOT, E. M.; KOLLER, B. H.; GERAGHTY, D. E.; ORR, H. T.; STROMINGER, J. L.; SPIES, T. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 8535 - 8539, 1987.
- CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDON, A. J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.** , v. 27, p. 176 - 186, 1983.
- CHANG, T-L; SHEA, C. M.; URIOSTE, S.; THOMPSON, R. C.; BOOM, W. H.; ABBAS, A. K. Heterogeneity of Helper/Inducer T Lymphocytes. III. Response of IL-2 and IL-4 producing (Th1 and Th2) T cell clones to antigen presented by different accessory cells. **J. Immunol.**, v. 145, n. 9, p. 2803-2808, 1990.
- COFFMANN, R. L.; SEYMOUR, B. W. P.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D. D.; CHRISTIANSEN, J. A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H. M.; SVELKOU, H. F. J.; FINKELMAN, F. D.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunological Reviews**, v. 102, p. 5 - 28, 1988.
- COHEN - HAGUENAUER, O.; ROBBINS, E.; BUSSON, M.; DESCHAMPS, I.; HORS, J.; LALOUEL, J. M.; DAUSSET, J.; COHEN, D. A systematic study of HLA class II- β DNA restriction

- fragment in insulin-dependent diabetes mellitus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 3335, 1985.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R. C. C.; PIRMEZ, C.; SCHUBACH, A.; COUTINHO, S. G. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with american mucocutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 79, p. 221 - 226, 1990.
- CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNÁNDEZ, C. T.; TAPIA, F. J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; CASTÉS, M.; RONDÓN, A. J. The Clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transaction of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 444 - 448, 1993.
- CROCKER, P. R.; BLACKWELL, J. M.; BRADLEY, D. J. Expression of the natural resistance gene Lsh in resident liver macrophage. **Infection and Immunity**, v. 43, p. 1033 - 1040, 1984.
- CROCKER, P. R.; DAVIES, E. V.; BLACKWELL, J. M. Variable expression of the murine natural resistance gene Lsh in different macrophage populations infected *in vitro* with *Leishmania donovani*. **Parasite Immunology**, v. 9, p. 705 - 719, 1987.
- DAUSSET, J. Leuco - agglutinins. IV. Leuco - agglutinins and blood transfusion . **Vox Sang.**, v. 4, p. 190, 1954.
- DAUSSET, J. Iso - leuco - anticorps. **Acta Haematol.** (Basel), v. 20, p.156 - 166, 1958.
- DAUSSET, J.; COLOMBANI, J. (eds). **Histocompatibility Testing 1972**. Copenhagen: Munksgaard, 1973.
- DAY, N. K.; L'ESPERANCE, P.; GOOD, R. A.; MICHAEL, F. A.; HANSEN, J. A.; DUPONT, B.; JERSILD, C. Hereditary C2 deficiency: genetic studies and associations with the HLA system. **J. Exp. Med.**, v. 141, p. 1464 - 1469, 1975.
- DEL BRUTTO, OH; GRANADOS, G.; TALAMÁS, O.; SOTELO, J.; GORODESKY, C. Genetic pattern of the HLA A, B, C, DR and DQ antigens in Mexican patients with parenchimal brain cysticercosis. **Human Biol.**, v. 63, p. 85 - 93, 1991.
- DETOLLA, L. J.; SEMPREVIVO, L. H.; POLCZUCK, N. C.; PASSMORE, H. C. Genetic control of acquired resistance to visceral leishmaniasis in mice. **Immunogenetics**, v. 10, p. 353 - 361, 1980.
- DEVERSON, E.V.; GOW, I.R.; COADWELL, W.J.; MONACO, J.J.; BUTCHER, G.W.; HOWARD, J.C. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. **Nature**, v. 348, p. 738 - 741, 1990.

- DE VRIES, R. R. P.; SERJEANTSON, S. W.; LAYRISSE, Z. Leprosy. Joint Report. In: Albert, E. D.; Baur, M. P.; Mayr, W. R. (eds). **Histocompatibility Testing 1984**. Berlin: Springer-Verlag. 1984. p. 362 - 367.
- DE VRIES, R. R. P., OTTENHOFF, T. H. M.; VAN SCOOTEN, W. C. A. Human Leukocyte Antigens (HLA) and Mycobacterial Disease. **Springer Semin. Immunopathol.** , v. 10, p. 305 - 318, 1988.
- DOHERTY, P. C.; ZINKERNAGEL, R. M. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene. **Nature**, v. 256, p. 50 - 52, 1975.
- DUNHAM, I.; SARGENT, C. A.; TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R. D. Mapping of the Human Major Histocompatibility Complex by Pulsed Field Gel Electrophoresis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7237 - 7241, 1987.
- DUPONT, B.; JERSILD, C.; HANSEN, G. S.; NIELSEN, L. S.; THOMSEN, M.; SVEJGAARD, A. Typing for MLC determinants by means of LD-homozygous and LD-heterozygous. **Transplant. Proc.** , v. 5, p. 1543 - 1549, 1973.
- DYER, P. H. Class I and class II *loci* of the human major histocompatibility complex. **Baillière Clin. Rheum.**, v. 2, n. 3, p. 529 - 546, 1988.
- ERLICH, H.; BUGAWAN, T.; BEGOVICH, A. B.; SCHARF, S.; GRIFFITH, R.; SAIKI, R.; HIGUCHI, R.; WALSH, P.S. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. **Europ. J. Immunogenet.** , v. 18, p. 33 - 55, 1991.
- FALK, K.; ROTZSCHKE, O.; JUNG, G.; RAMMENSEE, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. **Nature**, v. 351, p. 290 - 296, 1991.
- FARRELL, J. P.; MULLER, I.; LOUIS, J. A. A role for Lyt2⁺ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice. **Journal of Immunology**, v. 142, p. 2051 - 2056, 1989.
- GAJEWSKI, T. F.; PINNAS, M.; WONG, T.; FITCH, F. W. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. **J. Immunol.**, v. 146, p. 1750 - 1758, 1991.
- GORCZYNSKI, R. M.; MACRAE, S. Analysis of subpopulations of glass adherent mouse skin cells controlling resistance/susceptibility to infection with *Leishmania tropica* and correlation with the development of independent proliferative signals to Lyt-1.2⁺/Lyt-2.1⁺ T lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 67, p. 74 - 89, 1982.
- GORODESKY, C.; FLORES, J.; AREVALO, N.; CASTRO, L. E.; SILVA, A.; RODRIGUEZ, O. Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. **Lepr. Rev.** , v. 58, p. 401 - 406, 1987.

- GORODEZKY, C., GUZMAN, J.; GRANADOS, G.; HOBART, O.; FLORES, J.; CASTRO, L.; PEREZ, H. HLA-linked susceptibility in Mexicans with localized cutaneous leishmaniasis. **Program and Abstract Book of the V Latin American Histocompatibility Workshop**. 1989. p. 42.
- GORONSY, J.; WEYAND, C. M.; FATHMAN, C. G. Shared T cell recognition sites on human histocompatibility leukocyte antigens class II molecules of patients with seropositive rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 77, p. 1042, 1986.
- GREEN, J. R.; WOODROW, J. C. Sibling method for detecting HLA-linked genes in disease. **Tissue Antigens**, v. 9, p. 31 - 35, 1977.
- GREEN, D. R.; FLOOD, P. M.; GERSHON, R. K. Immunoregulatory T-cell pathways. **Annual Review of Immunology**, v. 1, p. 439 - 463, 1983.
- GRUMET, F. C.; BUELOW, R.; GORRE-WILDE, H.; KUBENS, B.; GAROVOY, M.; POULETTY, P. Report of the Second International Soluble HLA (sHLA) Workshop. **Human Immunology**, v. 40, p. 153 - 165, 1994.
- GUIRGES, S. Y. Natural and experimental re-infection of man with oriental sore. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 65, p. 197 - 205, 1971.
- GUO, H.C.; JARDTZKY, T.S.; GARRET, T.P.J.; LANE, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. Different length polypeptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. **Nature**, v. 360, p. 364 - 366, 1992.
- HANDMAN, E.; BURGESS, A. W. Stimulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of *Leishmania tropica* killing by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 122, p. 1134 - 1137, 1979.
- HANSEN, H. E.; RYDER, L. P.; NIELSEN, L. S. Recombination between the second and third series of the HL-A system. **Tissue Antigens**, v. 6, p. 275 - 277, 1975.
- HARDY, D.; BELL, J. I.; LONG, E. O.; LINDSTEIN, T.; MCDEVITT, H. O. Mapping of the class II region of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. **Nature**, v. 323, p. 453 - 455, 1986.
- HARTZMANN, R. J.; SEGALL, M.; BACH, M. L.; BACH, F. H. Histocompatibility matching VI. Miniaturization of the mixed leukocyte culture test : A preliminary report. **Transplantation**, v. 11, p. 268 - 273, 1971.
- HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKESLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 59 - 72, 1989.

- HIGASHI, Y.; TANAE, A.; INOUE, H.; FUJI-KURIYAMA, Y. Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450 (C21) gene : implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 42, p. 17 - 25, 1988.
- HILL, A. V.; ALLSOP, C. E. M.; KWIATKOWSKI, D.; ANSTEY, M. N.; TWUMASI, P.; ROWE, P. A.; BENNETT, S.; BREWSTER, D.; MCMICHAEL, A.; GREENWOOD, B. M. Common west african HLA antigens are associated with protection from severe malaria. **Nature**, v. 352, p. 595 - 600, 1991.
- HILL, J. O.; AWWAD, M.; NORTH, R. J. Elimination of CD4⁺ supressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8⁺ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 1819 - 1827, 1989.
- HOLADAY, B. J.; SADICK, M. D.; WANG, Z. E.; REINER, S. L.; HEINZEL, F. P.; PARSLow, T. G.; LOCKSLEY, R. M. Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1 and Th2-like cell lines. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 1653 - 1658, 1991.
- HOWARD, J. G.; HALE, C.; CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. I. Immunogenetics aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunology**, v. 2, p. 303 - 314, 1980a.
- HOWARD, J. G.; HALE, C.; LIEW, F. Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of specific supression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 594 - 607, 1980b.
- HUGHES, A. L.; NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility class I reveals overdominant selection. **Nature**, v. 335, p. 167 - 170, 1988.
- HUGHES, A. L.; NEI, M. Nucleotide substitution of major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, v. 86, p. 958 - 962, 1989.
- HUGHES, A. L.; NEI, M. Maintenance of MHC polymorphism. **Nature**, v. 355, p. 402 - 403, 1992.
- JONGSMA, A.; SOMEREN, H.; WESTERWALD, A.; HAGEMEIJER, A.; PEARSON, P. Localization of genes of human chromosomes by studies of human - Chinese hamster somatic cell hybrids. **Humangenetik**, v.20, p. 195 - 202, 1973.
- JONSSON, A. K.; HYLDIG-NIELSEN, J. J.; SERVENIUS, B.; LARHAMMAR, D.; ANDERSSON, G.; JORGENSEN, F.; PETERSON, P. A.; RASK, L. Class I genes of the human major histocompatibility complex. Comparisons of the DQ and DX α and β genes. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 8767 - 8777, 1987.

- KAVATHAS, P.; BACH, F.H.; DEMARS, R. Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 4251-4255, 1980.
- KAYE, P. M.; PATEL, N. K.; BLACKWELL, J. M. Acquisition of cell-mediated immunity to *Leishmania*. II. Lsh gene regulation of accessory cell function. **Immunology**, v. 65, p.17 - 22, 1988.
- KAYE, P. M.; BLACKWELL, J. M. Lsh, antigen presentation and the development of CMI. **Research in Immunology**, v. 140, p. 810 - 815, 1989.
- KELLY, A.; POWIS, S.H.; KERR, L.A.; MOCKRIDGE, I.; ELLIOTT, T.; BASTIN, J.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; ZIEGLER, A.; TROWSDALE, J.; TOWNSEND, A. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. **Nature**, v. 355, p. 641 - 644, 1993.
- KEUNING, J. J.; TERMIJTELEN, A.; BLUSSE VAN OUD ALBLAS, A.; GABB, B. W.; D'AMARO, J.; VAN ROOD, J. J. LD (MLC) population and family studies in a Dutch population. In: Kissmeyer-Nielsen (ed.). **Histocompatibility Testing 1975**. Copenhagen: Munksgaard, 1975. p. 533 - 543.
- KLEIN, J. Genetic control of immune response: New concepts and old misconceptions. **J. Pediatr.**, v. 111, n. 6, p. 996 - 999, 1987.
- KLEIN, J.; FIGUEROA, F. Evolution of the major histocompatibility complex. **CRC Crit. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 295 - 386, 1986.
- KLEIN, J.; TAKAHATA, N.; AYALA, J. MHC Polymorphism and Human Origins. **Scientific American**, December. p. 46 - 51, 1993.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. E.; Killick-Kendrick, R. (eds): **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Vol. 1. London: Academic Press, 1987.
- LAMM, L.U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 40, p.128, 1985.
- 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 no. 6 in a family with a pericentric inversion. **Human Hered.**, v. 24, p.273 - 284, 1974.
- LAMM, L. U.; CULLEN, P.; EDWARDS, J. H.; VAN LEUWEEN, A.; LARSEN, B.; CANN, H.; THOMPSON, J.; ALBERT, E.; MONK, K.; RICHARDS, S.; BODMER, W. F. Joint family analysis. In: Bodmer, W. F.; Batchelor, J. R.; Bodmer, J. G.; Festenstein, H.; Morris,

- P. J. (eds.). **Histocompatibility Testing 1977**. Copenhagen: Munksgaard , 1978. p. 279 - 293.
- LARA, M. L.; LAYRISSE, Z.; SCORZA, J. V.; GARCIA, E.; STOIKOW, Z.; GRANADOS, J.; BIAS, W. Immunogenetics of human American Cutaneous Leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. **Hum. Immunol.**, v. 30, p. 129 - 135, 1991.
- LAWLOR, D.A.; ZEMMOUR, J.; ENNIS, P.D.; PARHAM, P. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 23 - 63, 1990.
- LAWRENCE, S. K.; SMITH, C. L.; SRIVASTAVA, R.; CANTOR, C. R.; WEISSMAN, S. M. Megabase-scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. **Science**, v. 235, p. 1387 - 1390, 1987.
- LIEW, F. Y. Functional heterogeneity of CD4⁺ T cells in leishmaniasis. **Immunology Today**, v. 10, p. 40 - 45, 1989.
- LIEW, F. Y.; HALE, C.; HOWARD, J. G. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific supressor T cells. **Journal of Immunology** , v. 128, p. 1917 - 1922, 1982.
- LIEW, F. Y.; HOWARD, J. G.; HALE, C. Prophylatic immunization against experimental leishmaniasis. III. Protection against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves Lyt-1+2⁻ T cells that do not mediate cutaneous DTH. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 456 - 461, 1984.
- LILLY, F.; BOYSE, E. A.; OLD, L. J. Genetic basis of susceptibility to viral leukamogenesis. **Lancet**, v. 2, p. 1207 - 1209, 1964.
- LLOP, E.; RHOTAMMER, F.; ACUÑA, M.; APT, W. HLA antigens in cardiomyopathic Chileas chagasics. **Am. J. Hum. Genet.** , v. 41, p. 770 - 773, 1988.
- LOHOFF, M.; DINGFELDER, J.; ROLLINGHOFF, M. A search for cells carrying the gd T cell receptor in mice infected with *Leishmania major*. **Current Topics In Microbiology and Immunology**, v. 173, p. 285 - 289, 1991.
- MADDEN, D.R.; GORGA, J.C.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. **Nature**, v. 353, p. 321 - 325, 1991.
- MADDEN, D.R.; GORGA, J.C.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. The three dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. **Cell**, v. 70, p. 1035 - 1048, 1992.

- MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. 2. Resposta humoral tissular. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 28, n. 5, p. 293 - 299, 1986.
- MATASMURA, M.; FREMONT, D.H.; PETERSON, P.; WILSON, I.A. Emerging principles for the recognition antigens by MHC class I molecules. **Science**, v. 257, p. 927 - 934, 1992.
- MCDEVITT, H. O.; SELA, M. Genetic control of the antibody response : Demonstration of determinant - specific differences in response to synthetic polypeptide antigens in two strains of inbred mice. **J. Exp. Med.**, v. 122, p. 517-531, 1965.
- MELO, M. N.; MAYRINK, W.; COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; WILLIAMS, P.; ARAÚJO, F. G.; COELHO, M. V.; BATISTA, S. M. Padronização do antígeno de Montenegro. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 19, p. 161 - 164, 1977.
- MILON, G.; TITUS, R. G.; CEROTTINI, J. C.; MARCHAL, G.; LOUIS, J. A. Higher frequency of *Leishmania major*-specific L3T4+ cells in susceptible BALB/c as compared with resistance CBA mice. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 1467 - 1471, 1986.
- MILTENBURG, A. M. M.; VAN LAAR, J. M.; DE KUIPER, R.; DAHA, M. R.; BREEDVELD, F. C. T cell clones from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 cell subset. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 35, p. 603 - 610, 1992.
- MITCHELL, G. F.; CURTIS, J. M.; HANDMAN, E.; MCKENZIE, I. F. C. Cutaneous leishmaniasis in mice: disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 58, p. 521 - 532, 1980.
- MITCHELL, G. F.; CURTIS, J. M.; HANDMAN, E. Resistance to cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 59, p. 555 - 565, 1981.
- MOCK, B. A.; FORTIER, A. H.; POTTER, M.; BLACKWELL, J.; NANCY, C. A. Genetic control of systemic *Leishmania major* infection: identification of subline differences for susceptibility to disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 122, p. 115 - 121, 1985.
- MODLIN, R. L.; TAPIA, F. J.; BLOOM, B. R.; GALLINOTO, M. E.; CASTES, M.; RONDON, A. J.; REA, T. H.; CONVIT, J. *In situ* characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 60, p. 241 - 248, 1985.
- MODLIN, R. L.; PIRMZ, C.; HOFMAN, F. M.; TORIGIAN, V.; UYEMURA, K.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; BRENNER, M. B. Lymphocytes bearing antigen-specific $\gamma\delta$ T cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. **Nature**, v. 339, p. 544 - 548, 1989.

- MOLL, H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today**, v. 14, n. 8, p. 383 - 387, 1993.
- MOLL, H.; SCOLLAY, R. G.; MITCHELL, G. F. Resistance to cutaneous leishmaniasis in nude mice injected with L3T4+ T cells but not with Lyt2+ T cells. **Immunology and Cellular Biology**, v. 66, p. 57 - 63, 1988.
- MONACO, J. J.; MCDEVITT, H. O. Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 79, p. 3001 - 3005, 1982.
- MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives in Dermatology and Syphilis**, v. 13, p. 187, 1926.
- MORTON, C. C.; KIRSCH, I. R.; NANCE, W. E.; EVANS, G. A.; KORMAN, A. J.; STROMINGER, G. L. Orientation of loci within the human major histocompatibility complex by chromosomal *in situ* hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 2816 - 2820, 1984.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Two types of mouse helper T-cell clone - implications for immune regulation. **Immunology Today**, v. 8, p. 223 - 227, 1987.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145 - 173, 1989.
- MURRAY, J. S.; MADRI, J.; TITE, J.; CARDING, S. R.; BOTTOMLY, K. MHC control of CD4+ T cells subset activation. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2135 - 2140, 1989.
- NEEFJES, J.J.; PLOEGH, H.L. Allele and locus-specific differences in the association of MHC class I H chain with β_2m and cell surface expression. Differential effects of inhibition of glycosylation on class I sub-unit association. **Eur. J. Immunol.**, v. 18, p. 801 - 810, 1988.
- NEPOM, B. S.; NEPOM, G. T.; MICKELSON, E.; SCHALLER, J. G.; ANTONELLI, P.; HANSEN, J. A. Specific HLA-DR associated histocompatibility molecules characterize patients with seropositive juvenile rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 74, p. 287 - 291, 1984.
- NEPOM, B. S.; SCHWARTZ, D.; PALMER, J. P.; NEPOM, G. T. Transcomplementation of HLA genes in IDDM: HLA-DQ α and β chains produce hybrid molecules in DR3/DR4 heterozygotes. **Diabetes**, v. 36, p. 114 - 117, 1987.
- NERUP, J.; PLATZ, P.; ANDERSON, O. O.; CHRISTY, M.; LYGSOE, J.; POULSEN, J. E.; RYDER, L. P.; THOMSEN, M.; STAUB NIELSEN, K.; SVEJGAARD, A. HL-A antigens and Diabetes Mellitus. **Lancet**, v. 2, p. 864 - 866, 1974.

- NETZEL, B.; GROSSE - WILDE, H.; RITTNER, C. H.; PRETORIUS, A. M. G.; SCHOLZ, S.; ALBERT, E. D. HL -A/MLC recombination frequency and LD typing in HL-A / MLC / Bf / PGM3 recombinant families. In : Kissmeyer-Nielsen (ed.). **Histocompatibility Testing 1975**. Copenhagen: Munksgaard, 1975. p. 955 - 959.
- NIELSEN, L. S.; RYDER, L. P.; SVEJGAARD, A. The third (AJ) segregant series. In: F.Kissmeyer - Nielsen (ed.). **Histocompatibility Testing 1975**. Copenhagen: Munksgaard, 1975. p. 324 - 329.
- OKADA, K.; BOSS, J. M.; PRENTICE, H.; SPIES, T.; MENGLER, R.; AUFRAY, C.; LILLIE, J.; GROSSBERGER, D.; STROMINGER, J. L. Gene organization of DC and DX subregions of the human major histocompatibility complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 3410 - 3414, 1985.
- OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. **Tissue Antigens**, v. 37, p. 197, 1991.
- O'NEILL, G. J.; POLLACK, M. S.; YANG, S. Y.; LEVINE, L. S.; NEW, M. I., DUPONT, B. Gene frequencies and genetic linkage disequilibrium for the HLA-linked genes Bf, C2, C4S, C4f, 21-hydroxylase deficiency and glyoxalase I. **Transplantation Proceedings**, v. 11, p. 1713 - 1715, 1979.
- O'NEIL, C. E.; LABRADA, M.; SARAIVA, N. G. *Leishmania (Viannia) panamensis*-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, n. 2, p. 181 - 188, 1993.
- OWERBACH, D.; LERNMARK, A.; PLATZ, P.; RYDER, L.; RASK, L.; PETERSON, P. Susceptibility to Insulin-dependent Diabetes defined by Restriction Enzyme Polymorphism of HLA -D Region Genomic DNA. **Diabetes**, v. 33, p. 958, 1984.
- PAYNE, R.; ROLFS, M. R. Fetomaternal leucocyte incompatibility. **J. Clin. Invest.**, v. 37, p. 1756 - 1763, 1958.
- PAYNE, R.; TRIPP, M.; WEIGLE, J.; BODMER, W. F.; BODMER, J. A new leucocyte isoantigen system in man. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v.29, p. 285, 1964.
- PELLEGRINO, M. A.; FERRONE, S.; PELLEGRINO, A. D.; OH, S. K.; REISFELD, R. A. Evaluation of two sources of soluble HL-A antigens: platelets and serum. **Eur. J. Immunol.**, v. 4, p. 250 - 255, 1974.
- PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Pessoa Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988. p. 66 -124.

- PETZL-ERLER, M.L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v. 33, p. 408 - 414, 1989.
- PETZL-ERLER, M. L.; BELICH, M. P.; QUEIROZ-TELLES, F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. **Hum. Immunol.**, v. 32, p. 254 - 260, 1991.
- PIRMEZ, C.; COOPER, C.; PAES-OLIVEIRA, M.; SCHUBACH, A.; TORIGIAN, V.; MODLIN, R. Immunologic responsiveness in American Cutaneous Leishmaniasis lesions. **The Journal of Immunology**, vol. 145, p. 3100-3104, n. 9, 1990.
- POLLACK, M. S.; LEVINE, L. S.; O'NEILL, G. J.; PANG, S.; LORENZEN, F.; KOHN, B.; RONDANINI, G.F.; CHIUMELLO, G.; NEW, M.I.; DUPONT, B. HLA linkage and B14, DR1, BfS haplotype associations with the genes for the late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 33, p. 540 - 550, 1981.
- POULETTY, P.; FERRONE, S.; AMESLAND, F.; COHEN, N.; WESTHOFF, U.; CHARRON, D.; SHIMIZU, R. M.; GROSSE-WILDE, H. Summary report from the first international workshop on soluble HLA antigens. Paris, August 1992. **Tissue Antigens**, v. 42, p. 45-54, 1993.
- PRESTON, P. M.; DUMONDE, D. C. Experimental cutaneous leishmaniasis. V. Protective Immunity in subclinical and self-healing infection in the mouse. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 23, p. 126 - 138, 1976.
- RANI, R.; FERNANDEZ-VINA, M. A.; ZAHEER, S. A.; BEENA, K. R.; STATNY, P. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from North India. **Tissue Antigens**, v. 42, p. 133 - 137, 1993.
- REINER, N. E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. **Immunology Today**, v. 15, n. 8, p. 374 - 381, 1994.
- REZAI, H. R.; FARRELL, J.; SOULSBY, E. J. L. Immunological responses of *L. donovani* infection in mice and significance of T cell in resistance to experimental leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 40, p. 508 - 514, 1980.
- RIDEL, P. R.; ESTERRE, P.; DEDET, J. P.; PRADINAUD, R.; SANTORO, F.; CAPRON, A. Killer cells in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene**, v. 82, p. 223 - 226, 1988.
- RIDLEY, D. S.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 508 - 514, 1980.
- RIDLEY, M. J.; RIDLEY, D. S. Cutaneous leishmaniasis: immune-complex formation and necrosis in the acute phase. **Brit. J. Exp. Path.**, v. 65, p. 327 - 336, 1984.

- RIDLEY, D. S.; MAGALHÃES, A. V.; MARSDEN, P. D. Histological Analysis And The Pathogenesis Of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Journal of Pathology**, v. 159, p. 293 - 299, 1989.
- ROACH, T. I. A.; KIDERLEN, A. F.; BLACKWELL, J. M. Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotas in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lsh^S and Lsh^r congenic mouse strains. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 3935 - 3944, 1991.
- ROBERTS, M.; ALEXANDER, J.; BLACKWELL, J. M. Genetic analysis of *Leishmania mexicana* infection in mice: single gene (Scl-2) controlled predisposition to cutaneous lesion development. **Journal of Immunogenetics**, v. 17, p. 89 - 100, 1990.
- ROFFI, J.; DEDET, J. P.; DESJEUX, P.; GARRÉ, M. T. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 183 - 189, 1980.
- ROLLINI, P.; MACH, B.; GORSKI, J. Linkage map of three HLA-DR β chain genes: Evidence for a recent duplication event. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7197 - 7201, 1985.
- RUSSO, M. D.; ARMITAGE, R. J.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; GRABSTEIN, K. H.; REED, S. G. Antigen-reactive $\gamma\delta$ T cells in human leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, USA, v. 151, p. 3712 - 3718, 1993.
- SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Differing lymphokine profile of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science**, v. 254, p. 279 - 282, 1991.
- SANTAMARIA, P.; BOYCE-JACINO, M.T.; LINDSTROM, A.L.; BARBOSA, J.J.; FARAS, A.J.; RICH, S.S. HLA Class II Typing: Direct Sequencing of DRB, DQB and DQA Genes. **Human Immunology**, v. 33, p. 69 - 81, 1992.
- SARAVIA, N. G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUIN, A. F.; NAVAS, C.; PALMA, G.; WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J. Infec. Dis.**, v. 159, p. 725 - 735, 1989.
- SCHARF, S. J.; FRIEDMANN, A.; BRAUTBAR, C.; SZAFER, F.; STEINMAN, L.; HORN, G.; GYLLENSTEN, U.; ERLICH, H. A. HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 3504 - 3508, 1988.
- SCHARTON, M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gama that drives differentiation of CD4⁺ T cells subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.**, vol. 178, p. 567 - 577, 1993.

- SCHMITZ, J.; ASSENMACHER, M.; RADBRUCH, A. Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 191 - 199, 1993.
- SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, p. 1675 - 1684, 1988.
- SESSA, P. A.; PEREIRA, F. E. L.; BARROS, G. C.; MATTOS, E. A.; DAHER, V. R. Blood groups of the ABO and Rh systems and mucocutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 8, p. 183, 1985.
- SHAW, S.; POLLACK, M. S.; PAYNE, S. M.; JOHNSON, A. H. HLA-linked B cell alloantigens of a new segregant series: Population and family studies of the SB antigens. **Hum. Immunol.**, v. 1, p. 177 - 185, 1980.
- SINGAL, D.; BLAJCHMANN, M. Histocompatibility (HL-A) antigens lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 22, p. 429- 432, 1973.
- SINGH, S. P. N.; MEHRA, N. K.; DINGLEY, H. B.; PANDE, J. N.; VAIDYA, M. C. Human leukocyte antigen (HLA) linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLA-DR types. **J. Infect. Dis.**, v. 148, p. 676 - 681, 1983.
- SMITH, L. E.; RODRIGUES, M.; RUSSELL, D. G. Cytotoxic T cells and *Leishmania* infected macrophages. **Journal of experimental Medicine**, v. 174, p. 499 - 506, 1991.
- SPIES, T.; SORRENTINO, R.; BOSS, J. M.; OKADA, K.; STROMINGER, J. L. Structural organization of the DR sub-region of the human major histocompatibility complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 5165 - 5169, 1985.
- SPIES, T.; CERUNDOLO, V.; COLONNA, M.; CRESSWELL, P.; TOWNSEND, A.; DEMARS, R. Presentation of viral antigen by MHA class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. **Nature**, v. 355, p. 644 - 646, 1992.
- SPRING, B. ; FONATSCH, C. ; MULLER, C. ; PAWELEC, G. ; KÖMPF, J.; WERNET, P.; ZIEGLER, A. Refinement of HLA Gene Mapping with Induced B-Cell Line Mutants. **Immunogenetics**, v. 21, p. 277 - 291, 1985.
- STERN, L. J.; BROWN, J. H.; JARDETZKI, T. S.; GORGA, J. C.; URBAN, R. G.; STROMINGER, J. L.; WILEY, D. C. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. **Nature**, v. 368, p. 215 - 221, 1994.

- SVEJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYDER, L. P. Insulin-dependent diabetes mellitus. In: Terasaki, P. I. (ed.). **Histocompatibility Testing 1980**. New York : Springer-Verlag , 1980. p. 638 - 656.
- SVEJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYDER, L. P. HLA and disease 1982 - A Survey. **Immunol. Rev.**, v. 70, p. 193 - 218, 1983.
- TAPIA, F. J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M. A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today**, v. 15, n. 4, p. 160 - 165, 1994.
- TARDIF, G.N. Complement quality control. In: Zachary, A.A., Teresi, G.A. (eds.). **ASHI Laboratory Manual**. 2 ed. Lenexa, KS: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1990.
- TERASAKI, PAUL I. History of HLA: A Personalized View. In: _____ (ed.). **History of HLA: Ten Recollections**. 1. ed. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1990. p. 215 - 256.
- TERASAKI, P. I.; MANDELL, M.; VAN DE WATER, J.; EDINGTON, T. E. Human blood lymphocyte cytotoxicity reactions with allogenic antisera. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** , v. 120, p. 322 - 334, 1964.
- TITUS, R. G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J. A. Involvement of specific Lyt2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 17, p. 1429 - 1433, 1987.
- TITUS, R. G.; THEODOS, C. M.; KIMSEY, P. B.; SHANKAR, A.; HALL, L.; MCGURN, M.; POVINELLI, L. Role of T cells in Immunity to the intracellular pathogen, *Leishmania major*. In: Avila e Harris (eds.). **Intracellular Parasites v. 18 : Subcellular biochemistry**. New York: Plenum Press, 1993. p. 99-129.
- TIWARI, J. L.; TERASAKI, P. I. **HLA and diseases associations**. New York: Spring-Verlag, 1985. p. 465.
- TODD, J. A.; BELL, J. I.; MCDEVITT, H. O. HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature**, v. 329, p. 599 - 604, 1987.
- TONNELLE, C.; DEMARS, R.; LONG, E.O. DO β : A new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. **EMBO J.**, v. 4, n. 11, p. 2839 - 2847, 1985.
- TREMONTI, L.; WALTON, B. C. Blast transformation and migration-inhibition in toxoplasmosis and leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, p. 49 - 56, 1970.

- TROWSDALE, J.; KELLY, A.; LEE, J.; CARSON, S.; AUSTIN, P.; TRAVERS, P. Linkage map of two HLA-SB β and two HLA-SB α - related genes: An intron in one of the SB β genes contains a processed pseudogene. **Cell**, v. 38, p. 241 - 249, 1984.
- ULCZAK, O. M.; BLACKWELL, J. M. Immunoregulation of genetically controlled acquired responses to *Leishmania donovani* infection in mice: the effects of parasite dose, cyclophosphamide and sub-lethal irradiation. **Parasite Immunology**, v. 5, p. 449 - 463, 1983.
- ULCZAK, O. M.; GHARIDIAN, E.; SKAMENE, E.; BLACKWELL, J. M.; KONGSHAVN, P. A. L. Characterization of protective T cells in the acquired response to *Leishmania donovani* in genetically determined cure (H-2^b) and noncure (H-2^d) mouse strains. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 2892 - 2899, 1989.
- UYEMURA, K.; KLOTZ, J.; PIRMEZ, C.; OHMEN, J.; WANG, X. H.; HO, C.; HOFFMAN, W. L.; MODLIN, R. L. Microanatomic clonality of $\gamma\delta$ T cells in human leishmaniasis lesions. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 1205 - 1211, 1992.
- WALTERS, J. M.; WATT, D. W.; STEVENS, F. M.; MCCARTHY C. F. HLA antigens in haemochromatosis. **British Medical Journal**, v. 4, p. 520, 1975.
- WALTON, B. C.; VALVERDE, L. Racial differences in spundia. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 23 - 29, 1979.
- WALTON, B. C.; BROOKS, W. H.; ARJONA, I. Serodiagnosis of american leishmaniasis by direct fluorescent antibody test. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, p. 296 - 299, 1972.
- VAN EDEN, W.; DEVRIES, R. R. P.; D'AMARO, J.; SCHREUDER, I.; LEIKER, D. L.; VANROOD, J. J. HLA-associated genetic control of the type of leprosy in a population of Surinam. **Human Immunology**, v. 4, p. 343 - 350, 1982.
- VAN EDEN, W.; DE VRIES, R. R. P. HLA and Leprosy: a re-evaluation. **Lepr. Rev.**, v. 55, p. 89 - 104, 1984.
- VAN ROOD, J. J. ; FERNISSE, J. G.; VAN LEEUWEN, A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. **Nature**, v. 181, p.1735, 1958.
- VAN ROOD, J. J.; VAN LEEUWEN, A. Leucocyte grouping : A method and its application. **J. Clin. Invest.**, v. 42, p.1382 - 1390, 1963.
- VARKILA, K.; CHATELAIN, R.; LEAL, M. M. C. C.; COFFMAN, R. L. Reconstitution of C.B-17 scid mice with BALB/c T cells initiates a T helper type-1 response and renders them capable of healing *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 262 - 268, 1993.

- WEYAND, C. M.; GORONSY, J.; FATHMAN, G. Human T cell clones used to define functional epitopes on HLA class II molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 762, 1986.
- WYLER, D. J.; WEINBAUM, F. I.; HERROD, H. R. Characterization of in vitro proliferative responses of human lymphocytes to leishmanial antigens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 140, p. 215 - 221, 1979.
- YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DEANS, R. J.; WEINBERG, K.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, p. 277 - 279, 1991.
- ZIEGLER, A. ZIMMER, F. G., FONATSCH, C.; SO, A.; TROWSDALE, J. Mapping of HLA class I and II genes using HLA deletion mutant cell lines. HGM8. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 40, p. 788, 1985.
- ZWILLING, B. S.; VESPA, L.; MASSIE, M. Regulation of I-A expression by murine peritoneal macrophages: differences linked to the Bcg gene. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 1372 - 1376, 1987.