

EDILEINE DELLALIBERA

**Polimorfismo de Genes de HLA Classe II (DRB1, DQA1 e
DQB1) e Associação com Doenças Parasitárias na
População do Estado de Pernambuco**

RECIFE - PE

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOCTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Polimorfismo de Genes de HLA Classe II (DRB1, DQA1 e
DQB1) e Associação com Doenças Parasitárias na
População do Estado de Pernambuco**

*Tese apresentada por Edileine Dellalibera ao Curso de
Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em
Genética.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Rosilda dos Santos Silva

RECIFE - PE

2004

**Polimorfismo de Genes de HLA Classe II (DRB1, DQA1 e DQB1)
e Associação com Doenças Parasitárias na População do Estado
de Pernambuco**

EDILEINE DELLALIBERA

Comissão Examinadora

MEMBROS TITULARES:

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

Departamento de Genética/CCB/UFPE

Prof. Dr. José Ferreira dos Santos

Departamento de Genética/CCB/UFPE

Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Departamento de Clínica Médica/FMRP/USP

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva

Departamento de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ/PE

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE

MEMBROS SUPLENTE:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE

Profa. Dra. Rosilda dos Santos Silva

Departamento de Genética/CCB/UFPE

**Aos meus pais, Orlando e Elizabeth, e a
meu querido esposo Petronio.**

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dra. Rosilda dos Santos Silva e Dr. Luiz Mauricio-da-Silva, meus pais na ciência e eternos orientadores, pela disponibilidade, estímulo e amizade dispensados durante a realização deste trabalho, mais uma etapa da minha vida.

Ao professor Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, pela orientação e amizade dispensadas durante todo o curso.

Ao professor Dr. Eduardo Antônio Donadi, que gentilmente disponibilizou o Laboratório de Imunologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a realização de parte dos experimentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos, à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FAEPA) e ao Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do Departamento de Genética/CCB/UFPE pelo apoio financeiro e técnico necessários para a realização deste trabalho.

À Pragati Nigam, pela amizade e apoio dados durante o período em que trabalhamos juntas em Ribeirão Preto e Recife.

Aos amigos Tania Tassinari Rieger e José Ferreira dos Santos pela amizade, convivência e conselhos que me fortalecem a cada novo dia.

A todos do Laboratório de Genética Molecular Humana que me ajudaram, direta ou indiretamente, na conclusão de mais esta etapa da minha vida, em especial a Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, pela amizade e valiosa ajuda nas correções dos textos, e Maria da Glória Raposo da Rocha, pelo carinho, paciência e conselhos dados nos momentos difíceis.

A todos do Departamento de Genética e do Curso do Doutorado em Ciências Biológicas do CCB/UFPE, pelo apoio dado.

À Amélia Silva Rocha, Profa. Vânia Pinheiro Ramos, Dra. Zulma Medeiros e Abiel Santos pela coleta das amostras.

A todos os participantes, pacientes ou não, que gentilmente forneceram material biológico para a realização deste trabalho.

Às minhas queridas irmãs Renata e Graziela, pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais Orlando e Elizabeth que, apesar da distância que nos separa durante alguns períodos do ano, nunca deixaram de me apoiar, incentivar e aconselhar.

A Romeu, Maria Dulce, Michelle e Romulo pelo carinho e acolhida no convívio familiar.

A Petronio, meu querido esposo, pelo apoio, respeito, compreensão e carinho, mas, sobretudo, pelo amor e companhia na vida de todos os dias.

SUMÁRIO

Resumo.....	3
Abstract.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 Os genes do sistema HLA.....	9
2.2 Moléculas de HLA.....	11
2.3 O polimorfismo dos genes de HLA Classe II.....	12
2.4 O polimorfismo dos genes de HLA Classe II e associações com doenças infecciosas.....	15
2.4.1 Associação HLA - Filariose.....	17
2.4.2 Associação HLA – Esquistossomose.....	20
2.5 Técnicas utilizadas para a tipificação dos locos HLA.....	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
4. MANUSCRITOS.....	37
<i>Manuscrito 1</i> – Polimorfismo de três locos de HLA Classe II na população do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.....	38

<i>Manuscrito 2</i> – Associação de genes de HLA Classe II (DRB1 e DQB1) com filariose bancroftiana na população do Estado de Pernambuco.....	53
<i>Manuscrito 3</i> – Lack of association between HLA-DQB1 alleles and the hepatosplenic form of schistosomiasis in Brazilian patients from Pernambuco.....	66
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	76
6. ANEXOS.....	79

Resumo

A população da Região Nordeste do Brasil originou-se a partir da miscigenação entre caucasianos europeus, negros africanos e índios nativos. Entretanto, apesar dos vários estudos realizados com populações brasileiras, pouco se sabe sobre a contribuição de cada um dos grupos étnicos na formação da atual população nordestina inferida pelo polimorfismo dos locos de HLA. No presente estudo uma amostra da população do Estado de Pernambuco foi caracterizada quanto ao polimorfismo dos locos de HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1 e verificadas possíveis associações dos locos DRB1 e DQB1 com filariose bancroftiana e do loco DQB1 com esquistossomose mansônica na mesma população. Os alelos DRB1*0701 (0,1390), DQA1*0102 (0,1954) e DQB1*0201 (0,2128) foram os mais freqüentemente encontrados nesta população. Foram identificados no total 113 possíveis haplótipos, sendo o DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (0,1234) o mais freqüente na população pernambucana. Os resultados mostraram que a população pernambucana está geneticamente mais próxima de populações caucasianas européias e mais distante de negros africanos e índios nativos, embora tenham sido encontrados nela alelos típicos de populações indígenas e alelos característicos de populações africanas. Não foi encontrada nenhuma associação entre o loco HLA-DQB1 e esquistossomose mansônica na população estudada. Foram encontradas associações de susceptibilidade, conferida pelos alelos DRB1*0301 e DQB1*0402, e de proteção, conferida pelos alelos DRB1*0102, DQB1*0401 e DQB1*0608, ao desenvolvimento da filariose bancroftiana na população do Estado de Pernambuco.

Abstract

The population from the Northeastern region of Brazil originated from the mixture of Caucasian Europeans, Africans and Indians. However, despite of many studies done with Brazilian populations, we know few about the contribution of each ethnic group in the formation of the actual Northeastern population inferred by the polymorphism of the HLA loci. In this study, a sample from the population of the State of Pernambuco was characterized using polymorphism of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 loci and possible associations were verified in the DRB1 and DQB1 loci with bancroftian filariasis and in the DQB1 locus with schistosomiasis mansoni in the same population. The alleles DRB1 *0701 (0,1390), DQA1*0102 (0,1954) and DQB1*0201 (0,2128) were the most frequent found in this population. 113 haplotypes were identified, and the most frequent in the population of Pernambuco was DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (0,1234). The results show that the population of Pernambuco is genetically next to Caucasian European populations and far from Africans and Indians, although, in this population, typical alleles of Indian and African populations have been found. Association between HLA-DQB1 locus and schistosomiasis mansoni was not found in the studied population. Associations of susceptibility were found, conferred by DRB1*0301 and DQB1*0402 alleles, and of protection, conferred by DRB1*0102, DQB1*0401 e DQB1*0608 alleles, to the development of the bancroftian filariasis in the population of the State of Pernambuco.

1. Introdução

1. Introdução

Dentre todos os genes humanos, os genes de HLA são os mais polimórficos. O polimorfismo apresentado por estes genes está basicamente restrito à região codificadora da fenda de ligação do peptídeo que será apresentado aos linfócitos T durante a resposta imunológica, e tem sido freqüentemente utilizado na caracterização genética de diferentes populações mundiais. O avanço tecnológico ocorrido nos últimos anos promoveu a descoberta de maior número de alelos de HLA. Somente no 13th International Histocompatibility Workshop, realizado em 2002, foram listados 315 alelos HLA-DRB1, 22 alelos HLA-DQA1 e 53 alelos HLA-DQB1.

Apesar da importância da determinação das frequências alélicas dos diferentes locos de HLA em populações normais para a realização de estudos de susceptibilidade/resistência a doenças, suporte a serviços que visem a identificação de indivíduos e a realização de transplantes, pouca informação se tem sobre o polimorfismo destes locos nas populações do Nordeste brasileiro. Em vista disso, realizamos o presente trabalho, com os seguintes objetivos:

1. Caracterizar a população do Estado de Pernambuco quanto ao polimorfismo dos locos de HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1 tipificados por biologia molecular (amostra controle), construindo um banco de dados;
2. Determinar a estrutura genética da população com base nas frequências genotípicas e alélicas dos locos analisados;
3. Tipificar quanto aos locos HLA-DRB1 e -DQB1 uma amostra de indivíduos portadores de filariose bancroftiana da população do Estado de Pernambuco, selecionados pelo serviço de atendimento de pacientes filarióticos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ de Recife-PE;

4. Verificar a existência de associação de alelos dos locos de HLA estudados com a filariose bancroftiana;
5. Tipificar quanto ao loco HLA-DQB1 uma amostra de indivíduos portadores de esquistossomose mansônica da população do Estado de Pernambuco, selecionados pelo serviço de atendimento de pacientes esquistossomóticos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco;
6. Verificar a existência de associação de alelos do loco HLA-DQB1 com a esquistossomose mansônica.

2. Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1 OS GENES DO SISTEMA HLA

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH) ou MHC (*major histocompatibility complex*) dos mamíferos em geral é denominado de HLA (*human leukocyte antigens*) em humanos, e representa um conjunto de locos gênicos responsáveis pela síntese de proteínas cuja principal função é a apresentação de peptídeos aos linfócitos T no sistema imunológico. Os genes do HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6, na região p21.3 (Senger e cols., 1993), sendo constituídos por cerca de quatro milhões de pares de bases. Estão divididos em três grandes grupos denominados de HLA Classe I, localizados na região mais telomérica, Classe II, localizados na região mais centromérica, e Classe III, situados entre os de Classes I e II. A região do HLA Classe I contém genes denominados HLA-A, -B e -C, que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade, assim denominadas por desempenharem a principal função no reconhecimento de peptídeos pelas células T CD8⁺. Os genes HLA-E, -F, -G, -H, -J e -X, também de Classe I, exibem menor polimorfismo do que os genes HLA-A, -B e -C e são conjuntamente denominados de genes HLA Classe IB (não-clássicos). A região de HLA Classe II contém os genes denominados HLA-DR, -DQ e -DP, também chamados de HLA-D. Os genes HLA-DR são subdivididos em DRA e DRB. O gene DRA não apresenta polimorfismo e codifica a cadeia α da estrutura da molécula HLA-DRA, enquanto os genes HLA-DRB são subdivididos em DRB1 a 9. Destes, os genes DRB2, DRB6, DRB7 e DRB9 são considerados pseudogenes. Os genes HLA-DQ e HLA-DP são todos polimórficos e

são também subdivididos em DQA e DQB, e DPA e DPB. Os genes DQA e DPA codificam as cadeias α e os genes DQB e DPB codificam as cadeias β das moléculas de HLA-DQ e -DP, respectivamente. Finalmente, a região de HLA Classe III contém genes que codificam as proteínas que não participam da apresentação de peptídeos aos linfócitos T, mas participam de outras etapas importantes da resposta imunológica, tais como os componentes do complemento (C2, Fator B e C4) e citocinas do tipo fator de necrose tumoral α (TNF- α) e linfotóxina (TNF- β) (Lechler, 1994; Abbas e cols., 2000; Janeway e cols., 2002).

Os genes HLA Classe I contêm oito exons e a organização intron-exon reflete a estrutura do domínio da molécula. O primeiro exon codifica a sequência sinal, e o segundo, terceiro e quarto exons os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, respectivamente. A região transmembrana é codificada por um quinto exon, e a cauda citoplasmática pelos exons 6, 7 e 8. Os genes HLA Classe II apresentam cinco exons que codificam a cadeia α e seis exons que codificam a cadeia β , com exceção da cadeia β da molécula DQ que é codificada por cinco exons (Lechler, 1994; Abbas e cols., 2000; Janeway e cols., 2002).

Os diferentes locos de HLA não segregam independentemente. Este fato, chamado desequilíbrio gamético ou desequilíbrio de ligação (DL), foi demonstrado pela baixa taxa de recombinação observada na região do HLA (Begovich e cols., 1992; Thomsen e cols., 1994), e pelas preferências no pareamento estrutural das moléculas de HLA (Kwok e cols., 1989; 1993). O DL pode se estender a todo HLA. Sabe-se, por exemplo, que os alelos A1, B8, DR3 e DQ2 são frequentemente herdados juntos de maneira conservativa, constituindo um haplótipo ou supergene (Futuyma, 1992). Estes haplótipos podem ser evolutivamente conservados e são referidos como haplótipos ancestrais (Degli-Esposti e cols., 1992).

Ao contrário dos receptores de células T e genes de imunoglobulinas, os genes de HLA não sofrem recombinação somática para produzir sua diversidade e, assim sendo, as moléculas de HLA manifestam sua diversidade não dentro, mas entre os

indivíduos de uma população. A diversidade alélica do sistema HLA dentro das populações pode ser produzida por diferentes mecanismos, tais como pressão de seleção de patógenos (Hill e cols., 1992), conversão gênica e mutação de ponto (Hughes e Nei, 1988; 1989).

2.2 MOLÉCULAS DE HLA

As moléculas de HLA Classe I são produzidas constitutivamente em todas as células nucleadas enquanto as de Classe II são expressas em células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, linfócitos B e macrófagos. As moléculas HLA Classe I são responsáveis pela apresentação de peptídeos endógenos, enquanto as Classe II são responsáveis pela apresentação de peptídeos exógenos aos linfócitos T do sistema imunológico. Ambas são glicoproteínas de superfície celular constituídas por diferentes subunidades estruturais (Janeway e cols., 2002).

A molécula de HLA Classe I consiste de duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia transmembrana α ou pesada, com cerca de 44 kDa, codificada por genes de HLA, e uma pequena cadeia não-covalentemente associada à cadeia α de 12kDa, a β 2-microglobulina, que não é codificada por gene de HLA. Esta molécula possui quatro domínios, três formados pela cadeia α (α 1, α 2, e α 3) e um formado pela cadeia β 2-microglobulina. As cadeias α se orientam de modo que a porção amino-terminal aponta para fora da célula, ficando a porção carboxi-terminal na região citoplasmática. Os domínios α 1 e α 2 dobram-se formando uma fenda na superfície da molécula onde se insere o peptídeo a ser apresentado ao linfócito T. O assoalho da fenda é formado por um conjunto de oito fitas β -pregueadas, enquanto que as paredes laterais são formadas por elevações laterais das α -hélices dos domínios α 1 e α 2 (Abbas e cols., 2000).

A molécula de HLA Classe II consiste de um complexo não-covalente de duas cadeias α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e duas cadeias β ($\beta 1$ e $\beta 2$) que atravessam a membrana celular. Esta molécula assemelha-se à molécula HLA Classe I. As principais diferenças localizam-se na porção final da fenda de ligação do peptídeo, a qual é mais aberta nas moléculas HLA Classe II para acomodarem peptídeos maiores (Abbas e cols., 2000).

2.3 O POLIMORFISMO DOS GENES DE HLA CLASSE II

Dentre todos os genes humanos, os genes HLA são os mais polimórficos. O polimorfismo apresentado por eles está basicamente restrito à região codificadora da fenda de ligação do peptídeo (anteriormente descrita) que será apresentado aos linfócitos T para induzir a resposta imunológica. Já foram também descritos polimorfismos dos genes codificadores das moléculas transportadoras, TAP-1 e TAP-2, associadas com o processamento de antígenos citoplasmáticos (Powis e cols., 1993), TNF (Messer e cols., 1991) e do complemento (Campbel e cols., 1990). No entanto, este polimorfismo não é tão extenso como o dos genes que codificam as moléculas apresentadoras de antígenos, as quais têm que se ligar a uma grande diversidade de peptídeos. Também já foi encontrado polimorfismo nas seqüências intrônicas das moléculas de HLA Classe II (Andersen e cols., 1991; McGinnis e cols., 1994).

De acordo com Marsh e cols. (2002), no 13th International Histocompatibility Workshop foram descritos 315 alelos HLA-DRB1, 22 alelos HLA-DQA1 e 53 alelos HLA-DQB1. Este grande polimorfismo apresentado pelos genes de HLA Classe II tem sido utilizado como ferramenta de estudo em diversos tipos de análises populacionais, tais como a caracterização de uma população e sua comparação com outras em estudos evolutivos, a validação de dados para aplicações práticas como análises forenses, buscas de histocompatibilidade entre doadores e receptores de órgãos e tecidos e ainda

em estudos que buscam verificar a existência de associações de genes de HLA com doenças (Hill e cols., 1991; Martinel-Laso e cols., 1995; Pai e cols., 1995; Date e cols., 1995; Khaled e cols., 1995; Grubic e cols., 1995; Hmilda e cols., 1995; Cowland e cols., 1995; Mattiuz e cols., 1997; Arnaiz-Villena e cols., 1999).

Os resultados de diversos estudos que buscam caracterizar diversas populações mundiais quanto ao polimorfismo dos locos de HLA classe II mostram que alelos como DRB1*07, DRB1*11, DQA1*0501, DQB1*02 e DQB1*03 (Lulli e cols., 1998; Arnaiz-Villena e cols., 1999; Gibert e cols., 2000; Saruhan-Direskeneli e cols., 2000; Mack e cols., 2000; Amirzargar e cols., 2001; Muro e cols., 2001; Arnaiz-Villena e cols., 2001a; Arnaiz-Villena e cols., 2001b; Sánchez-Velasco e Levy-Cobián, 2001; Crespí e cols., 2002) são os mais freqüentemente encontrados em populações caucasianas. Em populações africanas os alelos DRB1*07, DRB1*15, DQA1*01, DQB1*02 e DQB1*06 são os mais freqüentes (Arnaiz-Villena e cols., 1995; Ohashi e cols., 2000; Renquin e cols., 2001; Pimtanonthai e cols., 2001; Anaya e cols., 2001; Spinola e cols., 2002). Já em populações ameríndias os alelos DRB1*08, DRB1*15, DRB1*16 e DQA1*03 são os mais freqüentes (Lázaro, e cols., 1999; Layrisse e cols., 2001; Tokunaga e cols., 2001; Uinuk-ool e cols., 2002). Estes resultados demonstram que enquanto alguns alelos estão presentes em altas freqüências em diferentes populações (como, por exemplo, o alelo DRB1*07 encontrado freqüentemente entre caucasianos e negros) (Arnaiz-Villena e cols., 1995; Lulli e cols., 1998; Gibert e cols., 2000; Ohashi e cols., 2000; Muro e cols., 2001; Renquin e cols., 2001), outros são encontrados exclusivamente em determinadas populações (como, por exemplo, o alelo DRB1*08 encontrado apenas em populações ameríndias com altas freqüências (Lázaro, e cols., 1999)).

Em alguns estudos que foram realizados em determinados tipos de populações foram identificados alguns destes alelos exclusivos. Lázaro e cols. (1999), por exemplo, caracterizaram uma amostra de indivíduos pertencentes à tribo sul-americana Terena quanto ao polimorfismo dos locos HLA-DRB1, -DQB1 e -DPB1. Os resultados mostraram altas freqüências dos alelos DRB1*0802 (0,373), DRB1*1602

(0,4746) e DQB1*0301 (0,8667). Como o alelo DRB1*0802 não é encontrado em populações de caucasianos nem de negros pode ser sugerido que este alelo é, provavelmente, um marcador desta população indígena. O mesmo não ocorre com o alelo DQB1*0301 (0,8667), cujas frequências em caucasianos e negros são também altas. Em outro estudo, Layrisse e cols. (2001) caracterizaram a tribo venezuelana Yucpa. Os resultados mostraram que os alelos de maiores frequências nos Yucpa são DRB1*0411 (0,6136), DQA1*03011 (0,7500) e DQB1*0302 (0,7386), diferindo, portanto, das frequências dos alelos DRB1*0411 (0,0339) e DQB1*0302 (0,3333) encontrados nos Terena. O alelo DRB1*0411 também não aparece em negros e caucasianos e, a exemplo do alelo DRB1*0802 nos Terena, também pode ser considerado um marcador genético da população dos Yucpa.

No Brasil, onde a população originou-se a partir da miscigenação ocorrida entre caucasianos europeus, negros africanos e índios nativos (Krieger e cols., 1965), alguns trabalhos de caracterização quanto ao polimorfismo dos locos de HLA Classe II foram feitos nas populações dos Estados do Rio de Janeiro, Paraíba e São Paulo (Moraes e cols., 1993; Maciag e cols., 2000; Louzada-Junior, e cols., 2001). Os resultados destes trabalhos mostram que nas três populações foram encontrados os alelos DRB1*0802 e DRB1*0411, típicos de índios, e os alelos DRB1*0302, -*1503 e -*0804, muito frequentes em populações negras africanas, com frequências menores do que as encontradas nas populações de origem, o que reforça a informação da miscigenação ocorrida entre os três grupos étnicos na formação da atual população brasileira.

2.4 O POLIMORFISMO DOS GENES DE HLA CLASSE II E ASSOCIAÇÕES COM DOENÇAS INFECCIOSAS

O descobrimento das associações entre alelos de alguns locos de HLA com certas doenças foi um grande avanço na compreensão destas doenças sob o ponto de vista genético, auxiliando no entendimento do quadro clínico e na avaliação do prognóstico do paciente. A literatura existente sobre estas associações consiste da verificação das frequências de antígenos HLA em um grupo de pacientes e de sua comparação com as frequências destes mesmos antígenos observados em alguns indivíduos considerados controles adequados (Tiwari e Terasaki, 1985). O método básico para analisar este tipo de dado populacional, ou seja, através da comparação de frequências antigênicas em indivíduos não relacionados comparada àquela apresentada por pacientes foi desenvolvido por Woolf (1955). Esta comparação consistia na análise de um alelo em particular a partir de uma tabela 2x2 contendo o número de indivíduos que possuem este alelo nos grupos controle e de pacientes, e o número de indivíduos, destes grupos, que não possuem o alelo analisado. Isto gera a fórmula $X = hK/Hk$, na qual X é o risco relativo, h e H correspondem a presença do alelo analisado e k e K correspondem a ausência do alelo analisado nas amostras de paciente e controle, respectivamente. Entretanto, Woolf (1955) não considerou nesta análise a possibilidade de uma das categorias (número de pacientes que apresentam o alelo, por exemplo) ser zero, o que inviabilizaria o cálculo. Assim, Haldane (1956) introduziu à fórmula algumas modificações, resultando na fórmula $X = [(2h+1)(2K+1)]/[(2H+1)(2k+1)]$, que é a utilizada hoje para a verificação da existência de associações e se um determinado alelo confere resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento de uma determinada doença. A interpretação do resultado do cálculo do risco relativo é feita da seguinte maneira: se $X > 1$, então o indivíduo que tem o alelo analisado terá X vezes mais chance de desenvolver a doença em relação ao indivíduo

que não o tem e, portanto, apresentará susceptibilidade ao desenvolvimento da doença; se $X < 1$, então o indivíduo que tem o alelo analisado terá X vezes menos chance de desenvolver a doença e, portanto, apresentará resistência ao desenvolvimento da doença estudada. Esta fórmula pode ser utilizada, da mesma maneira, para a verificação de associação entre haplótipos de HLA e doenças.

Os genes HLA Classe II são caracterizados por um extenso polimorfismo, cuja variabilidade alélica gera uma grande diversidade protéica localizada em sítios específicos da molécula dentro da fenda de ligação do peptídeo (antígeno), o que torna estes genes bons candidatos a conferir suscetibilidade ou resistência ao desenvolvimento de doenças infecciosas. Diversas associações dos genes HLA com diferentes doenças têm sido descritas, sendo a existente entre o alelo HLA-B27 e a espondilite anquilosante a mais conhecida (Tiwari e Terasaki, 1985). A identificação de associações entre genes de HLA e doenças infecciosas como malária (Hill e cols., 1991) e leishmaniose (Lara e cols., 1991) tem evidenciado que os genes de HLA desempenham um importante papel na determinação da suscetibilidade/resistência a estes tipos de doenças. Hill e cols. (1991), através de um extenso estudo de crianças com malária no Oeste africano, mostraram que o HLA-Bw53 e o haplótipo DRB1*1302/DQB1*0501 estão associados independentemente com proteção à malária severa. Estes antígenos são comuns no Oeste africano, porém são raros em outras populações. Lara e cols. (1991) analisaram 24 famílias venezuelanas portadoras de leishmaniose cutânea quanto ao polimorfismo de HLA-A, -B, -C, -DR e -DQ e sugeriram que o alelo HLA-DQw3 confere suscetibilidade à leishmaniose cutânea localizada. Outro exemplo deste tipo de associação é dado pelos resultados do estudo de Vejbaesya e cols. (2002) que sugerem que o alelo DQB1*0502 pode aumentar o risco para o desenvolvimento de tuberculose pulmonar. Por outro lado, os alelos DQA1*0601, DQB1*0301 conferem proteção contra esta doença na população da Tailândia (Vejbaesya e cols., 2002).

2.4.1 Associação HLA - Filariose

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a filariose linfática, também conhecida como elefantíase, põe em risco mais de um bilhão de pessoas em mais de 80 países. Mais de 120 milhões já foram infectadas, das quais 40 milhões estão seriamente incapacitadas e desfiguradas. Cerca de dois terços desses indivíduos vivem na Índia e na África, e o terço restante vive na Ásia, Pacífico e Américas Central e do Sul (Michael e cols., 1996; Michael e Bundy, 1997; WHO, 2000).

A filariose linfática é transmitida ao homem através de picadas do mosquito *Culex quinquefasciatus* ou *Mansonia ssp* infectado com a forma larval (microfilária) do parasita *Wuchereria bancrofti* ou *Brugia malayi*, respectivamente. Estes vermes alojam-se no sistema linfático do hospedeiro, onde se reproduzem originando milhares de microfilárias, as quais migram para a corrente circulatória. O comprometimento do fígado e do sistema linfático causado pela obstrução dos vasos provocada pela presença do verme adulto, juntamente com a incapacidade causada pela doença, promove grandes impactos econômico, psicológico e social na comunidade afetada (Organização Mundial de Saúde - www.who.int/health-topics/lymphfil.htm; WHO, 2000).

Segundo Dreyer e Dreyer (2000) a manifestação clínica, direta ou indiretamente relacionada à infecção filarial, depende da localização do verme adulto, localização esta que depende do sexo do indivíduo infectado. Em mulheres, esta localização é mais habitual nos membros inferiores, superiores (Dreyer e cols., 1999) e mamas (Dreyer e cols., 1996), enquanto nos homens a localização do verme adulto é mais freqüente nos vasos linfáticos do cordão espermático (Norões e cols., 1996). A etiologia do processo agudo é bacteriana (Shenoy e cols., 1995) em cerca de 97% dos indivíduos acometidos (Dreyer e cols., 1999) e pode culminar em elefantíase quando há a formação de linfedema crônico (Dreyer e Dreyer, 2000).

A classificação inicial dos grupos de pessoas que viviam em áreas de filariose endêmica era baseada na presença ou ausência de microfilaremia (presença de microfilária no sangue circulante) e/ou patologia crônica. Entretanto, a detecção de anticorpos circulantes, o descobrimento da patologia linfática oculta e a existência de doença renal em indivíduos microfilarêmicos assintomáticos, além do reconhecimento de infecção bacteriana na patogênese da doença aguda e crônica (Dreyer e cols., 2000a; Dreyer e cols., 2000b; Shenoy e cols., 1999) levou Melrose (2002) a sugerir que esta classificação estava obsoleta. Atualmente, aceita-se que há três grupos de pessoas encontrados em áreas de filariose endêmica: o primeiro representado por pessoas expostas mas que não apresentam evidências da doença; o segundo são os portadores de microfilaremia assintomática; e o terceiro representado por pessoas com a doença crônica com linfodema crônico, hidrocele e elefantíase, podendo, nos três grupos, aparecer episódios de filaremia aguda (Organização Mundial da Saúde).

Após análises imuno-histoquímicas da resposta inflamatória frente à infecção filarial foi demonstrado que o tecido afetado apresenta um infiltrado perivascular anormal de células CD3⁺ (linfócitos T) em 73% de indivíduos com a doença clínica e em 55% de indivíduos com microfilaremia assintomática. Este infiltrado de células CD3⁺ é composto predominantemente por células T CD8 nos membros de pacientes com a doença clínica, e predominantemente por células T CD4 nos membros dos indivíduos com microfilaremia assintomática. Nos indivíduos com a doença clínica também foram encontrados elevados níveis de moléculas CD8 solúveis e de células T CD8⁺ HLA-DR⁺ na circulação, participando na patogênese da doença (Lal e cols., 1989; Lal e cols., 1990; Freedman e cols., 1995; Freedman, 1998; Almeida e Freedman, 1999). Entretanto, as células T CD8⁺ não expressam normalmente moléculas de HLA Classe II, mas sim de Classe I. Essa situação poderia ser explicada pelo fato de que a expressão tanto das moléculas de HLA Classe I quanto de Classe II é regulada por citocinas, particularmente interferons, que são liberados durante uma resposta imune. O interferon γ (IFN- γ), por exemplo, aumenta a expressão de

moléculas de HLA Classe I e II e pode induzir a expressão de moléculas de Classe II em certos tipos celulares que normalmente não as expressam (Janeway e cols., 2002). O estudo realizado por Almeida e Freedman (1999) relata que a quantidade de células produtoras tanto de IFN- γ quanto de interleucina-4 (IL-4) é menor em indivíduos filarêmicos do que em indivíduos não filarêmicos, o que sugere que a deficiência de células que expressam moléculas de HLA Classe II pode influenciar na resolução da doença.

Alguns estudos têm sido realizados visando a identificação das vias de ativação, proliferação celular e expressão de algumas moléculas de superfície celular relacionadas à resposta imune para infecções parasitárias, como leishmaniose (Meddeb-Garnaoui e cols., 2001), oncocercariose (Meyer e cols., 1994), filariose bancroftiana (Freedman e cols., 1999) e filariose brugiana (Yazdanbakhsh e cols., 1995). Maizels e cols. (1995) estudaram a ativação de células T e a participação de anticorpos na progressão para elefantíase em indonésios com filariose brugiana. Em indivíduos livres de patologia foram encontradas altas freqüências de 2B3, um epitopo presente em DQw6, -8 e -9, quando comparados com pacientes com a patologia. Este resultado sugere que 2B3 protege contra o desenvolvimento de elefantíase. Assim, o loco DQ pode estar associado com a apresentação de antígenos da microfilária brugiana para células T supressoras, sugerindo que a rede regulatória é deficiente em pacientes com risco para o desenvolvimento da patologia.

Murdoch e cols. (1997) verificaram que uma amostra de indivíduos do Estado de Kaduna (Região Norte da Nigéria) com despigmentação cutânea provocada pela infecção de *Onchocerca volvulus* (verme pertencente à mesma família Onchocercidae da *Wuchereria bancrofti* e que produz doença com epidemiologia semelhante à da filariose) apresentou freqüências aumentadas de DQA1*0501 e DQB1*0301 quando comparadas com o grupo de pessoas com pele normal e grandes quantidades de microfilárias (NSHMF – Normal Skin and High Microfilarial Load). Por outro lado, a amostra de indivíduos com despigmentação cutânea também apresentou freqüências

diminuídas de DQA1*0101 (0,2200) e Cw6 (0,1500) quando comparadas com o grupo de indivíduos NSHMF (0,5700 e 0,5800, respectivamente). Quando estes indivíduos NSHMF foram analisados de acordo com a faixa etária, houve uma acentuada diminuição na frequência de DQA1*0501 (de 0,3000 para 0,1600) e um aumento da frequência de DQA1*0101 (de 0,5700 para 0,7200) no grupo de indivíduos com idade igual ou superior a 32 anos. Os autores sugerem a existência de uma base imunogenética para o espectro dos acometimentos cutâneos em oncocercariose e que as moléculas HLA-DQ estão associadas, ao nível de resposta imune, com antígenos do parasita.

Meyer e cols. (1994) analisaram o polimorfismo dos locos HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 e -DPB1 em 1818 indivíduos moradores da Libéria, Região Oeste da África, uma região hiperendêmica para *Onchocerca volvulus*. Os resultados mostraram que o haplótipo DQA1*0501-DQB1*0301 foi significativamente mais freqüente entre indivíduos supostamente imunes do que entre pacientes com doença generalizada ou localizada. O alelo DQB1*0201 foi mais freqüente em pacientes com doença generalizada do que em pacientes com doença localizada ou com imunidade putativa.

2.4.2 Associação HLA - Esquistossomose

Estima-se a existência, em todo o mundo, de cerca de 150 milhões de indivíduos infectados por parasitas membros do gênero *Schistosoma*. A esquistossomose mansônica é endêmica em vários países africanos, desde o delta do Nilo, no Norte, até Zimbábue e Moçambique, no Sul, bem como na América do Sul e Antilhas, onde o parasita foi introduzido com o tráfico de escravos africanos. Pequenos focos são também encontrados na Arábia Saudita, Iêmen e Oman, na Ásia. No Brasil, acredita-se haver entre 2,5 e 6 milhões de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, concentrados principalmente nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Paraíba e Espírito Santo (Katz e Peixoto, 2000).

A esquistossomose mansônica é transmitida por caramujos de água doce pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, da família Planorbidae. Esses caramujos são capazes de resistir por longos períodos de estiagem em seus criadouros e distribuem-se amplamente no continente americano, desde a América Central até o Brasil, Suriname e Venezuela, na América do Sul. Três espécies são responsáveis pela transmissão da esquistossomose no Brasil: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. O principal vetor da esquistossomose no Brasil é *B. glabrata*, distribuindo-se por todos os Estados do Nordeste e do Sudeste, Goiás e Paraná (Paraense, 2001).

A lesão histopatológica básica da esquistossomose crônica é o granuloma que se desenvolve em torno dos ovos de *S. mansoni* no fígado e no espaço perivascular da parede intestinal. A forma hepatoesplênica da doença decorre de obstrução mecânica originada pela presença de extensas áreas de fibrose hepática, resultando em hipertensão portal e congestão passiva crônica do baço (Ferreira e cols., 2003).

Alguns estudos populacionais foram realizados visando a busca de uma possível associação entre os locos de HLA e esquistossomose. McManus e cols. (2001), por exemplo, demonstraram que os alelos HLA-DRB1*0901, -DRB1*1302, -DQB1*0303 e -DQB1*0609 estão associados com susceptibilidade à fibrose hepática causada pela infecção por *Schistosoma japonicum* em uma população da Região Sudeste da China. Por outro lado, os alelos DRB1*1501 e DQB1*0601 foram encontrados associados à resistência para a doença hepatoesplênica na mesma população. No Brasil, Secor e cols. (1996) analisaram o polimorfismo dos locos de HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1 em populações dos vilarejos de Itaquara e Itiricu no Estado da Bahia, locais endêmicos para *S. mansoni*. Os resultados mostraram que apenas o alelo DQB1*0201 estava associado à susceptibilidade para o desenvolvimento da doença hepatoesplênica causada pela infecção do *S. mansoni*.

A susceptibilidade genética para a infecção de *S. mansoni* também tem sido relacionada ao gene SM1, mapeado no cromossomo 5q31-q33, numa região muito próxima aos genes codificadores do receptor 1 do fator estimulador de colônia, fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos, interleucinas 3, 4, 5, 9, 13 e do

fator imuno regulatório (Marquet e cols., 1996; Coussinier-Paris e Dessein, 1995). No estudo realizado por Chiarella e cols. (1998) em uma amostra da população do Estado da Bahia, não foi encontrada nenhuma ligação entre o gene SM1 e os genes de HLA. De acordo com os autores, a susceptibilidade ou resistência à esquistossomose não depende primariamente do perfil dos genes de HLA do indivíduo infectado. Entretanto, se as moléculas de HLA desempenham uma importante função na resposta imune específica contra o *S. mansoni*, estas podem estar envolvidas no desenvolvimento dos diferentes aspectos clínicos da doença, como a formação do granuloma e o desenvolvimento de hepatoesplenomegalia. De fato, no estudo realizado por Corrêa-Oliveira e cols. (2000), os autores observaram um aumento na porcentagem de células $CD8^{+}HLA-DR^{+}$ em pacientes na fase crônica da esquistossomose, enquanto na fase aguda da doença o mesmo não aconteceu, apoiando a hipótese de Chiarella e cols. (1998) de que as moléculas HLA podem influenciar o prognóstico da esquistossomose mansônica.

2.5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A TIPIFICAÇÃO DOS LOCOS HLA

Tradicionalmente, os antígenos HLA foram inicialmente definidos através de técnicas sorológicas, as quais necessitavam da separação de linfócitos T e B para a tipificação dos antígenos de classe I e II, respectivamente. Estas técnicas baseiam-se na identificação das moléculas HLA expressas nas superfícies celulares através da utilização de anti-soros específicos para o reconhecimento destas moléculas, os quais nem sempre são capazes de discriminar todas as variantes alélicas. Com o advento de técnicas moleculares, principalmente da PCR (Polymerase Chain Reaction), o DNA passou a ser utilizado na maioria dos trabalhos que objetivam a determinação dos

alelos de HLA, o que propiciou o descobrimento de novas variantes alélicas, como DRB1*1340 e DRB1*0106 (Palou e cols., 1999; Maciag e cols., 2000).

Atualmente, as técnicas de PCR-SSP (PCR - Sequence Specific Primer) e PCR-SSOP (PCR - Sequence Specific Oligonucleotide Probing) são as mais utilizadas. A técnica de PCR-SSP consta de amplificação do DNA genômico pela PCR, usando kits produzidos comercialmente, seguida de eletroforese do material amplificado, análise da fotografia do gel e a inserção dos dados em *software* apropriado fornecido pelo fabricante dos kits. A PCR dá-se por meio da utilização de *primers* cuja seqüência é específica para cada grupo de alelos, quando utilizado micro-SSP de baixa resolução, e por *primers* cuja seqüência é alelo específica, quando utilizado micro-SSP de alta resolução. Já a técnica de PCR-SSOP consiste na amplificação por PCR do DNA genômico a partir de *primers* loco-específicos, seguida da imobilização do material amplificado em um suporte sólido (em geral membrana de *nylon*), no qual se dá a hibridização com sondas alelo-específicas adequadamente marcadas (Kimura e Sasazuki, 1992).

3. Referências Bibliográficas

3. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. AND POBÉR, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th ed. Sauders, 2000.
- ALMEIDA, A. B. AND FREEDMAN, D. O. Epidemiology and immunopathology of bancroftian filariasis. **Microbes and Infection**, 1, 1015-1022, 1999.
- AMIRZARGAR, A., MYTILINEOS, J., FARJADIAN, SH, DOROUDCHI, M., SCHERER, S., OPELZ, G. AND GHADERI, A. Human leukocyte antigen class II allele frequencies and haplotype association in Iranian normal population. **Hum. Immunol.**, 62: 1234-1238, 2001.
- ANAYA, J.M., CORREA, P. A., MANTILLA, R. D., JIMENEZ, F., KUFFNER, T. AND MCNICHOLL, M. Rheumatoid arthritis in African Colombians from Quibdo. **Sem. Arth. Rheum.**, 31 (3): 191-198, 2001.
- ANDERSEN, L. C., BEATY, J. S., NETTLES, J. W., SEYFRIED, C.E., NEPOM, G. T. AND NEPOM, B. S. Allelic polymorphisms in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. **J. Exp. Med.**, 173, 181-192, 1991.
- ARNAIZ-VILLENA, A., KARIN, M., BENDIKUZE, N., GÓMEZ-CASADO, E., MOSCOSO, J., SÍLVERA, C., OGUZ, F. S., SARPER DILER, A., DE PACHO, A., ALLENDE, L., GUILLEN, J. AND MARTINEZ LASO, J. HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans. **Tissue Antigens**, 57: 308-317, 2001a.
- ARNAIZ-VILLENA, A., ELAIWA, N., SILVERA, C., ROSTOM, A., MOSCOSO, J., GÓMEZ-CASADO, E., ALLENDE, L., VARELA, P. AND MARTINEZ-LASO, J. The origin of Palestinians and their genetic relatedness with other Mediterranean populations. **Hum. Immunol.**, 62: 889-900, 2001b.

- ARNAIZ-VILLENA, A., ILIAKIS, P., GONZALEZ-HEVILLA, M., LONGAS, J., GOMEZ-CASADA, E., SFYRIDAKI, K., TRAPAGA, J., SILVERA-REDONDO, C., MATSOUKA, C. AND MARTINEZ-LASO, J. The origin of Cretan populations as determined by characterization of HLA alleles. **Tissue Antigens**, 53(3), 213-26, 1999.
- ARNAIZ-VILLENA, A., BENMAMAR, D., ALVAREZ, M., DIAZ-CAMPOS, N., VARELA, P., GÓMEZ-CASADO, E. AND MARTINEZ-LASO, J. HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. **Hum. Immunol.**, 43: 259-268, 1995.
- BEGOVIĆ, A. B., MCCLURE, G. R., SURAJ, V. C., HELMUTH, R. C., FILDES, N., BUGAWAN, T. L., ERLICH, H. A. AND KLITZ, W. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. **J. Immunol.**, 148, 249-258, 1992.
- CAMPBELL, R. D., DUNHAM, I., KENDALL, E. AND SARGENT, C. Polymorphism of the human complement component C4. **Expl. Clin. Immunogenet.**, 7, 69-84, 1998.
- CHIARELLA, J.M., GOLDBERG, A.C., ABEL, L., CARVALHO, E.M., KALIL, J. AND DESSEIN, A. Absence of linkage between MHC and a gene involved in susceptibility to human schistosomiasis. **Braz . J. Med. Biol. Res.**, 31(5):665-70, 1998.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R., CALDAS, I. R., MARTINS-FILHO, O. A., QUEIROZ, C. C., LAMBERTUCCI, J. R., CUNHA-MELO, J. R., SILVEIRA, A. S., PRATA, A., WILSON, A., GAZZINELLI, G. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. **Acta Trop.** 23;77(1):141-6, 2000.
- COUSSINIER-PARIS, P. AND DESSEIN, A.J. *Schistosoma* specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* at Th0/2. **Eur. J. Immunol.**, 25: 2295-2302, 1995.

- COWLAND, J. B., MADSEN H. O. AND MORLING, N. HLA-DQA1 typing in Danes by two polymerase chain reaction (PCR) based methods. **Forensic Sci. Inter.**, 73, 11-13, 1995.
- CRESPÍ, C., MILÀ, J., MARTÍNEZ-POMAR, N., ETXAGIBEL, A., MUÑOZ-SAA, I., PRIEGO, D., LUQUE, A., PONS, J., PICORNELL, A., RAMON, M., CASTRO, J. A. AND MATAMOROS, N. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. **Tissue Antigens**, 60: 282-291, 2002.
- DATE, Y., KIMURA, A., KATO, H. AND SASAZUKI, T. DNA typing of a HLA-A gene: population study and identification of four new alleles in Japanese. **Tissue Antigens**, 47, 93-101, 1995.
- DEGLI-ESPOSTI, M. A., LEAVER, A. L., CHRISTIANSEN, F. T., WITT, C. S., ABRAHAM, L. J. AND DAWKINS, R. L. Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. **Hum. Immunol.**, 34, 242-252, 1992.
- DREYER, G., BRANDÃO, A. C., AMARAL, F., MEDEIROS, Z. AND ADDISS, D. Detection by ultrasound of living adult *Wuchereria bancrofti* in the female breast. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 91, 95-96, 1996.
- DREYER, G., MEDEIROS, Z., NETTO, M. J., LEAL, N. C., DE CASTRO, L. G. AND PIESSENS, W. F. Acute attacks in the extremities of persons living in an area endemic for bancroftian filariasis: differentiation of two syndromes. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene**, 93, 413-417, 1999.
- DREYER, G. AND DREYER, P. Bases para o tratamento da morbidade em áreas endêmicas de filariose bancroftiana. **Rev. Soc. Brás. Méd. Tropical**, 33(2), 217-221, 2000.
- DREYER, G., NORÕES, J. AND FIGUEREDO-SILVA, J. New insight into the natural history and pathology of bancroftian filariasis: implications for clinical management and filariasis control programmes. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, 94, 594-595, 2000a.

- DREYER, G., NORÕES, J., FIGUEREDO-SILVA, J. AND PIESENS, W.
Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: a clinical perspective.
Parasitol. Today, 16, 544-548, 2000b.
- FERREIRA, M. U., FORANDA, A. S. AND SCHUMAKER, T. T. S. **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**. Manole, 156p, 2003.
- FREEDMAN, D. O. Immune dynamics in the pathogenesis of human lymphatic filariasis. **Parasitol. Today**, 14, 229-234, 1998.
- FREEDMAN, D. O., HORN, T. D., MAIA E SILVA, C. M., BRAGA, C. AND MACIEL, A. Predominant CD8⁺ infiltrate in limb biopsies of individuals with filarial lymphedema and elephantiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 53, 633-638, 1995.
- FREEDMAN, D. O., PLIER, D. A., ALMEIDA, A., MIRANDA, J., BRAGA, C., MAIA E SILVA, M., TANG, J. AND FURTADO, A. Biased TCR repertoire in infiltrating lesional T cell in human bancroftian filariasis. **J. Immunol.** 162, 1756-1764, 1999.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2a. ed. SBG/CNPq. Ribeirão Preto, São Paulo. p. 631, 1992.
- GIBERT, M., REVIRON, D., MERCIER, P., CHIARONI, J. AND BOETSCH, G. HLA-DRB1 and DQB1 polymorphisms in Southern France and genetic relationships with other Mediterranean populations. **Hum. Immunol.**, 61: 930-936, 2000.
- GRUBIC, Z., ZUNEC', R., NAIPAL, A., KASTELAN, A. AND GIPHART, M. J. Molecular analisys of HLA class II polymorphism in Croitians. **Tissue Antigens**, 46, 293-298, 1995.
- HALDANE, J. B. S. The estimation and significance of the logarithm of a ration of frequencies. **Ann. Hum. Genet.**, 20:309-311, 1956.
- HILL, A. V. S., ALLSOPP, A. E. M., KWIATKOWSKI, D., ANSTEY, N. M., TWUMASI, P., ROWE, P. A., BENNETT, S., BREWSTER, D., MCMICHAEL,

- A. J. AND GREENWOOD, B. M. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. **Nature**, 352 (15): 595-600, 1991.
- HILL, A. V. S., ALLSOPP, C. E. M. AND KWIATSKOWSKY, D. Extensive genetic diversity in the HLA class II regions of Africans, with a locally predominant allele, DRB1*1304. **Proc Natl Acad Sci** 89: 2277-2281, 1992.
- HMIDA, S.A., GAUTHIER, A., DRIDI, F., QUIILIVIC, B., GENETET, K., BOUKEF' AND SEMANA, G. HLA class II gene polymorphism in Tunisians. **Tissue Antigens**, 45: 633-68, 1995.
- HUGHES, A. L. AND NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals over-dominant selection. **Nature**, 335, 167, 1988.
- HUGHES, A. L. AND NEI, M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for aver-dominant selection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86, 958, 1989.
- JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., HUNT, S. E WALPORT, M. **Imunobiologia. O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. 5^a. Ed. Artmed, Porto Alegre, 767 p, 2002.
- KATZ, N. AND PEIXOTO, S. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33: 303-308.
- KHALED, E. AI-NASSAR, MATHEW, J., THOMAS, N. AND FATANIA, H.R. HLA-DQA Allele and Genotype Fin a Native Kuwaiti. **Forensic Sci. Inter.**, 72: 65 – 69, 1995.
- KIMURA, A. AND SASAZUKI, T. Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: Tsuji, K., Aizawa, M., Sasazuki, T., eds. HLA-1991. **Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference**. Vol. I. Oxford: Oxford University Press, 397-419, 1992.

- KRIEGER, H., MORTON, N. E., MR, M. P., AZEVÊDO, E. S., FREIRE-MAIA, N. AND YASUDA, N. Racial admixture in Northeastern Brazil. **Ann. Hum. Genet., Lond.** 29, 113, 1965.
- KWOK, W.W., KOVATS, S., THURTLIE, P. AND NEPOM, G.T. HLA-DQ allelic polymorphisms constrain patterns of class II heterodimer formation. **J. Immunol.** 150: 2263 – 2270, 1993.
- KWOK, W.W., THURTLIE, P. AND NEPOM, G.T. A genetically controlled pairing anomaly between HLA-DQ and HLA-DQ chains. **J. Immunol.** 143: 3598 – 36, 1989.
- LAL, R. B., KUMARASWAMI, V., KRISHMAN, N., NUTMAN, T. B. AND OTTESEN, E. A. Lymphocyte subpopulations in Bancroftian filariasis: activated (DR+) CD8+ T cells in patients with chronic lymphatic obstruction. **Clin. Exp. Immunol.**, 77, 77-82, 1989.
- LAL, R. B., RAMZY, R. M. AND GAD, A. A. Elevated levels of soluble CD8 molecule in patients with lymphatic filariasis. **Immunol. Lett.**, 26, 85-88, 1990.
- LARA, M.L., LAYRISSE, Z., SCORZA, J.V., GARCIA, E., STOIKOW, Z., GRANADOS, J. AND BIAS, W. Immunogenetics of human american Cutaneous Leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. **Hum. Immunol.**, 30, 129-135, 1991.
- LAYRISSE, Z., GUEDEZ, Y., DOMÍNGUEZ, E., PAZ, N., MONTAGNANI, S., MATOS, M., HERRERA, E., OGANDO, V., BALBAS, O. AND RODRIGUES-LARRALDE, A. Extended HLA haplotypes in a Carib Amerindian population: the Yucpa of the Perija Range. **Hum. Immunol.**, 62: 992-1000, 2001.
- LÁZARO, A. M., MORAES, E., MARCOS, C. Y., MOARES, J. R., FERNÁNDEZ-VIÑA, M. A. AND STASTNY, P. Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. **Hum. Immunol.**, 60: 1138-1149, 1999.
- LECHLER, R. **HLA and Disease**. Academic Press Inc. USA, 186 p., 1994.

- LOUZADA-JUNIOR, P., SMITH, A.G., HANSEN, J. A., DONADI, E. A. HLA-DRB1 and DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. **Tissue Antigens**, 57: 158-162, 2001.
- LULLI, P., GRAMMATICO, P., BRIOLI, G., CATRICALÀ, C., MORELLINI, M., ROCCELA, M., MARIANI, B., PENNESI, G., ROCCELLA, F., CAPPELLACCI, S. AND TRABACE, S. HLA-DR and -DQ alleles in Italian patients with melanoma. **Tissue Antigens**, 51: 276-280, 1998.
- MACIAG, P. C., JUNES, K. S., VILLA, L.L. AND PELTZ-ERLER. Identification of a novel allele, DRB1*1340, in two Brazilian individuals. **Tissue Antigens**, 56: 194-196, 2000b.
- MACIAG, P.C., SCHLECHT, N.F., SOUZA, P.S.A., FRANCO, E.L., VILLA, L.L., PETZL-ERLER, M.L. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. **Cancer Epid. Biomarkers & Prev.**, 9:1183-1191, 2000a.
- MACK, S. J., BUGAWAN, T. L., MOONSAMY, P. V., ERLICH, J. A., TRACHTENBERG, E. A., PAIK, Y. K., BEGOVICH, A. B., SAHA, N., BECK, H. P., STONEKING, M. AND ERLICH, H. A. Evolution of Pacific/Asian populations inferred from HLA class II allele frequency distributions. **Tissue Antigens**, 55: 383-400, 2000.
- MAIZELS, R. M., SARTONO, E., KURNIAWAN, A., PARTONO, F., SELKIRK, M. E. AND YAZDANBAKHSH, M. T-cell activation and the balance of antibody isotypes in human lymphatic filariasis. **Parasitol. Today**, (11) 2, 50-56, 1995.
- MARQUET, S., ABEL, L., HILLAIRES, D., DESSEIN, H., KALIL, J., FEINGOLD, J., WEISSENBAACH, J. AND DESSEIN, A.J. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. **Nature Genet.** 14: 1-8, 1996.

- MARSH, S. G. E., ALBERT, E. D., BODMER, W. F., BONTROP, R. E., DUPONT, B., ERLICH, H. A., GERAGHTY, D. E., HANSEN, J. A., MACH, B., MAYR, W. R., PARHAM, P., PETERSDORF, E. W., SASAZUKI, T., SCHREUDER, G. M. TH., STROMINGER, J. L., SVEJGAARD, A. AND TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. **Tissue Antigen.**, 60, 407-464, 2002.
- MARTINEL-LASO, J., DE JUAN, D., MARTINEZ-HUILES, N., GOMEZ-CASADO, E., CUADRADO, E. AND ARNAIZ-VILENA, A. The contribution of HLA-A, -B, -C and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques. **Tissue Antigens**, 45, 327-245, 1995.
- MATTIUZ, P. L., DI PAOLO, E., FOSSOMBRONI, V., MENICUCCI, A., PRADELLA, F., PORFIRIO, B. AND ROMBOLA, G. HLA-B44subtypes and the chance of finding HLA compatible donor/recipient pairs for bone marrow transplantation: a haplotype study of 303 Italian families. **Tissue Antigens**, 50(6), 602-9, 1997.
- MCGINNIS, M.D., LEBO, R.V., QUINN, D.L. AND SIMONS, M.J. Ancient, highly polymorphic human major histocompatibility complex DQA1 intron sequences. **Am. J. Hum. Gen.** 52: 438 - 444., 1994
- MCMANUS, D. P., ROSS, A. G. P., WILLIAMS, G. M., SLEIGH, A. C., WIEST, P., ERLICH, H., TRACHTENBERG, E., GUANLING, W., MCGARVEY, S. T., LI, Y. S. AND WAINE, G. J. HLA class II antigens positively and negatively associated with hepatosplenic schistosomiasis in a Chinese population. **Int. J. Parasit.**, 31: 674-680, 2001.
- MEDDEB-GARNAOUI, A., GRITLI, S., GARBOUJ, S., BEM FADHEL, M., EL KARES, R., MANSOUR, L., KAABI, B., CHOUCANE, L., BEM SALAH, A. AND DELLAGI, K. Association analysis of HLA-Class II and Class III gene polymorphisms in the susceptibility to Mediterranean visceral leishmaniasis. **Hum. Immunol.**, 62, 509-517, 2001.

- MELROSE, D. W. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. **Int. J. Parasitology**, 32:947-960, 2002.
- MESSER, G., SPENGLER, U., JUNG, M., HONOLD, G., BLOMER, K., PAPE, G., RIETMULLER, G. AND WEISS, E. Polymorphic Structure of the Tumor Necrosis Factor (TNF) Locus: An Nco1 Polymorphism in the First Intron of the Human TNF- β Gene Correlates with a Variant Amino Acid in Position 26 and a Reduced Level of TNF Production. **J. Exp. Med.**, 173: 209-219, 1991.
- MEYER, C. G., GALLIN, M., ERTTMANN, K. D., BRATTIG, N., SCHNITTGER, L., GELHAUS, A., TANNICH, E., BEGOVICH, A. B., ERLICH, H. A. AND HORSTMANN, R. D. HLA-D alleles associated with generalized disease, localized disease, and putative immunity in *Onchocerca volvulus* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 7515-7519, 1994.
- MICHAEL, E. AND BUNDY, D. A. P. Global mapping of lymphatic filariasis. **Parasitol. Today**, 13:472-476, 1997.
- MICHAEL, E., BUNDY, D. A. P. AND GRENFELL, B. T. Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. **Parasitol.** 112: 409-428, 1996.
- MORAES, M. E., FERNANDEZ-VIÑA, M., SALATIEL, I., TSAI, S., MORAES, J. R. AND STASTNY, P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. **Tissue Antigens**, 41: 238-242, 1993.
- MURDOCH, M. E., PAYTON, A., ABIOSE, A., THOMSON, W., PANICKER, V. K., DYER, P. A., JONES, B. R., MAIZELS, R. M. AND OLLIER, W. E. R. HLA-DQ alleles associate with cutaneous features of onchocerciasis. **Hum. Immunol.**, 55: 46-52, 1997.
- MURO, M., MARÍN, L., TORÍO, A., MOYA-QUILES, M. R., MINGUELA, A., ROSIQUE-ROMAN, J., SANCHIS, M. J., GARCIA-CLATAYUD, M. C., GARCÍA-ALONSO, A. AND ALVAREZ-LÓPEZM. R. HLA polymorphism in

- the Murcia population (Spain): in the cradle of the archaeologic Iberians. **Hum. Immunol.**, 62: 910-921, 2001.
- NORÕES, J., ADDISS, D., AMARAL, F., COUTINHO, A., MEDEIROS Z. AND DREYER G. Occurrence of living adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene**, 90: 55-56, 1996.
- OHASHI, J., YOSHIDA, M., OHTSUKA, R., NAKAZAWA, M., JUJI, T. AND TOKUNAGA, K. Analysis of HLA-DRB1 polymorphism in the Gidra of Papua New Guinea. **Hum. Biol.**, 72(2): 337-347, 2000.
- PAI, C.Y., CHOU, S.L., YANG, C.H. AND TANG, T.K. Flow Chart HLA-DQA1 Genotyping and Its Application to a Forensic Case. **Journal of Forensic Sciences**, 40:(2) 228 -235, 1995.
- PALOU, E., MONGAY, L., ARIAS, M.T., ISART, F., SUÁREZ, B., MASSÓ, M., FABREGAT, V., MARTORELL, J., GAYÁ, A. Identification of a novel DRB1-allele (DRB1*0106) by sequence-based typing. **Tissue Antigens**, 53: 308-310, 1999.
- PARAENSE, W. L. The schistosome vectors in the Américas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 96 (Suppl.): 7-16, 2001.
- PIMTANOTHAI, N., HURLEY, C. K., LEKE, R., KLITZ, W. AND JOHNSON, A. H. HLA-DR and -DQ polymorphism in Cameroon. **Tissue Antigens**, 58: 1-8, 2001.
- POWIS, S.H., TONKS, S., MOCKRIDGE, I., KELLY, A.P., BODMER, J.G. AND TROWSDALE, J. Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. **Immunogenetics**, 37: 373 – 380, 1993.
- RENQUIN, J., SANCHEZ-MAZAS, A., HALLE, L., RIVALLAND, S., JAEGER, G., MBAYO, K., BIANCHI, F. AND KAPLAN, C. HLA class II polymorphism in Aka Pygmies and Bantu Congolese and a reassessment of HLA-DRB1 African diversity. **Tissue Antigens**, 58: 211-222, 2001.

- SÁNCHEZ-VELASCO, P AND LEYVA-COBIÁN, F. The HLA class I and class II allele frequencies studied at the DNA level in the Svanetian population (Upper Caucasus) and their relationships to Western European populations. **Tissue Antigens**, 58: 223-233, 2001.
- SARUHAN-DIRESKENELI, G., UYAR, F. A., BAKAR, S. AND ERAKSOY, M. Molecular analysis of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 polymorphism in Turkey. **Tissue Antigens**, 55: 171-174, 2000.
- SECOR, W. E., DEL CORRAL, H., DOS REIS, M. G., RAMOS, E. A., SIMÓN, A. E., MATOS, E. P., REIS, E. A., DO CARMO, T. M., HIRAYAMA, K., DAVID, R. A., DAVID, J. R. AND HARN, D. A. JR. Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201. **J. Infect. Dis.**, 174(5): 1131-5, 1996.
- SENGER, G., RAGOISSIS, J., TROWSDALE, J. AND SHEER, D. Fine mapping of the MHC class II region within 6p21 and evaluation of probe ordering interphase fluorescence in situ hybridization. **Cytogenet. Cell. Genet.** 61, 49-53, 1993.
- SHENOY, R., KUMARASWAMI, V., SUMA, T., RAJAN, K., AND RADHAKUTTYAMMA, G. A double blind, placebo-controlled study of the efficacy of oral penicillin, diethylcarbamazine or local treatment of the affected limb in preventing acute adenolymphangitis in lymphodema caused by brugian filariasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 93, 367-377, 1999.
- SHENOY, R. K., SANDHYA, K., SUMA, T. K. AND KUMARASWAMI, V., A preliminary study of filariasis related acute adenolymphangitis with special reference to precipitating factors and treatment modalities. **South. Asian J. Trop. Med. Public Health**, 26, 301-305, 1995.
- SPINOLA, H., BREHM, A., WILLIAMS, F., JESUS, J. AND MIDDLETON, D. Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde. Relationships with the slave trade route. **Ann. Hum. Genet.**, 285-296, 2002.
- THOMSEN, M., NEUGEBAUER, M., ARNAUD, J., BOROT, N., SEVIN, A., BAUR, M. AND CAMBON-THOMSEN, A. Recombination fractions in the

- HLA system based on data set "provinces Francaises": Indications of haplotype-Specific recombination rates. **Eur. J. Immunogenet.** 21: 33 – 43, 1994.
- TIWARI, J. AND TERASAKI, P. I. **HLA and Disease Associations**. Springer-Verlag, 472pp, 1985.
- TOKUNAGA, K., OHASHI, J., BANNAI, M. AND JUJI, T. Genetic link between Asians and Native Americans: Evidence from HLA genes and haplotypes. **Hum. Immunol.**, 62: 1001-1008, 2001.
- UINUK-OOL, T. S., TAKEZAKI, N., SUKERNIK, R. I., NAGL, S. AND KLEIN, J. Origin and affinities of indigenous Siberian populations as revealed by HLA class II gene frequencies. **Hum. Genet.**, 110: 209-226, 2002.
- VEJBAESYA, S., CHIERAKUL, N., LUANGTRAKOOL, K., SRINAK, D. AND STEPHENS, H. A. F. Associations of HLA class II alleles with pulmonary tuberculosis in Thais. **Eur. J. Immunogenet.**, 29, 431-434, 2002.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Eliminate Filariasis: Attack Poverty. Proceedings of the Meeting of the Global Alliance to eliminate lymphatic filariasis. Geneva. **WHO**, 2000.
- WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann. Hum. Genet.** 19:251-253, 1955.
- YAZDANBAKHS, M., SARTONO, E., KRUIZE, Y. C. M., KURNIAWAN, A., PARTONO, F., MAIZELS, R. M., SCHREUDER, G. M. T., SCHIPPER, R. AND VRIES, R. R. P. HLA and elephantiasis in lymphatic filariasis. **Hum. Immunol.**, 44, 58-61, 1995.

4. Manuscritos

Manuscrito 1

***POLIMORFISMO DE TRÊS LOCOS DE HLA CLASSE II NA POPULAÇÃO DO
ESTADO DE PERNAMBUCO, NORDESTE DO BRASIL***

Manuscrito a ser enviado para a revista *Tissue Antigens* (Blackwell Publishing)

POLIMORFISMO DE TRÊS LOCOS DE HLA CLASSE II NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO, NORDESTE DO BRASIL

Edileine Dellalibera¹, Rosilda dos Santos Silva¹, Marcos Antonio de Moraes Júnior¹, Pragati Nigam¹, Eduardo Antonio Donadi², Luiz Mauricio-da-Silva¹

¹Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Divisão de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: DRB1, DQA1, DQB1, população brasileira, polimorfismo.

Correspondência para:

Luiz Mauricio-da-Silva, MD, Ph.D

Rua Professor Aurélio de Castro Cavalcanti, 79/804, Boa Viagem

51210-020 Recife-PE

Tel/Fax. +55 81 3271-8512

E-mail> mauricio@ufpe.br

RESUMO

A atual população da Região Nordeste do Brasil originou-se a partir da miscigenação ocorrida entre o negro africano, o caucasiano europeu e o índio nativo. Apesar dos vários estudos realizados em diversas populações mundiais, pouco se sabe sobre o polimorfismo dos locos de HLA classe II das populações desta Região. O presente estudo caracterizou a população do Estado de Pernambuco quanto ao polimorfismo dos locos de HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1. Os alelos DRB1*0701 (0,1390), DQA1*0102 (0,1954) e DQB1*0201 (0,2128) foram os mais frequentemente encontrados nesta população. Foram identificados no total 107 possíveis haplótipos, sendo o DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (0,1234) o mais freqüente na população pernambucana. A alta heterozigosidade observada em cada um dos locos analisados (0,9540 para DRB1, 0,7931 para DQA1 e 0,7126 para DQB1) mostra a grande variabilidade genética existente na população estudada. A presença, nesta população, dos alelos DRB1*0411 (0,0230), DRB1*0807 (0,0057) e DRB1*1402 (0,0057) e do haplótipo DRB1*0411-DQA1*0301-DQB1*0302 (0,0115), típicos de populações indígenas, e dos alelos DRB1*0302 (0,0115), DRB1*0804 (0,0057) e DRB1*1503 (0,0632), comuns em populações negras, reforçam a informação de que houve a participação de povos destas duas etnias (negro e índio) na origem da população atual do Estado de Pernambuco. Os resultados encontrados após o cálculo das distâncias genéticas entre a população pernambucana e suas populações parentais,

indicaram que esta população está mais próxima de caucasianos europeus (0,0839) e mais distante de negros africanos e indígenas americanos (0,4387 e 1,2814, respectivamente).

INTRODUÇÃO

O polimorfismo dos genes HLA tem sido freqüentemente utilizado na caracterização genética de diferentes populações mundiais. O avanço tecnológico ocorrido nos últimos anos promoveu a descoberta de maior número de alelos de HLA. Somente no 13th International Histocompatibility Workshop, realizado em 2002, foram listados 315 alelos HLA-DRB1, 22 alelos HLA-DQA1 e 53 alelos HLA-DQB1, aos quais certamente serão adicionados outros novos alelos encontrados no decorrer de novos estudos {1}.

A população brasileira, de um modo geral, diferencia-se em algumas regiões geográficas do país. Enquanto na Região Sul, por exemplo, há um maior contingente de caucasianos europeus, sobretudo de alemães e italianos {2}, na Região Norte há uma predominância de descendentes indígenas {3}. Entretanto, na Região Nordeste, onde o intercruzamento racial foi muito mais efetivo do que nas demais regiões do país {4}, é praticamente impossível distinguir um indivíduo como pertencente a um dos três grupos étnicos, o que dá às populações desta Região uma característica única quando comparadas com outras populações brasileiras e mundiais {5}. O presente estudo tem como objetivo caracterizar uma amostra da população do Estado de Pernambuco, Região Nordeste do Brasil, quanto ao polimorfismo dos locos de HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1, e avaliar a contribuição de cada grupo étnico ancestral (caucasiano, negro e índio) para a formação da atual população pernambucana.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue venoso de 87 parturientes saudáveis não aparentadas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, mediante consentimento informado. O DNA foi extraído de acordo com o descrito na literatura {6}.

A tipificação do loco de HLA-DRB1 foi realizada através da utilização de kits de baixa e alta resolução comercializados pela One Lambda Inc., os quais utilizam a técnica de PCR-SSP. O loco DQA1 foi tipificado através de kit fornecido pelo Collaborative Transplant Study (CTS), o qual também utiliza a técnica de PCR-SSP, e o loco DQB1 foi tipificado através da técnica de PCR-SSO descrita por Kimura e Sasazuki {7}.

As frequências alélicas foram obtidas pelo método da contagem direta. Foram utilizados os programas Arlequin {8} para a análise de frequências haplotípicas, GDA {9} para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste exato de Fisher e DISPAN {10} para a verificação das distâncias genéticas {11} entre a população do presente estudo e outras descritas na literatura aqui consideradas como parentais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências alélicas da população pernambucana estão descritas na Tabela 1. Foram encontrados 45 alelos para o loco DRB1, 12 alelos para o loco DQA1, e 19 alelos para o loco DQB1. Foram mais frequentes os alelos DRB1*0701 (0,1390), DQA1*0102 (0,1954) e DQB1*0201 (0,2128). Os três locos analisados estão completamente ligados ($p=0,0000$). Os locos DRB1 ($p=0,1609$) e DQA1 ($p=0,0847$) estão em equilíbrio apresentando a distribuição das frequências genotípicas de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, enquanto o loco DQB1 ($p=0,0000$) está em desequilíbrio. As heterozigosidades observadas para os locos DRB1, DQA1 e DQB1 (0,9540, 0,7931 e 0,7126, respectivamente) mostram a grande variabilidade genética existente na população pernambucana.

Foram encontrados no total 113 possíveis haplótipos no presente estudo, sendo que apenas 25 deles apresentaram frequências superiores a 0,0100. Destes, foram mais frequentes os haplótipos DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (0,1234), DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 (0,0460), DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501 (0,0335), DRB1*1101-DQA1*05012-DQB1*0301 (0,0230), DRB1*0402-DQA1*0301-DQB1*0302 (0,0287), DRB1*0801-DQA1*0401-DQB1*0401 (0,0230) e DRB1*1503-DQA1*0102-DQB1*0602 (0,0216). O haplótipo DRB1*0411-DQA1*0301-DQB1*0302 (0,6023), comum em índios americanos {12}, foi encontrado com frequência de 0,0115 na população de Pernambuco.

Foram também encontrados na população analisada os alelos DRB1*0802 (0,0057), DRB1*0411 (0,0230), típicos de ameríndios, e os alelos DRB1*0302 (0,0115), DRB1*1503 (0,0632) e DRB1*0804 (0,0057), significativamente mais freqüentes em populações africanas {12,13,14}. Estes mesmos alelos também estiveram presentes nas populações estudadas nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraíba {15,16,17}, reforçando a informação de que houve a participação de povos destas duas etnias (negro e índio) na origem da atual população brasileira.

A contribuição de cada grupo étnico ancestral (caucasiano, negro e índio) para a formação da população atual do Estado de Pernambuco, foi avaliada através do cálculo da distância genética {11}. Os resultados indicam que a população pernambucana está geneticamente mais próxima de populações caucasianas ($d=0,0839$), as quais provavelmente contribuíram com um maior contingente genético para a formação da população estudada, e mais distante geneticamente das populações negras africanas ($d=0,4387$) e ameríndias ($d=1,2814$) (Figura 1). A composição genética da atual população pernambucana apresentando um maior contingente de caucasianos europeus é condizente com os registros históricos do processo de colonização do Nordeste brasileiro {18}, o qual foi efetuado por portugueses, espanhóis e holandeses, que aqui encontraram um pequeno contingente de índios nativos. Posteriormente estes colonizadores europeus transportaram para a Região um grupo de negros africanos que aqui viveram inicialmente como escravos. Do inter cruzamento entre estes povos surgiu a atual população do Estado de Pernambuco {5}.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Laboratório de Genética Molecular Humana da Universidade Federal de Pernambuco, da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), e Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FAEPA).

Tabela 1. Frequências alélicas dos locos HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1 na população do Estado de Pernambuco.

Alelo	Frequência	Alelo	Frequência	Alelo	Frequência	Alelo	Frequência
DRB1*01	0,0115	DRB1*0802	0,0057	DQA1*0101	0,0977	DQB1*0201	0,2128
DRB1*0101	0,0517	DRB1*08041	0,0057	DQA1*0102	0,1954	DQB1*0301	0,0920
DRB1*0102	0,0460	DRB1*0807	0,0057	DQA1*0103	0,0862	DQB1*0302	0,0747
DRB1*03	0,0172	DRB1*09012	0,0230	DQA1*0104	0,0460	DQB1*0303	0,0287
DRB1*03011	0,0172	DRB1*1001	0,0230	DQA1*0201	0,1667	DQB1*0304	0,0460
DRB1*03012	0,0057	DRB1*12	0,0057	DQA1*0301	0,1552	DQB1*0401	0,0805
DRB1*03021	0,0115	DRB1*1201	0,0115	DQA1*0401	0,0690	DQB1*05	0,0172
DRB1*04	0,0172	DRB1*1202	0,0057	DQA1*0501	0,0230	DQB1*0501	0,1437
DRB1*0401	0,0057	DRB1*13	0,0287	DQA1*05011	0,0172	DQB1*0503	0,0230
DRB1*0402	0,0287	DRB1*1301	0,0805	DQA1*05012	0,1149	DQB1*05031	0,0230
DRB1*0404	0,0172	DRB1*1302	0,0057	DQA1*0502	0,0230	DQB1*05032	0,0460
DRB1*0405	0,0115	DRB1*1305	0,0057	DQA1*0601	0,0057	DQB1*06	0,0230
DRB1*0407	0,0057	DRB1*1309	0,0057			DQB1*0601	0,0057
DRB1*0410	0,0057	DRB1*14	0,0057			DQB1*0602	0,0862
DRB1*0411	0,0230	DRB1*1401	0,0057			DQB1*0603	0,0287
DRB1*07	0,0172	DRB1*1402	0,0057			DQB1*0604	0,0057
DRB1*0701	0,1390	DRB1*15	0,0230			DQB1*0605	0,0057
DRB1*11	0,0172	DRB1*1501	0,0517			DQB1*0607	0,0057
DRB1*1101	0,0460	DRB1*1503	0,0632			DQB1*0608	0,0517
DRB1*1102	0,0115	DRB1*16	0,0057				
DRB1*1104	0,0460	DRB1*1601	0,0115				
DRB1*08	0,0172	DRB1*16021	0,0172				
DRB1*0801	0,0287						

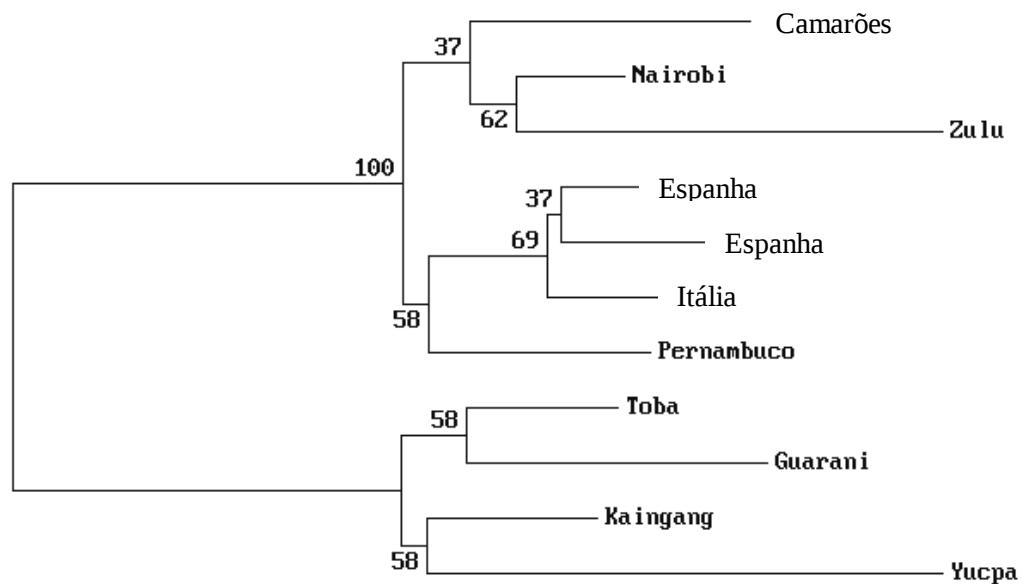


Figura 1. Dendrograma construído pelo método Neighbor-joining. A população do Estado de Pernambuco foi comparada com as populações de outros estudos, aqui consideradas como parentais (Espanha {19}, Yucpa {12}, Camarões {20}, Nairobi (Kenia) {21}, Zulu (África do Sul) {22}, Itália {23}, Espanha {24}, Toba {25}, Guarani {26}, Kaingang {27}).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GMTh, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigen.*, 60, 407-464, 2002.
2. Dornelles, CL, Callegari-Jacques, SM, Robinson, WM, Weimer, TA, Franco, MHLP, Hickmann, AC, Geiger, CJ, Salzano, FM. Genetics, surnames, grandparents' nationalities, and ethnic admixture in Southern Brazil – do the patterns of variation coincide? *Genet. Mol. Biol.*, 22, 2, 151-161, 1999.
3. Santos, SEB and Guerreiro, JF. The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon Region. *Rev. Brasil. Genet.*, 18, 2, 311-315, 1995.
4. Salzano, FM. Human races: myth, invention, or reality? *Interciencia*, 22,5, 221-227, 1997.
5. Krieger H, Morton NE, Mr MP, Azevêdo ES, Freire-Maia N and Yasuda N. Racial admixture in Northeastern Brazil. *Ann. Hum. Genet.*, Lond. 29, 113, 1965.
6. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16, 1215, 1988.
7. Kimura A, SasazuKi T: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: Tsuji, K., Aizawa, M.,

- Sasazuki, T., eds. HLA-1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. Vol. I. Oxford: Oxford University Press, 397-419, 1992.
8. Schneider S, Roessli D, Excoffier L: Arlequin 2.000. A software for population genetics data analysis (<http://anthro.unige.ch/arlequin>), 2000.
 9. Lewis PO, Zaykin D: Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>, 2001.
 10. Ota, T. DISPAN: Computer program for Genetic Distance and Phylogenetic Analysis. Institute of Molecular and Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, 1993.
 11. Nei M: Genetic distances between populations. Am. Nat. 106:283-292, 1972.
 12. Layrisse Z, Guedez Y, Domínguez E, Paz N, Montagnani S, Matos M, Herrera E, Ogando V, Balbas O, Rodrigues-Larralde A: Extended HLA haplotypes in a Carib Amerindian population: the Yucpa of the Perija Range. Hum. Immunol., 62: 992-1000, 2001.
 13. Lázaro AM, Moraes E, Marcos CY, Moares JR, Fernández-Viña MA, Stastny P: Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. Hum. Immunol., 60: 1138-1149, 1999.
 14. Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, CA, 1997.

15. Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA: HLA-DRB1 and DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. *Tissue Antigens*, 57: 158-162, 2001.
16. Moraes ME, Fernandez-Viña M, Salatiel I, Tsai S, Moraes JR, Stastny P: HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. *Tissue Antigens*, 41: 238-242, 1993.
17. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PSA, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML: Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epid. Biomarkers & Prev.*, 9:1183-1191, 2000.
18. Verger P. Trade Relations between the Bight of Benin and Bahia from the 17th to 19th century. Pp. 1-7. Ibadan University Press.
19. Muro M, Marín L, Torío A, Moya-Quiles MR, Minguela A, Rosique-Roman J, Sanchis MJ, Garcia-Clatayud MC, García-Alonso A, Alvarez-López MR: HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): in the cradle of the archaeological Iberians. *Hum. Immunol.*, 62: 910-921, 2001.
20. Pimtanonthai N, Hurley CK, Leke R, Klitz W, Johnson AH: HLA-DR and -DQ polymorphism in Cameroon. *Tissue Antigens*, 58: 1-8, 2001.
21. Gaur L, Montero R: Nairobi normal. In: Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1997.
22. Hammond MG: Zulu normal. In: Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1997.

23. Ferrara GB, Delfino L, Longo A, Morabito A, Pera C, Pozzi S: Italian normal. In: Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1997.
24. Sánchez J, Ocón,P, Ramón E, Cardoso M, Caballero A, Ortiz AA: Caucasian Spanish normal. In: Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1997.
25. Lázaro AM, Fernandez-Viña MA, Raimandi E, Marcos CY, Stastny P: Two South American Indian tribes normal. In: Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1997.
26. Petzl-Erler ML: Guarani Amerindian Brazil normal. In: Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1997.
27. Petzl-Erler ML: Kaingang Amerindian Brazil normal. In: Terasaki PI, Gjertson DW: HLA 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1997.

Manuscrito 2

***ASSOCIAÇÃO DE GENES DE HLA CLASSE II (DRB1 E DQB1) COM
FILARIOSE BANCROFTIANA NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE
PERNAMBUCO.***

Manuscrito a ser enviado para a revista *Human Immunology* (Elsevier)

**ASSOCIAÇÃO DE GENES DE HLA CLASSE II (DRB1 E DQB1) COM
FILARIOSE BANCROFTIANA NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE
PERNAMBUCO.**

**Edileine Dellalibera¹, Luiz Mauricio-da-Silva¹, Marcos Antonio de Moraes Júnior¹,
Zulma Medeiros², Gerusa Dreyer³, Eduardo Antonio Donadi⁴, Rosilda dos Santos Silva¹**

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

² Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

³ Departamento de Doenças Tropicais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

⁴Divisão de Imunologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Palavras-chave: filariose bancroftiana, população brasileira, DRB1, DQB1

Correspondência para:

Rosilda dos Santos Silva, Ph.D

Rua Professor Aurélio de Castro Cavalcanti, 79/804, Boa Viagem

51210-020 Recife-PE

Tel/Fax. +55 81 32718512

E-mail> rosilda@ufpe.br

RESUMO

O polimorfismo dos locos de HLA-DRB1 e -DQB1 foi analisado através da técnica PCR-SSP/SSO, em uma amostra de indivíduos saudáveis e em outra de pacientes filarióticos da população do Estado de Pernambuco, Região Nordeste do Brasil. Foram detectados um total de 55 alelos para o loco HLA-DRB1 e de 25 para o loco HLA-DQB1. Os alelos DRB1*0701 (0,1257) e DRB1*0301 (0,1435) foram os mais freqüentes nas amostras controle e de pacientes, respectivamente, e o alelo DQB1*02 (0,2050 e 0,2269) foi o mais freqüente nas duas amostras. As diferenças das freqüências alélicas quando comparadas a amostra controle com a amostra de pacientes filarióticos, foram estatisticamente significativas para os alelos DRB1*0102 ($p=0,0002$), DRB1*0301 ($p<0,0001$), DQB1*0401 ($p<0,0001$), DQB1*0402 ($p=0,0125$) e DQB1*0608 ($p=0,0050$), mesmo após a correção de Bonferroni. Os riscos relativos calculados para cada um destes alelos foram 0,03, 6,68, 0,02, 24,74 e 0,03, respectivamente. Estes resultados sugerem que os alelos DRB1*0102, DQB1*0401 e DQB1*0608 conferem proteção contra o desenvolvimento da filariose bancroftiana, enquanto que os alelos DRB1*0301 e DQB1*0402 conferem suscetibilidade ao desenvolvimento desta doença na população pernambucana.

INTRODUÇÃO

O entendimento da contribuição genética para o desenvolvimento de doenças infecciosas no homem tem despertado grande interesse científico. Doenças como filariose, leishmaniose, malária e oncocercariose ainda continuam endêmicas em certas regiões do mundo, como África e América do Sul (Organização Mundial de Saúde – www.who.int). A maioria dos trabalhos até então realizados tem focado os aspectos histopatológicos, bem como a ativação de diferentes tipos celulares na geração da resposta imunológica a estas doenças {1, 2, 3, 4}. No entanto, poucos trabalhos têm priorizado a determinação do polimorfismo dos genes de HLA. Considerando o papel fundamental desempenhado pelas moléculas de HLA na resposta imunológica, é de grande importância determinar qual ou quais alelos de HLA estão envolvidos em uma possível associação com as doenças parasitárias. No estudo realizado por Meyer e cols. (1994) {2}, por exemplo, os autores estudaram o polimorfismo dos locos de HLA-DRB1 e -DQB1 em um grupo de pacientes do Oeste africano portadores de oncocercariose, e encontraram o alelo DQB1*0301 conferindo proteção contra o desenvolvimento da doença, e os alelos DQB1*0501 e DQB1*0201 conferindo susceptibilidade ao desenvolvimento de oncocercariose generalizada. Este último (DQB1*0201) também foi encontrado conferindo susceptibilidade ao desenvolvimento da forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica em uma amostra da população do Estado da Bahia, Brasil {5}.

O Estado de Pernambuco, localizado na Região Nordeste do Brasil é uma área endêmica para filariose bancroftiana {6,7,8} e até o momento não há informações de que sua população tenha sido analisada quanto a possíveis associações de alelos de HLA com filariose bancroftiana. O presente estudo tem como objetivo verificar o polimorfismo dos locos HLA-DRB1 e -DQB1 em uma amostra de pacientes filarióticos da Região Metropolitana da cidade de Recife, capital do Estado de Pernambuco, e buscar possíveis associações destes locos com susceptibilidade ou resistência à filariose bancroftiana por comparação do polimorfismo dos locos analisados observado nas amostras controle e de pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra - Foram coletadas amostras de sangue venoso de 95 parturientes saudáveis não aparentadas do HCUFPE (Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco), as quais constituíram a amostra controle, e de 108 indivíduos portadores de filariose bancroftiana, também não aparentados, atendidos pelo serviço de acompanhamento de pacientes filarióticos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), que constituíram a amostra de pacientes filarióticos. Ambas as amostras foram obtidas mediante consentimento informado, tendo sido o projeto aprovado pela Comissão de Ética do HCUFPE.

Tipificação dos locos de HLA - A tipificação do loco DQB1 da amostra controle foi realizada através da técnica de PCR-SSO descrita por Kimura e Sasazuki (1992) {9}. O loco DRB1 da amostra controle e os locos DRB1 e DQB1 da amostra de pacientes filarióticos foram tipificados através da técnica de PCR-SSP utilizando kits de baixa e alta resoluções fornecidos comercialmente pela One Lambda Inc.

Análise Estatística - As frequências alélicas foram obtidas pelo método da contagem direta. O programa GDA foi utilizado para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste exato de Fisher {10}. O cálculo do risco relativo (RR) foi realizado para os alelos que mostraram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas a amostra controle com a de pacientes ($p < 0,05$), mesmo após a correção de Bonferroni.

RESULTADO

Foram identificados no total 55 alelos distintos para o loco DRB1 e 25 para o loco HLA-DQB1. Na amostra controle foram identificados 45 alelos para o loco DRB1, e 17 alelos para o loco DQB1 (Tabela 1). Já na amostra de filarióticos foram identificados 44 alelos para o loco DRB1 e 19 alelos para o loco DQB1 (Tabela 2). Para o loco DRB1, os alelos *0701 (0,1257) na amostra controle e *0301 (0,1435) em

filarióticos foram os mais freqüentes. Para o loco DQB1, o alelo mais freqüente foi o *02 nas amostras controle (0,2050) e de filarióticos (0,2269).

Após a comparação das freqüências alélicas dos dois locos entre as duas amostras (controle e de pacientes) foram observadas diferenças significativas para os alelos DRB1*0102 ($p=0,0110$), DRB1*0301 ($p<0,0001$), DQB1*0401 ($p<0,0001$), DQB1*0402 ($p=0,0125$) e DQB1*0608 ($p<0,0050$) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os resultados sugerem que os alelos DRB1*0102, DQB1*0401 e DQB1*0608 estão relacionados com a proteção contra o desenvolvimento de filariose bancroftiana por apresentarem maior freqüência na amostra controle e risco relativo muito baixo (0,03, 0,02 e 0,03, respectivamente), enquanto os alelos DRB1*0301 e DQB1*0402 estão relacionados à suscetibilidade ao desenvolvimento da filariose bancroftiana na população do Estado de Pernambuco por apresentarem maior freqüência na amostra de pacientes filarióticos e alto risco relativo, principalmente o alelo DQB1*0402 ($RR=24,74$). No entanto, nenhum destes alelos foi encontrado associado a um quadro clínico específico.

Vários estudos têm tentado buscar possíveis associações dos alelos de HLA com diferentes doenças parasitárias. Yazdanbakhsh e cols. (1995) {4}, ao estudarem

um grupo de pacientes da Indonésia com filariose brugiana (causada por *Brugia malayi* - microfilária pertencente à mesma família - Onchocercidae - da *Wuchereria bancrofti*), encontraram um aumento estatisticamente significativo de indivíduos saudáveis com o antígeno HLA-DR3, sugerindo que este antígeno deve conferir proteção contra o desenvolvimento da doença. Na população pernambucana, o alelo DRB1*0301 parece conferir suscetibilidade à filariose bancroftiana ($p < 0,0001$).

Meyer e cols. (1994) {4} estudaram o polimorfismo dos locos de HLA-DRB1 e -DQB1 em um grupo de pacientes com oncocercariose (patologia causada pelo verme *Onchocerca volvulus*, também pertencente à família Onchocercidae e de epidemiologia semelhante à da filariose) do Oeste africano. Os resultados não mostraram associações entre esta patologia e os alelos HLA-DRB1. Entretanto, encontraram indicação de que o alelo DQB1*0301 confere proteção, e os alelos DQB1*0501 e -*0201 suscetibilidade à oncocercariose generalizada. Nenhum destes alelos foi encontrado associado a filariose bancroftiana na população do Estado de Pernambuco. Entretanto, ao contrário do encontrado por Meyer e cols. (1994) {4}, dois alelos HLA-DRB1 foram encontrados na população pernambucana conferindo suscetibilidade (DRB1*0301) e proteção (DRB1*0102) ao desenvolvimento da filariose bancroftiana. Os altos riscos relativos apresentados pelos alelos DRB1*0301 ($RR=6,68$) e DQB1*0402 ($RR=24,74$) sugerem que os indivíduos saudáveis que apresentam estes alelos estão mais predispostos ao desenvolvimento da doença.

Tabela 1. Frequências alélicas do loco HLA-DRB1 na amostra controle e na amostra de pacientes filarióticos da população do Estado de Pernambuco.

Alelo	Controle	Filarióticos	Alelo	Controle	Filarióticos	Alelo	Controle	Filarióticos
*01	0,0105	0,0000	*0701	0,1257	0,0602	*1202	0,0053	0,0000
*0101	0,0526	0,1204	*08	0,0211	0,0046	*13	0,0263	0,0093
*0102	0,0579	0,0000	*0801	0,0263	0,0093	*1301	0,0790	0,0833
*0103	0,0000	0,0093	*0802	0,0053	0,0093	*1302	0,0053	0,0185
*03	0,0158	0,0046	*0803	0,0000	0,0046	*1303	0,0000	0,0324
*0301	0,0263	0,1435	*08041	0,0053	0,0093	*1305	0,0053	0,0093
*0302	0,0105	0,0231	*0807	0,0053	0,0046	*1309	0,0053	0,0000
*0311	0,0053	0,0000	*0901	0,0000	0,0185	*14	0,0053	0,0046
*04	0,0211	0,0278	*09012	0,0263	0,0000	*1401	0,0105	0,0648
*0401	0,0053	0,0093	*1001	0,0211	0,0185	*1402	0,0053	0,0046
*0402	0,0263	0,0000	*11	0,0158	0,0417	*15	0,0263	0,0139
*0403	0,0000	0,0093	*1101	0,0474	0,0231	*1501	0,0474	0,0231
*0404	0,0158	0,0139	*1102	0,0105	0,0093	*1502	0,0000	0,0185
*0405	0,0158	0,0324	*1104	0,0421	0,0185	*1503	0,0684	0,0278
*0407	0,0053	0,0046	*1116	0,0000	0,0046	*16	0,0053	0,0000
*0409	0,0000	0,0046	*1125	0,0000	0,0046	*1601	0,0105	0,0000
*0410	0,0053	0,0000	*12	0,0053	0,0046	*16021	0,0158	0,0139
*0411	0,0211	0,0139	*1201	0,0105	0,0000	*16022	0,0000	0,0093
*07	0,0158	0,0046						

Tabela 2. Frequências alélicas do loco HLA-DQB1 na amostra controle e amostra de pacientes filarióticos da população do Estado de Pernambuco.

Alelo	CONTROLE	FILARIÓTICOS	Alelo	CONTROLE	FILARIÓTICOS
*02	0,2050	0,2269	*0503	0,1000	0,0602
*0203	0,0000	0,0093	*0504	0,0000	0,0046
*03	0,0000	0,0139	*06	0,0211	0,0000
*0301	0,0895	0,1157	*0601	0,0053	0,0185
*0302	0,0842	0,0833	*0602	0,0895	0,0926
*0303	0,0316	0,0278	*0603	0,0263	0,0509
*0304	0,0421	0,0231	*0604	0,0053	0,0278
*0307	0,0000	0,0278	*0605	0,0053	0,0000
*0401	0,0737	0,0000	*0607	0,0053	0,0000
*0402	0,0000	0,0556	*0608	0,0579	0,0000
*05	0,0158	0,0000	*0609	0,0000	0,0046
*0501	0,1421	0,1435	*0611	0,0000	0,0046
*0502	0,0000	0,0093			

Tabela 3. Relação dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1 que mostraram diferenças estatisticamente significantes nas amostras controle e de pacientes filarióticos na população do Estado de Pernambuco e seus respectivos riscos relativos.

Alelo	CONTROLE		FILARIÓTICOS		P (<0,05)	RR
	Presença	Ausência	Presença	Ausência		
DRB1*0102	11	84	0	108	0,0002	0,03
DRB1*0301	5	90	31	77	<0,0001	6,68
DQB1*0401	14	81	0	108	<0,0001	0,02
DQB1*0402	0	95	12	96	0,0125	24,74
DQB1*0608	11	84	0	108	0,0050	0,03

BIBLIOGRAFIA

1. Meddeb-Garnaoui, A., Gritli, S., Garbouj, S., Bem Fadhel, M., El Kares, R., Mansour, L., Kaabi, B., Chouchane, L., Bem Salah, A. and Dellagi, K. Association analysis of HLA-Class II and Class III gene polymorphisms in the susceptibility to Mediterranean visceral leishmaniasis. **Hum. Immunol.**, 62, 509-517, 2001.
2. Meyer, C. G., Gallin, M., Erttmann, K. D., Brattig, N., Schnittger, L., Gelhaus, A., Tannich, E., Begovich, A. B., Erlich, H. A. and Horstmann, R. D. HLA-D alleles associated with generalized disease, localized disease, and putative immunity in *Onchocerca volvulus* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 7515-7519, 1994.
3. Freedman, D. O., Plier, D. A., Almeida, A., Miranda, J., Braga, C., Maia e Silva, M., Tang, J. and Furtado, A. Biased TCR repertoire in infiltrating lesional T cell in human bancroftian filariasis. **J. Immunol.** 162, 1756-1764, 1999.
4. Yazdanbakhsh, M., Sartono, E., Kruize, Y. C. M., Kurniawan, A., Partono, F., Maizels, R. M., Schreuder, G. M. T., Schipper, R. and Vries, R. R. P. HLA and elephantiasis in lymphatic filariasis. **Hum. Immunol.**, 44, 58-61, 1995.
5. Secor WE, del Corral H, dos Reis MG, Ramos EA, Zimon AE, Matos EP, Reis EA, do Carmo TM, Hirayama K, David RA, David JR and Harn-Jr DA (1996) Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201. **J. Infect. Dis.**, 174: 1131-1135.

6. Bonfim, C., Lessa, F., Oliveira, C., Evangelista, M. J., Santo, M. E., Meireles, E., Pereira, J. C. and Medeiros, Z. Situação da filariose bancroftiana na Região Metropolitana do Recife: estudo em uma área endêmica no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 19(5): 1497-1505, 2003.
7. Coutinho, A., Medeiro, Z. and Dreyer, G. História da filariose linfática em Pernambuco. I. Aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 29(6): 607-612, 1996.
8. Dreyer, G., Coutinho, A., Miranda, D., Noroes, J., Rizzo, J. A., Galdino, E., Rocha, A., Medeiros, Z., Andrade, L. D., Santos, A., Figueredo-Silva, J. and Ottesen, E. A. Treatment of bancroftian filariasis in Recife, Brazil: two-year comparative study of the efficacy of single treatments with ivermectin or diethylcarbamazine. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 89, 98-102, 1995.
9. Kimura, A. and SasazuKi, T. Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: Tsuji, K., Aizawa, M., Sasazuki, T., eds. HLA-1991. **Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference**. Vol. I. Oxford: Oxford University Press, 397-419, 1992.
10. Lewis, P. O. and Zaykin, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors by the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>, 2001.

Manuscrito 3

***LACK OF ASSOCIATION BETWEEN HLA-DQB1 ALLELES AND THE
HEPATOSPLENIC FORM OF SCHISTOSOMIASIS IN BRAZILIAN PATIENTS
FROM PERNAMBUCO***

Manuscrito enviado para a revista *Genetics and Molecular Biology*
(Sociedade Brasileira de Genética) - Short Communication

**LACK OF ASSOCIATION BETWEEN HLA-DQB1 ALLELES AND THE
HEPATOSPLENIC FORM OF SCHISTOSOMIASIS IN BRAZILIAN
PATIENTS FROM PERNAMBUCO**

**Edileine Dellalibera¹, Luiz Mauricio-da-Silva¹, Ana Lúcia C Domingues², Heloísa
S Dias², Marcos Antonio de Moraes Júnior¹, Eduardo Antonio Donadi ³ and
Rosilda dos Santos Silva¹**

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

²Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³Divisão de Imunologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

KEY WORDS: HLA-DQ, *Schistosoma mansoni*, Brazilian population

SHORT TITLE: DQB1 and schistosomiasis in Pernambuco

Corresponding author:

Rosilda dos Santos Silva, Ph.D

Rua Professor Aurélio de Castro Cavalcanti, 79/804, Boa Viagem

51210-020 Recife-PE

Tel/Fax. +55 81 2126 8512

E-mail> rosilda@ufpe.br

ABSTRACT

Since HLA-DQ molecules have been involved in the immune response against *Schistosoma* infection, this study aims to evaluate the polymorphism of HLA-DQB1 genes in 47 patients presenting with the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni from the State of Pernambuco, an endemic area of the Northeastern region of Brazil. The results indicated no association between HLA-DQB1 alleles and schistosomiasis mansoni in the studied population.

INTRODUCTION

Several clinical and epidemiological lines of evidence suggest that the hepatosplenic (HE) form of human schistosomiasis mansoni may depend on genetic factors. Studies on the Major Histocompatibility Complex (MHC) association with HE schistosomiasis have yielded heterogeneous results according to the population evaluated (Prata, 1992). Recently, Secor et al. (1996) reported the association of HLA-DQB1*0201 allele with the development of HE schistosomiasis in Brazilian patients from the State of Bahia. On the other hand, HLA-DQ molecules have been reported to control the T-cell response against *Schistosoma*. Since the composition of the Brazilian population may vary on a regional basis, and since HLA-DQ molecules may be involved in the immune response to the parasite (Ohta et al., 1990), in this study we evaluated the polymorphism of HLA-DQB1 alleles in a selected group of patients presenting with HE schistosomiasis from an endemic area of the State of Pernambuco.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

A total of 47 patients with HE schistosomiasis aged 19-87 years (median = 51) and 100 healthy controls from the same area and of similar ethnic background were

studied. The diagnosis of HE schistosomiasis was based on epidemiological and clinical data, stool examination and the presence of periportal fibrosis and splenomegaly as detected by abdominal ultrasonography. Control subjects presented no abnormalities on stool examination and on ultrasonography. Informed consent was obtained from all participants, and the local Ethics Committee approved the protocol of the study.

HLA typing

DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells using a salting out procedure (Miller et al., 1988). HLA-DQB1 alleles were typed after hybridization of amplified DNA with sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP), using sets of primers and probes as defined at the 12th International Histocompatibility Workshop (Bignon et al., 1997). DNA was amplified using 25 pmol of each HLA-DQB primer, 12.5 pmol of each dNTP, 1.25 mM MgCl₂, 5 µl 10 X enzyme buffer, and 5 U Taq-DNA polymerase (Perkin-Elmer, USA). Amplification conditions included an initial cycle at 94 ° C for 4 min, 30 cycles at 94 ° C for 30 s, 53 ° C for 30 s and 72 ° C for 60 s, and a final extension cycle at 72 ° C for 10 min. Probes were end-labeled with 11-dUTP digoxigenin (Boehringer Mannheim, Germany), hybridized to denatured DNA, and blotted onto nylon membranes in a chemoluminescence assay (Donadi et al., 2000).

Statistical analysis

Allele frequency was obtained by direct allele counting. Statistical analysis was performed using the two-tailed exact Fisher test, considered to be significant at $P < 0.05$. P values were corrected by the Bonferroni procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

The frequencies of HLA-DQB1 alleles of patients and controls are shown in Table 1. Only the DQB1*0301 ($p=0,0397$) and the DQB1*0608 ($p=0,0159$) alleles presented statistically significant disparities when patients were compared to controls. However, significance was not reached after the Bonferroni correction ($p=0,6352$ and $p=0,2544$, respectively).

Brazilians from Pernambuco have peculiar features of a trihybrid population formed by the contribution of individuals of Caucasian, African and Native Amerindian origin, in which the phenotypic characteristics of each original population have been highly mixed. The admixture of genes from all these individuals is also reflected in the HLA gene profile. Since the development of the extraordinary HLA polymorphism observed in several populations has been attributed to a pathogen-induced selection (Hill et al., 1992), the study of the association of HLA polymorphism in populations of distinct ethnic background is of relevance.

No significant association between the HLA-DQB1 alleles and the schistosomiasis mansoni was observed in the population from the State of Pernambuco. In contrast, Secor et al. (1996) found an increased frequency of the HLA-DQB1*0201 allele for HE schistosomiasis patients from the Brazilian State of Bahia, a region where the miscegenation among individuals of Caucasian and Afro-American origin is the hallmark. This difference possibly comes from the fact that the modern population from the State of Bahia has a different genetic structure when compared to other Northeastern Brazilian populations; i.e., the gene pool from Black individual is greater (Verger, 1976; Salzano and Freire-Maia, 1970).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FAEPA).

REFERENCES

- Bignon JD, Fernández-Viña MA, Cheneau ML, Fauchet R, Schreuder GMT, Clayton J, Marsh SGE and Charron D (1997) HLA DNA class II typing by PCR-SSOP: 12th International Histocompatibility Workshop experience. Charron D, ed. *Genetic diversity of HLA functional and medical implication*. Volume I. EDK Medical and Scientific International Publisher, Paris, 21-25.
- Donadi EA, Smith AG, Louzada-Jr P, Voltarelli JC and Nepom GT (2000) HLA class I and II profiles of patients presenting with Sydenham's chorea. *J Neurol* 247: 122-128.
- Hill AVS, Allsopp CEM and Kwiatskowsky D (1992) Extensive genetic diversity in the HLA class II regions of Africans, with a locally predominant allele, DRB1*1304. *Proc Natl Acad Sci* 89: 2277-2281.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- Ohta N, Edahiro T, Ishii A, Yasukawa M and Hosaka Y (1990) HLA-DQ-controlled T cell response to soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum* in humans. *Clin Exp Immunol* 79: 403-408.
- Prata A (1992) Influence of the host related factors in the development of the hepatosplenic form of Schistomiasis *mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 39-44.

Salzano, F. M. and Freire-Maia, N. (1970) Problems in human biology. A study of Brazilian populations. *Detroit: Wayne State University Press*, pp. 38-45.

Secor WE, del Corral H, dos Reis MG, Ramos EA, Zimon AE, Matos EP, Reis EA, do Carmo TM, Hirayama K, David RA, David JR and Harn-Jr DA (1996) Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201. *J Infect Dis* 174: 1131-1135.

Verger, P. (1976). Trade relations between the Bight of Benin and Bahia from the 17th to 19th century. *Ibadan University Press*, pp. 1-7.

Table 1: HLA-DQB1 allele frequency in Brazilian patients presenting with the hepatosplenic form of schistosomiasis and in control individuals.

Allele	Control	Patients
*0201	0,2150	0,1383
*0301	0,0914	0,2128
*0302	0,0860	0,0426
*0303	0,0323	0,0106
*0304	0,0484	0,0745
*0401	0,0699	0,0638
*0501	0,1559	0,1702
*0503	0,0215	0,0000
*0601	0,0054	0,0106
*0602	0,0914	0,1596
*0603	0,0323	0,0213
*0605	0,0000	0,0213
*0607	0,0000	0,0106
*0608	0,0645	0,0000
*05031	0,0269	0,0532
*05032	0,0591	0,0106

5. Conclusões Gerais

5. Conclusões Gerais

A caracterização da população do Estado de Pernambuco, Região Nordeste do Brasil, quanto ao polimorfismo dos locos de HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1 e a verificação das possíveis associações dos locos DRB1 e DQB1 com filariose bancroftiana e do loco DQB1 e esquistossomose mansônica na população pernambucana nos permitiu concluir que:

1. A alta heterozigosidade observada em cada um dos locos analisados (0,9540 para DRB1, 0,7931 para DQA1 e 0,7126 para DQB1) mostra a grande variabilidade genética existente na população estudada;
2. A presença, nesta população, dos alelos DRB1*0411 (0,0230), DRB1*0807 (0,0057) e DRB1*1402 (0,0057) e do haplótipo DRB1*0411-DQA1*0301-DQB1*0302 (0,0115), típicos de populações indígenas, e dos alelos DRB1*0302 (0,0115), DRB1*0804 (0,0057) e DRB1*1503 (0,0632), comuns em populações negras, reforçam a informação de que houve a participação de povos destas duas etnias (negro e índio) na origem da população atual do Estado de Pernambuco;
3. Os resultados encontrados após os cálculos das distâncias genéticas entre a população pernambucana e suas populações parentais, indicaram que a população de Pernambuco está mais próxima de caucasianos europeus (0,0839)

e mais distante de negros africanos e indígenas americanos (0,4387 e 1,2814, respectivamente);

4. Os resultados sugerem que os alelos DRB1*0102, DQB1*0401 e DQB1*0608 conferem proteção contra o desenvolvimento da filariose bancroftiana, enquanto que os alelos DRB1*0301 e DQB1*0402 conferem suscetibilidade ao desenvolvimento desta doença na população pernambucana;
5. Os altos riscos relativos apresentados pelos alelos DRB1*0301 (RR=6,68) e DQB1*0402 (RR=24,74) sugerem que os indivíduos saudáveis que apresentam estes alelos estão mais predispostos ao desenvolvimento da doença e reforçam a necessidade de medidas de controle e atenção por parte dos administradores e planejadores de saúde, uma vez que a filariose permanece endêmica e em processo de expansão atingindo áreas consideradas indenes na Região Metropolitana de Recife;
6. Não há associação dos diferentes alelos do loco HLA-DQB1 com suscetibilidade ou proteção a esquistossomose mansônica na população do Estado de Pernambuco.

6. Anexos

Normas da Revista Tissue Antigens

Manuscripts should be sent to:

Tissue Antigens

Editor-in-Chief

Professor James McCluskey

Department of Microbiology and Immunology

The University of Melbourne

Parkville, Victoria 3052

Australia

Tel: +61 3 83445709 or +61 3 9885228

Fax: +61 3 98885228

Email: TissueAntigens@bigpond.com

All submitted manuscripts must be accompanied with a completed [Copyright Assignment form](#). The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic databases and the like without the prior written permission of the publisher.

Manuscripts must be written in correct English. Review articles, full-length articles, brief communications and articles focusing on people in immunogenetics are accepted. All manuscripts must be typewritten, double spaced, with margins of at least 2 cms.

Review articles are generally invited, however suggestions on review topics or potential articles are welcome in the form of 1/2 page synopses submitted to the Reviews Editor,

Joe A. Trapani

Research Division

Peter MacCallum Cancer Institute

Locked bag 1

A'Beckett Street

Melbourne, 8006 Australia

Tel: +61 3 9656 3726

Fax: +61 3 9656 1411

E-mail: j.trapani@pmci.unimelb.edu.au

Full-length articles should not exceed **10** printed pages.

Full-length papers should consist of: title page, including full title and short title (short title not to exceed 45 letters and spaces; abstract not to exceed 250 words); Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (including grant and/or other sources of support), References, tables, figure legends and figures. All pages should be numbered consecutively, beginning with the title page.

Key words. Four to nine key words for indexing should be given by the author(s) together with the abstract. They should be placed in alphabetical order and, when possible, adjusted to the medical subject headings of **Index Medicus**.

Page Charges. Any article which exceeds 10 printed pages will be charged. Excess pages must be paid for at a rate of GBP 75 per page unless specific written arrangements have been negotiated with the Editor-in-Chief. Invited papers are as a rule not charged for excess pages. Papers will be invoiced upon publication.

Tables. The tables should be typed, double-spaced, on sheets separate from the text, and titles must be self-explanatory. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, and due regard should be paid to the proportions of the printed page. The approximate location in the text should be indicated by a circled note in the margin.

Figures. Figures should be supplied as unmounted, glossy photographs and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should be identified with the figure number on the back and the orientation indicated. In the text, its approximate location should be indicated by a circled note in the margin.

Printed illustrations must not exceed the journal page dimensions of 21 x 28 cm unless arrangement is made with the editor. Micrographs should be planned so that they can be produced without reduction. Single-column figures must not exceed 8.1 x 23.4 cm, but lettering should be large enough to be legible if reduction for printing is necessary to meet the above specifications. Captions to figures (legends) should be typed consecutively on a separate page or pages at the end of the paper. It is the policy of Tissue Antigens for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from the Internet. The web address for the form is:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/Sub3000_X_CoW.pdf

If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact Eva Strinovich at: tissueantigens@bigpond.com and she will be able to e-mail or FAX a form to you. Once completed, please return the form to the Production Editor at the address below:

Lorna Faith

Blackwell Publishing

101 George Street

Edinburgh

EH2 3ES

Fax: +44 131 226 3803

mailto: lorna.faith@edn.blackwellpublishing.com

Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned.

References. Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals (in parentheses). All authors cited, and only these, must be listed at the end of the paper. List all authors when six or less; when seven or more, list only first three and add "et al". The titles of journals should be abbreviated according to the List of journals indexed, printed annually in the January issue of Index Medicus.

Examples:

1. Brock JH, Esparza I. Failure of reticulocytes to take up iron from lactoferrin saturated by various methods Br J Haematol 1979; 42: 481-3.
2. Marsh N. Fibrinolysis. Chichester: John Wiley & Sons, 1981: 46.
3. Galton DAG. The chronic leukaemias. In: Hardisty RM, Weatherall DJ, ed. Blood and its disorders. 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982: 877-917.

4. Defesche JC, Dekker E, Kastelein JJP. The South African 2.5 kb deletion: a typical Dutch FH mutation. Proc. 9th Int Symp Atherosclerosis 1991: 141.

Unpublished data, not yet in press, should not be included in the list of references. They may be referred to in the text as "(unpublished data)" or "(personal communications)".

Abbreviations and symbols. Use Chemical Abstracts as a guide for abbreviations and symbols. All units must be metric. The following examples illustrate preferred abbreviations: 37°C, 3H, 14C, min (for minutes), h (for hours), ml, g.

Scientific names and nomenclature. Official or standardized nomenclature should be used whenever available (e.g. the CD nomenclature for leukocyte differentiation antigens; official HLA Nomenclature).

Brief communications must not exceed 10 typewritten pages and must not be divided into sections. The first paragraph should state the purpose of the report; include an abstract not to exceed 120 words. Description of methods or technical notes should preferably be in the legends to tables and figures.

People in Immunogenetics articles should not exceed 2 printed pages.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

The preferred method of submitting manuscripts is by email attachment of a PDF file. This should contain the manuscript, including all illustrations and tables and be sent to TissueAntigens@bigpond.com If there are difficulties in saving the file in PDF format, the manuscript can be attached as text in Word or Wordperfect, and accompanying illustrations, figures, and tables as TIFF or EPS files. In order to secure

proper color separation all color files must be in CMYK (cyan, magenta yellow, black) mode.

If email submission is not possible, send one original and three copies (4 copies in total) of the manuscript, including four (4) sets of figures and tables, to the Editor-in-Chief. Please enclose an electronic version of the manuscript and illustrations, in the formats outlined above, on a newly formatted 3.5-inch floppy diskette, zip disk, or on a CD-rom.

The following information must be written on the disk labels:

Journal title

Author name

Manuscript title

Computer system (Windows, Mac)

Word processor (Word, WordPerfect) and version

Graphics application (Illustrator, Corel Draw) and version.

The electronic version and the paper manuscript must be identical. If print and paper versions differ, the print version will be used. Retain a copy of the manuscript; manuscripts are not insured against loss or damage. No manuscripts or disks will be returned. If specifically requested to do so at the time of submission, the Editorial Office will attempt to return figures. Otherwise, none will be returned.

Journal cover figures. Tissue Antigens considers cover illustrations relevant to an article in an issue. Submissions must be both scientifically and visually interesting. Illustrations will not be necessarily reprinted in the article, but they must be connected to the content. Submit by post two copies (2) as glossy prints 12cm wide by 9cm high, with the top indicated, and include a brief caption. Label them with the first author's name and corresponding postal and email addresses, and telephone and fax numbers. These glossy prints will not be returned unless requested.

Proofs. Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. Only minor revisions are allowed without extra cost.

Offprints. Offprints can be obtained by using the offprint order form accompanying the proofs.

Author Material Archive Policy. Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not already done so.

Anexo 2**Normas da Revista Human Immunology**

Manuscripts may be sent to Nicole Suciú-Foca, Ph.D, Editor-in-Chief, *Human Immunology*, Columbia University, 630 West 168 Street, P&S 14-401, New York, NY 10032, USA; or Jon J. van Rood, Leiden University Medical Centre, E3-Q, Post Box 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands. Manuscripts are accepted with the understanding that they are original, unpublished work and are not being submitted elsewhere. If an abstract has appeared, this should be noted in the cover letter. All subsequent inquiries by authors regarding the status of manuscripts may be made by fax (+1 212-305-3429) or by electronic mail (suciu_foca@cuccfa.ccc.columbia.edu). It is the journal's policy to answer all inquiries as quickly as possible.

The Manuscript. Submit in quadruplicate, in English, double-spaced, on one side of the paper only, collated so that the complete package consists of four self-contained copies that include the following sections: title page, Abstract (not more than 200 words). Keywords (up to 5). Abbreviations (list of abbreviations used), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion.

Acknowledgements, References, tables, figure legends, and figures. The title page should include the names and affiliations of the authors, the complete address and telephone and facsimile number of the corresponding author, five keywords and an abbreviated title of not more than 45 characters and spaces. Footnotes in the text should be defined on the page on which they appear and be numbered consecutively

with superscript Arabic numerals. Identify any mathematical variables that may be confused with numbers, e.g., the letter "l" and the number "1". A cover letter indicating which review section (i.e. Molecular and Structural Immunology, Cellular Immunology, Immunogenetics or Clinical Immunology) is most appropriate for the manuscript, the total number of pages (including references, acknowledgements, tables, etc.) and the total number of figures should be included. All submissions accepted for publication must be accompanied by a computer diskette containing the current version of the manuscript, exclusive of the tables and figures.

Tables. Each table should be typed, double space on a separate page, and numbered with Arabic numerals in the order of reference in the text. Use only horizontal rules. Table titles should be informative, with detailed information appearing as footnotes and identified in the table by superscript letters.

Figures. Submit four sets of camera-ready original figures. Type legends double-spaced on a separate page. Letters, arrows and symbols used in the figures should be identified in the legend and not on the figure itself. Label each figure on the back with a paste-on label or in pencil indicating the number of the figure, the corresponding author's name, and the top of the figure. Do not mount figures or attach them with paper clips; enclosing them in an envelope or between paper will suffice. Hand-drawn artwork and photocopies are not acceptable as originals. For line artwork, the originals must be black ink drawings of professional quality or glossy photographs. Lettering and data-point symbols should be large enough to read with ease when the figure is reduced for the Journal page. The largest photograph that can be accepted without reduction is 4 and three eighths x 7 and a half inches (12 x 19 cm).

References. Identify references in the text by Arabic numerals in brackets, and number consecutively in the References section in order as they are first mentioned. References should include names of all authors (last names first); title of article; title of journal (abbreviate according to the style of *Index Medicus*) or book; volume

number; location and name of publishing company (books only); first page, year of publication. Example:

Journal. Leen MPJM, Gorski J: Differential expression of isomorphic HLA-DR β genes is not a sole function of transcription. Hum Immunol 50:111, 1996.

Book. Peter JB, Shoenfeld Y: Autoantibodies. Amsterdam, Elsevier Science, 1996.

Chapter in a book. Bendtzen K, Hansen MB, Ross C, Svenson M: Cytokine Autoantibodies. In Peter JB, Shoenfeld Y (eds): Autoantibodies 1996. Amsterdam, Elsevier Science, 1996.

Proofs and Reprints. The corresponding author will receive galley proofs, which should be proofread and returned with the original manuscript within 48 *hours* of receipt. Corrections are limited to printer's errors-no substantial author's changes will be made without charge. The corresponding author of each article will receive 50 offprints free of charge. Additional offprints may be ordered at the price listed on the order form accompanying the proofs.

Page Charges. No page charges are applied to the journal.

Copyright. Upon receipt of an article, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. This transfer will ensure the widest dissemination of information under US copyright law. This does not imply an obligation by the journal to publish, and if the article is not accepted the copyright form will be returned with its article.

Brief Communications. Limited to three published pages. Prepare these manuscripts using the same format as full length style.

Reports of Meetings or Workshops, Editorials and Reviews. A letter of inquiry should be sent to the editor, prior to the submission of these materials.

Authors can keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's [Author Gateway](#).

Instructions for authors regarding GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the ***electronic copy***, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "(GenBank accession nos. [AI631510](#), [AI631511](#), [AI632198](#), and [BF223228](#)), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. [BE675048](#)), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. [AA361117](#))".

Anexo 3

Normas da Revista Genetics and Molecular Biology

1. Manuscripts should be submitted to:

Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief

Genetics and Molecular Biology

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736

14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

- a. A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere;
- b. Three copies of the manuscript and figures.
- c. Two copies of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
- d. A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected; if a disk arrives damaged, a new disk will be requested, causing delays in publication. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIF or JPG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first

author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution:

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, and city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, and arranging for the payment of color illustrations and author alterations charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text: must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names;

in citations with three or more authors, name the first author and use “et al”. Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (“et al” should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation. Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

Sample book citation

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras*. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) *Elementos de Genética*. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

Sample abstracts in meeting citation:

Basile R (1973) Cromossomos Politênicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de Rhyncosciara. Ciênc e Cult 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample Thesis/Dissertation citation:

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the Tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

f) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes, typed directly below the table, should be indicated in lowercase superscript numbers.

g) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Three sets of illustrations of the highest quality must be provided, one original and two copies in glossy paper. If you have created figures electronically, submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIF or JPG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 ppi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600–1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author, and an arrow indicating top of illustration.

Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

h) Nomenclature: current standard international nomenclature should be adhered to.

i) Sequences may appear in text or in figure. DNA must be sequenced on both strands. DNA, RNA , or protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into appropriate data bank and the accession number must be provided before publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

j) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

k) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. Their format is that of full-length article. The text must be kept to a minimum.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal.

3.6 History, Story and Memories: accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.