

REGINA FUKAI

***ALELOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE DE
CLASSE II EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE
LEUCEMIAS AGUDAS, AO DIAGNÓSTICO***

CAMPINAS

2002

REGINA FUKAI

***ALELOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE DE
CLASSE II EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE
LEUCEMIAS AGUDAS, AO DIAGNÓSTICO***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA HELENA STANGLER KRAEMER

CAMPINAS

2002

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

F955al Fukai, Regina
Alelos de histocompatibilidade de classe II em indivíduos
portadores de leucemias agudas , ao diagnóstico / Regina Fukai.
Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Maria Helena Stangler Kraemer
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia aguda. 2. Histocompatibilidade. 3. Biologia
Molecular. I. Maria Helena Stangler Kraemer. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena S. Kraemer

Membros:

1. Prof. Dr. Paulo Louzada Junior
2. Profa. Dra. Irene G. H. Lorand - Metzger
3. Profa. Dra. Maria Helena S. Kraemer

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/05/2002

800219288

DEDICATÓRIA

*Dedico à minha mãe e minha família
que me apoiaram e incentivaram
nesta caminhada.*

Este trabalho recebeu recursos financeiros em termos de uma bolsa de mestrado da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e apoio financeiro da FAEP.

*À minha orientadora, **Dra. Maria Helena Stangler Kraemer**, pela oportunidade, disponibilidade e pelos seus ensinamentos que foram indispensáveis para o meu crescimento profissional acadêmico, minha gratidão e estima.*

*Ao **Dr. Cármino Antonio de Souza**, pela sua co-orientação, seu indispensável apoio e colaboração clínica para a obtenção dos pacientes; meus sinceros agradecimentos pela atenção durante todo este período.*

Aos **pacientes** que permitiram ser investigados, colocando suas vidas à mostra dando sua contribuição para pesquisa científica;

Ao **Hospital das Clínicas** pelo suporte e infra-estrutura para a realização desta tese,

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunogenética de Transplantes da Unicamp: **Margareth, Ana, Arthur e Vera**; pelo indispensável apoio e ensino na execução da parte técnica deste trabalho e pela amizade e atenção a mim proporcionada durante todo este tempo de permanência no laboratório;

Ao Dr. **Carlos Alberto Magna**, pela participação e assistência na análise estatística;

À Dra **Irene Lourand-Metze** e Dr. **Paulo Louzada Júnior**, pelas importantes correções e sugestões apresentadas para a elaboração final desta tese;

Aos **residentes** da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela colaboração na obtenção dos pacientes deste trabalho;

À querida funcionária **Noélia**, que me ajudou na manutenção e preparo do material para ser utilizado na execução da técnica deste trabalho;

À querida amiga **Cláudia**, pelo companheirismo e amizade proporcionada durante todo o decorrer deste tempo;

À minha mãe, minhas irmãs; **Tânia e Lúcia** que me sustentaram e incentivaram nas horas difíceis e se alegraram com a minha conquista;

À **Deus**, que me proporcionou saúde e forças para vencer as adversidades encontradas no caminho e prosseguir adiante.

À todos os amigos, que conheci neste trajeto e não foram citados, mas permanecem guardados no meu coração, pelas suas palavras de ânimo e de encorajamento.

*“O Deus que me revestiu de forças e aperfeiçoou o meu caminho
Ele deu a meus pés a ligeireza das corças e me firmou nas minhas alturas”.*

Salmo 18:32-33

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxxi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1. Antígenos leucocitários humanos (HLA) e a Histocompatibilidade nos transplantes.....	37
1.1.1. A organização dos genes no complexo HLA.....	38
1.1.2. Moléculas HLA de classe I- Proteínas e genes.....	41
1.1.3. Moléculas HLA de classe II- Proteínas e genes.....	42
1.1.4. Moléculas HLA de classe I e II e apresentação de peptídeos antigênicos para diferentes tipos de células.....	43
1.2. Herança dos alelos de classe II.....	45
1.3. HLA e associação com doenças.....	49
1.4. Leucemias agudas.....	51
1.4.1. Definição.....	51
1.4.2. Classificação.....	51
1.4.3. Incidência Patogênese.....	53
1.4.4. Patogênese.....	53
1.4.4.1. - Diversidade biológica.....	54
1.4.4.2. Fatores causais.....	56
1.4.4.3. Associação HLA e leucemia agudas.....	56

2. OBJETIVOS.....	61
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.1. Caracterização dos indivíduos da pesquisa.....	68
3.1.1. Seleção dos indivíduos controle.....	68
3.1.2. Seleção dos pacientes.....	69
3.2. Tipificação dos genes HLA de Classe II.....	70
3.2.1. Extração e purificação do DNA.....	70
3.2.2. Amplificação do gene utilizando a PCR-SSP.....	71
3.2.2.1. Utilização de primers de sequência específica.....	71
3.3. Análise do DNA amplificado.....	74
3.3.1. Fotodocumentação e interpretação dos resultados.....	75
3.3.2. Associação e definição dos alelos HLA.....	77
3.4. Análise estatística.....	77
4. RESULTADOS.....	81
4.1. Tipificação dos alelos HLA-DRB1-5 e DQB1.....	83
4.2. Frequências alélicas e gênicas na LMA, LLA e controles.....	83
4.3. Associação com os alelos HLA-DRB1 e DQB1 na LMA e LLA.....	86
4.4. Associação com os haplótipo HLA-DRB1 e DQB1.....	88
5. DISCUSSÃO.....	95
5.1. Alelos HLA-DRB1/DQB1 em controles sadios.....	97
5.2. Alelos HLA de classe II-DRB1-5 e DQB1 na leucemia aguda.....	99
5.3. Associação positiva de alelos HLA-DRB1/DQB1 e haplótipos.....	102

5.4. Frequência diminuída dos alelos e haplótipos HLA-DRB1/DQB1.....	102
5.5. Associações de alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1.....	103
6. CONCLUSÕES.....	107
7. SUMMARY.....	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
9. ANEXOS.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LLA	Leucemia Linfóide aguda
HLA	Antígenos Leucocitário Humanos
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
EA	Espondilite anquilosante
RR	Risco relativo
<i>pc</i>	<i>p</i> corrigido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SSP	Specific Sequence Primer

	PÁG.
Tabela I: Distribuição das frequências alélicas e gênicas HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes com leucemia mielóide aguda e no grupo controle.....	84
Tabela II: Distribuição das frequências alélicas e gênicas HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes com leucemia linfóide aguda e grupo controle...	85
Tabela III: Significância estatística dos alelos HLA-DRB1, -DRB3,-DRB4,-DRB5 e -DQB1 em pacientes com leucemia mielóide aguda.....	87
Tabela IV: Significância estatística dos alelos HLA-DRB1, -DRB3,-DRB4,-DRB5 e -DQB1 em pacientes com LLA.....	88
Tabela V: Frequência dos haplótipos HLA-DRB1 e -DQB1 em pacientes com LMA e pacientes com LLA.....	89
Tabela VI: Valores da significância do RR, χ^2 e valor de p dos haplótipos em pacientes com LMA (n=30).....	90
Tabela VII: Valores da significância do RR, χ^2 e valor de p dos haplótipos em pacientes com LLA (n=15).....	91
Tabela VIII: Associações positivas observadas para os alelos e haplótipos HLA DRB1 a -DRB5 e - DQB1 detectados por SSP nos pacientes com LMA e LLA.....	92
Tabela IX: Associações negativas observadas para os alelos e haplótipos HLA DRB1,-DRB3, -DRB4, -DRB5 e - DQB1 detectados por SSP nos pacientes com LMA e LLA.....	93

	PÁG.
Figura 1: Mapa simplificado do complexo HLA.....	39
Figura 2: Mapa simplificado da região de classe I.....	39
Figura 3: Mapa simplificado da região de classe II.....	40
Figura 4: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe I.....	41
Figura 5: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe II.....	42
Figura 6: Apresentação de peptídeos antigênicos às células T.....	43
Figura 7: Polimorfismo dos alelos HLA.....	45
Figura 8: Representação dos exons da molécula HLA de classe II. L-peptídeo líder TM- região transmembrânica; CYT- final citoplasmático.....	46
Figura 9: Nomenclatura dos alelos HLA.....	47
Figura 10: Expressão da codominância dos antígenos HLA.....	48
Figura 11: Representação da herança dos alelos HLA.....	49
Figura 12: Estrutura do DNA.....	70
Figura 13: Desnaturação.....	72
Figura 14: Anelamento dos primers.....	73
Figura 15: Extensão.....	73
Figura 16: Representação de primer específico.....	75
Figura 17: Fotodocumentação da amplificação dos genes HLA de classe II de um paciente de LMA.....	76
Figura 18: Fotodocumentação da amplificação dos genes HLA de classe II de um paciente de LLA.....	76



RESUMO

Nesta tese, foram analisados 100 indivíduos controle sadios, da população de Campinas-Sudeste do Brasil, e 30 indivíduos com leucemia mielóide aguda e 15 indivíduos com leucemia linfóide aguda, da mesma região geográfica.

As tipificações dos alelos HLA de classe II (HLA-DRB1-5 e DQB1), foram efetuadas através do método molecular por DNA/PCR/SSP, para média resolução. O DNA foi extraído por um procedimento “Salting out”, do sangue periférico de cada indivíduo componente da pesquisa. Utilizando-se a técnica da PCR/SSP por primers da “One Lambda”, foram quantificadas um total de 13 alelos DRB1, 1 alelo DRB3, 1 alelo DRB4, 1 alelo DRB5 e 5 alelos DQB1 para uma média resolução ou genérica.

A análise dos resultados mostrou associações positivas, indicando susceptibilidade à LMA e LLA, com os alelos HLA-DRB1*07 ($p=0,01$, $\chi^2=6,63$ RR=3,05) e o haplótipo HLA-DRB1*07/ DQB1*02 ($p=0,01$, $\chi^2=5,60$, RR=2,84) para a LMA e com o alelo HLA-DRB1*03 ($p=0,008$, $\chi^2=6,8943$, RR=4,4615) e HLA-DQB1*02 ($p=0,01$, $\chi^2=6,31$, RR=4,06) para a LLA.

As associações negativas encontradas foram: com o alelo HLA-DQB1*03 ($p=0,0015$, $\chi^2=10,14$, RR=0,25), para a LMA e para a LLA, com os alelos HLA-DRB1*04 ($p=0,02$, $\chi^2=4,86$, RR=0,13) e DQB1*03 ($p=0,003$, $\chi^2=8,47$, RR=0,00) e o haplótipo HLA-DRB1*04/DQB1*03 ($p=0,01$, $\chi^2=5,55$, RR=0,00).

Nossos achados permitem definir a população controle como Caucásioide Miscigenada e sugerem uma possível associação dos alelos de classe II- HLA-DRB1 e DQB1, na etiologia das leucemias agudas, no entanto, estes dados necessitam ser confirmados em futuros estudos, com a ampliação da casuística e por outros estudos controlados.



INTRODUÇÃO

1.1. ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA) E A HISTOCOMPATIBILIDADE NOS TRANSPLANTES

Aproximadamente há cem anos atrás, biólogos interessados em câncer começaram a estudar os tumores que apareciam em camundongos domésticos. Como cada tumor morria com o camundongo no qual ele aparecia, os pesquisadores passaram a transplantar tumores de camundongos doentes para camundongos saudáveis. Na grande maioria, esses tumores transplantados não se desenvolviam nos camundongos saudáveis e eram rejeitados por mecanismos, mais tarde conhecidos como de resposta imune (GORER, P.A, 1937). Estudos posteriores desse fenômeno se tornaram possíveis pela produção de linhagens consanguíneas “inbred” de camundongos, e linhagens geneticamente homogêneas. Constatou-se que tecidos transplantados entre camundongos de mesma linhagem genética eram aceitos, enquanto os transplantes entre camundongos de linhagens diferentes eram sempre rejeitados (SNELL, G.D.,1968). Experimentos posteriores com cruzamento de linhagens consanguíneas foram realizados a fim de definir o número de locos genéticos que contribuíam para a rejeição dos tecidos. Desta feita, foi constatado que somente um loco tinha um efeito forte, enquanto outros 10 a 20 outros locos também contribuíam. A esse grupo de fatores genéticos denominou-se locos de histocompatibilidade, uma vez que eles determinaram as compatibilidades teciduais. O loco dominante foi chamado de Complexo Principal de Histocompatibilidade, enquanto os outros foram coletivamente chamados de locos secundários de histocompatibilidade (KLEIN et al., 1971).

Atualmente os estudos sobre os antígenos de histocompatibilidade têm sido concentrados nas células do sangue, uma vez que, historicamente foi constatada a expressão de antígenos HLA de classe I na grande maioria das células brancas dos camundongos, enquanto uma minoria expressava antígenos de classe II. Nos camundongos tanto eritrócitos (células vermelhas do sangue) como leucócitos (células brancas do sangue) expressam antígenos HLA de classe I (SNELL, G.D, 1968). Em contraste, eritrócitos humanos não expressam antígenos HLA de classe I, enquanto que eles são expressos na totalidade dos leucócitos humanos. Por essa razão os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade foram denominados de antígenos leucocitários humanos, usualmente

abreviados de HLA, sendo a definição HLA usada para designar tanto aloantígenos de classe I como de classe II (BODMER et al., 1984). As diferenças estruturais na expressão das moléculas HLA de classe I e classe II entre receptores e doadores nos transplantes, constituem os estímulos mais importantes da rejeição e demais respostas imunes nos transplantes clínicos (DAUSSET, J., 1981). Sob essas diferenças, reside um extenso e complicado polimorfismo genético o qual assegura a herança, a expressão, e as diferentes combinações dos alelos de classe I e classe II nos humanos. A proteína codificada por um alelo é denominada de aloantígeno e a combinação de aloantígenos de classe I e II expressas por um indivíduo é denominada de tipagem HLA (KISSMEYER & DICK, 1979).

A tipagem HLA foi tradicionalmente feita utilizando-se ensaios sorológicos realizados em leucócitos purificados do sangue periférico. Esses experimentos determinam diferenças antigênicas entre os possíveis aloantígenos e definem a tipagem HLA com relação a uma série de antígenos. Quando métodos bioquímicos e de biologia molecular foram usados para estudar diferentes alelos HLA, constatou-se limitações em relação aos ensaios sorológicos. Dessa forma gradualmente as técnicas de tipificação sorológica foram gradualmente substituídas por métodos mais precisos, fundamentados na tipificação do DNA genômico e na determinação da sequência dos alelos. No momento, o uso da tipificação HLA em estudos clínicos se encontra em um período de grande fluxo e desenvolvimento (ROOD et al., 1991; PARHAM et al., 1988; PARHAM & OHTA, 1996).

1.1.1. A organização dos genes no Complexo HLA

Os genes que codificam os aloantígenos HLA de classe I e II estão intimamente ligados entre si no braço curto do cromossomo 6. Esta parte do genoma constitui o Complexo Principal de Histocompatibilidade (figura 1), também conhecido pela sigla em inglês MHC (Major Histocompatibility Complex), sendo denominado na espécie humana de sistema HLA (Human Leucocyte Antigen). O complexo HLA tem cerca de 4 milhões de pares de bases (pb), o equivalente a 0,1% do genoma humano, englobando mais de cem genes (CAMPBELL & TROWSDALE, 1993), podendo ser subdivididos em 3 regiões:

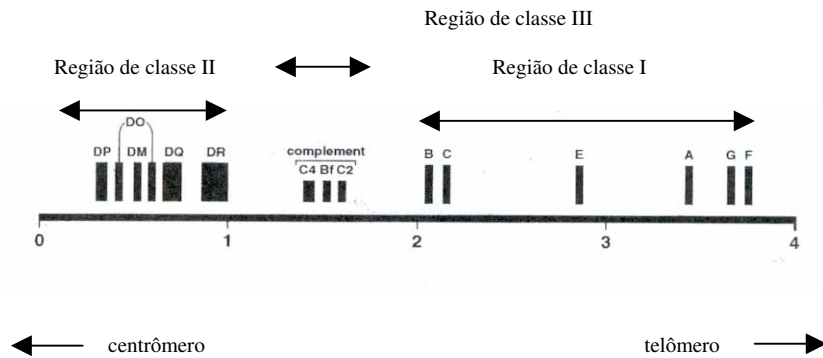


Figura 1: Mapa simplificado do complexo HLA

a) Na parte mais telomérica do cromossomo 6 estão localizados os genes HLA de classe I que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA -A, -B e -C (figura 2). Ainda incluindo nessa região, estão os pseudogenes, ou seja, genes que não se expressam nas moléculas funcionais, HLA-H,-G,-J,-K,-L. As moléculas de classe I (HLA-E, HLA-G) são expressos em tecidos específicos e em tempos específicos. Por exemplo, a molécula HLA-G é expressa na interface materno/fetal. Essas moléculas são menos polimórficas que as moléculas HLA-A, -B,-C, e são consideradas importantes para a compatibilidade HLA.(PARHAM & OHTA, 1996). Os genes da família MIC constituídos por 5 genes: MICA, MICB, MICC, MICD e MICE, sendo que somente os genes MICA e MICB são expressos nas moléculas (GRUEN et al., 1996).

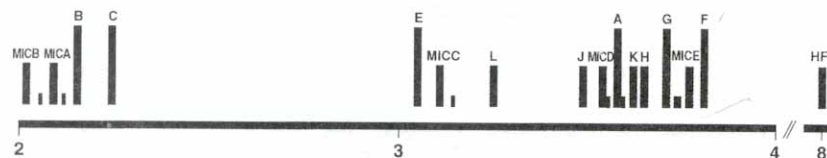


Figura 2: Mapa simplificado da região de classe I

b) Na sub-região HLA-DR, os genes se apresentam divididos em três categorias: os genes que codificam as cadeias α e β das moléculas HLA de classe II, os pseudogenes relacionados às cadeias gênicas α e β , e os genes envolvidos no processamento e apresentação do antígeno pelas moléculas HLA de classe II. Nesta última, estão diversos genes (figura 3), como o HLA-DRA, que codifica a cadeia α não polimórfica e os genes HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 e DRB5 respectivamente (et al., 1987). Nas sub-regiões HLA-DQ e DP, encontram-se os genes HLA-DQA1 e -DPB1 (JONSSON et al., 1987).

A região de classe II também possui outros genes como os TAP e os LMT. Os genes TAP1 e TAP2 codificam proteínas responsáveis pelo transporte até o retículo endoplasmático dos peptídeos gerados no citosol (TOWNSEND & TROWSDALE, 1993). Os genes LMP2 e LMP7 codificam os componentes do proteossoma, responsáveis pela geração dos peptídeos (GLYNNE et al., 1991). Os genes HLA-DM, codificadores das moléculas HLA-DMA e DMB, codificam as moléculas que catalizam a ligação de peptídeos as moléculas HLA de classe II (CHO et al., 1991).

c) Dentro da região de classe III situam-se os genes que codificam algumas proteínas do Sistema Complemento, C2, C4, da via clássica e o fator B da via alternativa do Sistema Complemento (LEHNER & TROWSDALE, 1998; BAHRAM et al., 1994).

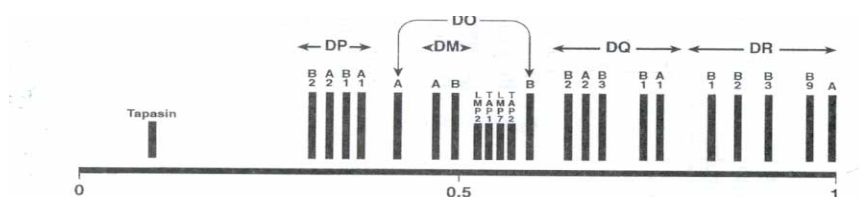


Figura 3: Mapa simplificado da região de classe II

Os genes que codificam as cadeias α do complexo HLA de classe I e as cadeias α e β do complexo HLA de classe II, estão ligados, isto é, além de estarem no mesmo cromossomo, estão próximos os suficientes para segregarem juntos. Uma combinação particular dos alelos de diferentes locos do complexo HLA é denominada haplótipo (JANEWAY et al., 1997). Outra característica dos genes HLA é o desequilíbrio de ligação,

isto é, para preservar determinados haplótipos, a frequência observada de um dado alelo é maior que a esperada por combinação de alelos ao acaso. Um exemplo na população caucasóide é o haplótipo HLA-A1 e HLA-B8 cuja frequência do gene individual, é de 27,5% e 15,7%. A frequência esperada dos dois alelos para o mesmo cromossomo é de 4,3%. No entanto este haplótipo aponta uma frequência de 9,8% no cromossomo 6, indicando uma baixa frequência de recombinação entre HLA-A e HLA-B. Nos locos HLA-DR e HLA-DQ não são observadas recombinações. (FEDER et al., 1996).

1.1.2. Moléculas HLA de classe I – Proteínas e Genes

As moléculas HLA de classe I são constituídas por dois polipeptídeos: a glicoproteína de cadeia pesada de 45 Kda que se encontra ancorada na membrana de célula e a cadeia leve solúvel em água de 12 KDa – a Beta 2 microglobulina (BODMER et al., 1997).(figura 4)

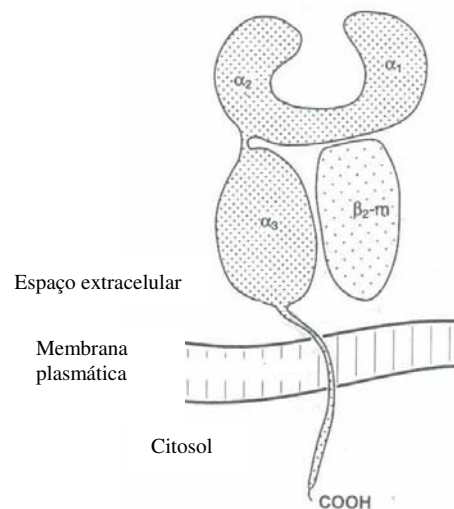


Figura 4: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe I

A cadeia leve é usualmente chamada de $\beta 2$ - microglobulina por ter sido inicialmente caracterizada como um componente solúvel de urina e do soro e assim denominada pela sua mobilidade eletroforética relativa a outras proteínas no soro (BJORKMAN et al., 1990).

A $\beta 2$ – microglobulina é codificada por um gene no cromossomo 15 e para a qual não foi descoberta variação de polimorfismo na expressão da proteína. Os genes que codificam as cadeias pesadas dos antígenos HLA de classe I possuem uma estrutura característica em que diferentes domínios de proteínas são codificados por exons separados: o peptídeo iniciador é codificado pelo exon 1, os três domínios extracelulares ($\alpha 1, \alpha 2$ e $\alpha 3$) são codificados pelos exons 2,3 e 4 respectivamente, a âncora transmembrana é codificada pelo exon 5, o final citoplasmático pelos exons 6 e 7 e a região 3 (linha) não lida, pelo exon 8. (PARHAM et al., 1988; PARHAM & OHTA, 1996). No total, os exons dos genes de classe I da cadeia leve são constituídos de 1089-1101 nucleotídeos.(MARSH et al.,2000).

1.1.3. Moléculas HLA de classe II- Proteínas e genes

As moléculas HLA de classe II são constituídas das cadeias α e β , cada uma tendo 2 domínios extracelulares (figura 5).

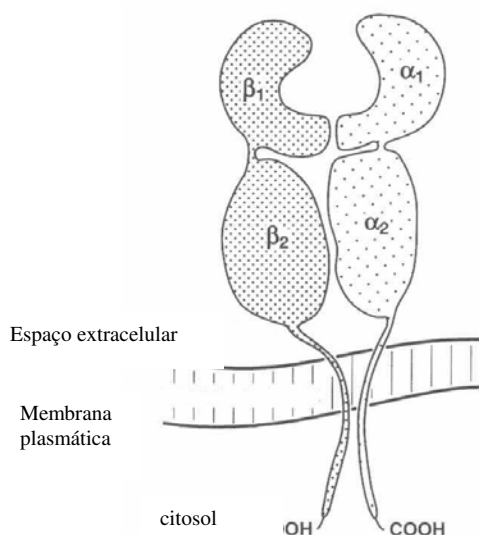


Figura 5: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe II

Os domínios extracelulares da cadeia α são denominados $\alpha 1$ e $\alpha 2$, e os da cadeia β de $\beta 1$ e $\beta 2$. As cadeias α possuem de 33-35 KDa e as cadeias β de 26-28 KDa. A sequência das duas cadeias indica que cada uma possui dois domínios de membrana externo de aproximadamente 90 aminoácidos, e a região transmembrana e o domínio citoplasmático com aproximadamente 40 aminoácidos. A cadeia β contém duas pontes dissulfeto intracadeia e a cadeia α uma única ponte dissulfeto intracadeia (STERN et al., 1994). A organização exon- intron dos genes de classe II é similar aos genes de classe I, onde os exons codificam domínios separados de proteínas. Os genes da cadeia α e β têm estruturas similares onde o exon 1 codifica o peptídeo iniciador, e os exons 2 e 3 codificam os dois domínios extracelulares. Nos genes da cadeia β , o exon 4 codifica o domínio transmembrana, e o exon 5 codifica o final citoplasmático. Por outro lado, para os genes da cadeia α , ambas as regiões transmembrana e o final citoplasmático são codificados pelo exon 4 (TROWSDALE et al., 1985). O polimorfismo das moléculas HLA de classe II origina-se a partir dos genes da cadeia β . O mais polimórfico dos genes HLA de classe II é o HLA-DRB1 para o qual 221 alelos já foram definidos (CEREB et al., 1996).

1.1.4. Moléculas HLA de classe I e II e apresentação de peptídeos antigênicos para diferentes tipos de células

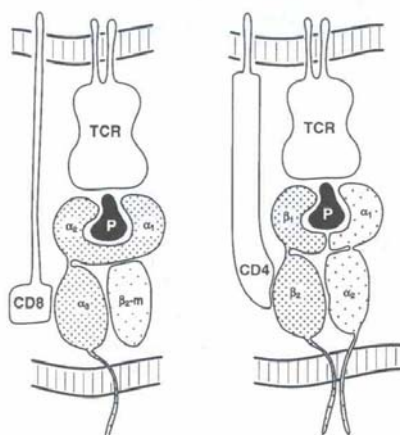


Figura 6: Apresentação de peptídeos antigênicos às células T

As moléculas HLA de classe I e II são moléculas do Sistema Imune essenciais na imunidade adaptativa mediada pelas células T. As moléculas HLA de classe I e II apresentam peptídeos antigênicos para os receptores de células α e β de célula TCD8 e célula TCD4, respectivamente. Os receptores de célula T interagem com a superfície da molécula de classe I, constituídas pelos domínios α_1 e α_2 , e o peptídeo de ligação. De maneira similar, os peptídeos de células T interagem com a superfície de moléculas de classe II formados pelos domínios α_1 , β_1 e peptídeo de ligação. Os co-receptores CD8 e CD4 interagem com moléculas HLA de classe I e II, respectivamente (figura 6). Os sítios de ligação nas moléculas HLA pelos co-receptores são distintos dos sítios de ligação pelos receptores de células T. O sítio de ligação do CD8 com a molécula de classe I é o domínio α_3 , sendo que o sítio de interação do CD4 com a molécula HLA de classe II é o domínio β_2 . Uma ativação eficiente das células T necessita da interação simultânea da molécula de HLA com o peptídeo antigênico, o receptor de célula T e o co-receptor (GOLDBERG et al., 1992).

Em geral, os antígenos externos apresentados pelas moléculas de classe I são derivados de infecções intracelulares, provavelmente vírus. Esses antígenos iniciam as respostas citolíticas das células T-CD8 as quais destroem as células infectadas e previnem a replicação viral. Uma vez que todas as células nucleadas são alvos potenciais para infecções virais, as moléculas de classe I são expressas por quase todos os tipos de células (WIERTZ et al., 1997).

Em geral, os antígenos externos apresentados pelas moléculas de classe II são derivados de patógenos presentes nos espaços extracelulares; isto inclui organismos que vivem e se replicam nos espaços extracelulares. Por exemplo, podemos citar várias bactérias e vírus que se locomovem entre as células. Estes antígenos estimulam respostas de células T-CD4 que servem para ativar macrófagos e células B. Esse modo de apresentação do antígeno não é necessário para todos os tipos de células, assim moléculas HLA de classe II são seletivamente expressos em células especializadas para esse fim e coletivamente denominadas células apresentadoras de antígenos (APC). Os macrófagos, as células B e as células dendríticas são as mais importantes células APC (CASTELLINO et al., 1997).

1.2. HERANÇA DOS ALELOS HLA

1. Os genes HLA são altamente polimórficos. Assim, os genes HLA de indivíduos não relacionados de uma grande população humana podem apresentar seqüências diferentes de DNA para esse gene. Cada seqüência diferente de DNA é chamada de alelo. Essas seqüências gênicas diferentes originam diferentes produtos alélicos (polipeptídeos) para as diferentes proteínas de classe II, onde:

A) Alguns locus formam muitos alelos, por exemplo, o loco DRB1 tendo aproximadamente 200 alelos. Outros locus apresentam poucos alelos como exemplo o DRA, com apenas 2 alelos.

- É pouco provável que dois indivíduos não relacionados carreguem os mesmos alelos de classe II para os locus, DR, DQ e DP (figura 7). A estimativa esperada é que somente 1 indivíduo para cada 20.000 de um grupo étnico, carregue os mesmos alelos HLA de outro indivíduo deste mesmo grupo.

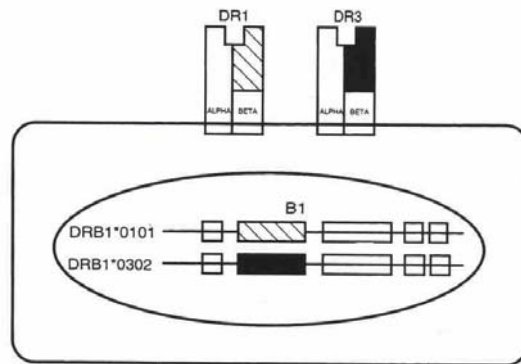


Figura 7: Polimorfismo dos alelos HLA

2. Nos alelos de classe II, o segundo exon que codifica o primeiro domínio de cada cadeia de polipeptídeo, contém a grande maioria da variabilidade alélica. Diferenças alélicas podem também ser encontradas em outros exons. As tipificações HLA de classe II definem as diferenças basicamente, no segundo exon (figura 8).

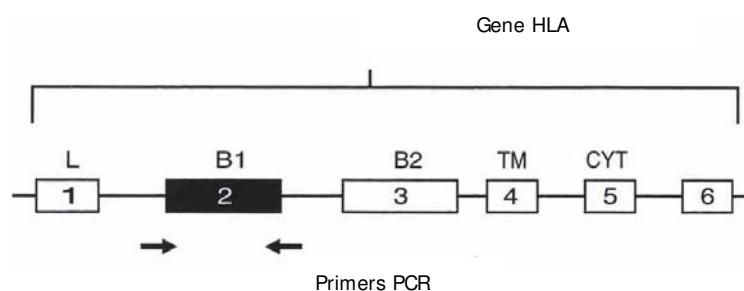


Figura 8: Representação dos exons da molécula HLA de Classe II, L-peptídeo iniciador da cadeia, TM-região transmembrânica, CYT-final citoplasmático

3. O Comitê de Nomenclatura para os alelos HLA-W.H.O define os nomes para os alelos HLA. Por exemplo, alelos do loco DRB1 são chamados: DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0403.

- Cada alelo HLA é designado pelo nome do gene ou loco seguido por um asterisco e um número com 4 dígitos indicando o alelo (figura 9).

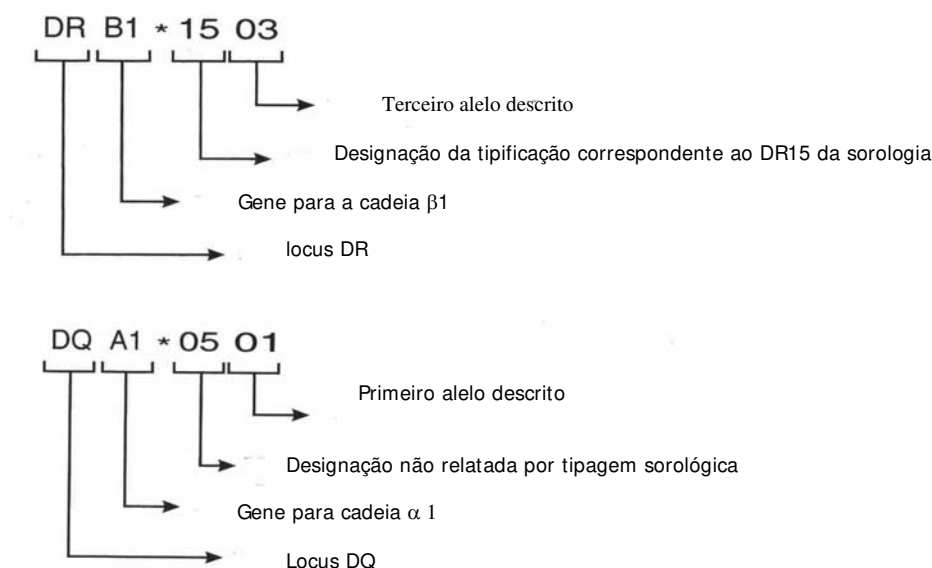


Figura 9: Nomenclatura dos alelos HLA

- Por exemplo, DQB1*0301 é um alelo do gene HLA-DQB. Os dois primeiros números na designação numéricos de cada alelo é o equivalente à definição sorológica. Os outros dois números se referem ao gene determinado.

- Cada indivíduo carrega duas cópias do gene alfa (α) ou beta (β) HLA-DR,-DQ,-DP, uma herdada de sua mãe e outra de seu pai . Além disso, como todos os genes HLA são encontrados em um só cromossomo, cada indivíduo herda uma cópia do cromossomo 6 carregando uma cópia do haplótipo HLA de sua mãe e uma cópia do haplótipo HLA de seu pai.

- Os genes HLA são codominantemente expressos, isto é, ambas as cópias codificam proteínas que são expressas na membrana celular em uma célula.(figura 10).

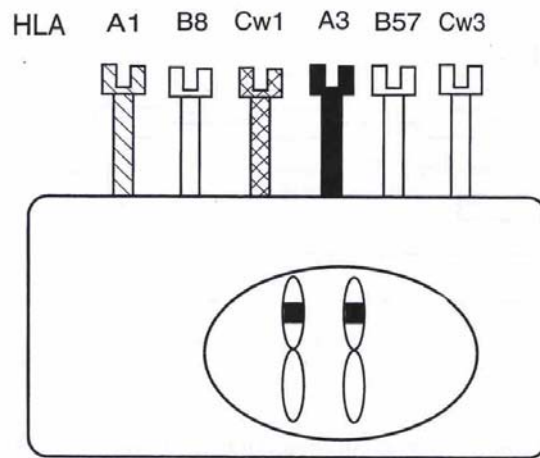


Figura 10: Expressão da codominância dos antígenos HLA

- O indivíduo pode ter dois alelos idênticos de um só gene (homozigose) ou pode ter dois diferentes alelo de um só gene (heterozigose).

- Os pais e filhos compartilham um cromossomo ou haplótipo (haploidêntico). Dois irmãos (irmão e irmã) têm de 1 a 4 chances de receber as mesmas 4 cópias do cromossomo 6 de seus pais, e serão HLA idênticos. Assim, os genes de classe II são herdados em bloco, tradicionalmente os cromossomos do pai são definidos como “a” e “b” e os cromossomos da mãe são definidos como “c” e “d”.

Algumas vezes, as duas cópias do cromossomo 6, que carregam os alelos de classe II, trocam segmentos gênicos. Esse processo é denominado recombinação recíproca (Figura 11). Dessa forma, as células germinativas podem herdar a nova combinação.

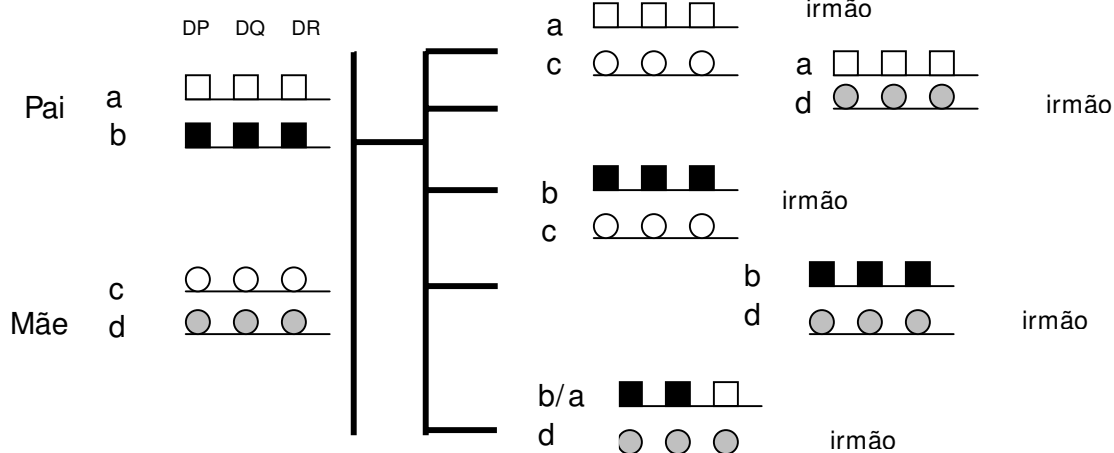


Figura 11: Representação da herança dos alelos HLA

1.3. HLA E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

Os estudos para correlacionar o polimorfismo HLA com a susceptibilidade ou proteção às doenças tiveram início logo após a padronização das técnicas sorológicas. Os avanços nessa área começaram com a demonstração em 1973 do antígeno HLA-B27 (então chamado HL-AW27) apresentando uma frequência muito alta- 95%, em pacientes com espondilite anquilosante (EA), em contraste com a frequência de 2% do HLA-B27 na população geral (MARSH et al., 2000).

Muitas doenças têm sido associadas ao Complexo HLA, como em nenhuma outra parte do genoma humano. No passado, foi questionado se esse fato era devido meramente por essa região haver sido mais estudada que outras. Atualmente tal hipótese mostrou-se incorreta, uma vez que estudos em outras regiões envolvendo outros marcadores falharam para definir qualquer região onde o envolvimento com certas doenças fosse comparável ao HLA. Os estudos do HLA e doenças tiveram início quando somente se tipava os antígenos de classe I. Assim, todas as primeiras associações descobertas foram com os antígenos HLA de classe I. Subseqüentemente, quando antígenos HLA de classe II foram definidos, outras doenças apresentaram uma forte associação com antígenos de

classe II, que estão em desequilíbrio de ligação com aqueles antígenos de classe I, previamente associados (MARSH et al., 2000).

Porém, uma questão ainda não respondida sobre essas associações, diz respeito ao comprometimento desse polimorfismo do HLA de classe II na causa da doença. Os alelos podem estar ligados a doença, ou meramente ligados a um outro gene com um polimorfismo ainda desconhecido. Muitas doenças associadas ao polimorfismo HLA são aquelas que não envolvem infecções agudas e seus sintomas são causados por um estado crônico de infecção ou autoimunidade (TIWARI & TERASAKI, 1985; LECHER, 1994). Entre elas podemos citar, espondilite anquilosante (EA), o diabetes melitus insulino-dependente (IDDM), artrite reumatóide (AR), miastemia grave (MG), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla (EM). Para essas doenças, acredita-se que os alelos HLA de classe I e II estejam diretamente envolvidos nos mecanismos causadores da doença. Entretanto, é importante considerar nessas doenças associadas ao determinado polimorfismo dos alelos HLA, outros fatores genéticos e ambientais, uma vez que a grande maioria dos indivíduos portadores de um alelo ou haplótipo associado a uma doença, jamais desenvolveu a mesma. Como exemplo, somente 2% dos indivíduos que são HLA-B27 positivo desenvolveram E.A., e o risco de incidência se encontra em 20% de pessoas positivas para o HLA-B27 com histórico de doença na família (BENJAMIN & PARHAM, 1990).

Em adição à predisposição genética, existem os fatores ambientais que muitas vezes desempenham um papel importante na determinação do início e da continuidade da doença auto-imune associada ao HLA. A identificação desses fatores é um desafio, pois os sintomas da mesma aparecem muito tempo depois dos eventos que acionam os mecanismos da doença. Entretanto, em quase todas as condições existem as evidências circunstanciais que a doença é iniciada por linfócitos T auto-ímmes, as quais surgem como um produto de resposta imune para as infecções. Assim, as infecções pelo vírus Coxsackie, tem sido correlacionado com IDDM, e infecções bacterianas intestinais com doenças associadas ao HLA-B27 (SINHA et al., 1990).

Em resumo, a visão corrente das doenças auto-imunes associadas ao HLA é que o desenvolvimento da doença envolve a predisposição genética, resultante da combinação dos fatores para o HLA e demais genes. Mesmo entre os indivíduos que possuem uma predisposição genética, somente uma minoria desenvolve a doença. Para aqueles que a desenvolvem, a doença surge porque um ou vários clones de linfócitos T, escapam da tolerância e tornam-se reativos para peptídeos próprios. Os linfócitos T atacam as células apresentadoras dos peptídeos próprios, ocorrendo a destruição celular e inflamação. Por outro lado, isso aumenta o processamento e apresentação de proteínas próprias que expandem a resposta imune e posteriormente aumentam a destruição dos tecidos e inflamação. Esses fatores conduzem a uma resposta inflamatória incontrolável nos tecidos alvos e desequilíbrios de suas funções fisiológicas (PIETERS et al., 1997).

1.4. LEUCEMIAS AGUDAS

1.4.1. Definição:

As leucemias agudas são um grupo de doenças clonais caracterizadas por acúmulo anormal de células imaturas do setor granulocítico na medula óssea. Estas células podem causar falência da medula óssea, elevar o número de leucócitos em circulação e infiltrar órgãos e tecidos orgânicos. É portanto frequente, mas não presente em todos os pacientes, os achados de células imaturas circulantes, elevação de leucócitos e evidência de falência medular, com anemia, neutropenia e plaquetopenia com envolvimento de outros órgãos, além da medula óssea, tais como o fígado, o baço, os linfonodos, as meninges, o cérebro, a pele e o testículo (HAASE et al.,1995).

1.4.2. Classificação:

As leucemias agudas são divididas de modo geral em leucemia mielóide aguda (LMA) e linfóide aguda (LLA), baseado nos achados morfológicos e citoquímicos. A LMA é subdividida em 8 variantes de acordo com a classificação FAB (franco-americana-britânica) (BENNET et al.,1985; BENNET et al., 1991). Ainda, de acordo com a classificação FAB, as LLA são sub-divididas em sub-tipos (L1, L2 e L3). A

imunofenotipagem (BRADSTOCK et al.,1993) análise cromossômica e rearranjos gênicos podem também ser utilizados para distinguir estes dois importantes sub-grupos de leucemias (BLOOMFIELD et al.,1987).

A Tabela abaixo apresenta a classificação FAB,dados de citoquímica, citogenética e imunogenética das leucemias agudas (BENNET et al., 1976; BOWMAN et al.,1986; KRAUSE et al., 1988).

LMA	LLA
M0 - indiferenciada	L1 - blastos pequenos, uniformes e alta relação nucleo-citoplasmática
M1 - sem maturação	L2 - blastos grande, heterogêneo, e baixa relação nucleo-citoplasmática
M2 - com maturação granulocítica	L3 - blastos vacuolizados e citoplasma basófilo (usualmente LLA-B)
M3 - promielocítica	
M4 - com maturação granulocítica e monocítica	
M5 - Monoblástica ou monocítica	
M6 - eritro-leucemia	
M7 - megacarioblástica	
CITOQUÍMICA	
Mieloperoxidase + (incluindo bastonetes de Auer)	negativa
Sudan Black +	negativa
Esterase inespecífica + em M4 e M5	negativa
PAS negativa ou + difusa	Positiva e grumos
Fosfatase ácida positiva	+ nas LLAT
MICROSCOPIA ELETRÔNICA	
+ em grânulos precoces	negativa
ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS	
M2 - t (8;21)	Precursor B: t (4;11), t (9;22), t (1;19), hiperdiploidia e hipodiploidia
M3 - t (15;17)	B (tipo Burkitt): t (8;14), t(2;22), t (2;8)
M4 - inv (16), del (16q)	LLA-T: t(8;14), t(11;14), t(10;14), t(1;14), t(7;9), t(7;19)
M5 - del(11q), t (9;11), t 11;19)	
M6 - +8	
IMUNOFENOTIPAGEM	
CD13+, CD33+, glicoforina+ e antígenos plaquetários	LLA-B: CD19+, cCD22+, CD10+; LLA-T: CD7+, cCD3+; TdT+

1.4.3. Incidência:

A LLA é mais comum na infância, com pico de incidência entre os três e cinco anos de idade. Em adultos, ocorre mais freqüentemente em indivíduos com menos de trinta anos (MAUER, 1990). O tipo precursor B comum (CD10+) é o mais freqüente na infância e tem incidência semelhante por sexo. Já a LLA-T é mais freqüente no sexo masculino. A LMA ocorre em todas as idades, é a forma mais comum de leucemia do adulto, incluindo os pacientes idosos, e pode ser derivada de Síndromes Mielodisplásicas ou outras doenças hematológicas (SANDLERS et al.,1997). A LMA é uma fração de 10 a 15% das leucemias da infância. É mais comum em indivíduos masculinos (LITCHMAN & HENDERSON, 1990; KRAGULJAC et al, 2000).

1.4.4. Patogênese:

As células leucêmicas, tanto da LMA como da LLA, são resultados de proliferação clonal. Nas leucemias agudas as células perdem a sua capacidade de diferenciação normal e ficam incapazes de novas divisões celulares. Esta acumulação resulta na substituição dos precursores normais e consequente falência da medula óssea (HAASE et al., 1995). A condição clínica do paciente vai depender do acúmulo de células e, quando este número ascende a 10^{12} o paciente começa apresentar sinais desta falência. A doença pode ser reconhecida por morfologia convencional, quando o número de blastos cresce acima de 5% das células da medula óssea. Este número tem sido usado como critério de remissão hematológica, após o tratamento quimioterápico. A apresentação clínica e mortalidade ligada à doença são cada vez mais expressiva quanto mais intensa for a neutropenia, anemia e a plaquetopenia (SANDLERS ET AL.,1997).

A leucemia aguda, de maneira similar a outros cânceres, é uma doença clonal, progressiva desencadeada por mutações. Uma diversidade de trocas cromossômicas e moleculares ocorre nas células leucêmicas, e a própria restrição de muitos clones específicos das leucemias sugere que estes clones sejam adquiridos e não herdados (DAUSSET et al.,1982).

No entanto, uma pequena, porém significativa proporção (acima de 5%) das leucemias agudas (tanto linfóides quanto mielóides) está associada à herança, freqüentemente envolvendo genes que codificam funções relacionadas à estabilidade genômica e reparos no DNA (TAYLOR et al., 1996). Em uma porcentagem maior de casos, a herança de alelos de múltiplos locos genéticos que regulam as respostas imunes às infecções (tal como os locos HLA) ou genes codificadores de enzimas envolvidas no metabolismo carcinogênico podem contribuir para um maior risco no desenvolvimento de leucemias (DAUSSET et al, 1982).

O papel dos genes herdados, na etiologia das leucemias agudas tem sido muito subestimado (TAYLOR et al., 1996). A diversidade das anormalidades moleculares é amplamente explicada pela complexidade dos circuitos genéticos que regulam a vida, a diferenciação, e a morte das diferentes células tronco -hematopoiéticas de onde se originam as leucemias agudas (GREAVES et al., 1996).

1.4.4.1. Diversidade biológica

A LMA é uma hemopatia clonal que se origina nas células germinativas da linhagem mielocítica. É uma leucemia originada de uma única célula primordial transformada com presença de desarranjos na diferenciação e proliferação dessas células que possuem a capacidade de diferenciar-se de forma desordenada em granulócitos, podendo manter tanto as células maduras como imaturas. Os blastos malignos encontram-se disseminados, principalmente, na própria medula óssea (LITCHMAN & HENDERSON, 1990).

As leucemias mielóides agudas possuem determinadas características comuns, (BENNET et al., 1976), incluindo a origem em uma suposta célula-tronco para a diferenciação de granulócitos-monócitos (Mc CULLOCH, 1984), alterações cromossômicas (LILLEYMAN et al, 1978) e a presença de antígenos característicos (FOON et al, 1982; SCHLOSMAINN et al, 1972; WINCHESTER et al, 1977 e BERSTEIN et al, 1982). Nesses antígenos está incluída a expressão de antígenos Ia em

todas as células das leucemias mielóides (BILLING et al, 1976) e uma variedade de outros antígenos da linhagem monócito- granulócito (BERSTEIN et al, 1982; DIMITRIU-BONA et al, 1982; SEREMETIS et al, 1985).

A LLA é caracterizada pelo acúmulo de células linfóides imaturas e malignas na medula óssea e, em muitos casos, no sangue periférico. As células linfóides expressam marcadores de superfície associados com os estágios iniciais de diferenciação e podem exibir características de células T e B. A disseminação das células é também evidenciada em locais extramedulares (MAUER, 1990).

A base molecular da LLA é provavelmente mais complexa que as considerações iniciais relacionadas à doença (PUI et al., 1996). As aberrações genéticas resultam em aumento da proliferação celular, diminuição da diferenciação celular e anulação do processo normal da morte celular programada (apoptose). Todos esses fatores parecem ter um papel no desenvolvimento do fenótipo da leucemia (CORTES et al., 1995).

Enquanto anormalidades complexas no cariótipo, indicativas de uma estabilidade genômica, são relativamente incomuns na LLA, todavia é provável que a LLA se desenvolve na conjunção de múltiplos eventos genéticos (PUI et al., 1993). Com exceção da Síndrome de Down, síndromes de predisposição genética para a LLA são raras, sugerindo que a LLA se desenvolve direto da aquisição sequencial de mutações somáticas na célula linfóide progenitora (RAIMONDI et al., 1993) onde mutações herdadas são um fato ainda desconhecido, nos genes de predisposição ao câncer e não podem ser excluídos.

O mecanismo pelo qual as mutações somáticas são adquiridas na LLA é variável, incluindo ganhos e perdas numéricas de cromossomos, amplificação do gene, deleção do gene, avaliação e inativação do gene por pontos de mutação. (QUESNEL et al., 1995).

1.4.4.2. Fatores causais

Os diferentes subtipos biológicos, das leucemias podem ter distintos mecanismos causais e estes podem estar funcionalmente ligados, entre anormalidades moleculares específicas e agentes causais (SHU et al, 1996). Os mecanismos etiológicos envolvidos na produção das mutações iniciais podem diferir daqueles indutores ou promotores das mutações subseqüentes (THIRMAN et al, 1993).

O espaço de tempo que vai desde as exposições relevantes, as mutações sequenciais e o diagnóstico clínico da doença, pode ser muito longo (PEDERSEN et al, 1994).

Embora muitas causas das leucemias agudas não sejam conhecidas, alguns fatores estão implicados e são bem conhecidos. As radiações ionizantes, determinados tipos de agentes químicos, especialmente solventes orgânicos -benzeno (GRÜNWALD et al, 1996) e vírus (HTLV-1), por exemplo, contribuem no desencadear da doença, como agentes ou fatores de risco. Observações ao longo do tempo em animais de experimentação e cultura de células , têm mostrado uma associação entre danos no DNA, e/ou transformação celular por estes mesmos agentes e o desencadear da leucemia (BOICE et al, 1996).

As exposições à esses agentes podem ser muito fortes ou não, e desde que a maioria dos indivíduos expostos não desenvolvem uma leucemia aguda, outros fatores necessariamente contribuem para a eclosão da doença (SHU et al., 1996). Estes exemplos também fornecem algumas explicações para o estado latente. Em muitos casos, o intervalo entre a exposição ao agente tóxico e o risco máximo da doença é de 3 a mais de 5 anos;mas e um risco maior ainda se pode estender por décadas (UNSCEAR, 1994).

1.4.4.3. Associação HLA e leucemias agudas

Estudos com o vírus Gross indutor das leucemias em camundongos levou às observações, que camundongos com o haplótipo H-2^k, poderiam realmente sucumbir à doença, sendo que aqueles com o haplótipo H-2^d apresentavam uma forma menos grave. Assim, o haplótipo H-2^b parecia conferir um grau de proteção para a doença (LILLY, 1966,1968).

Mais tarde, a partir de estudos em murinos com leucemia induzida por vírus, Lilly mostrou que o locus H-2 tinha apenas importância relativa quanto à susceptibilidade a estas leucemias. E a resistência produzida pelo alelo H-2^b poderia ser vencida pelo aumento da dose do vírus (LILLY, 1968). Outros exemplos do controle genético ligado ao H-2 pelos vírus indutores das leucemias, incluem aqueles causados pelos vírus Tennant (TENNANT & SNELL, 1968) e os vírus AKR (TUCKER et al, 1977). Em todos os casos, os fatos foram similares. Um ou vários genes ligados ao H-2 controlam a resistência ou susceptibilidade às leucemias, sendo a resistência frequentemente dominante sobre a susceptibilidade. Posteriormente, estudos sobre a resistência ao vírus Moloney, indutor das leucemias mostraram que o nível da virulência estava relacionado às respostas imunes e assim o desenvolvimento da leucemia era dependente da sua virulência (DEBRE et al., 1980; DAUSSET et al., 1982).

A observação de que os genes mapeados na região H-2 estavam envolvidos na susceptibilidade para as leucemias dos camundongos conduziu a numerosos estudos no homem para tentar identificar, na região HLA, os genes responsáveis na determinação da susceptibilidade ou resistência nos linfomas e leucemias humanas.

O primeiro estudo nas leucemias humanas mostrou uma frequência aumentada do antígeno HLA-A2 (KOURILSKY et al., 1967). Concomitantemente foram encontradas associações fracas dos antígenos de classe I- HLA-B e HLA- Cw com a doença de Hodgkins (AMIEL, J.L., 1967). Um trabalho posterior na LLA apresentou também, uma associação com os antígenos HLA-A2 e HLA-B12, sendo a primeira associação haplotípica documentada (WALFORD et al., 1970).

Um grande número de outros estudos investigou as associações HLA nas leucemias de crianças e adultos, incluindo a análise dos antígenos e genes HLA-DR e HLA-DQ (MOERLOOSE et al., 1977; GHODSI et al., 1998). Muitas destas investigações examinaram um grande número de pacientes e controles, e embora as técnicas utilizadas nas tipificações HLA fossem bastante precisas, os resultados dessas associações não mostraram resultados satisfatórios. Um estudo multicêntrico envolvendo um grande número de pacientes analisados, num total de 1834 indivíduos portadores de LLA, LMA e LMC, tratados entre 1969 a 1985 documentou associações com os antígenos HLA- Cw3 e

-Cw4, ambos como marcadores de susceptibilidade para as três leucemias citadas, porém com um risco relativo de 2,49 (D'AMARO et al., 1984; BORTIN et al.,1987) e um trabalho posterior realizado em um só centro mostrou uma associação com o antígeno HLA-Cw7 como marcador de susceptibilidade na LLA (MULLER et al.,1988).

O primeiro estudo relacionado aos antígenos de classe II e LLA mostrou um aumento na frequência do antígeno HLA-DR7 nos pacientes estudados (MOERLOOSE et al., 1977; CASPER et al.,1980). Um estudo posterior encontrou uma associação fraca com o antígeno HLA-DR4 e pacientes adultos com LLA (NAVARRETE et al.,1986). Uma das associações mais fortes já documentadas foi com o antígeno HLA-DR53 e LMA (SEREMETIS et al.,1985), com risco relativo de 7,88 ($p < 0,00005$).

Além das associações alélicas HLA, particularmente HLA-A2, HLA-Cw3; HLA-Cw4; HLA-DR3, com as leucemias, foi documentado que pacientes com leucemias tinham um aumento na frequência de irmãos com HLA idênticos (CHAN et al.,1982; DE MOOR et al.,1985, DORAK et al.,1994; DORAK et al.,1999) um aumento na homozigose para os antígenos HLA (VON FLIEDNER et al., 1983) e uma identidade HLA com os alelos de suas mães, quando ambos pais compartilhavam um antígeno HLA-DR (CARPENTIER et al.,1987).

Em família de pacientes com leucemias foi observado um aumento significativo de alelos HLA idênticos nos pais, principalmente HLA-DR (CHAN et al., 1982; CARPENTIER et al., 1987; NORDLANDER et al., 1983), onde foi encontrado que 35% dos irmãos não afetados tinham o mesmo genótipo HLA dos irmãos leucêmicos, quando a frequência esperada seria 25% (CHAN et al.,1982). Estes dados foram confirmados por DORAK et al, em pacientes jovens com leucemia mielóide crônica (DORAK et al.,1994).

Concomitantemente, Von Flidner e colaboradores (VON FLIEDNER et al.,1983) documentaram a herança dos genes HLA-DR em estudo de famílias de 55 crianças com LLA, e as observações foram: a) Aumento de igualdades para os locos HLA-B e HLA-DR entre os pais; b) Duas vezes mais homozigoses que o esperado, entre os pacientes quando os pais possuíam genes HLA idênticos, principalmente para os antígenos HLA-DR; c)- Aumento das frequências de identidades HLA entre irmãos .

Embora uma grande quantidade de estudos mostre associações consistentes dos genes HLA e as leucemias, o mecanismo dessas associações ainda permanece desconhecido (MICHEL et al.,1981; CHAN et al.,1982; DE JONGH et al.,1982; BORTIN et al.,1987; MULLER et al., CARUSO et al.,1987; LINET et al.,1988; DEARDEN et al.,1996; DORAK et al.,1999) e uma interpretação mais abrangente sobre as observações documentadas refere-se ‘as associações HLA com a susceptibilidade ‘as leucemias como sendo uma característica recessiva (DORAK et al.,1999) e mais provavelmente relacionada aos locos HLA-DR (DORAK et al.,1999). A natureza recessiva do MHC e associações com as leucemias também foram observadas em estudos de animais, no camundongo (DEMANT et al.,1989) e galinha (KAUFMAN et al.,1999).



OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Caracterizar a nível molecular, amostras de indivíduos saudáveis da região de Campinas e de indivíduos portadores de leucemias agudas, ao diagnóstico, para determinar os alelos HLA de classe II- HLA-DRB1-5 e-DQB1.
2. Determinar as frequências dos alelos e haplótipos de classe II em cada uma das populações estudadas.
3. Comparar as frequências destes alelos e haplótipos nas duas populações estudadas a fim de verificar os que têm relação com o aparecimento das leucemias agudas.



***MATERIAS E
MÉTODOS***

Lista de reagentes

1. Tampão de Lise I

0,3M Sacarose (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

5mM MgCl_2 (Cloreto de Magnésio) (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

10mM Tris-HCl (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

Triton X-100 U.S.P. 1% (Nuclear)

Volume final = 1 litro, e era estocada em local escuro, à 4°C.

2. Tampão de lise II

0,024M Na-EDTA (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

0,075M NaCl (Synth – Labsynth Produtos para laboratórios LTDA, Diadema-SP – Brasil).

O pH era ajustado a 8,0 com NaOH (hidróxido de Sódio – Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – Brasil), volume final = 1 litro, e estocada à temperatura ambiente, (22 – 25°C).

3. Solução Tris-Borato – 10X- Tampão de Eletroforese

0,9M Triz-Base (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – R.J.- Brasil).

0,9M Ácido Bórico (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – R.J.- Brasil).

0,2M Na-EDTA pH=7,5 (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

Volume final = 1 litro.

A solução era estocada à temperatura ambiente, (22-25°C).

4. Álcool isopropílico (C₃H₈O)- (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro R.J.- Brasil).

5. Álcool etílico (C₂H₆O) - 70% - 73,6ml de álcool etílico (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – R.J.- Brasil) diluídos em 26,3 ml de água bidestilada ultrapura. A solução era estocada à temperatura ambiente, (22-25°C).

6. Cloreto de Sódio (NaCl)- 6,0M – solução saturada – 35,04g NaCl (Synth – Labsynth Produtos para laboratórios LTDA, Diadema- SP – Brasil), eram diluídos em 100 ml de água bidestilada ultrapura , em seguida a solução era autoclavada à 121°C.

Era estocada à temperatura ambiente, (22-25°C).

7. Perclorato de Sódio – 0,5M – 70,2g de Perclorato de Sódio monohidratado (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA), eram diluídos em 100 ml de água bidestilada ultrapura e estocado à temperatura ambiente, (22-25°C).

8. SDS – Dodecil Sulfato de Sódio - 10,0g de SDS (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA), eram diluídos em 100ml de água bidestilada , ultrapura.

3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DA PESQUISA

3.1.1. Seleção dos indivíduos controle

Foram estudados 100 indivíduos sadios, doadores do Banco de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas- Hemocentro, provenientes da região de Campinas- SP.

A análise do grupo étnico foi feita sempre por um mesmo examinador. Foram incluídos na amostra indivíduos constituintes do grupo étnico caucasóide, oriental e ameríndio, classificados como brancos, formadores da atual população brasileira. Foram excluídos da amostra, os indivíduos do grupo étnico negro.

Foram colhidas amostras de sangue, com consentimento informado dos 100 doadores, e colhidos 10 ml de sangue venoso em tubos estéreis, vacutainer, contendo EDTA (Sal di-sódico do ácido etileno-dinitrilotetracético- di-hidrato) como anticoagulante. O material biológico foi encaminhado ao laboratório de Imunogenética de Transplantes, da Divisão de Patologia Clínica e Hospital das Clínicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, onde era processado para os procedimentos de tipificação dos alelos de Histocompatibilidade estudados.

Todos os doadores foram submetidos a exame médico onde não se constatou nenhuma doença de base e apresentaram sorologia negativa para doença de Chagas, Hepatite B e C e HIV.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.1.2. Seleção dos pacientes

Foram avaliados pacientes adultos com idade acima de 15 anos portadores de leucemias agudas, ao diagnóstico, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp. Foram tomados todos os casos consecutivos, no período de junho de 2000 a setembro de 2001. Todos os pacientes avaliados foram provenientes do Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Em relação à etnia foram observadas as mesmas características definidas para o grupo de indivíduos controle sadios, e igualmente foi excluído desse estudo os indivíduos do grupo étnico negro.

3.2. TIPIFICAÇÃO DOS GENES HLA DE CLASSE II

3.2.1. Extração e Purificação do DNA

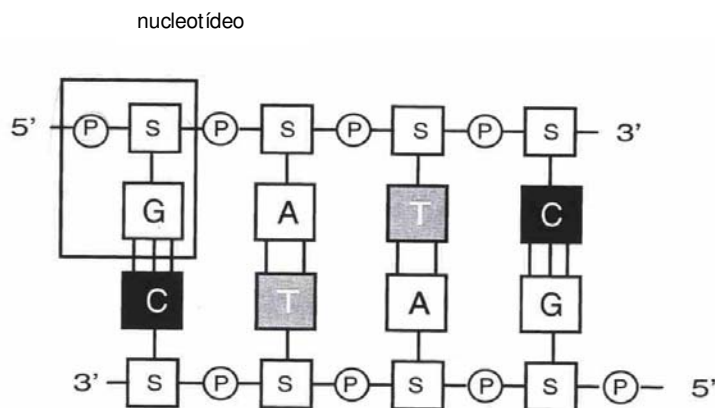


Figura 12: Estrutura do DNA

O DNA (figura 12), foi extraído por um procedimento denominado “salting out”, a partir de células do sangue periférico (MILLER *et al.*, 1988). Foram coletados 10 ml de sangue venoso, utilizando EDTA (Sal di-sódico do ácido etileno-dinitrilotetraacético-(di-hidrato)) como anticoagulante. Não era utilizado sangue heparinizado, pois a heparina poderia interferir na amplificação do DNA pela enzima Taq polimerase. O sangue total foi transferido para um tubo cônico de polipropileno de 50 ml, sendo adicionado 40ml de Tampão de lise de glóbulos vermelhos, tampão de Lise I gelado, composto pelos seguintes reagentes: sacarose 0,3M, triz-HCl 10mM, $MgCl_2$ 5mM e triton X100 a 10%. Em seguida a solução era homogeneizada por inversão e centrifugada durante 5 minutos a 2400 x g (3200 rpm), a + 4°C. O sobrenadante era cuidadosamente derramado e o precipitado ressuspendido em 4,5ml do tampão de lise de glóbulos brancos, tampão de lise II, composto pelos seguintes reagentes: NaCl 0,075M, NaEDTA 0,024M, hidróxido de sódio (NaOH), e era adicionado 125ul de Dodecil Sulfato de Sódio(SDS)10%, e 1,1ml de perclorato de sódio 5M, agitado vigorosamente por 10 segundos a temperatura ambiente. Para a extração de proteínas era adicionado 2ml de NaCl 6M, e agitava-se vigorosamente durante 15

segundos a temperatura ambiente. Após uma segunda centrifugação à 1500 x g (2600 rpm) por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante era derramado em tubo de polipropileno de 50 ml evitando o precipitado, e era adicionado 7ml de isopropanol absoluto, misturado gentilmente para a precipitação e ressuspensão do DNA. O DNA precipitado era retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur selada e retirado o excesso de isopropanol e lavado três vezes em 3ml de álcool etanol à 70%, por 1 minuto, à temperatura ambiente e redissolvido em 300 a 500µl de água deionizada estéril. O DNA era quantificado no espectrofotômetro, em 260nm e 280nm (UV) e o grau de pureza do DNA extraído era calculado pela razão entre absorbância obtida em 260nm e 280nm (A260:A280). Esta razão era considerada adequada quando permanecia entre 1,6 a 2,0; Quando os valores da absorbância eram inferiores a 1,5 o DNA era precipitado com álcool isopropílico. Finalmente a concentração do DNA era ajustada para 100ng/µl, com água deionizada estéril. Posteriormente era realizada a amplificação do DNA, e a amostra concentrada era guardada em freezer à -20°C. Caso este passo fosse realizado posteriormente, o DNA era requantificado no momento da reação, devido a sua precipitação (Hurley *et al.*, 1997).

3.2.2. Amplificação do gene utilizando a reação de polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método sensível para separar grandes quantidades de genes HLA específicos para tipagem HLA. Utilizando esse método pode-se gerar milhões de cópias de um gene específico (Hurley *et al.*, 1997).

3.2.2.1. Utilização de Primers de Sequência Específica para detectar alelos específicos

O DNA era amplificado pela reação de polimerase em cadeia, com um conjunto de “primers” sequência específica, segundo a metodologia desenvolvida por Zetterquist & Olerup, 1992, utilizando-se “primers” sintetizados, fornecidos pela One Lambda, Inc – Ca EUA, tanto em nível I– genérico, como em nível II, específico.

A reação de amplificação em nível I (genérico), era realizado em microplacas (One Lambda – Inc. Ca - EUA), com 32 poços contendo os “primers” já padronizados. Os demais reagentes da reação de amplificação eram misturados um tubo (mix) – as bases nitrogenadas, MgCl₂, corante, e 2μl da enzima Taq polimerase-(5U/μl)-(Gibco – Brasil). Inicialmente, eram retirados 9μl da solução (mix) e adicionados na escavação do controle negativo, previamente preparada com 1μl de água deionizada estéril; a seguir era adicionado ao restante da solução (mix) 39μl de DNA. E por fim, era colocado 10μl da solução (mix) em cada um dos poços da placa, exceto no controle negativo.

Pelo método PCR/SSP, foram realizadas as identificações, a nível genérico, do alelo HLA-DRB, através de 13 reações para as especificidades HLA – DRB1, 3 reações para as especificidades HLA – DRB3, 1 reação para o alelo DRB4 , 2 reações para o alelo DRB5, e 5 reações para as especificidades HLA – DQB1.

Para que fosse possível a amplificação do DNA, a microplaca era colocada em um termociclador (MJ – PTC-100), ocorria um ciclo de aproximadamente 1 hora e 20 minutos, com as temperaturas que seguem abaixo:

O DNA era amplificado pelo uso de 3 passos:

A- Desnaturação do DNA - 94°C – (figura 13) - responsável para que ocorra a desnaturação do DNA, separando a dupla fita.



Figura 13: Desnaturação do DNA

B- Anelamento dos primers - 55 a 59°C-(figura 14) - responsável para que os primers se anelem na região específica no DNA, delimitando o fragmento da região específica no DNA.



Figura 14: Anelamento dos primers

C- Extensão 72°C- (figura 15) - responsável para que ocorra a síntese do DNA, e a enzima Taq polimerase, adicione os nucleotídeos com suas bases complementares, entre os “ primers” que delimitam o início e o final do fragmento.

Usando 30 ciclos a amplificação foi realizada.

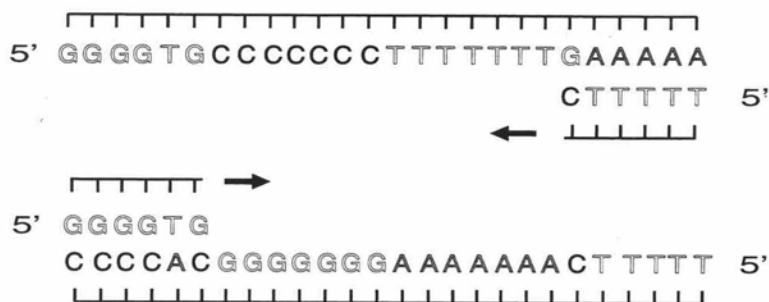


Figura 15: Extensão

Temperatura	Tempo	Função
1- 94°C	2 minutos 10 seg	Desnaturação
2- 59°C	1 minuto	Anelamento
3- 94°C	10 segundos	Desnaturação
4- 59°C	1 minuto	Anelamento
5- 8 vezes o passo 3 e 4		
6- 94°C	10 segundos	Desnaturação
7- 55°C	50 segundos	Anelamento
8- 72°C	30 segundos	Extensão
9 –19 vezes o passo 6 até o 8.		
10- 4°C	24 horas	Refrigeração

No final dos ciclos, os primers estavam prontos para serem aplicados ao gel de agarose à 2% com a adição do brometo de etídio a 0,5%, onde tipificaram-se os alelos de média resolução, DRB1,-DRB3,-B4,-B5 e DQB1.

3.3. ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO

Para determinar se o DNA foi bem amplificado após a reação de PCR, os produtos de amplificação da reação de polimerase em cadeia, eram separados por eletroforese em gel. A preparação do gel era realizada utilizando-se agarose a 2% em Tampão Tris-Borato (Triz-Base- 0,9M, ácido bórico – 0,9M , e Na-EDTA – 0,2M, pH=7,5). A agarose era dissolvida a alta temperatura, entre 90°C e 95°C, em um aparelho de microondas por 2 a 3 minutos, resfriado até 60°C com posterior adição de brometo de etídio a 0,5%, misturada e despejada na placa com pentes, para a formação de poços, e deixada em repouso por 40 a 50 minutos, à temperatura ambiente. Após a retirada dos pentes, o gel era colocado na cuba de eletroforese (Fharmacia-GNA – Suécia), com o nível da solução tampão (Triz-Borato-1X) de 2 a 3 mm acima da superfície do gel. Eram então aplicados os produtos de amplificação padronizados e o controle negativo. A eletroforese era realizada por 20 minutos a 220V. Após esse período, o gel era colocado em um transluminador UV (312nm) e fotografado para documentação e interpretação.

3.3.1. Fotodocumentação e interpretação dos resultados da tipagem por DNA

Muitos alelos HLA não apresentavam uma sequência única de nucleotídeos que caracterizava o alelo específico (figura 16), um erro nas condições ideais de amplificação, poderia resultar em alelos falsos positivos (falsos alelos amplificados) ou falsos negativos (alelos corretos não amplificados).

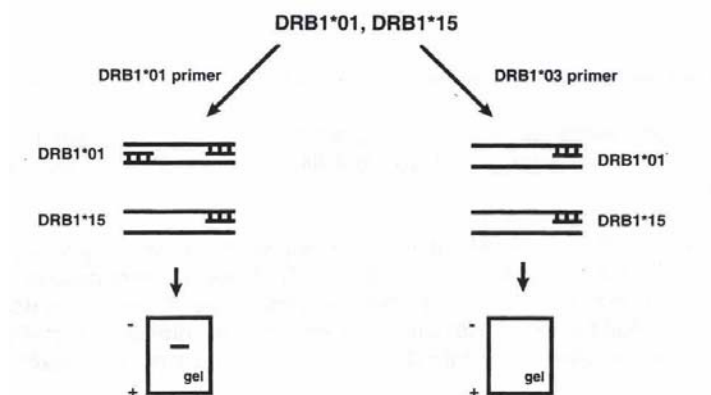


Figura 16: Representação de primer específico

A interpretação era baseada na presença ou ausência de amplificação do próprio alelo ou grupo específico; em cada uma das misturas de iniciadores específicos, continha também um par de iniciadores não alélicos que amplificava o gene da β globina humana, servindo como controle positivo de amplificação. Esse conjunto de “primers” não alélicos era 5 vezes menos concentrado que os “primers” específicos, produzindo um produto de amplificação de 750 pares de bases, sendo visualizadas quando a amplificação grupo-específico não ocorria. A presença de amplificação grupo específico era visualizada no gel pela formação de um produto de cerca de 125 à 250 pares de bases. No poço referente ao controle negativo nenhum desses fragmentos era observado.

1. Fotodocumentação da amplificação dos genes HLA de classe II- HLA-DRB1,-B3,-B4,-B5 e DQB1, por PCR/SSP- média resolução ou genérica de um paciente com leucemia mielóide aguda.

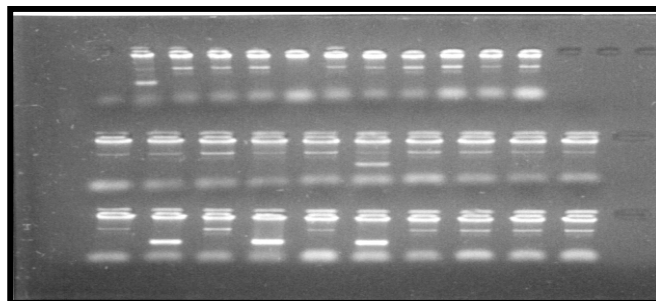


Figura 17: Fotodocumentação da amplificação dos genes HLA de classe II de um paciente de LMA

Tipagem: DRB1*01 DRB1*07

DRB4*

DQB1*02 DQB1*05

2. Fotodocumentação da amplificação dos genes HLA de classe II- HLA-DRB1,-B3,-B4,-B5 e DQB1, por PCR/SSP- média resolução ou genérica de um paciente com leucemia linfóide aguda.

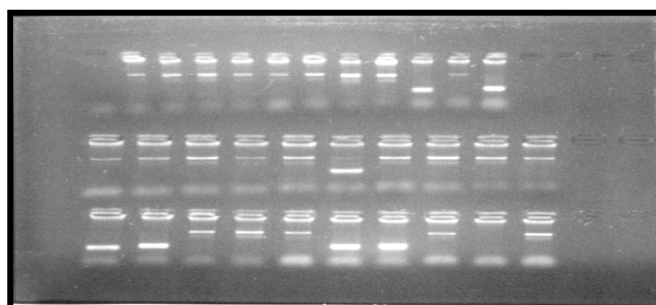


Figura 18: Fotodocumentação da amplificação dos genes HLA de classe II de um paciente de LLA

Tipagem: DRB1*07 DRB1*11

DRB3* DRB4*

DQB1*02 DQB1*03

3.3.2. Associação e definição dos alelos HLA de tipificação por DNA

As tipagens HLA eram determinadas pela comparação dos primers positivos e negativos, utilizando a lista de alelos conhecidos. Os resultados de fotodocumentação eram inseridos em uma planilha, fornecida pela One Lambda – Inc – Ca – EUA, onde estavam definidas as mesmas especificidades contendo “primers”. Através de programa de computador, Software, também fornecido pela One Lambda – Inc -Ca -EUA, era possível realizar a interpretação a fim de definir com exatidão o/os alelos dos pacientes em estudo.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a determinação das frequências alélicas e gênicas dos pacientes e indivíduos controles sadios foi utilizada a contagem direta, de acordo com o método descrito por LAMM & DEGOS, 1979 e SIEGEL, 1979 .

A frequência alélica é dada por:

$$F_a = \frac{na}{n}$$

onde:

F_a =frequência do alelo presente

na =número de indivíduos com o alelo presente

n = número total de indivíduos estudados

A frequência gênica é dada por:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - \frac{na}{n}}$$

onde:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - \underline{F}_a}$$

FG = Frequência gênica

$\underline{F}_a$ = Frequência alélica

A análise estatística de comparação entre as frequências alélicas e gênicas do grupo de pacientes e do grupo controles foi efetuada com o teste do Qui-quadrado χ^2 utilizando a tabela de contingência 2x2” (DYER,P & WARRENS,A, 1994). As frequências das especificidades HLA de Classe II observadas no grupo de pacientes e no grupo de indivíduos controles foram calculadas utilizando-se o teste exato de Fisher bicaudal, quando o menor valor esperado em uma das caselas era inferior a 5. Os valores de probabilidade assim obtidos eram corrigidos ($p_{c}=p$ corrigido), multiplicando-se o p obtido pelo número de especificidades testadas e multiplicando pelo número de comparações realizadas (SVEJGAAR, A. & RYDER, L. P, 1994).

E a significância estatística das diferenças entre os pacientes e grupo de indivíduos controles foi dada quando $p < 0,05$.

O cálculo do Qui-quadrado χ^2 foi calculado, pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{[(a \times d) - (c \times b)]^2 N}{(a+b) (c+d) (a+c) (b+d)}$$

e o cálculo do Qui-quadrado corrigido foi calculado pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{[|(a \times d) - (c \times b)| - 0,5 \times N]^2 N}{(a+b) (c+d) (a+c) (b+d)}$$

Para a associação entre um determinado alelo e a doença, a interpretação estatística é dada pela fórmula:

$$RR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

O risco relativo (RR) maior do que 1 significa uma associação positiva, isto é, quando há presença do alelo, ocorre o aumento do risco da doença. Para um $RR < 1$, significa uma associação negativa, isto é, aqueles que carregam estes genes ou antígenos desenvolvem baixo risco na expressão da doença. O $RR > 3,0$ é altamente significativa.



RESULTADOS

4.1. TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS HLA-DRB1,-DRB3,-DRB4,-DRB5 E-DQB1 EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA E LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA E NOS CONTROLES SADIOS

A análise detalhada do polimorfismo dos alelos HLA de classe II;-DRB1,-DQB1 em pacientes com leucemias agudas e nos controles sadios, está representada nas tabelas 4,5 e 6 (ANEXOS 4, 5 e 6), onde se encontram os resultados das tipificações realizadas. Os alelos HLA-DRB1, -DRB3,-DRB4,-DRB5 e-DQB1 foram determinados em 30 pacientes com leucemia mielóide aguda e 15 pacientes com leucemia linfóide aguda, sendo um total de 27 do sexo masculino e 18 do sexo feminino, com idade entre 15 a 70 anos e em 100 indivíduos utilizados como controles sadios, sendo 65 do sexo masculino e 35 do sexo feminino, com idade entre 19 a 63 anos (média 35,3 anos) (ANEXOS 1, 2 e 3) .

4.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GÊNICAS DETECTADAS POR PCR-SSP EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA, LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA E NOS CONTROLES SADIOS

As frequências alélicas e gênicas detectadas nas duas doenças (LMA e LLA) e no grupo controle avaliado são mostradas nas tabelas I e II. Nas primeiras colunas das tabelas estão descritos os alelos definidos. As frequências alélicas e gênicas estão nas colunas seguindo à direita. Foram definidos nos pacientes de leucemia mielóide aguda, 97 alelos -DRB1, -DRB3,-DRB4,-DRB5 e 53 alelos DQB1 e nos pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA), 49 alelos HLA-DRB1, -DRB3,-DRB4,-DRB5 e 25 alelos DQB1 definidos por PCR/SSP média resolução. Nos controles sadios foram definidos 340 alelos HLA-DRB1, -DRB3,-DRB4,-DRB5 e 183 alelos DQB1.

Para a leucemia mielóide aguda, o alelo HLA-DRB1*07 (43,3%) apresentou um aumento na frequência em relação aos controles sadios (20,0%) e o alelo HLA-DQB1*03 (33,3%) apresentou uma diminuição na frequência quando comparado ao controle (66,6%) (Tabela I).

Para a leucemia linfóide aguda, o alelo HLA-DRB1*03 (40,0%) apresentou um aumento na frequência quando comparado ao grupo controle (13,0%) enquanto que o alelo DQB1*03 (26,7%) apresentou uma diminuição na frequência em relação ao grupo controle (66,6%) (Tabela II).

TABELA I: Distribuição das frequências alélicas e gênicas HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes com LMA e no grupo controle.

Alelos	Pacientes LMA n=30		Controles n=100	
	Frequência alélica	Frequência gênica	Frequência alélica	Frequência gênica
HLA-DRB1				
*01	6 (20,0%)	0,1056	21 (21,0%)	0,1112
*15	6 (20,0%)	0,1056	15 (15,0%)	0,0780
*16	0,0000	0,0000	11 (11,0%)	0,0566
*03	2 (6,7%)	0,0339	13 (13,0%)	0,1938
*04	5 (16,7%)	0,0871	35 (35,0%)	0,1938
*11	6 (20,0%)	0,1056	27 (27,0%)	0,1456
*12	1 (3,3%)	0,0168	3 (3,0%)	0,0151
*13	8 (26,7%)	0,1437	27 (27,0%)	0,1456
*14	2 (6,7%)	0,0339	7 (7,0%)	0,4523
*07	13 (43,3%)	0,2472	20 (20,0%)	0,1056
*08	3 (10,0%)	0,0513	10 (10,0%)	0,0513
*09	0 (0,0%)	0,0000	2 (2,0%)	0,0101
*10	3 (10,0%)	0,0513	2 (2,0%)	0,0101
DRB3*	18 (60,0%)	0,3675	71 (71,0%)	0,4615
DRB4*	18 (60,0%)	0,3675	53 (53,0%)	0,3144
DRB5*	6 (20,0%)	0,1056	26 (26,0%)	0,1398
n° de alelos definidos		97	340	
DQB1*05	11 (36,7%)	0,204	35 (35,0%)	0,1938
DQB1*06	16 (53,3%)	0,3169	35 (35,0%)	0,1938
DQB1*02	14 (46,6%)	0,2697	33 (33,0%)	0,1815
DQB1*03	10 (33,3%)	0,1835	66 (66,0%)	0,4169
DQB1*04	2 (6,7%)	0,0339	14 (14,0%)	0,0726
n° de alelos definidos		53	183	

TABELA II: Distribuição das frequências alélicas e gênicas HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes com LLA e no grupo controle.

Alelos	Pacientes LLA n=30		Controles n=100	
	Frequência alélica	Frequência gênica	Frequência alélica	Frequência gênica
HLA-DRB1				
*01	5 (33,3%)	0,1835	21 (21,0%)	0,1112
*15	0 (0,0%)	0,000	15 (15,0%)	0,0780
*16	1 (6,7%)	0,0339	11 (11,0%)	0,0566
*03	6 (40,0%)	0,2254	13 (13,0%)	0,1938
*04	1 (6,7%)	0,0339	35 (35,0%)	0,1938
*11	3 (20,0%)	0,1056	27 (27,0%)	0,1456
*12	1 (6,7%)	0,0339	3 (3,0%)	0,0151
*13	5 (33,3%)	0,1835	27 (27,0%)	0,1456
*14	0 (0,0%)	0,000	7 (7,0%)	0,4523
*07	4 (26,7%)	0,1437	20 (20,0%)	0,1056
*08	1 (6,7%)	0,0339	10 (10,0%)	0,0513
*09	1 (6,7%)	0,0339	2 (2,0%)	0,0101
*10	1 (6,7%)	0,0339	2 (2,0%)	0,0101
DRB3*	13 (86,7%)	0,6349	71 (71,0%)	0,4615
DRB4*	6 (40,0%)	0,2254	53 (53,0%)	0,3144
DRB5*	1 (6,7%)	0,0339	26 (26,0%)	0,1398
n° de alelos definidos		49	340	
HLA-DQB1				
DQB1*05	7 (46,7%)	0,2697	35 (35,0%)	0,1938
DQB1*06	4 (26,7%)	0,1437	35 (35,0%)	0,1938
DQB1*02	10 (66,7%)	0,4226	33 (33,0%)	0,1815
DQB1*03	4 (26,7%)	0,1437	66 (66,0%)	0,4169
DQB1*04	2 (13,4%)	0,0691	14 (14,0%)	0,0726
n° de alelos definidos		25	183	

4.3. ASSOCIAÇÃO DOS ALELOS HLA-DRB1 E DQB1 EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA E LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA.

As tabelas III e IV mostram a significância estatística da frequência dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 na leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda, respectivamente.

Para a leucemia mielóide aguda, o alelo HLA-DRB1*07 apresentou uma associação positiva (RR= 3,0588) para a doença, com um $\chi^2 = 6,633$ e $p = 0,01$ e o alelo HLA-DQB1*03 apresentou uma associação negativa (RR=0,2576) para a doença com um $\chi^2 = 10,1407$ e $p = 0,0015$ (Tabela III).

Para a leucemia linfóide aguda, o alelo HLA-DRB1*03 (RR=4,4615, $\chi^2 = 6,8943$ e $p = 0,008$) e o alelo HLA-DQB1*02 (RR=4,0606, $\chi^2 = 6,3152$ e $p = 0,01$) apresentaram uma associação positiva para a doença enquanto o alelo HLA-DRB1*04 (RR=0,1327, $\chi^2 = 4,8692$ e $p = 0,02$) e o alelo HLA-DQB1*03 (RR=0,1873, $\chi^2 = 8,4723$ e $p = 0,003$) apresentaram uma associação negativa para a doença (Tabela IV). Foi feito o p corrigido (p_c) para todos os valores de significância.

Nas tabelas VIII (A, e C) e IX (A e B) estão representadas todas as associações positivas e negativas para os alelos na LMA e LLA.

TABELA III: Significância estatística dos alelos HLA-DRB1 a –DRB5 e –DQB1 em pacientes com LMA.

Alelos HLA – DRB1	RR	χ^2	valor de p
*01	0,9405	0,0149	0,9030
*15	1,3600	0,3419	0,5587
*16	0,0000	-	0,0672 ^F
*03	0,4780	-	0,3409 ^F
*04	0,3714	3,6412	0,0564
*11	0,6759	0,5970	0,4397
*12	1,1149	-	1,0000 ^F
*13	1,0300	0,0038	0,9508
*14	0,9490	-	1,0000 ^F
*07	3,0588	6,6333	<u>0,0100</u> ^L
*08	1,0000	-	1,0000 ^F
*09	0,0000	-	1,0000 ^F
*10	5,4444	-	0,0803 ^F
-DRB3*	0,6127	1,2932	0,2555
-DRB4*	1,3302	0,4562	0,4994
-DRB5*	0,6831	0,5805	0,4461
-DQB1			
*05	1,1349	0,0820	0,7746
*06	2,1224	3,2535	0,0713
*02	1,7765	1,8673	0,1718
*03	0,2576	10,1407	<u>0,0015</u> ⁼
*04	0,4388	-	0,2836 ^F
<i>lpc</i> =NS(Não significativa) <i>2pc</i> =0,015		F= Teste exato de Fisher	

TABELA IV: Significância estatística dos alelos HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 e -DQB1 em pacientes com LLA.

Alelos HLA – DRB1	RR	χ^2	valor de p
*01	1,8810	1,1339	0,2869
*15	0,0000	-	0,1077 ^F
*16	0,5779	-	0,6087 ^F
*03	4,4615	6,8943	<u>0,0086</u> ¹
*04	0,1327	4,8692	<u>0,0273</u> ²
*11	0,6759	-	0,5648 ^F
*12	2,3095	-	0,4698 ^F
*13	1,3519	0,2605	0,6098
*14	0,0000	-	0,2903 ^F
*07	1,4545	-	0,5535 ^F
*08	0,6429	-	0,6823 ^F
*09	3,5000	-	0,2903 ^F
*10	3,5000	-	0,2903 ^F
-DRB3*	2,6549	1,6259	0,2023
-DRB4*	0,5912	0,8823	0,3476
-DRB5*	0,2033	-	0,0670 ^F
-DQB1			
*05	1,6250	0,7658	0,3815
*06	0,6753	-	0,5250 ^F
*02	4,0606	6,3152	<u>0,0120</u> ³
*03	0,1873	8,4723	<u>0,0036</u> ⁴
*04	0,9451	-	0,9445 ^F

¹ p c=NS

² p c=NS

³ p c=NS

⁴ p c=0,036

F=Teste exato de Fisher

NS= Não significativa

4.4. ASSOCIAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS HLA-DRB1 E DQB1

A Tabela V mostra a comparação das frequências dos haplótipos HLA-DR/DQ entre os pacientes de leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda com o grupo controle sadio. Para a leucemia mielóide aguda foi encontrado um haplótipo associado positivamente com a doença, o DRB1*07 DQB1*02 (RR= 2,84, p =0,01) (Tabela VI).

Para a leucemia linfóide aguda foi encontrado um haplótipo associado negativamente para a doença, o DRB1*04 DQB1*03 (RR= 0,000, $p=0,01$)(Tabela VII).

Nas tabelas VIII (B) e IX (C) estão representadas as associações positivas para os haplótipos na LMA e LLA.

TABELA V: Frequências dos haplótipos HLA-DRB1 e-DQB1 em pacientes com LMA e LLA.

HAPLÓTIPOS		PACIENTES LMA		CONTROLES LLA
DRB1*01	DQB1*05	6 (20,0%)	5 (33,%)	20 (20,0%)
DRB1*15	DQB1*02	0	0	0
DRB1*15	DQB1*05	1 (3,4%)	0	0
DRB1*15	DQB1*06	5 (16,7%)	0	15 (15,0%)
DRB1*16	DQB1*03	0	0	3 (3,0%)
DRB1*16	DQB1*05	0	1 (6,7%)	8 (8,0%)
DRB1*03	DQB1*02	2 (6,7%)	5 (33,4%)	13 (13,0%)
DRB1*03	DQB1*04	0	0	0
DRB1*04	DQB1*02	0	0	1 (1,0%)
DRB1*04	DQB1*03	5 (16,7%)	0	28 (28,0%)
DRB1*04	DQB1*04	0	1 (6,7%)	6 (6,0%)
DRB1*11	DQB1*03	3 (10,0%)	3 (20,0%)	26 (26,0%)
DRB1*11	DQB1*05	0	0	0
DRB1*11	DQB1*06	2 (6,7%)	0	1 (1,0%)
DRB1*12	DQB1*03	0	0	1 (1,0%)
DRB1*13	DQB1*02	0	0	0
DRB1*13	DQB1*03	0	1 (6,7%)	2 (2,0%)
DRB1*13	DQB1*05	0	0	1 (1,0%)
DRB1*13	DQB1*06	8 (26,7%)	4 (26,7%)	21 (21,0%)
DRB1*14	DQB1*03	0	0	2 (2,0%)
DRB1*14	DQB1*05	1 (3,4%)	0	5 (5,0%)
DRB1*07	DQB1*02	12 (40,0%)	3 (20,0%)	19 (19,0%)
DRB1*07	DQB1*03	1 (3,4%)	0	1 (1,0%)
DRB1*08	DQB1*03	1 (3,4%)	0	1 (1,0%)
DRB1*08	DQB1*04	2 (6,7%)	1 (6,7%)	9 (9,0%)
DRB1*09	DQB1*02	0	1 (6,7%)	1 (1,0%)
DRB1*09	DQB1*03	0	0	1 (1,0%)
DRB1*10	DQB1*05	3 (10,0%)	1 (6,7%)	2 (2,0%)

TABELA VI: Valores de significância do RR, χ^2 e p dos haplótipos em pacientes com LMA.

HAPLÓTIPOS		RR	χ^2	p
DRB1*01	DQB1*05	1,0000	0,0000	1,0000
DRB1*15	DQB1*05	0,0000	-	0,0668 ^F
DRB1*15	DQB1*06	1,13333	0,0492	0,8244
DRB1*16	DQB1*03	0,0000	-	0,3371 ^F
DRB1*16	DQB1*05	0,0000	-	0,1098 ^F
DRB1*03	DQB1*02	0,4780	-	0,3409 ^F
DRB1*04	DQB1*02	0,0000	-	0,5824 ^F
DRB1*04	DQB1*03	0,5143	1,5649	0,2109
DRB1*04	DQB1*04	0,0000	-	0,1695
DRB1*11	DQB1*03	0,3162	-	0,0649 ^F
DRB1*11	DQB1*06	7,0714	-	0,0698 ^F
DRB1*12	DQB1*03	0,0000	-	0,5824 ^F
DRB1*13	DQB1*03	0,0000	-	0,4350 ^F
DRB1*13	DQB1*05	0,0000	-	0,5824 ^F
DRB1*13	DQB1*06	1,3680	0,4276	0,5132
DRB1*14	DQB1*03	0,0000	-	0,4350 ^F
DRB1*14	DQB1*05	0,6552	-	0,7028 ^F
DRB1*07	DQB1*02	2,8421	5,6041	0,0179
DRB1*07	DQB1*03	3,4138	-	0,3624 ^F
DRB1*08	DQB1*03	3,4138	-	0,3624 ^F
DRB1*08	DQB1*04	0,7222	-	0,6871 ^F
DRB1*09	DQB1*02	0,0000	-	0,5824 ^F
DRB1*09	DQB1*03	0,0000	-	0,5824 ^F
DRB1*10	DQB1*05	5,4444	-	0,0803 ^F

F= Teste exato de Fisher

TABELA VII: Valores de significância do RR, χ^2 e p dos haplótipos em pacientes com LLA.

HAPLÓTIPOS		RR	χ^2	p
DRB1*01	DQB1*05	2,0000	1,3630	0,2430 ^F
DRB1*15	DQB1*06	0,0000	-	0,1077 ^F
DRB1*16	DQB1*03	0,0000	-	0,4967 ^F
DRB1*16	DQB1*05	0,8214	-	0,8577 ^F
DRB1*03	DQB1*02	3,3462	2,6897	0,1010 [*]
DRB1*04	DQB1*02	0,0000	-	0,6973 ^F
DRB1*04	DQB1*03	0,0000	5,5517	<u>0,0185</u>
DRB1*04	DQB1*04	1,1190	-	0,9198 ^F
DRB1*11	DQB1*03	0,7115	-	0,6178 ^F
DRB1*11	DQB1*06	0,0000	-	0,6973 ^F
DRB1*12	DQB1*03	0,0000	-	0,6973 ^F
DRB1*13	DQB1*03	3,5000	-	0,2903 ^F
DRB1*13	DQB1*05	0,0000	-	0,6973 ^F
DRB1*13	DQB1*06	1,3680	-	0,6198 ^F
DRB1*14	DQB1*03	0,0000	-	0,5806 ^F
DRB1*14	DQB1*05	0,0000	-	0,3759 ^F
DRB1*07	DQB1*02	1,0658	-	0,9268 ^F
DRB1*07	DQB1*03	0,0000	-	0,6973 ^F
DRB1*08	DQB1*03	0,0000	-	0,6973 ^F
DRB1*08	DQB1*04	0,7222	-	0,7649 ^F
DRB1*09	DQB1*02	7,0714	-	0,1175 ^F
DRB1*09	DQB1*03	0,0000	-	0,6973 ^F
DRB1*10	DQB1*05	3,5000	-	0,2903 ^F

*= Qui-quadrado corrigido

F= Teste exato de Fisher

TABELA VIII: Associações positivas observadas para os alelos e haplótipos HLA-DRB1.-DQB1 detectados por SSP nos pacientes com LMA e LLA.

A) Associação positiva com o alelo HLA-DRB1 para a LMA

HLA-	RR	χ^2	Valor de <i>p</i>
-DRB1*07	3,0588	6,633	0,01 ¹
1 <i>pc</i> = 0,26			

B) Associação positiva com o haplótipo na LMA

Haplótipo	RR	χ^2	Valor de <i>p</i>
DRB1*07 DQB1*02	2,8421	5,60	0,0179

C) Associações positivas com os alelos HLA-DRB1 e DQB1 na LLA

HLA	RR	χ^2	Valor de <i>p</i>
-DRB1*03	4,4615	6,8943	0,008 ¹
-DQB1*02	4,0606	6,3152	0,0120 ²
1 <i>pc</i> =NS 2 <i>pc</i> =NS NS=Não significante			

TABELA IX: Associações negativas observadas para os alelos e haplótipos HLA-DRB. – DQB1 detectados por SSP nos pacientes com LMA e LLA.

A) Associação negativa com o alelo HLA-DQB1 na LMA

HLA-DQB1	RR	χ^2	valor de p
*03	0,2576	10,1407	0,0015 ¹

¹ $p<0,015$

B) Associações negativas com os alelos HLA-DRB1 e DQB1 na LLA

HLA	RR	χ^2	valor de p
-DRB1*04	0,1327	4,8692	0,0273 ¹
-DQB1*03	0,003	8,4723	0,003 ²

C) Associação negativa do haplótipo na LLA

Haplótipo	RR	χ^2	valor de p
DRB1*04 DQB1*03	0,0000	5,5517	0,0185



DISCUSSÃO

5.1. ALELOS HLA-DRB1/DQB1 EM CONTROLES SADIOS

Os estudos relacionados ao polimorfismo e à distribuição dos genes HLA clássicos vem sendo estabelecido ao longo do tempo, através de dados avaliados em numerosas populações humanas (TRACHTENBERG et al., IMANISHI et al., 1991; MIDDLETON et al., 2000; MARTINEZ-LASO et al., 2001). Esses conhecimentos referem-se às variações e às frequências dos genótipos HLA nos distintos grupos étnicos, formadores das populações humanas em diferentes regiões geográficas, e são fatores importantes para o entendimento dos eventos biológicos e genéticos dessas populações, como exemplo a recombinação, mutação e conversão gênica dos genes HLA (DEGLI-ESPOTI et al., 1992). O Sistema HLA representa a mais importante ferramenta para o estudo da origem dos grupos humanos, resultando em múltiplas aplicações, para a investigação de uma série de questões relacionadas à biologia molecular, imunogenética, susceptibilidade à doenças e variabilidade populacional, e nesse contexto podemos citar as frequências alélicas características de uma população as quais, se perpetuaram no tempo, independente das migrações (BOODMER, 1972; MARSH et al., 2000).

A atual população brasileira é constituída, na sua grande maioria, por indivíduos descendentes de: índios americanos-ameríndios (GUERRA et al., 1992; BELICH et al., 1992; PETZL-ERLER et al., 1993), de imigrantes oriundos dos países da Europa, mais especificamente da Espanha, Portugal, Itália e Alemanha (MORAES et al., 1993; MORAES et al., 1996) da África (MIGOT-NABIAS et al., 1999; ALVES-SILVA et al., 2000) e dos países orientais (BRAUN-PRADO et al., 2000).

Essa investigação do polimorfismo HLA de classe II na população de Campinas é continuidade de um primeiro estudo com o objetivo de analisar os genes HLA, o sistema genético e os marcadores por DNA na referida população dessa utilizando-se de métodos de tipificação HLA por biologia molecular DNA-PCR/SSP (THOMAZ et al., 1998). A fim de realizar uma análise mais detalhada dos alelos HLA de classe II-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 e -DQB1 e ampliar o número de amostras dos indivíduos controle da mesma população de Campinas, foram examinadas nesta pesquisa, duas populações humanas: uma constituída de 100 indivíduos controle sadios provenientes da região de Campinas; e uma constituída de 45 indivíduos portadores de leucemias agudas.

Na análise da população controle, foram encontrados muitos alelos e grupos de alelos predominantemente presentes entre populações européias e africanas, por exemplo: HLA-DRB1*03- no estudo 13%, nos africanos 13,99% e nos europeus 11,11%, DRB1*09 no estudo 2%, nos africanos 1,96% e nos europeus 1,36% (IMANISHI et al., 1991). Independente dessa tendência esperada, os resultados claramente revelam a alta diversidade e a mistura étnica desta população uma vez que, os alelos de classe II- HLA-DR e DQ, mais característicos entre os ameríndios vivendo no Brasil e populações orientais (LAYRISSE et al.,1988) foram encontrados em porcentagens elevadas no grupo de Brasileiros Caucásóides pesquisados, tanto para HLA-DRB1 como DRB4 . Os alelos observados em maior frequência para estes dois grupos: DRB1*04 e DQB1*03 são encontrados em frequência elevada nos Ameríndios – 40% e 66%, respectivamente, também estavam significativamente elevados neste estudo- (35,0% e 66,0%) respectivamente .

Além disso, foram encontrados em frequência elevada, certos alelos comuns em Orientais: -DRB1*15 (15%) na população estudada e (14,35%) na população de orientais; DRB1*08 (10%) na população estudada e (6,49%) nos orientais; DRB1*14 (7%) na população estudada e (7,69%) em orientais; DQB1*06 (39%) na população estudada e (39,47%) em orientais, e DQB1*05 – (36%) na população estudada e (36,29%) na população de orientais (MARSH et al, 2000).

A alta variabilidade observada na população de estudo , conseqüente da grande heterogeneidade de origens, dos indivíduos e das misturas entre indivíduos de etnias diferentes, resultou em dificuldades adicionais para a perfeita caracterização do polimorfismo HLA. Este fato reforça a necessidade de métodos de tipificação de alta resolução para discernir as especificidades individuais, isso porque a distribuição dos alelos de classe II em nossa população mostrou uma clara divisão entre outras populações caucásóides homogêneas e documentadas na literatura (IMANISHI et al.,1991; MIDDLETON et al.,2000). Nossos resultados revelam associações particulares entre os alelos HLA-DRB e DQB1, na composição de vários haplótipos encontrados, e estão em concordância com a amostra de indivíduos controle, anteriormente avaliada (THOMAZ et al., 1998), bem como de outras populações Caucásóides Brasileiras (BRAUN-PRADO

et al., 2000). Esses achados apresentam uma associação significativa quando comparadas às frequências de outras populações caucasóides (MIDDLETON et al., 2000; BRAUN-PRADO et al., 2000; IMANISH et al., 1991; LOUZADA-JUNIOR et al., 2001). E a identificação de alelos e haplótipos, previamente não relacionados em uma área geográfica bem definida pode refletir a transmissão desse alelo de uma população ancestral (AYLA, 1995; ALVES-SILVA et al., 2000), onde as características da população possivelmente refletem especificidades biológicas e genéticas importantes em estudos presentes e futuros de doadores associados aos genes HLA nessa população.

Os alelos HLA são amplamente conhecidos pela sua associação, com uma série de doenças de patogênese complexa (MC DEVITT & BODMER, 1972; PARK et al., 1998; CABALLERO et al., 1999; KRAEMER et al., 2000; GLADMAN et al., 2001; MACIEL et al., 2001) sendo a susceptibilidade, para muitas dessas condições multifatorial e oligo ou poligênica (SVEJGAARD & RYDER, 1994). A contribuição relativa de cada fator para patogênese de uma certa doença pode diferir entre populações, dependendo das frequências características, para os alelos HLA e a interação com outros fatores (PETZL-ERLER et al., 1999).

O conhecimento do padrão de polimorfismo e do desequilíbrio de ligação, nos diferentes grupos humanos, contribui para a interpretação de suas doenças específicas associadas aos alelos HLA ao nível de população e de espécie (DE PABLEO et al., 1997; MARSH et al., 2000).

5.2. ALELOS HLA DE CLASSE II – DRB1/B3/B4/B5 E- DQB1 NA LEUCEMIA AGUDA

Esta pesquisa estudou as associações dos alelos HLA-DRB1/B3/B4/B5 e HLA-DQB1 em 30 pacientes com LMA, 15 pacientes com LLA e 100 indivíduos sadios como controle, utilizando as técnicas de tipificação HLA por DNA/PCR/SSP. Os resultados revelaram associações significantes, de aumento ou diminuição nas frequências alélicas e haplotípicas nos pacientes quando comparado com a população de indivíduos controle sadio.

Em um trabalho, anteriormente realizado em nosso laboratório, foram avaliados, utilizando-se métodos clássicos de tipificação sorológica, 3 grupos de pacientes com LMA, LLA e anemia aplástica e os respectivos irmãos não afetados; a fim de estudar os antígenos HLA de classe I-HLA-A,-B,-Cw e II-HLA-DR,-DQ nessas doenças. Foram estudados um total de 186 indivíduos de 230 famílias recrutados de dois centros clínicos brasileiros (Campinas e Ribeirão Preto), e cada família tendo pelo menos um indivíduo doente. Os resultados mostraram que em 61 pacientes de LLA e 72 pacientes de LMA, foi constatada uma forte e significativa associação dos antígenos HLA-DR5 ($p < 0,001$, $RR=11,5$) e HLA- DR7 ($p < 0,001$, $RR= 6,7$) e os antígenos DR53 e DR52 ($p < 0,001$, $RR=0,1$ e $p < 0,001$, $RR=0,04$) (SELL et al.,1997).

Desde a demonstração de que o Complexo Principal de Histocompatibilidade influenciava o desenvolvimento das leucemias em camundongos, um grande número de estudos vem investigando as associações dos genes HLA associadas às leucemias agudas.

Os estudos iniciais sobre o sistema HLA e associação dos antígenos e alelos com as doenças se concentraram nas leucemias devido a descoberta da primeira associação com os genes do MHC e a leucemia no camundongo, em 1964 (LILLY et al., 1964).

O primeiro estudo de associação entre HLA e leucemias humanas foi efetuado na LLA com os antígenos de classe I-HLA-A,-B,-Cw, verificando um aumento na frequência do antígeno HLA-A2 (KOURILSKY et al.,1967). A associação deste antígeno nas leucemias é uma das poucas associações observadas em muitos estudos iniciais e confirmadas em outros estudos posteriores (ROGENTINE et al.,1973; ALBERT et al.,1977; TIWARI & TERASAKI, 1985).

Outras associações foram relacionadas aos alelos de classe I –HLA-A, -B,-Cw e embora esses primeiros trabalhos, não tenham documentado associações significantes com as leucemias (OLIVER et al.,1977; von FLIEDNER et al., 1980) , D'Amaro e colaboradores reportaram uma forte e consistente associação no alelo HLA-Cw4 e o desenvolvimento da LMA (D'AMARO et al, 1984); mais recentemente foi demonstrado risco relativo mais elevado dos antígenos HLA-B13 e HLA-Cw4 em pacientes com LLA, LMA e leucemia mielóide crônica, quando comparada ao grupo de indivíduos controle

sadios, sugerindo que o antígeno HLA-B13 e HLA-Cw4 podem ser considerados genes associados ‘a susceptibilidade no desenvolvimento da doença (JOVENTINO et al.,1995; BOLOGNESI et al.,2000).

Outros trabalhos investigando as associações HLA e as leucemias agudas incluíram a análise dos antígenos ou genes de classe II- HLA-DR,-DQ (DORAK et al.,1995; VON FLIEDNER et al., 1983; KNOWLES et al.,1986; SEREMETIS et al.,1985;DORAK et al.,1996; de MOERLOOSE et al., 1977; DEARDEN et al., 1996; DORAK et al., 1999). Os primeiros trabalhos envolvendo os genes de classe II-HLA-DR mostraram algumas associações significantes (DE MOERLOOSE et al., 1977; CASPER et al., 1980; NAVARRETE et al., 1986; DYER et al., 1986; SEREMETIS et al., 1985; DORAK et al., 1994; DORAK et al., 1996; DORAK et al., 1999), evidenciando claramente, na região HLA-DR, marcadores de susceptibilidade para as leucemias agudas, essas investigações documentaram uma série de dados importantes, relacionados aos antígenos e alelos de classe II-HLA-DR e HLA-DQ, associados a essas doenças. Muitas questões foram levantadas, porém até o presente, são poucos e esparsos, os resultados mais consistentes (DORAK et al., 1999).

Embora esses primeiros estudos tenham mostrado associações fortes com os antígenos HLA, em sua grande maioria esses achados não foram confirmados posteriormente,(DE MOERLOOSE et al., 1977; CASPER et al., 1980; NAVARRETE et al., 1986; DYER et al., 1986), e um grande número de investigações, (MICHEL et al., 1981; DE JONGH et al., 1982; CHAN et al.,1982; DE MOOR et al.,1985; CARPENTIER et al.,1987; CARUSO et al., 1987; BORTIN et al., 1987; LINET et al., 1988; MULLER et al., 1988; DORAK et al., 1994; DEARDEN et al.,1996; DORAK et al., 1999).) continuam sendo feitas, uma vez que vêm sendo referidas na literatura especializada.

Associações significantes têm sido descritas nos diferentes tipos de leucemias humanas e essas associações se localizam em mais de um locos, sugerindo uma associação de haplótipos, ou existência de muitos locos de susceptibilidade (CHAN et al., 1982) e independente das associações HLA foi observado um padrão peculiar de transmissão desses haplótipos (DORAK et al., 1992) : a) em famílias leucêmicas foi constatado um aumento na frequência de irmãos HLA idênticos (CHAN et al.,1982; DE MOOR et al.,1985;

CARPENTIER et al.,1987; DORAK et al., 1994), b) um aumento da homozigose dos alelos HLA-DR em pacientes com leucemia (CARPENTIER et al.,1987; VON FLIEDNER et al., 1983), sendo observados entre os pais, uma distorção genética favorecendo a homozigose HLA nos filhos afetados (DORAK et al., 1992). Uma característica importante, ainda refere-se à distribuição dos alelos HLA-DR compartilhados pelos pais o que, marcadamente determina a identidade HLA-DR do paciente com sua mãe quando comparado com o pai (CHAN et al.,1982). Este evento aparentemente só ocorre se o haplótipo compartilhado pelos pais e associados à doença tenha uma alta frequência de transmissão concernente ao seu haplótipo homólogo (DORAK et al., 1992). Essas idéias foram usadas por DORAK como um dos elementos relevantes nos estudos relacionados ao haplótipo, homozigose e mutações nos mecanismos associados à susceptibilidade às leucemias (DORAK et al., 1999).

5.3. ASSOCIAÇÃO POSITIVA DE ALELOS E HAPLÓTIPOS HLA-DRB1 E HLA-DQB1

Neste estudo foram definidos: 1 alelo HLA-DRB1 em associação positiva nos pacientes com LMA e 1 alelo –DQB1 em associação positiva com LLA.

Entre os alelos HLA-DRB1, o alelo HLA- DRB1*07 estava significativamente associado à LMA ($p<0,01$, $\chi^2=6,633$ e $RR= 3,05$). Entre os alelos HLA- DRB1 e HLA-DQB1, o alelo DRB1*03 ($p<0,008$, $\chi^2=6,89$ e $RR= 4,46$) e HLA- DQB1*02 ($p<0,01$, $\chi^2=6,633$ e $RR= 3,05$) estavam significativamente associados na LLA.

5.4. FREQUÊNCIA DIMINUÍDA DOS ALELOS E HAPLÓTIPOS HLA-DRB1/DQB1

O alelos DQBB1*03 ($p<0,001$, $\chi^2 =10,14$ e $RR=0,25$) na LMA e o alelo DRB1*04 e DQB1*03 ($p<0,02$, $\chi^2 =4,86$ e $RR=0,13$) na LLA e o haplótipo DRB1*04 e DQB1*03 ($p<0,01$, $\chi^2 =5,55$ e $RR=0,00$) na LLA, revelaram uma frequência diminuída, estatisticamente significantes, e o risco relativo $RR=0,00$ mostraram ter um efeito protetor nos pacientes analisados.

5.5. ASSOCIAÇÕES DE ALELOS HLA-DRB1 E HLA-DQB1

A importância fundamental deste estudo foi a possibilidade confirmar resultados anteriormente divulgados na literatura (SELL et al., 1997) e, cujos dados referem-se às associações mais significantes observadas nas leucemias agudas principalmente as associações com os antígenos HLA-DR7, HLA-DR53. Nessa investigação empregando métodos mais precisos de biologia molecular foi possível caracterizar os alelos HLA de classe II-DRB1/B3/B4/B5 e HLA-DQB1 de forma mais precisa e definir associações alélicas e haplotípicas altamente significantes, as quais vieram confirmar nossos dados anteriores, como também evidenciar novas e significantes associações.

Nossos achados na presente pesquisa possuem um forte suporte na literatura. O primeiro estudo de associação dos alelos HLA com LLA em crianças mostrou um aumento na frequência do antígeno HLA-DR7 (DE MOERLOOSE et al., 1977); trabalho similar realizado na Rússia, documentou uma frequência para o antígeno HLA-DR7 com a LLA em pacientes não relacionados (TIMONOVA et al., 1989). Estes resultados confirmam nossos achados para o antígeno HLA-DR7, cuja frequência esteve significativamente aumentada, neste estudo. Um estudo realizado por Von Fliedner et al, (VON FLIEDNER et al., 1983) mostra uma associação do antígeno HLA-DR7 e LLA em crianças e um aumento na frequência da homozigose relacionado ao antígeno HLA-DR7 (VON FLIEDNER et al., 1980).

O nosso trabalho documenta igualmente 2 pacientes com uma provável homozigose para o alelo HLA-DRB1*07, este fato está de acordo com os trabalhos de (CARPENTIER et al.,1987; VON FLIEDNER et al., 1983), relatando um aumento da homozigose , principalmente para os genes HLA-DR nas leucemias. A associação com o alelo HLA-DRB1*07, significativamente associado à LMA foi observado também em carcinoma de tireóide (RR=20,3) (DORAK et al., 1994; COLLINS et al., 1985).

Associações significantes de antígenos de classe II associados à leucemia em adultos foram relatadas para o antígeno HLA-DQ3 (UNO et al.,1988) . Igualmente trabalhos de DORAK et al., mostraram uma associação consistente com o alelo HLA-

DQB1*03 foi encontrado na literatura, com alto risco à susceptibilidade nas leucemias agudas (ZIJLSTRA et al., 1986; XU et al., 1993). Estes dados contrastam com nossos resultados para o alelo HLA-DQB1*03 com frequência diminuída associado à proteção a LLA.

Os resultados mais convincentes sobre a relevância do alelo HLA-DRB4/DR53 como fator de risco para as leucemias foi mostrado por SEREMETIS et al., (1982), esses pesquisadores usaram um anticorpo específico para uma região hipervariável do epítipo-região 3-(HVR3) da molécula HLA-DRB3 e encontraram uma associação extremamente forte dessa molécula com a LMA, com $RR = 7,8$ $p < 0,000005$). Posteriormente uma série de estudos moleculares para avaliação do loco HLA-DRB4* na LLA documentaram uma frequência diminuída nos pacientes, bem como excesso de homozigotes para o alelo HLA-DRB4*01 (DORAK et al., 1994; DORAK et al., 1996; DORAK et al., 1999). Mais recentemente um estudo envolvendo um grande número de pacientes com leucemia linfóide aguda crônica mostrou uma significativa diminuição da frequência do alelo HLA-DRB4*01 nos pacientes quando comparados aos indivíduos controle sadios da população, determinam um efeito protetor nos pacientes (POSTHUMA, 2000) . Esses dados são importantes e estão em concordância com nossos achados.

Neste trabalho foram encontrados 2 haplótipos, respectivamente HLA-DRB1*07, DQB1*02 na LMA e HLA-DRB1*03, DQB1*02 na LLA, ambos com significativa associação positiva sugerindo susceptibilidade à doença. E um haplótipo HLA-DRB1*04 DQB1*03 na LLA com associação negativa, indicando proteção à doença. Associações semelhantes as nossas relacionadas aos haplótipos HLA-DRB1 e DQB1 não foram encontradas na literatura. Apenas um estudo divulgado por TAYLOR et al., 1998, mostrou uma associação dos alelos DQA1*0101 e DQB1*0501 associada a susceptibilidade a LLA em crianças. Uma das hipóteses destes achados pode estar relacionadas à um aumento de frequência de recombinação na região HLA em família de leucêmicos, uma vez que o nível de homozigose observado nos pacientes estudados foi alto tanto entre os pacientes com LMA , como nos pacientes com LLA .

Foi constatada uma grande quantidade de “possíveis “ homozigoses nos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1. Foram observados na LMA: 5 homozigoses no alelo HLA-DRB1 e 7 no alelo DQB1, num total de 12 homozigoses e na LLA: 2 homozigoses no alelo DRB1 e 4 homozigoses no alelo DQB1. Esses dados podem ser interpretados como um possível mecanismo de associação nas leucemias agudas.

Esses nossos achados podem estar associados a etiologia da leucemia aguda, porém estes dados devem ser confirmados em futuros estudos por nós desenvolvidos com aumento da casuística, e por outros estudos controlados.



CONCLUSÕES

Esta pesquisa nos permite concluir que a atual população branca de Campinas - Sudeste do Brasil é constituída por uma mistura de alelos mais freqüentes em Ameríndios (Índios americanos), Caucasóides Europeus, Africanos e Orientais, podendo ser classificada como Caucasóide Miscigenada.

Na população de pacientes com leucemias agudas foi possível definir uma maior frequência do haplótipo HLA-DRB1*07 DQB1*02 e menor frequência do haplótipo HLA-DRB1*04 DQB1*03 em relação aos controles. Estes resultados indicam uma possível associação com a etiologia das doenças.

Para as demais associações observadas com os alelos HLA-DRB1*07, -DQB1*03 na LMA e HLA-DRB1*03, -DRB1*04, -DQB1*02 e -DQB1*03 na LLA, foi possível constatar significância. Estudos futuros serão necessários para confirmar esses achados, com aumento da casuística e outros estudos controlados.



SUMMARY

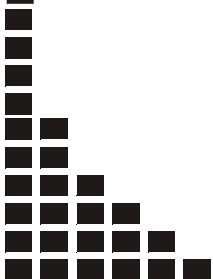
In this study, we analyzed 100 healthy control individuals, 30 individuals with acute myeloid leukemia (AML), and 15 individuals with acute lymphoid leukemia (ALL) from the population of Campinas, a city in the southeast of Brazil.

Typification of class II HLA alleles (HLA-DRB1-5 e DQB1) was carried out using the DNA/PCR/SSP molecular method at medium resolution. DNA was extracted through a salting-out procedure of peripheral blood of each individual participating in the research. 13 alleles DRB1, 1 allele DRB3, 1 allele DRB4, 1 allele DRB5, and 5 alleles DQB1 were quantified for a medium or generic resolution using the PCR/SSP technique for primers of "One Lambda".

The result showed a positive association – suggesting susceptibility to AML and ALL – for patients present the HLA-DRB1*07 allele ($p=0,01$, $\chi^2= 6,63$ RR= 3,05) and the HLA-DRB1*07/ DQB1*02 haplotype ($p=0,01$, $\chi^2= 5,60$, RR= 2,84) regarding AML. For ALL a positive association was found for the HLA-DRB1*03 ($p=0,008$, $\chi^2=6,8943$, RR=4,4615) and HLA-DQB1*02 alleles ($p=0,01$, $\chi^2=6,31$, RR=4,06) .

Negative associations were found for the HLA-DQB1*03 allele ($p=0,0015$, $\chi^2=10,14$, RR=0,25) for both AML and ALL, and for HLA-DRB1*04 ($p=0,02$, $\chi^2=4,86$, RR=0,13) and DQB1*03 alleles ($p=0,003$, $\chi^2=8,47$, RR=0,00), as well as the HLA-DRB1*04/DQB1*03 haplotype ($p=0,01$, $\chi^2=5,55$, RR=0,00).

Results allow us to define the control population as Miscellaneous Caucasoid and suggest a possible association of Class II-HLA-DRB1 and DQB1 alleles in the etiology of acute leukemia. However, data have to be confirmed in future studies with an increased number of cases and through other controlled studies.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ALBERT ED, NISPEROS, B.; THOMAS, ED. HLA antigens and haplotypes in acute leukemia. *Leukemia Research* 1:261-269, 1977.
- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am. J. Human. Genet.* 67:444-461, 2000.
- AMAR, A; KWIN, O. J; MOTRO, U., WITT, C.S.; BONNE-TAMIR, B.; GABILSON, R; BROUTBAR, C. Molecular Analysis of HLA class II Polymorphism among Different Ethnic Groups in Israel. *Human Immunology* 60: 723-730, 1999.
- AMIEL, J.L. Study of the leukocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: *Histocompatibility Testing* ,(ed.by E.S.Curtoni, P.L.Mattiuz & R.M. Tosi).p. 79-81, Munksgaard, Copenhagen, 1967.
- ANDERSON, G.; LARHAMMAR, D.; WIDMARK. Class II genes of the Human Major Histocompatibility Complex. Organization and evolutionary relationship of the DR-beta genes. *J Biol* 262: 8748-8758, 1987.
- ARICO, M. VALSECCHI M.G, CAMITTA B, SCHRAPPE M, CHESSLLS J, BARUCHEL A, GAYNON P, SILVERMAN L, JANKA-SCHAUB G, KAMPS W, PUI CH, MASERA G, CONTER V, RIEHM H, HEREMA N, SALLAN S, AUCLERC M.F, PULLEN J, SHUSTER J, CARROL A, RAIMOND S, RICHARDS S. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive Acute Lymphoblastic leukemia. *Engl J Med* 6 : 342(14):998-1006, 2000.
- AYLA, F.J. The myth of Eve: molecular biology and human origins. *Science* 270: 1930-1936, 1995.
- BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D.E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6259-6263, 1994.
- BAIN, B, CATOVSKY D. Current concerns in haematology, 2: classification of acute leukemia. *J.Clin. Pathol.* 43:882-887, 1990.

- BATCHELOR, J.R.; EDWARDS, J.H. & STUART, J. Histocompatibility and acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, **i**, 699, 1971
- BELICH, M.P., MADRIGAL, J.A., HILDEBRAND, W.H., ZEMMOUR, J., WILLIAMS, R.C., LUZ, R., PETZL-ERLER, M.L., PARHAM, P. Unusual HLA-B alleles in two tribes of brazilian Indians. *Nature* **357**: 326-329, 1992.
- BENJAMIN, R. & PARHAM, P. Guilt by association: HLA B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* **11**: 137-142, 1990.,
- BENNET, J.M.CATOVSKY, M.T. DANIEL, D.A. FLANDREN, H.R. GALTON, H.D. GRALNICK, and C.SULTAN. Proposals for the classification of acute leukemia. *Br.J.Haematol.* **33**: 451-458, 1976.
- BERNSTEIN, I., R. ANDREWS, S. COHEN, AND B.MCMASTER. normal and malignant human myelocit and monocytic cells identified by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **128**:876-881, 1982.
- BILLING, R.,R. RAFIZADEH, I. DREW, G. HARTMAN, R. GALE and P. TERASAKI. Human B lymphocyte antigens expressed by lymphocyte and myelocytic leukemia cells I. Detection by rabbit antisera. *J.Exp.Med* **144**: 167-178,1976.
- BJORKMAN, P.J.& PARHAM, P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecule. *Annual review of Biochemistry* **59**: 253-288, 1990.
- BJORKMAN, P.J.; SAPER,M.; SAMRAOUI,B. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* **329**: 506-512, 1987.
- BLOMFIELD, C.D.; DE LA CHAPELLE, A. Chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia. Clinical and biologic significance. *Semin.Oncol.* **14**:372-383, 1987.
- BODMER, W. Evolution Significance of the HLA System. *Nature* **309**: 425-430, 1972.
- BODMER, W.F.; ALBERT, E.; BODMER, J.G.; DAUSSET, J.; KISS-MEYER-NIELSEN, F.; MAYR, W.; PAYNE, R.; VAN ROOD, J.J.; WALFORD, R.L. Nomenclature of factors of the HLA System. *Hum Immunol.* **11**:117-125, 1984.

- BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROT, R.E.; CHARRON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; FAUCHET, R.; MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.T.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* **49**: 297-321, 1997.
- BOICE JDJ, inskip PD. Radiation-induced leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. Leukemia, 6 th ed. Philadelphia: **WB Saunders** 195-209, 1996.
- BORTIN, M.M.; D'AMARO, J.; BACH, F.H.; RIMM, A.A.; van ROOD, J.J. HLA associations with leukemia. *Blood* **70**:227-232, 1987.
- BRADSTOCK, K.F. The diagnostic and prognostic value of immunophenotyping in acute leukemia. *Pathology* **25**:367-374, 1993.
- BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A.L.; FARAH PEREIRA, N.; CULPI, L.; PETZLER, M.L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* **56**: 417-427, 2000.
- CABALLERO, A.; ALVÉS-LEÓN, S.; PAPAIS-ALVARENGA, R.; FERNÁNDEZ, O.; NAVARRO, G.; ALONSO, A. DQB1*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens* **54**: 524-526, 1999.
- CAMPBELL, R.D. & TROWSDALE, J. Map of the human MHC. *Immunol. Today* **14**: 349-352, 1993.
- CARPENTIER, N .A. and JEANNET, M. Increase HLA-DR compatibility between patients with acute myeloid leukemia and their parents: implication for bone marrow transplantation. *Transplant Proc.*, **19**: 2644-2645, 1987.
- CARUSO, C.; LO CAMPO, P.; BOTINDARIC, MODICA, M.A. HLA antigens in Sicilian patients affected by chronic myelogenous leukaemia. *Journal of Immunogenetics* **14**:295-299, 1987.
- CASPER J.T, DUQUESNOY R.J., BORELLA L: Transient appearance of HLA-DRw positive leukocytes in peripheral blood after cessation of antileukemia therapy. *Transplant Proc.* **12**: 130, 1980.

- CASTELLINO, F.; ZHONG, G.; GERMAIN, R.N. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum. Immunol.* **54**: 159-169, 1997.
- CEREB, N.; KONG, Y.; LEE, S.; MAYE, P.; YANG, S. Y. Nucleotide sequences of MHC class I introns 1,2 and 3 in humans and intron 2 in nonhuman primates. *Tissue Antigens* **47**: 498-511, 1996.
- CHAN, K.-W., POLLACK, M.S., BRAUN, JR., D., O'REILLY, R.J. and DUPONT, B. Distribution of HLA genotypes in families of patients with acute leukemia. *Transplantation* **33**: 613-615, 1982.
- CHO, S.; ATTAYA, M.; MONACO, J.J. New class II- like genes in the murine MHC. *Nature* **353**: 573-576, 1991.
- COLLINS WM, Brown DW, Ward PH, Dunlop WR, Briles WE. MHC and non-MHC genetic influences on Rous sarcoma metastasis in chickens. *Immunogenetics* **22**: 315-321, 1985.
- CORTES, J.E, KANTARJIAN H.M: Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer* **76**: 2393, 1995.
- D'AMARO J, BACH F H , van ROOD J. J, RIMM AA, BORTIN M. M: HLA-C associations with acute leukaemia. *Lancet* **2**: 1176, 1984.
- DAUSSET, J. The major histocompatibility complex in man. *Science* **213**: 146-147, 1981.
- DAUSSET, J., COLOMBANI, J. & HORS, J. Major histocompatibility complex and cancer, with special reference to human familial tumours Hodgkin's disease and malignancies). *Cancer Surveys* **1**: 119, 1982.
- DE MOERLOOSE, P.; CHARDONNENS, X.; VASSALI, P.; JEANNET, M.: [HLA-D antigens from B-lymphocytes and susceptibility to certain diseases]. *Schweiz Med Wochenschr- Journal Suisse De Medecine* **107**: 1461, 1977.
- DE JONGH BM, van der Dose-van den Berg A, Schreuder GM. Random HLA-DR distribution in children with acute lymphocytic leukaemia in long-term continuous remission. *British Journal of Haematology* **52**: 161-163, 1982

- DEARDEN SP, TAYLOR G.M.,GOKHALE D.^a ROBINSON M.D. THOMPSONW, OLLIER W, BINCHY J.M., STEVENS R.F., CARR T, BARDSLEY W.G.:Molecular analysis of HLA-DQB1 alleles in childhood common acute lymphoblastic leukaemia. *Br J. Cancer* **73**:603, 1996.
- DEBRE, P., BOYER, B., GISSELBRECHT, S., BISMUTH, A. & LEVY, J.P. Genetic control of sensitive to Moloney leukaemia virus in mice III. The three H-2 linked Rmv genes are immune response genes controlling the antiviral antibody response. *European Journal of Immunology* **10**: 914, 1980.
- DEGLI-ESPOSTI; M.A.; LEAVER, A.L.; CHRISTIANSEN, F.T.; WITT, C.S.; ABRAAM, L.J.; DAWKINS, R.L. Ancestral haplotypes: Conserved population MHC haplotypes. *Hum. Immunol.* **34**: 242-252, 1992.
- DE PABLO, R.; GARCIA-PACHECO; J.M.; VILCHES, C. HLA class II allele distribution in the Bubi population from the island of Bioko (Equatorial Guinea). *Tissue Antigens* **50**: 593-601, 1997.
- DIMITRIU-BONA, A.,R.J.WINCHESTER, I.SZER, M. REILLY,V.NAJFELD and J.CUTTNER. expression of early or mature monocyte-related antigens on certain acute myeloid leukemia (AML) before and after culture. *Clin.Res.* **30**:512a (abstr.), 1982.
- DORAK, M.T. and BURNETT, A.K. Major histocompatibility complex, t-complex, and leukemia. *Cancers Causes Control* **3**: 273-282, 1992.
- DORAK, M.T.; CHALMERS, E.A.; GAFFNEY D.; WILSON, D.W.; GALBRAITH, I.; HENDERSON, N.; WORWOOD, M.; MILLS, K.I.; BURNETT, A.K. Human major histocompatibility complex contains several leukemia susceptibility genes. *Leuk Lymphoma* **12**: 221-22, 1994.
- DORAK, M.T.; OWEN, G.;GALBRAITH, I.; HENDERSON, N.; WEBB, D.;MILLS, K.I.; DARKE,C.; BURNETT, A.K: Nature of HLA-associated predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **9**: 875, 1995.

- DORAK, M.T.; MACHULLA, H.K; HENTSCHEL, M.; MILLS, K.I.; LANGNER, J.; BURNETT, A.K : Influence of the major histocompatibility complex on age at onset of chronic lymphoid leukaemia. *Int.J. Cancer* **65**: 134, 1996.
- DORAK, M.T., LAWSON, T., MACHULLA, H. K., DARKE, C., MILLS, K.I., BURNETT, A.K. Unravelling an HLA-DR association in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 15;94(2): 694-700, 1999.
- DYER,P. & WARRENS,A. Design and interpretation of studies of the major histocompatibility complex in disease. In: LECHLER,R (ed). *HLA & Disease*. San Diego. Academic Press, p. 93-121, 1994.
- DYER, P.A, RIDWAY, J C., FLANAGAN, N.G. HLA- A,B.and DR antigens in chronic lymphocytic leukaemia. *Disease Markers* **4**: 231- 237, 1986
- FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics* **13**: 399-403, 1996.
- FOON, K.A., R.W. SCHROFF, AND R.P. GALE. Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. *Blood* **60**: 1-19, 1982.
- GERKINS, V.R., TING, A., MENCK, H.T., CASAGRANDE, J.T., TERASAKI P.I., PIKE, M.C. AND HENDERSON, B.E. HLA heterozygosity as a genetic marker of long-term survival. *J.Natl. Cancer Inst.*, **52**: 1909-1911, 1974.
- GLADMAN, D.D.; FAREWELL, V.T.; RAHMAN, P.; SCHENTAG, C.T.; PELLETT,F.; MING NG, C. & WADE, J.A. HLA-DRB1*04 Alleles in Psoriatic Arthritis: Comparison With Rheumatoid Arthritis and Healthy Controls. *Human Immunology* **62**:1239-1244, 2001.
- GLYNNE, R.;POWIS, S.H.;BECK, S. A proteasome- related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* **353**: 357-360, 1991.
- GOLDBERG, A. L. & ROCK, K.L. Proteolysis , proteosomes and antigen presentation. *Nature* **357**: 375-379, 1992.
- GORER, P.A. Genetic and Antigenic basis of tumor transplantation. *J.Pathol.bacteriol.* **44**: 691-697, 1937.

- GREAVES, M. The new biology of leukemia. In HENDERSON E.S, LISTER T.A.,GREAVES M.F, eds. Leukemia, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, p34-45, 1996.
- GREAVES M.F,: Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* **349**:344, 1997.
- GRUEN, J.R.; NALABOLU, S.R.; SHU, T.W. A transcription map of the major histocompatibility complex (MHC) class I region.*Genomics* 36: 70-85,1996
- GRÜNWALD H, ROSNER F. Chemicals and leukemia. In: Henderson ES, WB Lister T.A, Greaves M.F, eds Leukemia, 6th ed. Philadelphia: W.B Saunders, p179-94, 1996.
- GUERRA, L.K., REHFELDT, I.R. LIMA, M.T., PETZL-ERLER, M.L., MESSIAS, I.J.T. BF and C3 Genetic Polymorphisms in Kaingang Indians from Southern Brazil. *Hum. Hered* **42**:153-156, 1992.
- HAASE, D., FEURING-BUSKE, M., KÖNEMANN, S. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulation. *Blood* **86**:2906-12, 1995.
- HURLEY, C.K. Acquisitio and use of DNA-based HLA typing data in bone marrow registries. *Tissue Antigens* **49**: 323-328, 1997.
- IMANISHI, I; AKAZA,T; KIMURA, A; TOKUNAGA, K; GOJOBORI, T.Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In Tsuji; k.; Aizova, m.; Sasazuki, T (eds): HLA. Proceedings of the Eleventh International histocompatibility Workshop and Conference. Vol.1 Oxford, UK, Oxford University Press, p 1065, 1991.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS,P.; HUNT,S.; WALPORT,M. *Immunology*: The Immune System in Health and Disease. 3 th (ed) Garland Publishing Inc. USA, 535p, 1997.
- JONSSON, A.-K.; HYLDIG-NIELSEN, J.-J.; SERVENIUS, B. Class II genes of the Human Major Histocompatibility Complex. Comparisons of the DQ and Dx alpha and beta genes. *J.Biol.Chem.* **262**: 8767-8777, 1987.

- KISSMEYER-NIELSEN & DICK- Introduction to HLA Genetics. In: DICK, H.M. & KISSMEYER-NIELSEN, F. (eds)- *Histocompatibility Techniques*. Elsevier/North-Holland and Biomedical Press, Amsterdam, pp. 9-38, 1979.
- KLEIN, J. & SHEREFFLER, D.C.- The H-2 model for the major Histocompatibility Systems. *Transpl.Rev*; 6: 3-29, 1971.
- KRAEMER, M.H.S.; UTHIDA-TANAKA, A.M.; OLIVEIRA, V.C.; BIRAL, A.C.; CARDOSO, C.B.; MAGALHÃES, R.F.; MAGNA, L.A.; Early-onset of Psoriasis in Brazilian patients: Support for HLA-Class I and II Analysis. In: SIRISINHA, S.; CHAIYAROJ, S.C.; TAPCHASRI, P. (ed) 2nd Congress of the Federation of Immunological Society of Asia-Oceania. Bologna, Italy: Monduzzi Editore, *International Procedures Division*, V.I, 69-73, 2000.
- KRAUSE, J.R.; PENCHANSKY, L.; CONTIS, L.; KAPLAN, S.S. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.* **89**:341-346, 1988.
- KRAGULJAC N, MARISAVLJEVIC D, JANDKOVIC G, RADOSEVIC N, PANTIC M, DONFRID M, MILETIC N, BOSBOVIC D, COLOVIC M.Characterization of CD13 and CD33 surface antigen-negative acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* **114**(1): 29-34, 2000.
- KOURILSKY, F.M.,DAUSSET, J., FEINGOLD, N., DUPUY, J.M. & BERNARD, J. Etude de la repartition des antigènes leucocytaires chez des malades atteints de leucémies aigue en remission. In: *Advances in Transplantation*, (ed. By J. Dausset, J. Hamburger & g. Mathé) p 515, Munksgaard,Copenhagen, 1967.
- KNOWLES, R.W.; FLOMENBERG, N.; HORIBE, K.; WINCHESTER, R.; RADKA, S.F.; DUPONT, B.: Complexity of the supertypic HLA-DRw53 specificity: Two distinct epitopes differentially expressed on one or all of the DR beta-chains depending on the HLA-DR allotype. *J. Immunol* **137**:2618, 1986.
- LAMM, L.U.& DEGOS,L. Introduction to HLA genetics. "In": DICK, H.M.& KISSMEYER-NIELSEN,F.(eds). Histocompatibility techniques, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 131-162p.,1979

- LAYRISSE, Z., HEINEN, H.D., BALBAS, O., GARCIA, E., STOIKOV, Z, UNIQUE HLA-DR-DQ Associations revealed by family studies in Warao Amerindians. Haplotype and homozygosity frequencies. *Human Immunol.* **23**:45, 1988.
- LAWLER, S.D., KLOUDA, P.T., HARDISTRY, R.M & TILL, M.M. Histocompatibility and acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, **i**: 699, 1971.
- LECHLER, R. Mechanisms of HLA and disease associations. In: Lecher, R.(editor) *HLA & disease* . Academic Press, London, p. 83-91, 1994.
- LEHNER, P.J. & TROWSDALE, J. Antigen processing: coming out gracefully. *Curr.Biol.* **8**: R605-R608, 1998.
- LILLEYMAN, J.S.; A.E.WATMORE, P.; COOKE, R.J. SOKOL, and J. K. WOOD. Chromosomes in acute nonlymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* **39**: 311-316, 1978.
- LILLY, F. The inheritance of susceptibility to the Gross leukaemia virus in mice. *Genetics* **53**: 529,1966.
- LILLY, F. The effect of histocompatibility-2 type in response to the Friend leukaemia virus in mice. *Journal of Experimental Medicine* **127**: 456, 1968.
- LILLY, F.,E. A. BOYSE and L.J. OLD. Genetic basis of susceptibility to viral leukemogenesis. *Lancet.* **II**: 1207-1209, 1964.
- LICHTMAN,M.A.&HENDERSON, E.S. Acute myelogenous leukemia”In”WILLIAMS, W.J; BEAUTLER, E; ERLEV, A .J. & LICHTMAN, M. A. *Hematology* 4th edition. United States of America, McGraw-Hill, Inc.”ed”, 251-252, 1990.
- LINET, M.S.; BIAS, W.B.; DORGAN, J.F.; MCCAFFREY, L.D.; HUMPHREY, R.L. HLA antigens in chronic lymphocytic leukemia. *Tissue antigens* **31**:71-78,1988.
- LO CACCO F, FOA R. Diagnostic and prognostic advances in the immunophenotypic and genetic characterization of acute leukaemia. *Eur. J. Haematol.* **55**: 1-9, 1995.

- 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.
- MACHULLA, H.K. MULLER, L.P., SCHAAF, A., KUJAT, G., SCHONERMARCK, U., LANGNER, J. Association of chronic lymphocytic leukemia with specific alleles of the HLA-DR4:DR53:DQ8 haplotype in German patients. *Int. J. Cancer* **15**; 92(2):203-7, 2001.
- MACIEL, L.M.; RODRIGUES, S.S.; DIBBERN, R.S.; NAVARRO, P.A.; DONADI, E.A. Association of the HLA-DRB1*0301 and HLA-DQA1*0501 alleles with Graves disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds. *Thyroid* **11**: 31-35, 2001.
- MARSH, S.G.E.; PARHAM, P.; BARBER, L.D. *HLA and disease*. In: MARSH, S.G.E.; PARHAM, P.; BARBER, L.D.; (ed). The HLA Academic Press. San Diego, Califórnia., p79-83, 2000.
- MARSH, S.G.E.; PARHAM, P.; BARBER, L.D. *HLA and disease*. In: MARSH, S.G.E.; PARHAM, P.; BARBER, L.D.; (ed). The HLA Academic Press. San Diego, Califórnia, p.330-390, 2000.
- MARTINEZ-LASO, J.; SARTAKOVA, M.; ALLENDE, L.; KONENKOV, V.; MOSCOSO, J.; SILVERA-REDONDO, C.; PACHO, A.; TRAPAGA, J.; GOMEZ-CASADO, E. & ARNAIZ-VILLENA, A. HLA molecular markers in Tuvinians: a population with both Oriental and Caucasoid characteristics. *Ann. Hum. Genet.* **65**: 245-261, 2001.
- MAUER, A.M ; Acute lymphocytic leukemia. “In”: WILLIAMS, W.J; BEAUTLER, E; ERSLEV, A.J.& LICHTMAN, M.A *Hematology* 4th edition. United States of America, McGraw-Hill, Inc, 994-1003, 1990.
- McCULLOCH, E.A. The blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Clin. Haematol.***13**;(2) 503-515, 1984.

- Mc DEVITT, H.O.& BODMER, W.F. Histocompatibility antigens immune responsiveness and susceptibility to disease. *Am. J. Med.* **52**: 1-8, 1972.
- MERUELO, D., LIEBERMAN, M., GINZION, N., DEAK, B. & MCDEVITT, H.O. Genetic control of radiation leukaemia virus induced tumorigenesis. Role of the major murine histocompatibility complex h-2. *Journal of Experimental Medicine* **146**:1079, 1977.
- MICHEL K, HUBBEL C, DOCK NL, DAVEY FR. Correlation of HLA-DRw3 with childhood acute lymphocytic leukemia [letter]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 105:560-560, 1981.
- MIDDLETON, D.; WILLIAMS, F.; MEENAGH, A.; DAAR, A.S.; GORODEZKY, C.; HAMMOND, M.; NASCIMENTO, E.; BRICENO, I.; PEREZ, M.P. Analysis of the Distribution of HLA-A Alleles in Populations from Five Continents. *Human Immunology* **61**:1048-1052, 2000.
- MIGOT-NABIAS., FAJARDY, I., DONZE, P.M., EVERAERE, S., MAYOMBO, J., MINH, T.N., RENAUT, A., GEORGES, A.J. HLA class II polymorphism in a Gabonese Banzabi population. *Tissue Antigens* **53**: 580-585, 1999.
- MORAES, J.R.F., MORAES, M.E.H – Distribuição dos alelos HLA na população brasileira. *Hematologia Hemoterapia* **1** :18-23, 1996.
- MORTIMER M. BORTIN, JOSEPH D'AMARO, FRITZ H. BACH, ALFRED A. RIMM and JON J.van ROOD : HLA Associations with leukemia. *Blood* **70** (1) pp 227-232, 1987.
- MULLER, C.A.; HASMANN, R.; GROSSE WILDE H. et al. Significant association of acute lymphoblastic leukemia with HLA-Cw7. *Genetic Epidemiology* **5**: 453-461, 1988.
- NAVARRETE C, ALONSO A., AWAD J, McCLOSKEY D, GANESAN T.S., AMES J, LISTER T.A., FESTENSTEIN H: HLA class I and class II antigen association in acute leukaemias. *J Immunogenet* **13**:77, 1986.

- NORDLANDER C, FUCHS T, HAMMARSTROM L, SMITH CI. Human leukocyte antigens group A in couples with unexplained infertility. *Fertility & Sterility* **40**:60-65, 1983
- OLIVER, R.T.D., PILLAI, A., KLOUDA, P.T. & LAWER, S.D. HLA linked resistance factors and survival in acute myelogenous leukaemia. *Cancer* **39**: 2337,1977.
- ORGAD S, COHEN I. J.,NEUMANN Y, VOGEL R, KENDE G, RAMOT B, ZAIZOV R, GAZIT E : HLA-A11 is associated with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia* **2**:79S, 1988.
- OSOBA, D., FALK, J.A., SOUSAN, P., CIAMPI, A. & TILL, J.E. The prognostic value of HLA phenotypes in Hodgkin's disease. *Cancer* **46**:1825, 1980.
- PARHAM, P.;LOMEN, C.E.; LAWLOR, D.A.;WAYS,J.P.; HOLMES, N.; COPPIN, H.L.;SALTER, R.D.;WAN, A.M.; ENNIS, P.D. Nature of polymorphism in HLA-A,-B,-C molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4005-4009, 1988.
- PARHAM, P. & OHTA, T. Population biology of antigen presentation by MHC Class I molecules. *Science* : 272: 67-74, 1996.
- PARK, Y.S.; WANG, C.Y.; KO, K.W.; YANG, S.W.; PARK, M.; YANG, M.C.K. & SHE, J.X. Combinations of HLA DR and DQ Molecules Determine the Susceptibility to Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Koreans. *Human Immunology* **59**: 794-801, 1998.
- PEDERSEN-BJERGAARD J, ROWLEY J.D. The balanced and the unbalanced chromosome aberration of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* **83**: 2780-86, 1994.
- PETZL-ERLER, M.L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. *Ciência e Cultura* **51**: 199-211, 1999.
- PETZL-ERLER, M.L., LUZ, R., SOTOMAIOR, V.S. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: The Kaingang and the Guarani. *Tissue Antigens* **41**: 227-237, 1993.

- PIETERS, J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 89-96, 1997.
- POSTHUMA EF, FALKENBURG J.H. APPERLEY JF, GRATWOHL A, HERTENSTEIN B, SCHIPPER R.F. OUDSSHOORN M, BIEZEN J.H, HERMANS J, WILLEMZE R, ROOSNEK E, NIEDERWIESER D. HLA-DRA is associated with a diminished risk of the development of chronic myeloid leukemia (CML). Chronic Leukemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Registry. *Leukemia* **14**(5):859-62, 2000.
- PUI, C-H, BEHM F.G, CRIST W.M: clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **82**:343, 1993.
- PUI, C-H: Acute leukemia in children. *Curr. Opin Hematol.* **3**: 249, 1996.
- QUESNEL B, PREUDHOMME C, PHILIPPE N. et al. p16 gene homozygous deletions in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **85**: 657-63, 1995.
- RAIMONDI, S.C. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **81**: 2237-2251, 1993.
- ROGENTINE, G.N., TRAPANI, R.J., YANKEE, R.A. & HENDERSON, E.S. HLA antigens and acute lymphocytic leukaemia: the nature of the HLA-A2 association. *Tissue Antigens* **3**:470, 1973.
- ROMANA, S.P., POIREL H, LECONIAT M et al. high frequency of the t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **86**: 4263-4269, 1995.
- ROOD, J.J. van LEEUWEN, A. Van and FERNISSE, J.G. The Eurotransplant story. In *History of Transplantation: Thirty-Five Recollections* (ed. P.I. Terasaki), pp.497-510, 1991.
- SANDLERS, D.P.; ROSS, J.A. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin. Oncol.* **24**:3-16, 1997.

- SCHLOSSMAN, S.F., L. CHESS, R. E. HUMPHRIES, AND J. STROMINGER.
Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells.
Proc. Natl. Acad. Sci.USA. **73**:1288-1292, 1976.
- SELL, A.M.; DONADI, E.A.; VOLTARELLI, J.C.; OLIVEIRA, V.C.; BIRAL, A.C.;
THOMAS, S.R.; BRANDALISE, S.R.; MAGNA, L.A., TEIXEIRA, M.P;
ARANEGA, V.L.; KRAEMER, M.H.S. Population and family study of
histocompatibility antigens in acute leukemia and aplastic anemia. In: CHARRON,
D. (ed.). *Genetic diversity of HLA: functional and medical implications*. Vol.II.
Paris, FR.; EDK, 763-765, 1997.
- SEREMETIS,S.,V.SLOAN,,CUTTNER AND R.WINCHESTER. Phenotype heterogeneity
in acute myelogenous leukemia (AML) detected by monoclonal antibodies (Moab).
Clin.Res.(abstr) **33**:550A, 1985.
- SEREMETIS S, CUTTNER J, WINCHESTER R: Definition of possible genetic basis for
susceptibility to acute myelogenous leukemia associated with the presence of a
polymorphic Ia epitope. *J. Clin Invest* **76**:1391, 1985.
- SHU X-O, ROSS J.A, PENDERGRASS T.W, REAMAN G.H, LAMPKIN B, ROBISON
L.L. Parental alcohol consumption, cigarette smoking and risk of infant leukemia: a
Children's Cancer Group study. *J. Natl Cancer Inst* **88**:24-31, 1996.
- SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. Editora McGraw-
Hill do Brasil, Ltda., São Paulo, 350p,1979.
- SINHA, A. A.; LOPEZ, M.T.; MCDEVITT, H.O. Autoimmune disease: the failure of self
tolerance. *Science* **248**: 1380-1388, 1990.
- SNELL,G.D. The H-2 locus of the mouse observations and speculations concerning its
comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biológica (Praha)* 14:335-358,
1968.
- STERN,L.J.; BROWN,J.H.;JARDETZKY, T.S. Crystal structure of the human class II
MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*
368:215-221, 1994.

- SVEJGAAR, A. & RYDER, L. P.. HLA and disease associations: detecting the strongest associations. *Tissue Antigens* **43**: 18-27, 1994.
- TAYLOR, G.M.; BIRCH J.M.. The hereditary basis of human leukemia. In: Henderson ES, Lister T.A, Greaves M.F., eds. *Leukemia* ,6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 210-45, 1996.
- TAYLOR, G.M.; DEARDEN, S.; PAYNE, N; AYRES, M.; GOKHALE, D.A.; BIRCH, J.M.; BLAIR, V.; STEVENS, R.F.; WILL, A.M.; EDEN, O.B. Evidence that an HLA-DQA1-DQB1 haplotype influences susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukaemia in boys provides further support for an infection-related aetiology. *Br J Cancer*. 78(5):561-5, 1998.
- TAYLOR, G.M; ROBINSON, M.D; BINCHY, A; BIRCH, J.M; STENVEN, R.F; JONES, P.M.;CARR,T; DEARDEN,S.;GOKHALE,D.A. Preliminary evidence of association between HLA-DPB1 0201 and childhood common acute lymphoblastic leukemia supports infectious a etiology. *Leukemia* 9:440-3, 1995.
- TENNANT, J. SNELL, G. D. The H-2 locus and viral leukemogenesis as studied in congenic strains in mice. *Journal of the National Cancer Institute* **41** :597
- TERASAKI, P.I. & GJERTSON, D.W. HLA Polymorphism: Origin and Maintenance. In: Terasaki, P.I. & Gjertson, D.W. (ed). *HLA 1997*. Published by UCLA Tissue Laboratory Los Angeles, California 90095. p.1-6, 1997.
- THIRMAN M.J, GILL H.J, BURNETT R.C et al Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemia with 11 q23 chromosomal translocation. *N Engl.J.Med*. **329**:909-14, 1993.
- THOMAZ, E.M.; SAKAMOTO, A.M.; DONADI, E.A.; MAGNA, L.A.; KRAEMER, M.H.S. Molecular analysis and distribution of the MHC class II alleles and haplotypes in the Brazilian Population. International Proceeding Division, Bologna, vol.II, p169-172, 1998.
- TIMONOVA LA, RUMIANTSEV AG. HLA-antigeny I i II klassov pri ostrom limfoblastnom leikoze u detei. *Gematol Transfuziol* ; **34**:19-22, 1989.

- TIWARI, J.L.; TERASAKI, P.I. *Mechanisms of Hla and disease association*. In: Tiwari, J.L.; Terasaki, P.I.(Editors) Springer-Verlag, New York, 28-31, 1985.
- TOWNSEND, A. & TROWSDALE, J. The transporters associated with antigens processing. *Semin.Cell Biol.* **4**:53-61, 1993.
- TRACHTENBERG, A; JOBIN, L.F.J.; KRAEMER, E.; SALZANO, F.M.; MORAES, M.E.H.; MORAES, J.R.F.; LIMA, M.G.; ARCG-GOMES, B.; FERREIRA, G. The HLA polymorphism in five Brazilian populations. *Anns Hum. Biol.* **15**:213-221, 1988.
- TROWSDALE, J. & KELLY, A. The human HLA class II α chain gene DZ α is distinct from genes in the DP, DQ, and DR subregion. *EMBO J.* **4**: 2231-2237, 1985.
- TROWSDALE, J.; RAGOISSIS, J.; CAMPBELL, R. D.- Map of the human MHC. *Immunology Today.* **12**: 445, 1991.
- TUCKER, H.G., WEENS, I., TSICHLIS, P. SCHWARTZ, R.S., KHIROYA, R. & DONNELLY, I. Influence of H-2 complex on susceptibility to infection by murine leukemia virus. *Journal of Immunology* **118**: 1239, 1977.
- UNO, H., KAWANO, K., MATSUOKA, H. and TSUDA, K. HLA and adult T-cell leukaemia: HLA-linked genes controlling susceptibility to human T-cell leukaemia virus type I. *Clin. Exp. Immunol.* **71**: 211-216, 1988.
- VON FLIEDNER, V.E., Z. SULTAN-KHAN and M. JEANNET. HLA-DRw antigens associated with acute leukemia. *Tissue antigens.* **16**:399, 1980.
- VON FLIEDNER, V.E., SULTAN-KHAN, Z. & JEANNET, M. HLA-A and HLA-B antigens in acute leukaemia: A2-B12 phenotypes correlate with longer survival in acute myelogenous leukaemias. *Acta Haematologica* **65** :73, 1981.
- VON FLIEDNER, V.E.; MERICA, H.; JEANNET, M.; BARRAS, C.; FELDGES, A.; IMBACH, P.; WYSS, M: Evidence for HLA-linked susceptibility factors in childhood leukemia. *Hum. Immunol.* **8**: 183, 1983.

- XU A, VAN EIJK MJ, PARK C, LEWIN H.A. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *Journal of Immunology* 151: 6977-6985, 1993
- WALFORD. R.L, Finkelstein S, Neerhout R, Konrad P, Shanbrom E. Acute childhood leukaemia in relation to the HLA human transplantation genes. *Nature* **5231**: 461-462, 1970.
- WIERTZ, E.J.H.J.; MUKHERJEE, S.; PLOEGH, H.L. Viruses use stealth technology to escape from the host immune system. *Molec. Med. Today* **3** : 116-123, 1997.
- WINCHESTER, R.R.J., G.D.ROSS, C.I.JAROWSKI, C.Y.WANG, HALPER, and H.BROXMEYER. Expression of Ia-like antigen molecules on human granulocytes during early phases of differentiation. *Proc Natl. Acad. Sci. Usa* **74**: 4012-4016, 1977.
- ZIJLSTRA, M. AND MELIEF, C.J.M. Virology, genetics and immunology of murine lymphomagenesis. *BBA* **865**: 197-231, 1986.



ANEXOS

Tabela 1- Caracterização dos indivíduos sadios em relação à sexo e idade

Indivíduos	Sexo	Idade	Indivíduos	Sexo	Idade
1- JAV	M	43	51- FCC	M	36
2- JRS	M	30	52- MLB	M	28
3- JJM	M	41	53- NFS	M	34
4- JCF	M	51	54- VAGA	M	40
5- RFG	M	33	55- PHM	M	44
6- VS	M	27	56- LNF	M	37
7- MRN	M	26	57- NAR	M	34
8- ACS	M	25	58- MS	F	33
9- EPD	M	28	59- MCO	F	40
10- AH	M	50	60- AP	F	38
11- LAC	M	45	61- JARN	M	51
12- CRP	M	37	62- GRCV	M	36
13- CRL	F	31	63- MJS	F	25
14- LMB	F	37	64- JFF	M	38
15- ECC	M	37	65- AAMM	F	37
16- SLJ	F	30	66- MDCV	F	36
17- CF	M	53	67- MAM	F	40
18- JTR	F	29	68- MMN	M	22
19- SCIBC	F	38	69- MS	F	45
20- RSSO	F	30	70- CAB	M	52
21- DFCF	M	37	71- MNAS	F	44
22- RB	M	42	72- RFD	F	39
23- MAS	M	29	73- JAS	M	40
24- IO	M	31	74- MCM	F	18
25- LFG	M	38	75- MFS	F	43
26- JFS	M	37	76- MAM	M	46
27- LEBO	F	49	77- ALL	M	18
28- NNS	F	43	78- AJR	M	51
29- WBM	F	50	79- SCO	M	28
30- MAM	F	51	80- FOC	M	26
31- JOCL	M	46	81- CSR	F	40
32- RLBC	F	41	82- CBB	M	45
33- AR	M	40	83- OMS	M	41
34- RLO	M	43	84- ARS	M	51
35- SCB	F	33	85- BA	M	42
36- OCSF	M	32	86- ALS	M	33
37- LAOS	M	52	87- CASS	F	54
38- APPC	F	29	88- DAJ	F	35
39- ACFB	F	25	89- OPA	M	49
40- JBA	F	47	90- RAA	M	27
41- OFS	M	49	91- JAF	M	22
42- APS	F	24	92- RF	M	26
43- RHFA	M	29	93- FFT	M	23
44- ALP	M	25	94- LMB	F	35
45- CMTT	M	45	95- SAR	M	36
46- JRB	M	33	96- PJP	F	46
47- JBT	M	53	97- WCS	M	22
48- JAS	M	34	98- CSC	F	31
49- TATM	F	43	99- BJT	M	22
50- ABP	M	45	100- ALSJ	M	30

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes de LMA segundo idade e sexo

PACIENTES	IDADE	SEXO	PACIENTES	IDADE	SEXO
1-A.M.	41	M	16- LCL	49	M
2- LTT	43	M	17- RVM	41	M
3- DOF	52	F	18- GTB	41	F
4-DJBC	49	M	19- EJS	28	M
5-CACP	47	F	20- VEF	27	M
6- MLV	43	F	21- AACN	13	M
7- FAZ	18	F	22- MLGP	39	F
8- GLS	25	M	23- AXL	35	M
9- FAV	31	M	24- JMS	62	M
10- RAR	16	M	25- SDFCB	40	F
11- DHL	29	M	26- ACL	46	F
12- TGSF	41	F	27- MRM	29	M
13- JAC	39	M	28- MGD	46	F
14- GTS	18	F	29- ALSF	57	M
15- IRV	33	M	30- CHFF	21	M

Tabela 3 - Caracterização dos pacientes de LLA, segundo sexo e idade

Pacientes	Idade	Sexo
1- SRST	36	F
2- LUR	18	F
3- MLTM	57	F
4-PHM	20	M
5-PBP	27	F
6- AJF	24	M
7- LAM	19	M
8- EJS	16	M
9- LDFB	56	F
10- GSE	24	F
11- AJS	35	M
12- VJCJ	16	M
13- GG	48	M
14- RCS	21	M
15- EBM	70	F

TABELA 4-Tipificação dos alelos HLA-DRB1-5 e-DQB1 em pacientes com LMA

Pacientes	DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1	
A.M	*11	*15	B3*		B5*	*06	*03
L.T.T	*03	*13	B3*B3*			*06	*02
D.O.F.	*01	*07		B4*		*05	*02
D.J.B.C.	*01	*03	B3*			*05	*02
C.A.C.P.	*01	*11	B3*			*05	*03
M.L.V.	*10	*13	B3*			*05	*06
F.A.S	*10	*11	B3*			*05	*06
G.L.S.	*07	*13	B3*	B4*		*06	*02
F.A.V.	*04	*11	B3*	B4*		*06	*03
R.A.R.	*15				B5*	*06	
D.H.L.	*07	*08		B4*		*02	*04
T.G.S.F.	*07	*13	B3*	B4*		*06	*03
J.A.C.	*01	*14	B3*			*05	*05
G.T.S.	*04	*07		B4*B4*		*02	*03
I.R.V.	*07			B4*		*02	
L.C.V.	*01	*07		B4*		*05	*02
R.V.M.	*07	*13	B3*	B4*		*06	*02
G.T.B	*07	*13	B3*	B4*		*06	*02
E.J.S.	*07	*15		B4*	B5*	*06	*02
V.E.F.	*07	*11	B3*	B4*		*02	*03
A.A.C.N	*04	*13	B3*	B4*		*06	*03
M.L.G.P.	*08					*03	
A.X.S.	*13	*14	B3*			*05	*06
J.M.S	*04	*15		B4*	B5*	*06	*03
S.D.F.C.B	*07	*15		B4*	B5*	*06	*02
A.C.L.	*04	*11	B3*	B4*		*03	
M.R.V	*01	*08				*04	*05
M.G.D.	*15				B5*	*05	
A.L.S.F.	*10	*12	B3*			*05	*06
C.H.F.F.	*07			B4*		*02	

TABELA 5 -Tipificação dos alelos HLA-DRB1-5 e-DQB1 em pacientes com LLA

Pacientes	DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1	
S.R.S.T	*07	*11	B3*	B4*		*02	*03
L.U.R	*01	*12	B3*			*05	*02
M.L.T.M	*03	*13	B3*B3*			*02	*03
P.H.M.	*11	*16	B3*		B5*	*05	*03
P.B.P	*03	*13	B3*			*06	*02
A.J.F	*03		B3*			*02	
L.A.M	*01	*13	B3*			*05	*06
E.J.S.	*03	*13	B3*B3*			*06	*02
L.D.F.B.	*08	*11	B3*			*03	*04
G.S.E	*03	*07	B3*	B4*		*02	*02
A.J.S	*01	*09		B4*		*05	*02
V.J.C.J	*01	*04		B4*		*05	04
G.G	*07	*10		B4*		*05	
R.C.S	*01					*05	
E.B.M	*07	*13	B3*	B4*		*06	*02

TABELA 6 - Tipificação dos alelos HLA-DRB1-5 e-DQB1 em indivíduos controle sadios

Indivíduo	DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1	
1-JAV	*01	*11	B3*			*05	*03
2-JRS	*15	*11	B3*		B5*	*06	*06
3-JJM	*01	*11	B3*			*05	*03
4-JCF	*13	*11	B3*			*06	*03
5-RFG	*04	*11	B3*	B4*		*03	*03
6-VS	*13	*08	B3*			*06	*04
7-MRN	*15				B5*	*06	
8-ACS	*15				B5*	*06	
9-EPD	*15				B5*	*06	
10-AH	*07	*11	B3*	B4*		*02	*03
11-LAC	*04	*11	B3*	B4*		*03	*03
12-CRP	*16	*14	B3*		B5*	*05	*05
13-CRL	*16	*04		B4*	B5*	*05	*03
14-LMB	*13	*07	B3*	B4*		*06	*02
15-ECC	*04	*14	B3*	B4*		*05	*03
16-SLJ	*07	*11	B3*	B4*		*02	*03
17-CF	*04	*13	B3*	B4*		*06	*02
18-JTR	*13	*07	B3*	B4*		*06	*02
19-SCIBC		*13	B3*			*06	
20-RSSO	*04	*07		B4*		*02	*03
21-DFCB	*04	*07		B4*		*02	*03
22-RB	*04	*11	B3*	B4*		*03	*03
23-MAS	*13	*07	B3*	B4*		*06	*02
24-IO	*01	*11	B3*			*05	*03
25-LFG	*01	*07		B4*		*05	*02
26-JFS	*08	*11	B3*			*04	*03
27-LEBO	*01	*09		B4*		*05	*02
28-NNS	*01	*04		B4*		*05	*04
29-WBM	*08	*11	B3*			*04	*03
30-MAM	*13	*01	B3*			*06	
31-JOCL	*04	*04		B4*		*04	*04
32-RBLC	*07	*08		B4*		*02	*04
33-AR	*04	*11	B3*	B4*		*03	*03
34-RLO	*07	*14	B3*	B4*		*03	*02
35-SCB	*01	*11	B3*			*05	*03
36-OCSF	*15	*04		B4*	B5*	*06	*03
37-AOS	*13	*04	B3*	B4*		*03	*04
38-APPC	*11	*14	B3*			*05	*03
39-ACFB	*10					*05	
40-JBA	*16	*07		B4*	B5*	*05	*02

(cont.)

Indivíduo		DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQB1		
41-OFS	*04	*07			B4*		*02	*03
42-APS	*13	*08	B3*				*03	*04
43-RHFA	*16	*08				B5*	*04	*03
44-ALP	*07	*09		B4*			*02	*03
45-CMTT	*04	*13	B3*	B4*			*06	*03
46-JRB	*16	*08				B5*	*04	*05
47-JBT	*01	*13	B3*				*05	06
48-JAS	*07	*01		B4*			*05	*02
49-TATM	*04	*08		B4*			*03	*04
50-ABP	*01	*08		B4*			*05	*04
51-FCC	*15	*03	B3*			B5*	*06	*02
52-MLB	*01	*14	B3*				*05	*05
53-NFS	*13		B3*				*06	
54-VAGA	*16					B5*	*05	
55-PHM	*13		B3*				*03	
56-LNF	*01	*15				B5*	*05	*06
57-NAR*15	*11		B3*		B5*		*06	*03
58-MS	*01	*08					*05	*04
59-MCO	*04	*10		B4*			*05	*03
60-AP	*16	*11	B3*			B5*	*05	*03
61-JARN	*04	*13	B3*	B4*			*06	*03
62-GRCV	*15	*04		B4*		B5*	*06	*03
63-MJS	*01						*05	
64-JFF	*07	*13	B3*	B4*			*05	*02
65-AAM	*11	*13	B3*B3*				*06	*03
66-MDCV	*07	*16		B4*		B5*	*05	*02
67-MAM	*04	*15		B4*		B5*	*06	*03
68-MMN	*04	*12	B3*	B4*			*03	*03
69-MS	*01	*11	B3*				*05	*03
70-CAB	*01	*03	B3*				*05	*02
71-MNAS	*03	*13	B3*B3*				*06	*02
72-FRD	*03	*04	B3*	B4*			*02	*03
73-JAS	*11	*1	B3*B3*				*03	*03
74-MCM	*03	*04	B3*	B4*			*02	*03
75-MFS	*04	*13	B3*	B4*			*06	*03
76-MAM	*01	*07		B4*			*05	*02
77-ALL	*04	*11	B3*	B4*			*03	*03
78-AJR	*11	*13	B3*B3*				*06	*03
79-SCO	*15	*03	B3*			B5*	*06	*02
80-FOC	*04	*03	B3*	B4*			*02	*03
81-CSR	*15	*04		B4*		B5*	*06	*04
82-CBB	*03	*16	B3*			B5*	*02	*03

(cont.)

Indivíduo		DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQB1		
83-OMS	*15					B5*	*06	
84-ARS	*01	*16				B5*	*05	*05
85-BA	*13	*13	B3*B3*				*06	*06
86-ALS	*07	*15		B4*	B5*		*06	*02
87-CASS	*03	*13	B3*B3*				*06	*02
88-DAJ	*01	*04		B4*			*05	*03
89-OPA	*04	*15		B4*	B5*		*06	*03
90-RAA	*03	*11	B3*B3*				*02	*03
91-JAF	*01	*04		B4*			*05	*03
92-RF	*04	*13	B3*	B4*			*06	*03
93-FFT	*04	*13	B3*	B4*			*06	*03
94-LMB	*03	*11	B3*B3*				*02	*03
95-SAR	*13	*16	B3*		B5*		*06	*03
96-PJP	*11	*14	B3*B3*				*05	*03
97-WCS	*07	*03	B3*	B4*			*02	*02
98-CSC	*03	*14	B3*B3*				*02	*03
99-BJT	*04	*07		B4*			*03	*03
100-ALSJ	*04	*11	B3*	B4*			*03	*03