

Elaine Valim Camarinha Marcos

**Doença de Jorge Lobo e sua relação com os antígenos
do sistema HLA**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças Tropicais,
área de concentração em Doenças
Tropicais, modalidade Biologia Tropical
da Faculdade de Medicina de Botucatu,
da UNESP, para obtenção do título de
Mestre.**

**Orientador:
Prof. Dr. Diltor Vladimir Araujo Opromolla**

**Botucatu
2001**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Marcos, ElaineValim Camarinha

Doença de Jorge Lobo e sua relação com os antígenos do sistema HLA /
Elaine Valim Camarinha Marcos. – 2001.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2001.

Orientador: Diltor Vladimir Araújo Opromolla

1. Blastomicose queloidiana – Aspectos imunológicos

CDD 616.969

Palavras-chave: HLA; Doença de Jorge Lobo; Micose; Imunologia

Dedicatória

Ao Pedro, meu companheiro, paciente em todos os momentos.

Aos meus filhos, Mariana e João Pedro, frutos da harmonia e do amor em família.

À memória de meus pais, **“Cyro e Gonçalina”**, meus primeiros mestres,
responsáveis pela minha formação pessoal.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Diltor Vladimir Araujo Opromolla, orientador desse trabalho, quem admiro muito por seu profissionalismo, pela atenção e confiança.

À Dra. Elza Araújo Torres, pela atenção, incentivo e amizade.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em particular:

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais – FMB – UNESP

Ao *Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond*, Diretor Técnico de Departamento (ILSL).

À *Fabiana Covolo de Souza*, farmacêutica-bioquímica (ILSL).

Ao *Dr. José Francisco Furtado*, médico do Hospital Souza Araújo em Rio Branco/AC.

Às Pesquisadoras da Equipe Técnica de Imunologia (ILSL), *Fátima Regina, Maria Esther e Eliane*.

Às funcionárias da Equipe Técnica de Imunologia (ILSL), *Érika, Márcia, Iracema e Nice*.

À *Patrícia Sammarco Rosa*, médica-veterinária (ILSL).

À *Telma A. Sneideris*, responsável pelo CPD (ILSL).

À *Paula Opromolla*, (ILSL).

À Cleide Ortega, responsável pelo setor de Recursos Didáticos e Pedagógicos (ILSL).

À *Juliana*, secretária da Divisão Pesquisa e Ensino (ILSL).

À *Regina Célia Spadim*, funcionária da Seção de Pós-Graduação – FMB – UNESP.

Aos pacientes que participaram do trabalho.

a todos, obrigada.

"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar, e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro!"

(Fernando Sabino)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	08
Resumo.....	09
1. Introdução.....	11
1.1 Doença de Jorge Lobo.....	11
1.2. O complexo HLA e Doenças.....	16
1.3. Complexo HLA e Doença de Jorge Lobo.....	21
2. Objetivo.....	24
3. Material e Método.....	26
3.1. Casuística.....	26
3.2. Métodos laboratoriais.....	26
3.3. Análise estatística.....	31
4. Resultados.....	32
5. Discussão.....	39
6. Conclusões.....	45
7. Summary.....	47
8. Referências Bibliográficas.....	49
Anexos.....	65

ABREVIATURAS

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

HLA - Human leucocyte antigen

TCR – T cell receptor

DNCB - dinitroclorobenzeno

ACD – ácido cítrico + dextrose

PCR-SSP – polymerase chain reaction by specific sequence primer

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

DNA - dextrorribonucleic acid

SDS - sodium dodecil sulfate

RR – risco relativo

JL – Jorge Lobo

BR – grupo controle da população brasileira

RESUMO

A doença de Jorge Lobo é uma micose causada pelo fungo *Lacazia loboi* (*L.loboi*), o qual se assemelha filogenética e antigenicamente ao *Paracoccidioides brasiliensis* (*P.brasiliensis*). Devido às características epidemiológicas e aos poucos estudos relacionados aos aspectos imunológicos dessa doença, o objetivo desse trabalho foi pesquisar a frequência dos antígenos HLA de classe I e classe II em 21 pacientes portadores da doença de Jorge Lobo e comparar com população controle. As tipagens HLA de classe I foram realizadas pela técnica de microlinfocitotoxicidade e as de classe II pelo método de PCR-SSP. Como controles, utilizaram-se duas populações: uma do Estado do Acre e outra da população brasileira, segundo os dados publicados no 11th IHW no Japão.

Esse trabalho sugere a primeira associação proposta entre antígenos e doença de Jorge Lobo, especificamente com o HLA-DQ3, quando comparados os dados entre pacientes e população brasileira. Contudo, não mostra qualquer tipo de associação quando se comparam pacientes e população do Acre. Acredita-se que, com o aumento do número de pacientes estudados e com a utilização de metodologia para identificação dos diferentes alelos que codificam o fenótipo DQ-3, poderão ser obtidos melhores resultados.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE JORGE LOBO

A doença de Jorge Lobo foi descrita em 1931 por Jorge de Oliveira Lobo, médico e professor de Dermatologia da Faculdade de Medicina do Recife - PE, em um paciente pernambucano que vivia como seringueiro na Amazônia e apresentava lesões nodulares, salientes, confluentes e duras, localizadas na região lombossacral (LOBO, 1931). A doença ocorre predominantemente na região amazônica brasileira, porém há casos descritos na Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Panamá, Costa Rica, México, Peru, Honduras e Bolívia (RODRIGUEZ-TORO, 1993).

Recentemente, o número total de casos diagnosticados da doença foi estimado em 458, dos quais 295 estão no Brasil (OPROMOLLA et al., 1999b).

As condições de vida dos pacientes parecem ter grande importância na epidemiologia dessa micose, influenciadas que são tanto pelos hábitos e costumes da população, como pelos fatores ligados ao meio ambiente. Entre os casos relatados na literatura, há predominância de lavradores, seringueiros e garimpeiros (LACAZ, C.S. et al., 1986).

O seu agente etiológico é um fungo classificado como “*Lacazia loboi*” (*L. loboi*) (TABORDA et al., 1999). Nas lesões cutâneas, esse parasita apresenta-se sob forma arredondada, com parede celular espessa, bem refringente e citoplasma com aspecto homogêneo ou granular, medindo 6 a 12 µm de diâmetro (LACAZ et al., 1986).

O habitat natural do *L. loboi* e suas condições de vida não são conhecidos. Presume-se que, na natureza, ele seja encontrado no solo, na água e nos vegetais (LACAZ et al., 1986; BURNS et al., 2000). O encontro de golfinhos, naturalmente infectados com o fungo, sugere que a água, doce ou salgada, seja um de seus reservatórios (LACAZ et al., 1986).

Até o momento, as tentativas de cultivo do fungo em meios artificiais não foram frutíferas. Este fato tem dificultado em muito o estudo da doença (FONSECA & LACAZ, 1971).

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa da reprodução experimental da doença de Jorge Lobo e somente alguns mostraram resultados positivos. A inoculação do *L. loboi* na bolsa jugal do hamster (SAMPAIO & DIAS, 1970) e em alguns quelônios, (SAMPAIO et al., 1971), segundo os autores, mostraram lesões semelhantes às do homem. Em 1977, SAMPAIO & DIAS realizaram trabalho inoculando um tatu do gênero *Euphractus* e relatam obtenção de lesão macroscópica rica em fungos. Em 1999a, OPROMOLLA et al. inocularam camundongos Suíços, por via intradérmica, e obtiveram alterações histológicas semelhantes à doença humana, entretanto, sem lesões macroscópicas. Mais recentemente, MADEIRA et al. (2000), ao inocularem camundongos isogênicos da linhagem BALB/c com o fungo *L. loboi*, obtiveram lesões macroscópicas com grande número de fungos viáveis, semelhantes às lesões do homem. Com os resultados desse trabalho, essa linhagem se tornou um modelo experimental para o estudo da doença de Jorge Lobo.

A porta de entrada do *L. loboi* não se encontra totalmente esclarecida, porém, acredita-se que traumatismos cutâneos ofereçam condições para sua penetração. O período de incubação da doença também não é conhecido, parece ser longo, superior a um ou dois anos (LACAZ et al., 1986).

Não há comprovação da transmissão entre pessoas na doença de Jorge Lobo, muitos dos casos descritos na literatura são isolados, sem referência da doença em outros membros da família (DIAS et al., 1970; OPROMOLLA et al., 1999b).

Os resultados terapêuticos com várias drogas antifúngicas têm sido pobres e a cirurgia continua sendo a melhor opção para esses casos (FONSECA & LACAZ, 1971; OPROMOLLA et al., 1999b).

Clinicamente, verifica-se que as lesões cutâneas, causadas pelo fungo, são infiltrativas, verrucosas ou com aspecto queloidiano que crescem lentamente. As lesões ulceradas parecem ser devidas mais a traumatismos do que

primariamente à ulceração espontânea (OPROMOLLA et al., 1999b). Essas lesões localizam-se mais freqüentemente no pavilhão auricular e nos membros inferiores, mas podem ocorrer em outras áreas da pele (MORAES, 1962). Os sintomas mais freqüentes são ligeiro ardor e coceira na área das lesões (LACAZ et al., 1986).

O comprometimento de gânglios linfáticos regionais não é freqüente. Não há evidências de lesões nos órgãos internos, mas existe o relato de um caso com comprometimento testicular 47 anos após o início da doença (RODRIGUEZ-TORO, 1993). Não há comprometimento do estado geral nos pacientes, exceto quando há extensa ulceração das lesões com infecção secundária (SILVA, 1972).

Histopatologicamente, essa micose apresenta, como principal característica, uma reação histiocitária difusa, freqüentemente com fibrose, restrita ao derma, com presença de células gigantes, tipo corpo estranho e células gigantes tipo Langhans, com numerosos parasitas livres ou no interior dessas células; linfócitos, plasmócitos e neutrófilos estão presentes em pequeno número (BARUZZI et al., 1979; OPRMOLLA et al., 2000). O quadro histológico é bastante típico para permitir sua distinção de qualquer outra lesão blastomicótica (LACAZ, C. S. et al., 1986).

A resposta do hospedeiro à agressão pelo *L. loboi* é muito variável. Alguns pacientes manifestam uma forma disseminada da doença, enquanto em outros as lesões são localizadas. De qualquer forma, o parasita mantém seu tropismo pela pele. Os fatores e a forma como ocorre a disseminação das lesões não são conhecidos (LACAZ et al., 1986). Há casos cujos exames histopatológicos evidenciaram a presença de parasitas no interior de vasos sanguíneos, sugerindo disseminação hematogênica (FRAGA & MIRANDA, 1968; BARUZZI et al., 1981).

Até o momento, sabe-se muito pouco sobre os aspectos imunológicos envolvidos nesta doença, possivelmente pelo fato de seu agente etiológico não ser ainda cultivável em meios artificiais. Dos estudos realizados envolvendo a resposta imune humoral de pacientes portadores da doença de Jorge Lobo, a maioria tem empregado antígenos do *Paracoccidioides brasiliensis* (P.

brasiliensis) e de outros fungos, como *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) e *Blastomyces dermatitidis* (*B. dermatitidis*).

Em 1968, SILVA et al. demonstraram que na pele o fungo estava antigenicamente relacionado ao *P. brasiliensis*, apresentando também antígenos comuns com células leveduriformes do *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *Candida albicans* e a forma miceliana do *Coccidioides immitis*. Nesse sentido, os autores, empregando como substrato antigênico células leveduriformes do *P. brasiliensis*, verificaram que 55,2% dos pacientes com doença de Jorge Lobo apresentaram positividade à imunofluorescência indireta.

Outros estudos sorológicos têm sido realizados, na maioria dos casos, também com o *P. brasiliensis*, mostrando a existência de antígenos comuns entre *L. loboi* e *P. brasiliensis*, principalmente em provas de imunodifusão em gel de ágar, fixação de complemento e precipitação em meio líquido (FONSECA & LACAZ, 1971; BARUZZI et al., 1979; BARBOSA et al., 1981).

MENDES-GIANNINI et al. (1984) realizaram teste de ELISA com antígenos do *P. brasiliensis* e obtiveram reações cruzadas com soros de pacientes portadores de outras infecções micóticas que não a paracoccidioidomicose, inclusive com a doença de Jorge Lobo. Em 1979, PECHER et al. observaram que os portadores da doença não respondem ao Dinitroclorobenzeno (DNCB), sugerindo imunidade celular ligeiramente diminuída, dados estes confirmados por MUSATTI et al. em 1980.

Um fato interessante no estudo da doença de Jorge Lobo é o encontro da doença em golfinhos, sob a forma de lesões geralmente úlcero-crostosas, localizadas mais comumente na cauda ou dorso desses animais (MIGAKI et al., 1971; WOODWARD, 1972; DE VRIES & LAARMAN, 1973; POELMA et al., 1974; CALDWELL et al., 1975; SYMMERS, 1983; BOSSART, 1984).

Outro fato que chama a atenção no estudo da doença de Jorge Lobo é a descrição dessa micose em índios Caiabis que viviam em uma área entre os rios Teles Pires e Arinos, formadores do rio Tapajós, no norte do estado de Mato Grosso. Outras tribos indígenas que habitavam esta área ao lado dos Caiabis

não apresentavam a doença. Quando esses índios foram transferidos para o Parque Nacional Indígena do Xingu, nenhum caso novo surgiu na tribo. Tem-se, assim, um grupo populacional que em seu “habitat” estava exposto a elevado risco de infecção por um determinado agente, evidenciado pelo número considerável de indivíduos que apresentavam o quadro clínico dermatológico da doença. Esse risco aparentemente deixa de existir quando essa população se desloca para uma nova área geográfica (BARUZZI et al., 1973; BARUZZI et al., 1979). Apesar de outros fatores estarem atuando na alta incidência da doença nessa tribo indígena em particular, acredita-se que possa existir uma suscetibilidade genética desses índios, predispondo-os à doença de Jorge Lobo. Até hoje não se sabe quais fatores podem atuar na suscetibilidade e disseminação da doença.

1.2. O COMPLEXO HLA E DOENÇAS

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) foi descrito no homem pela primeira vez em 1958 por DAUSSET, na França. Atualmente, chamados Antígenos de Leucócitos Humanos (HLA), são definidos como um conjunto de locos gênicos ligados intimamente, localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p-21.3), e que codificam aloantígenos (antígenos que diferem dentro de uma mesma espécie). Sua importância foi reconhecida inicialmente no campo dos transplantes de órgãos por serem responsáveis pelo processo de rejeição, quando um órgão transplantado apresenta HLA incompatível com o receptor (AMOS et al, 1970; ZINKERNAGEL & DOHERTY, 1979; Mc DEVITT, 1980; STASTNY et al., 1983). Hoje sabe-se que linfócitos T reconhecem o peptídeo antigênico ligado às moléculas do HLA na superfície da célula apresentadora, onde se inicia a ativação da resposta imune específica, incluindo a secreção de citocinas, proliferação e controle das funções efetoras e regulatórias dos linfócitos. Além disto, o HLA exerce controle da suscetibilidade genética a várias doenças (MUNRO & BRIGHT, 1976; SASAZUKI et al., 1983; SVEJGAARD et al., 1983; RISCH, 1987; THORSBY, 1995; ABBAS et al.,

2000).

Complexos gênicos, homólogos ao complexo HLA do homem, foram descritos em todas as espécies de vertebrados em que foram pesquisados (HANSEN et al., 1993).

O HLA é constituído pelas regiões gênicas de classe I, II e III. Os genes da região de classe I expressam glicoproteínas de superfície celular, encontradas na membrana das células nucleadas do organismo, e determinam o reconhecimento do antígeno pelo linfócito T CD8⁺ (KRENSKY et al., 1990), sendo reconhecidos como antígenos clássicos de transplante. Os genes HLA de classe II se expressam em linfócitos B, macrófagos, monócitos, linfócitos T ativados e células dendríticas foliculares (STRACHAN 1987; THORSBY 1987; TROWSDALE 1987), determinando o reconhecimento do antígeno pelo linfócito T CD4⁺ (QVIGST et al., 1986; ABBAS et al., 2000). A região de classe III contém genes responsáveis por várias funções, incluindo proteínas do sistema complemento (C2, C4 e fator B), enzimas como a 21-hidroxilase, as enzimas glicolisadoras de moléculas HLA, fatores de necrose tumoral alfa e beta, receptor para interferon gama, além de outros genes, cujos produtos ainda não foram definidos (TROWSDALE & CAMPBELL, 1997).

As moléculas de classe I são glicoproteínas que atravessam a membrana celular e apresentam um domínio citoplasmático carboxiterminal (COOH), uma região transmembrânica e 3 domínios externos aminoterminais (NH₂). Os domínios externos (1, 2 e 3) são compostos pela cadeia α -polimórfica, com peso molecular de 44 kD, sendo o domínio α 3 ligado não-covalentemente à β 2-microglobulina que é uma proteína de peso molecular de 12 kD, não polimórfica, codificada no cromossomo 15. Os domínios α 1 e α 2 formam o sítio de ligação com o antígeno (GOOLFELLOW et al., 1975; STROMINGER, 1987).

As moléculas de classe II são constituídas por duas cadeias polipeptídicas, α (32 a 34 kD) e β (29 a 32 kD), associadas não-covalentemente, contendo grupos oligossacarídeos ligados ao nitrogênio, porção extracelular NH₂ e porção intracelular COOH, sendo dois terços de cada cadeia localizados no espaço extracelular. As duas cadeias das moléculas HLA de classe II são

codificadas por diferentes genes do MHC, sendo ambas polimórficas. Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ formam o sítio de ligação com o antígeno (STROMINGER, 1987; ABBAS et al., 2000). Interferons alfa, beta e gama induzem aumento da expressão de moléculas de classe I e II, podendo induzir também a expressão de moléculas de classe II em células que normalmente não expressam esses antígenos, como nos linfócitos T, quando se tornam ativados (STRACHAN, 1987; TROWSDALE, 1987).

As regiões NH_2 de $\alpha 1$ e $\beta 1$ apresentam alta variabilidade (regiões hipervariáveis), sendo responsáveis pelo polimorfismo do complexo. Já os domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$ da classe II são muito conservados, apresentando homologia de aminoácidos com os domínios das regiões constantes das imunoglobulinas. Isso é uma indicação de que os genes do MHC e das imunoglobulinas evoluíram a partir de gene ancestral comum da superfamília das imunoglobulinas. Essa superfamília inclui ampla variedade de moléculas de superfície celular, como os receptores de células T (TCR), CD4, CD8 (KAUFMAN & STROMINGER, 1982; STROMINGER, 1987; WILLIAMS, 1988).

As moléculas de classe I apresentam peptídeos aos linfócitos T CD8^+ , geralmente com função citotóxica, enquanto que as moléculas de classe II apresentam o fragmento peptídico antigênico processado aos linfócitos T CD4^+ . A ligação do complexo antígeno-MHC ao linfócito se dá pelo receptor específico TCR (MONACO, 1992; GERMAIN & MARGULIES, 1993). Diferentes moléculas HLA ligam-se e apresentam diferentes peptídeos aos linfócitos T e esta seletividade depende da configuração e da estrutura química de sua fenda ligante ao peptídeo (BJØRKMAN et al., 1987; GERMAIN, 1994).

A enumeração dos antígenos HLA presentes em um indivíduo constitui o fenótipo HLA. O conjunto de antígenos codificados por genes de um cromossomo haplóide constitui um haplótipo. Os genes do complexo HLA são co-dominantes, isto é, tanto os de origem paterna como os de origem materna se expressam na membrana celular. O conjunto de haplótipos paterno e materno constitui o genótipo. Assim, cada indivíduo apresenta dois haplótipos, um de origem paterna e outro de origem materna. Por herança mendeliana simples, há

25% de probabilidade de dois irmãos apresentarem dois haplótipos comuns (HLA idênticos), 50% de probabilidade de apresentarem um haplótipo comum (HLA haploidentícos) e 25% de probabilidade de não apresentarem identidade (HLA distintos).

O polimorfismo do complexo HLA é enorme, cada loco HLA (A, B, C, DR, DQ e DP) pode ser ocupado alternativamente por uma série de genes alélicos. Esses são os locos codificadores de proteínas mais polimórficos conhecidos até agora (KLEIN, 1979; DAUSSET, 1981; KLEIN, 1986). Há evidências moleculares e de genética populacional de que essa diversidade genética é mantida por seleção natural atuando em longos períodos de tempo (McCONNELL et al., 1988; HUGHES & NEI, 1988; HUGHES & NEI, 1989; POTTS & WAKELAND, 1990; KLEIN et al., 1993). A seleção natural é mantida pelo polimorfismo decorrente da função central dos genes HLA, pelo desencadeamento do reconhecimento imune, gerado a partir de agentes infecciosos que induzem a diversificação evolutiva dos genes HLA (LAWLOR et al., 1990; HILL et al., 1991; KLEIN & O'HUIGIN, 1994). O polimorfismo HLA é tão notável que freqüentemente a heterozigose, em populações acasaladas ao acaso, aproxima-se de 100%. É praticamente impossível encontrar dois indivíduos, não aparentados, portando o mesmo genótipo HLA (MUSSATI & DE LIMA, 1989).

Além da diversidade e do polimorfismo dos genes, outra característica do complexo HLA é a ocorrência de associações preferenciais entre alelos de locos diferentes. Esse fenômeno é chamado de desequilíbrio de ligação. Um desequilíbrio de ligação fica caracterizado quando a freqüência concomitante de dois ou mais alelos em um mesmo haplótipo é significativamente maior do que o esperado no caso de distribuição ao acaso (BAUR et al., 1984).

A diversidade de genes, o polimorfismo, a herança mendeliana simples e a participação de genes HLA na resposta imune constituem as principais características que tornam o complexo HLA extremamente atraente sob o ponto de vista de estudos de doenças.

Foram descritas muitas associações importantes entre antígenos

HLA e várias doenças (TIWARI & TERASAKI, 1985; MUSSATI & DE LIMA, 1989). O exemplo clássico de associação é o da espondilite anquilosante com o antígeno HLA-B27 que está presente em 93% dos pacientes e somente em 5 a 8 % dos controles (BREWERTON et al., 1973; SCHLOSSTEIN et al., 1973; TIWARI & TERASAKI, 1985). Atualmente, sabe-se que essa associação é devida ao fato de que todos alelos que determinam o fenótipo HLA-B27 têm, na sua fenda de apresentação antigênica, nove aminoácidos, sendo o segundo aminoácido uma arginina que, quando reconhecida pelo linfócito T CD8⁺, está diretamente envolvida no aparecimento da doença. Assim, pode-se concluir que a própria molécula HLA-B27 proporciona a predisposição genética para o desenvolvimento da espondilite anquilosante (THORSBY, 1995; EDWARDS et al., 2000).

As doenças infecciosas são a principal causa de morbidez e morte prematura nos países em desenvolvimento. Ainda que para algumas doenças infecciosas um gene principal de suscetibilidade tenha sido proposto, a suscetibilidade para o agente infeccioso bem como a patogênese da doença são geralmente características multifatoriais. Em alguns casos, o componente genético permanece desconhecido, mas para a maioria das doenças os genes têm sido identificados (PETZEL-ERLER, 1999).

Apesar das várias associações descritas, muitas questões sobre os mecanismos de suscetibilidade permanecem obscuras. No entanto, há evidências de que não é o mesmo loco gênico envolvido e nem é o mesmo mecanismo que atua nas diversas patologias, o que evidencia que os genes HLA não somente conferem resposta imune protetora, mas também podem influenciar na indução imunopatológica da doença (APANIUS et al., 1997).

Segundo THORSBY (1995), antes da realização de estudos direcionados para desvendar quais os mecanismos podem agir nos diferentes tipos de associações, deve-se estabelecer quais genes do complexo HLA são os responsáveis pela determinação da suscetibilidade ou proteção à doença, ou seja, se são os genes codificadores de moléculas HLA apresentadoras de peptídeos ou as próprias moléculas HLA codificadas (associação primária), ou mesmo outros genes do complexo em desequilíbrio de ligação (associação secundária).

Na investigação da relação entre HLA e doenças, duas abordagens podem ser utilizadas: análise de associação (estudo populacional) e análise de cossegregação ou ligação (estudo familiar).

A análise de associação consiste na comparação das frequências dos antígenos entre pacientes e controles, sendo ambos os grupos constituídos por indivíduos não aparentados e de mesmo grupo étnico (TIWARI & TERASAKI, 1985). Pelo cálculo do risco relativo, pode-se estimar a força da associação. O risco relativo indica quantas vezes um indivíduo portador do antígeno em questão é mais suscetível à doença do que um indivíduo não-portador desse antígeno (SVEJGAARD et al., 1983; SVEJGAARD & RYDER, 1994).

O estudo familiar é um método para a verificação de genes de suscetibilidade a doenças dentro ou próximos do complexo HLA por análise de ligação. Pela análise de ligação, utilizando-se famílias em que há mais de um irmão afetado, compara-se a ocorrência da doença à herança dos haplótipos HLA (CUDWORTH & WOODROW, 1975; GREEN & WOODROW, 1977).

O método de ligação permite avaliar o caráter recessivo ou dominante do gene de suscetibilidade e não há necessidade de homogeneidade étnica entre as famílias estudadas. Além disso, permite detectar genes de suscetibilidade mesmo que não correspondam a genes HLA conhecidos e/ou não estejam em desequilíbrio de ligação com os mesmos e pode auxiliar na localização do gene dentro do complexo HLA, desde que algum irmão afetado apresente recombinação entre os genes do complexo HLA (HORS, 1985).

Quando não há relato de recorrência familiar da doença a ser estudada e o trabalho for pioneiro, deve-se utilizar a análise de associação.

1.3. COMPLEXO HLA E DOENÇA DE JORGE LOBO

Sabe-se que a maioria das doenças associadas com o complexo HLA resulta da interação entre vários fatores genéticos e o meio ambiente (THORSBY & RÖNNINGER, 1993). Na paracoccidiodomicose (Pbmicose), está

caracterizada a influência dos fatores ambientais, geográficos e das condições de vida no seu aparecimento (FAVA NETO et al., 1965). Na literatura consultada, encontram-se cinco trabalhos sugerindo associações entre Pbmicoose e antígenos do complexo HLA.

Um trabalho realizado na Colômbia relata associação entre os antígenos HLA-B13 e HLA-A9 que predispõem à Pbmicoose. Verificou-se também que o HLA-A9 apresenta-se com maior frequência nos pacientes que mostram a forma pulmonar progressiva da doença, evidenciando assim que a presença deste antígeno pode influenciar a suscetibilidade e a evolução clínica da doença (RESTREPO et al., 1983). Outro estudo, realizado na Venezuela, indica associação com o antígeno HLA-B12, mas nenhuma correlação com HLA-A9 (GONZÁLEZ et al., 1983).

Na população da região de Curitiba (Estado do Paraná), observou-se uma frequência aumentada do antígeno HLA-B40 (LACERDA et al., 1988), por outro lado, VISENTAINER et al. (1993) não observaram qualquer associação entre antígenos HLA e Pbmicoose, no estudo de amostra populacional brasileira da região de Londrina (Estado do Paraná).

Outro trabalho realizado na população brasileira, na região de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo), também verificou frequência aumentada do antígeno HLA-B40 e do antígeno HLA-Cw1, todavia, sem correlação com a forma clínica da doença (GOLDANI et al., 1991).

Apesar dos resultados conflitantes, SAN-BLAS (1993) acredita na participação do complexo HLA na suscetibilidade genética da Pbmicoose e considera que as diferenças étnicas dessas associações são muito importantes.

O *L. loboi* e o *P. brasiliensis* apresentam grande semelhança filogenética e possuem muitos antígenos em comum (HERR et al., 2001), além disso, a prevalência exclusiva da doença de Jorge Lobo na região amazônica brasileira e a particularidade de sua alta incidência em uma única tribo indígena sugerem que aspectos genéticos possam atuar na suscetibilidade ou proteção à doença.

Não existe, até o momento, nenhum estudo sobre os possíveis

INTRODUÇÃO

fatores do hospedeiro que atuariam no aparecimento da doença, principalmente com relação aos fatores genéticos, e não há relatos de recorrência familiar (DIAS et al., 1970). Por isso, neste caso, considerando-se que a investigação é pioneira, o mais recomendado é o estudo de associação.

Desta forma, decidiu-se investigar a frequência de antígenos do complexo HLA em pacientes brasileiros com a doença de Jorge Lobo, comparada à frequência da população controle.

2. OBJETIVOS

1. Pesquisar a frequência de antígenos do complexo HLA (classe I e classe II) em pacientes brasileiros portadores de doença de Jorge Lobo e em população controle.
2. Comparar os resultados obtidos para se verificar se há ou não associação.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. CASUÍSTICA

Foram estudados 21 pacientes caucasóides brasileiros, portadores da doença de Jorge Lobo, oriundos do Estado do Acre, que estavam se submetendo a exames clínicos-laboratoriais e a tentativas terapêuticas no Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru, S.P.

Como grupos controles, foram analisadas amostras de duas populações: caucasóides do Estado do Acre, tipadas para antígenos HLA-DR,-DQ; e os dados da população brasileira para antígenos HLA-A,-B,-DR,-DQ publicados no 11th IHW – Japão.

3.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

Tipagem HLA Classe I

Foi realizada pela técnica de microlinfocitotoxicidade mediada por complemento (TERASAKI et al., 1978), utilizando-se duas baterias de placas prontas com anti-soros, adquiridas da One-lambda – USA, sendo uma bateria com anti-soros policlonais e outra com anti-soros monoclonais (esta última utilizada para confirmação de tipagem duvidosa).

Coleta de sangue: Foram coletados 10ml de sangue venoso periférico, em tubo de coleta a vácuo descartável, contendo anticoagulante ACD (ácido cítrico e dextrose).

Separação de linfócitos: A separação de linfócitos do sangue venoso periférico foi realizada pela utilização de partículas imunomagnéticas com anticorpo monoclonal ligado à sua superfície que se ligam ao receptor CD2 dos

MATERIAL E MÉTODO

linfócitos T – “imunobeads T”, adquiridos da One-lambda – USA, conforme descrito a seguir:

Colocar em tubo de vidro 2ml de sangue total e adicionar 100µl de imunobeads T. Homogeneizar por inversão 2-3 vezes e, após 3 minutos em temperatura ambiente, acrescentar 2ml da solução fixadora (kit) e colocar o tubo no magneto (ímã) por 3 minutos. Remover o sobrenadante e descartá-lo com pipeta Pasteur. Retirar o tubo do magneto, ressuspender as células (ligadas aos beads) com 2ml de solução de NaCl 0,9% e homogeneizar (lavagem). Colocar o tubo no magneto por 1 minuto e repetir a lavagem com NaCl 0,9%. Ao final, ressuspender as células com meio de cultura Mc Coy 5A ou RPMI 1640 e acertar a concentração para $2-3 \times 10^6$ linfócitos/ml, em câmara de Neubauer.

Tipagem HLA: Após descongelamento das placas, adicionar às escavações contendo os anti-soros, 1µl da suspensão de células T, separadas anteriormente, e incubar por 30 minutos a 25°C. A seguir, acrescentar 5µl de soro de coelho como fonte de complemento (One-lambda - USA / classe I) e incubar por 60 minutos a 25°C. Decorrido o tempo necessário, retirar o excesso de soro pela inversão brusca da placa e acrescentar o corante específico – Brometo de Etídeo e Orange de Acridina, adquiridos da One-lambda - USA, comercialmente denominado FluoroQuench AO/EB. A leitura foi realizada quando decorridos pelo menos 15 minutos da aplicação do corante em microscópio, com aparelho para imunofluorescência e contraste de fase.

Os resultados foram anotados em protocolo (anexo), atribuindo-se os seguintes escores:

Morte celular	Escore	Interpretação
0 – 10	1	Negativo
11-20	2	Negativo duvidoso
21-40	4	Positivo duvidoso
41-80	6	Positivo
81-100	8	Positivo forte
-	0	Teste prejudicado

Tipagem HLA classe II

Foi realizada por técnica de polimorfismo de DNA, pelo método de PCR-SSP (reação da polimerase em cadeia, com primers de sequência-específica), utilizando-se kits de baixa e alta resolução, adquiridos da One-lambda – USA.

Coleta de sangue: Foram coletados 5ml de sangue venoso periférico em tubo de coleta a vácuo descartável, contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético).

Extração do DNA: A extração do DNA foi realizada pela técnica de “Salting-out” (MILLER et al., 1988), como descrito a seguir:

Centrifugar o sangue por 25 minutos a 1500rpm. Após centrifugação, retirar e desprezar o plasma, recuperar o anel de leucócitos em 2 tubos tipo Eppendorff® (capacidade de 2ml) com 0,7ml de tampão para lise de células vermelhas (reagente 1), homogeneizar em vortex aproximadamente 10 segundos e centrifugar por 2 minutos a 12.000rpm. Retirar o tubo da centrífuga, desprezar o sobrenadante, ressuspender o botão em 1ml de tampão de lise de células vermelhas, homogeneizar em vortex por aproximadamente 10 segundos e novamente centrifugar por 2 minutos a 12.000rpm. Repetir esse passo até obter lise de todas as hemácias. A última lavagem deverá ser realizada com água pura (Milli Q). Depois de se obter o botão de leucócitos, retirar e desprezar a água, secando bem, acrescentar 0,04ml de tampão Proteinase K 5X (reagente 2), 0,03ml de proteinase K (reagente 3), 0,02ml de SDS 20% (reagente 4) e 0,24ml de água pura. Homogeneizar em vortex fortemente e incubar 30 minutos a 55°C em banho-maria (B.M.), agitando-se o tubo com intervalos de 15 minutos. Retirar do B.M., acrescentar 0,1ml de NaCl 6M (reagente 5) e homogeneizar em vortex. Centrifugar por 6 minutos a 13.000rpm. Após centrifugação, transferir o sobrenadante para outro tubo pela inversão e dobrar o volume obtido com etanol

MATERIAL E MÉTODO

absoluto (MERCK). Homogeneizar gentilmente pela inversão por 30 segundos e centrifugar por 1 minuto a 13.000rpm. Retirar da centrifuga, desprezar o sobrenadante e acrescentar 1ml de etanol a 70%, agitar manualmente e centrifugar por 1 minuto a 13.000rpm. Finalmente, desprezar todo o sobrenadante cuidadosamente e, depois de retirar todo o álcool, reconstituir com 0,03 – 0,08ml de água pura.

A verificação da concentração e da pureza deverá ser feita em espectrofotômetro com luz ultravioleta (260nm e 280nm) e a concentração final acertada para 100ng/μl.

Tipagem HLA: A técnica da PCR foi realizada como segue:

Retirar do kit o material necessário para o número de tipagens a serem realizadas e, após descongelamento, homogeneizar o mixer (kit) com os nucleotídeos em vortex. Dispensar no microtubo controle negativo 1μl de DNA extraído e 9μl de mixer. Depois, acrescentar ao mixer 10μl de DNA extraído e 2μl da enzima Taq Polimerase (Perkin-Elmer) – solução de mixer. Homogeneizar em vortex. Na placa com os microtubos, já contendo os primers específicos, dispensar 10μl da solução de mixer. Vedar bem toda a placa e colocar no termociclador (Perkin-Elmer 9600) seguindo o programa:

Número de ciclos	Passo	Temperatura (°C)	Tempo (Seg.)
01	01	94	130
	02	63	60
09	01	94	10
	02	63	60
20	01	94	10
	02	59	50
	03	72	30
Final	01	04	-

Retirar a placa de microtubos do termociclador, transferir 10μl da reação PCR, na seqüência, para gel de agarose 2,5% (SIGMA) acrescido de

10µl Brometo de Etídeo 0,01% (SIGMA), utilizando-se o equipamento Micro SSP Gel System (One-lambda – USA). Correr eletroforese em tampão TBE (reagente 6) por 4-7 minutos a 150 volts. Fotografar o gel sobre o transiluminador UV. A leitura final foi anotada nos protocolos que acompanham o kit (anexo).

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado o estudo de associação entre doença de Jorge Lobo e complexo HLA pela análise das frequências dos antígenos (HLA) observadas em pacientes e controles pelo Teste Exato de Fisher. No caso de associações significantes ($P \leq 0,05$), foi calculado o risco relativo (RR), segundo a fórmula:

$$RR = \frac{\text{nº de pacientes com marcador} \times \text{nº de controles sem marcador}}{\text{nº de pacientes sem marcador} \times \text{nº de controles com marcador}}$$

Os valores corrigidos de P (Pc) foram calculados multiplicando-se o valor de P pelo número de antígenos testados (SVEJGAARD & RYDER, 1977).

4. RESULTADOS

Os fenótipos HLA dos 21 pacientes portadores da doença de Jorge Lobo estão apresentados na tabela 1.

As frequências antigênicas observadas nos pacientes e nos controles do Acre são apresentados na tabela 2.

Na tabela 3, estão as frequências antigênicas observadas nos pacientes e nos controles da população brasileira.

Os valores exatos de P e Pcorrigido (Pc) resultantes da comparação entre pacientes e controles do Acre são mostrados na tabela 4. Os valores exatos de P, Pc e risco relativo (RR), concernentes a associações significativas resultantes da comparação entre pacientes e controles da população brasileira, encontram-se na tabela 5.

A diferença mais importante foi com relação ao HLA-DQ3, presente em 57,1% dos pacientes, sendo que sua frequência na população brasileira é de 13,8% ($P = 1,2 \times 10^{-5}$; $Pc = 11,04 \times 10^{-4}$ e $RR = 8,4$). Entretanto, na comparação entre pacientes e população do Acre, esse dado não é significativo estatisticamente.

Comparando-se pacientes com controles da população brasileira, foram encontradas também frequências aumentadas do HLA-B40 (23,8% nos pacientes e 8,0% nos controles), do HLA-DR2 (42,9% nos pacientes e 21,2% nos controles) e do HLA-DQ1 (85,7%, nos pacientes e 50,0%, nos controles); frequências diminuídas do HLA-DR5 (9,5% nos pacientes e 44,0% nos controles) e do HLA-DR7 (0,0% nos pacientes e 29,0% nos controles). O HLA-DR7 também se encontra diminuído quando se compara pacientes e grupo controle do Acre (0,0% nos pacientes e 18,0% nos controles). Todavia, os valores de P não permaneceram significativos após a correção para o número de antígenos testados (Pc).

Tabela 1 – Fenótipos HLA dos 21 pacientes portadores da micose de Jorge Lobo.

Pac.	HLA – A		HLA - B		HLA - DR		HLA – DQ	
1	69	31	57	61	04	08	03	04
2	02	-	50	61	01	04	03	05
3	02	30	51	57	03	-	02	-
4	02	03	07	38	15	14	05	06
5	03	29	07	-	15	09	02	06
6	02	68	44	75	13	08	03	06
7	25	32	44	35	01	04	03	05
8	02	-	51	17	11	-	03	05
9	24	31	62	35	01	11	05	-
10	02	03	60	-	08	15	02	05
11	28	11	07	14	01	15	05	06
12	30	33	51	14	13	15	03	06
13	02	69	27	-	03	13	03	06
14	02	24	44	35	13	14	03	06
15	02	24	35	60	04	-	03	-
16	02	03	42	52	08	15	03	05
17	01	03	18	57	01	04	03	05
18	02	29	44	60	13	15	03	06
19	29	31	35	62	04	16	03	-
20	02	10	44	39	01	04	05	-
21	02	30	07	39	09	16	02	05

Tabela 2 - Frequência fenotípica dos antígenos HLA –DR e DQ em 21 pacientes portadores da micose de Jorge Lobo e em controles da população do Estado do Acre

HLA	JL ^I	Acre ^{II}
DR1	28,6	20,0
DR2	42,9	36,0
DR3	9,5	16,0
DR4	33,4	34,0
DR5	9,5	14,0
DR6	33,4	30,0
DR7	0,0	18,0
DR8	19,0	16,0
DR9	9,5	4,0
DR10	0,0	4,0
DR11 ₅	9,5	14,0
DR12 ₅	0,0	0,0
DR13 ₆	23,8	20,0
DR14 ₆	9,5	6,0
DR15 ₂	33,4	18,0
DR16 ₂	9,5	18,0
DQ1	85,7	62,0
DQ2	23,8	28,0
DQ3	57,1	74,0
DQ4	4,8	20,0
DQ5	47,7	32,0
DQ6	38,0	30,0

^I JL: doença de Jorge Lobo

^{II} Acre: controles da população do Estado do Acre N=50

Tabela 3 - Frequência fenotípica dos antígenos HLA – A, B, DR e DQ em 21 pacientes portadores da micose de Jorge Lobo e em controles da população brasileira.

HLA	JL	BR ^{III}	HLA	JL ^{IV}	BR	HLA	JL	BR
A1	4,8	17,5	B17	14,3	6,7	B70	0,0	2,0
A2	62,0	45,0	B18	4,8	9,0	B73	0,0	0,0
A3	24,0	13,2	B21	4,8	10,2	B75 ₁₅	4,8	1,6
A9	14,3	24,7	B22	0,0	4,3	B76 ₁₅	0,0	0,0
A10	9,5	16,9	B27	4,8	6,7	B81	0,0	-
A11	4,8	9,5	B35	23,8	25,7			
A19	52,4	40,8	B37	0,0	2,0	DR1	28,6	16,6
A23 ₉	0,0	6,1	B38 ₁₆	4,8	6,8	DR2	42,9	21,2
A24 ₉	14,3	18,6	B39 ₁₆	9,5	9,7	DR3	9,5	17,7
A25 ₁₀	4,8	5,3	B40	23,8	8,0	DR4	33,4	20,9
A26 ₁₀	0,0	10,3	B41	0,0	2,6	DR5	9,5	35,9
A28	19,0	13,0	B42	4,8	1,0	DR6	33,4	24,8
A29 ₁₉	14,3	9,0	B44 ₁₂	23,8	21,1	DR7	0,0	23,0
A30 ₁₉	14,3	10,5	B45 ₁₂	0,0	3,2	DR8	19,0	11,3
A31 ₁₉	14,3	9,7	B46	0,0	0,0	DR9	9,5	4,3
A32 ₁₉	4,8	6,0	B47	0,0	0,0	DR10	0,0	3,9
A33 ₁₉	4,8	5,6	B48	0,0	0,0	DR11 ₅	9,5	29,1
A34 ₁₀	0,0	1,3	B49 ₂₁	0,0	6,1	DR12 ₅	0,0	6,8
A36	0,0	0,6	B50 ₂₁	4,8	4,1	DR13 ₆	23,8	20,9
A43	0,0	0,0	B51 ₅	14,3	13,0	DR14 ₆	9,5	3,9
A66 ₁₀	0,0	-	B52 ₅	4,8	3,3	DR15 ₂	33,4	15,9
A68 ₂₈	4,8	-	B53	0,0	2,3	DR16 ₂	9,5	5,3
A69 ₂₈	9,5	-	B54 ₂₂	0,0	0,4			
A74 ₁₉	0,0	-	B55 ₂₂	0,0	3,9	DQ1	85,7	61,3
			B56 ₂₂	0,0	0,0	DQ2	23,8	32,7
B5	19,0	16,3	B57 ₁₇	14,3	4,5	DQ3	57,1	13,8
B7	19,0	10,5	B58 ₁₇	0,0	2,2	DQ4	4,8	12,7
B8	0,0	8,8	B60 ₄₀	14,3	3,9	DQ5	47,7	-
B12	23,8	24,3	B61 ₄₀	9,5	4,1	DQ6	38,0	-
B13	0,0	2,2	B62 ₁₅	9,5	8,4			
B14	9,5	9,5	B63 ₁₅	0,0	1,3			
B15	14,3	11,3	B64 ₁₄	0,0	-			
B16	14,3	16,5	B65 ₁₄	0,0	-			

^{III} BR: controles da população brasileira; N = 307.

^{IV} JL: doença de Jorge Lobo.

Tabela 4 - Diferenças estatísticas significativas observadas nas frequências de antígenos HLA entre pacientes (JL) e controles da população do Estado do Acre (Ac).

HLA	Freq. JL %	Freq. Ac %	P	Pc
DR7	0,0	18,0	0,049	1,100 ns

P = valor de P, teste exato de Fisher; $P \leq 0,05$

Pc = P corrigido; $P \leq 0,05$

ns = não-significante.

Tabela 5 - Diferenças estatísticas significativas observadas nas frequências de antígenos HLA entre pacientes (JL) e controles da população brasileira (BR).

HLA	Freq JL %	Freq BR %	P	Pc
B40	23,8	8,0	0,032	2,944 ns
DR2	42,9	21,2	0,030	2,760 ns
DR5	9,5	44,0	0,015	1,380 ns
DR7	0,0	29,0	0,010	0,920 ns
DQ1	85,7	50,0	0,033	3,036 ns
DQ3	57,1	13,8	$1,2 \times 10^{-5}$	$11,04 \times 10^{-4}$

P = valor de P, teste exato de Fisher; $P \leq 0,05$

Pc = P corrigido; $P \leq 0,05$

ns = não-significante.

5. DISCUSSÃO

A doença de Jorge Lobo é uma micose rara, que ocorre predominantemente na região amazônica brasileira, causada pelo fungo *L. loboi*. São poucos os estudos que avaliam as alterações imunológicas do paciente portador dessa micose, e também não se conhecem os fatores relacionados à predisposição ou à proteção ao aparecimento da doença nos indivíduos afetados.

Nesse trabalho, as frequências dos antígenos HLA-A,-B,-DR e – DQ foram determinadas em todos os 21 pacientes com doença de Jorge Lobo examinados no Instituto Lauro de Souza Lima. Dos pacientes estudados, 20 eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino, o que mostra maior prevalência da doença em adultos do sexo masculino. Essa incidência pode ser explicada pelo fato de o homem dedicar-se mais às atividades rurais que as mulheres, ficando, assim, diretamente em contato com o agente etiológico. O principal objetivo foi investigar a relação entre antígenos do complexo HLA e doença de Jorge Lobo, para verificar se esses antígenos influenciam na suscetibilidade e/ou proteção à doença.

Como grupo controle, inicialmente, analisou-se uma amostragem da população do Acre. Entretanto, considerando-se que o número de pessoas que constituem essa amostra é pequeno, decidiu-se analisar também amostra da população brasileira, pelos dados publicados no 11th IHW do Japão.

SVEJGAARD & RYDER (1977) sugerem, para que não aconteça um erro estatístico, que se multiplique o valor de P obtido pelo número de antígenos testados. Este P corrigido (Pc) visa a assegurar que os valores da probabilidade não estejam elevados ao acaso para qualquer um dos antígenos investigados. Na análise estatística desse estudo, tomou-se o cuidado de corrigir o valor de P para o número de antígenos testados (92 para população brasileira e 22 para população do Acre).

A comparação das frequências dos antígenos do complexo HLA observadas nos pacientes, com as determinadas no grupo controle do Acre, não

revelou qualquer tipo de associação entre antígenos do complexo HLA e doença de Jorge Lobo ($P_c \geq 0,05$). Embora a análise estatística não seja significativa ($P_c \geq 0,05$), é importante ressaltar a diminuição na frequência do antígeno HLA-DR7 comparada ao grupo controle do Acre (0,0% x 18,0%), porque, talvez, com uma amostra maior de pacientes e controles, seja possível evidenciar uma associação protetora entre HLA-DR7 e doença de Jorge Lobo.

No entanto, a comparação das frequências dos antígenos HLA, observadas entre pacientes e grupo controle da população brasileira, revelou associação entre HLA-DQ3 e doença de Jorge Lobo ($P_c = 11,04 \times 10^{-4}$ e $RR = 8,4$). O antígeno HLA-DQ3 foi detectado em 57,1% dos pacientes com doença de Jorge Lobo, sendo 13,8% a frequência desse antígeno na população brasileira.

Esse dado não foi verificado na comparação entre pacientes com doença de Jorge Lobo e grupo controle do Acre, talvez, porque, nessa população, a frequência esperada do antígeno HLA-DQ3 é de 74,0%, enquanto que na população brasileira é de 13,8%. Isto, provavelmente, seja decorrente do grupo controle utilizado ser pequeno (50 indivíduos) ou até mesmo porque o HLA-DQ3 apresente frequência elevada nessa população em particular.

Observou-se também frequência aumentada do antígeno HLA-B40 (23,8% x 8,0%), HLA-DR2 (42,9% x 21,2%) e HLA-DQ1 (85,7% x 50,0%), entretanto, sem significado estatístico ($P_c \geq 0,05$). Com relação à frequência diminuída dos antígenos HLA-DR5 (9,5% x 44,0%) e HLA-DR7 (0,0% x 29,0%), eles igualmente não permaneceram estatisticamente significativos após a correção do valor de P.

A associação entre HLA-DQ3 e doença de Jorge Lobo, sugerida no presente trabalho, representa a primeira descrição dessa associação na literatura consultada.

A doença de Jorge Lobo é causada pelo fungo *Lacazia loboi* (*L. loboi*), que se assemelha filogeneticamente e antigenicamente ao *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) que é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (Pbmicosse) (HERR et al., 2001; SILVA et al., 1972).

Os poucos trabalhos realizados na tentativa de se evidenciar

associação entre antígenos HLA e Pbmicose mostram controvérsias e não esclarecem o mecanismo imunológico envolvido nas associações propostas. O trabalho de RESTREPO et al., realizado em 1983 na Colômbia, mostrou frequência aumentada dos antígenos HLA-B13 e HLA-A9, sugerindo que eles dariam suscetibilidade e influenciariam na evolução das diferentes formas clínicas da doença. Já o trabalho de GONZÁLEZ et al. (1983), realizado no mesmo ano na Venezuela, apenas revelou possível associação com o antígeno HLA-B12. Contudo, em nenhum desses trabalhos foi calculado o valor de P_c , invalidando assim essas propostas de associação, segundo os critérios estatísticos exigidos para se verificar associação HLA e doenças.

No Brasil, encontram-se relatos de três trabalhos semelhantes aos anteriores, sendo que dois deles foram realizados em populações muito próximas do ponto de vista étnico e geográfico, mas mostraram resultados opostos. LACERDA et al. (1988) estudaram população de pacientes atendidos na cidade de Curitiba – PR; VISENTAINER et al. (1993) estudaram pacientes atendidos na cidade de Londrina, também no estado do Paraná. Contudo, os resultados de LACERDA et al. (1988) mostraram frequência aumentada do antígeno HLA-B40 e os de VISENTAINER et al. (1993) não relataram qualquer tipo de associação entre antígenos HLA e Pbmicose. Por outro lado, o estudo de GOLDANI et al. (1991), realizado no estado de São Paulo, com pacientes atendidos na cidade de Ribeirão Preto, evidenciou frequência aumentada do antígeno HLA-B40, confirmando os dados obtidos por LACERDA et al em 1988. Essas diferentes associações propostas talvez possam ser explicadas: pelas diferenças entre o número de alelos estudados, pois esses influenciam diretamente o valor de P_c ; pela especificidade dos soros utilizados na identificação desses alelos (monoclonais ou policlonais), o que gera resultados controversos devido aos grupos de reações cruzadas existentes entre os antígenos do complexo HLA; ou mesmo pelo número de pacientes e controles utilizados nos trabalhos que estudam associação HLA e doenças, o que leva a falsas associações resultantes da estratificação ou seleção inadequada, principalmente dos controles (PETZEL-ERLER, 1999; APANIUS et al., 1997).

O polimorfismo dos genes do complexo HLA está caracterizado pelo número extremamente alto de alelos, pela uniformidade das frequências alélicas dentro de uma mesma população e pelas diferenças genéticas entre grupos isolados (PETZEL-ERLER, 1999).

Com relação ao estudo de associação entre HLA e Pbmicose, os dados da literatura são controversos tanto no que dizem respeito a uma associação consistente entre HLA e doença, quanto nas diferenças das frequências alélicas observadas em uma mesma população.

Apesar da grande semelhança entre os fungos *L. loboi* e *P. brasiliensis*, não foram encontrados, nessa pesquisa com doença de Jorge Lobo, dados que concordem com as associações já descritas entre HLA e Pbmicose.

A associação entre HLA-DQ3 e doença de Jorge Lobo que foi encontrada pode ser verdadeira, isto é, o antígeno HLA-DQ3 talvez seja marcador de suscetibilidade da doença. Entretanto, o fenótipo HLA-DQ3 apresenta “splits” ou subdivisões (DQ7, DQ8 e DQ9), as quais são codificadas por pelo menos 8 alelos diferentes, o que direciona a continuidade da pesquisa na identificação do grau de associação com os diferentes alelos gênicos na população de pacientes com doença de Jorge Lobo.

Além disso, a molécula DQ apresenta polimorfismo em ambas as cadeias que a constituem e, como já descrito em outras patologias, como a doença celíaca, a associação é resultante da expressão conjunta de cadeias α e β específicas e não da expressão de um fenótipo em particular (THORSBY, 1995). Assim, torna-se necessário identificar a homologia entre as cadeias α e β , que constituem o fenótipo HLA-DQ3, observada nos pacientes aqui estudados com doença de Jorge Lobo.

Outra hipótese é de que a associação HLA-DQ3 não seja verdadeira, isto é, que não seja esse o marcador de suscetibilidade, mas um gene ou outro produto gênico, codificado por alelos localizados na região do complexo HLA, e que apresentam desequilíbrio de ligação com os genes HLA.

Sabe-se, também, que a manifestação clínica das doenças infecciosas, na maioria das vezes, resulta da somatória de fatores como a

complexidade do agente etiológico, a predisposição genética do hospedeiro e da influência de fatores ambientais. A suscetibilidade para agentes infecciosos difere entre indivíduos, dependendo principalmente das variações do hospedeiro, como, por exemplo, o estado de saúde, a idade e o “background” genético.

Ainda que para algumas doenças infecciosas um gene principal de suscetibilidade tenha sido proposto, a suscetibilidade para o agente infeccioso, bem como a patogênese da doença, são, geralmente, características multifatoriais, como explicado anteriormente. Em alguns casos, o componente genético não foi esclarecido, mas, para a maioria das doenças, os genes, seus produtos e o mecanismo de atuação estão sendo identificados. Dos genes que atuam na resposta imune, o HLA parece estar mais relacionado à modulação da forma e manifestação clínica da doença do que à suscetibilidade para infecção propriamente dita. Como exemplo, pode-se citar a Pbmicose (RESTREPO et al., 1983) e a Hanseníase (SCHURR et al., 1991; ROY et al., 1999). A modulação da forma e a manifestação clínica da doença dependem dos genes atuantes na imunidade inata, mas mecanismos protetores e de suscetibilidade dependem, provavelmente, de outros genes envolvidos e da natureza do patógeno (PETZEL-ERLER, 1999).

Acredita-se que pesquisas planejadas a partir de questionamentos clínicos e epidemiológicos, como foi o caso do presente trabalho, abrem muitas perspectivas para o melhor entendimento das doenças e de seus marcadores genéticos de suscetibilidade e/ou proteção. É necessário prosseguir nessa linha de investigação, objetivando contribuir para um maior conhecimento da doença de Jorge Lobo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem uma associação entre os antígenos HLA-DQ3 e doença de Jorge Lobo, quando se comparam pacientes e controles da população brasileira.

São necessários novos trabalhos com maior número de pacientes e com metodologia adequada na identificação dos alelos que codificam o fenótipo HLA-DQ3 e suas subdivisões, para que sejam obtidos melhores resultados.

7. SUMMARY

Jorge Lobo's disease is a rare mycosis whose causative agent is the *Lacazia loboi* (*L. loboi*), a fungi antigenically and phylogenetically similar to the *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). Due to its epidemiological characteristics and the lack of studies related to the immunological aspects of this disease, our objective was to perform HLA class I and II typing in 21 Jorge Lobo's disease patients and compare their frequency with the healthy population. The Class I HLA typing was done through the lymphotoxicity technique, and the class II HLA determined by the PCR-SSP method. Two control populations were used, one from the state of Acre and the Brazilian population data published at the 11 (IHW) in Japan.

Our work suggests the first association proposed between antigen and Jorge Lobo's disease, specifically the DQ3-HLA, when patients were compared with Brazilian population. However, no association could be demonstrated when patient were compared with the population from Acre. We believe that a larger sample and the use of a method for identification of phenotype DQ-3 encoding allele would give us more detailed results.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBAS, A.K., LINCHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. 553p.

AMOS, D.B., COHEN, I., KLEIN, W.J. Mechanisms of immunologic enhancement. **Transpl. Proc.**,v. 2, p.68-69, 1970.

APANIUS, V., PENN, D., SLEV, P.R., RUFF, L.R., POTTS, W.K. The nature of selection on the major histocompatibility complex. **Crit. Rev. Immunol.**, v.17, p.179-224, 1997.

BARBOSA, S.F.C., TAKEDA, A.K., CHACHA, J., CUCÊ, L.C, FAVA NETTO, C. Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioides brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 41, p. 121-6, 1981.

BARUZZI, R.G., CASTRO, R.M., D'ANDRETTA Jr., C.,CARVALHAL, S., RAMOS, O.L., PONTES, P.L. Ocurrence of Lobo's blastomycosis among "Caiabi" Brazilian indians. **Int. J. Dermatol.**, v.12, p.95-98, 1973.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994, v2: Referências Bibliográficas.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARUZZI, R.G., LACAZ, C.S., SOUZA, F.A.A. História natural da doença de Jorge Lôbo. Ocorrência entre os índios Caiabi (Brasil Central). **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v.21, p.302-338, 1979.
- BARUZZI, R.G., MARCOPITO, L.F., MICHALANI, N.S., LIVIANU, J., PINTO, N.R.S. Early diagnosis and prompt treatment by surgery in Jorge Lobo's disease (Keloidal blastomycosis). **Mycopathologia**, v.74, p.51-4, 1981.
- BAUR, M.P., NEUGEBAUER, M., ALBERT, E.D. Reference tables of two-locus haplotype frequencies for all MHC marker loci. In: ALBERT, E.D., BAUR, M.P., MAYR, W.R., (Eds). **Histocompatibility testing 1984**. Berlim: Springer-Verlag, 1984. p. 677-755.
- BJØRKMAN, P.J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BENNET, W.S., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**. v. 329, p.506-512, 1987.
- BOSSART, G.D. Suspected acquired immunodeficiency in a Atlantic bottlenosed dolphin with chronic-active hepatitis and lobomycosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.185, p.1413-1414, 1984.
- BREWERTON, D.A., CAFFREY, M., HART, F.D., JAMES, D.C.O., NICHOLLS, A., STURROCK, R.D. Ankylosing spondylitis and HL-A27. **Lancet**. v.1, p. 904-907, 1973.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURNS, R.A., ROY, J.S., WOODS, C., PADHYE, A.A., WARNOCK, D.W. Report of the first human case of Lobomycosis in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.1283-5, 2000.

CALDWELL, D.K., CALDWELL, M.C., WOODARD, J.C., AJELLO, L., KAPLAN, N., McCLURE, H.M. Lobomycosis as a disease of the Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.24, p.105-114, 1975.

CUDWORTH, A.G., WOODROW, J.C. Evidence for HLA-linked genes in “juvenile” diabetes melitus. **Brit. Med. J.**, v.3, p.133-135, 1975.

DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. **Acta Haematol.**, v. 20, p.156-66, 1958.

DAUSSET, J. The major histocompatibility complex in man. **Science**, v.203, p.516, 1981.

DE VRIES, G.A., LAARMAN, J.J. A case of Lobo’s disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. **J. Aquat. Mammals**, v.1(3), p.26-33, 1973.

DIAS, L.B., SAMPAIO, M.M., SILVA, D. Jorge Lobo’s disease. Observations on its epidemiology and some unusual morphological forms of the fungus. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v.12, p.08-15, 1970.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EDWARDS, J.C.W., BOWNESS, P., ARCHER, J.R. Jekyll and Hyde: the transformation of HLA-B27. **Immunol. Today**, v.21, p.256-60, 2000.

FAVA NETO, C. CASTRO, R.M., GONÇALVES, A.P., DILLON, N.L. Ocorrência familiar de Blastomicose sul Americana. **Rev. Inst. Med Trop. São Paulo**, v. 7, p. 332-336, 1965.

FONSECA, O.J.M., LACAZ, C.S. Estudo de culturas isoladas de blastomicose queloidiforme (doença de Jorge Lobo). Denominação ao seu agente etiológico. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v.13, p.225-251, 1971.

FRAGA, S., MIRANDA, J.L. Keloidal blastomycosis (Jorge Lobo disease). In: CONGRESSUS INTERNATIONALIS DERMATOLOGIAE, 12, 1967, Munique. Anais, v.2, p.830-1.

GERMAIN, R.N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, v.76, p.287-299, 1994.

GERMAIN, R.N., MARGULIES, D.H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.11, p.403-450, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOLDANI, L.Z., MONTEIRO, C.M., DONADI, E.A., MARTINEZ, R., VOLTARELLI, J.C. HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 114, n.2, p.89-91, 1991.

GONZÁLEZ, N.M., ALBORNOZ, M., RIOS, R., PRADO, L. Paracoccidioidomycosis y su relación com el sistema HLA. In: ENCONTRO SOBRE PARACOCIDIOIDOMICOSE, 2 Anais.Botucatu, 1983. (Resumos adicionais)

GOODFELLOW, P.N., JONES, E.A., VAN HEININGEN, V., SOLOMON, E., BOBROW, M., MIGGIANO, V., BODMER, W.F. The $\beta 2$ microglobulin gene on chromossome 15, and not in the HL-A region. **Nature**. v.254, p.267-269, 1975.

GREEN, J.R., WOODROW, J.C. Sibling method for detecting HLA-linked genes in disease. **Tissue Antigens**, v.9, p.31-35, 1977.

HANSEN, T.H., CARRENO, B.M., SACHS, D.H. In: PAUL, W.E., ed. **Fundamental immunology**. 3 ed. New York: Raven Press, 1993. p.577-628

HERR, R.A., TARCHA, E.J., TABORDA, P.R.O., TAYLOR, J.W., AJELLO, L., MENDOZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic onygenales. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.309-14, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HILL, A.V.S., ALLSOPP, C.E.M., KWIATKOWSKI, D., ANSTEY, N.M., TWUMASI, P., ROWE, P.A., BENNETT, S., BREWSTER, D., McMICHAEL, A.J., GREENWOOD, B.M. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. **Nature**, v. 352, p.595, 1991.

HORS, J. HLA et maladies. In: DAUSSET, J. & PLA, M. (eds), **HLA Complexe Majeur d' histocompatibilité de l'homme**. Paris: Flammarion Medicine – Sciences, 1985, p. 227-256.

HUGHES, A.L., NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. **Nature**, v.335, p.167, 1988.

HUGHES, A.L., NEI, M. Nucleotide substitution at class II loci: evidence for overdominant selection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.958, 1989.

KAUFMAN, J.F., STROMINGER, J.L. HLA-DR light chain has a polymorphic N-terminal region and a conserved immunoglobulin - like C - terminal region. **Nature**, v. 297, p. 694-7, 1982.

KLEIN, J. The major histocompatibility complex of the mouse. **Science**, v.203, p.516, 1979.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KLEIN, J. FIGUEIROA, F. Evolution of the major histocompatibility complex. **Crit. Rev. Immunol.** v. 6, p.295-386, 1986.
- KLEIN, J., SATTA, Y., O'HUIGIN, C., TAKAHATA, N. The molecular descent of the major histocompatibility complex. **Annu. Rev. Immunol.**, v.11, p.269, 1993
- KLEIN, J., O'Huigin, C. MHC polymorphism and parasites. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v.346, p.351, 1994.
- KRENSKY, A.M., WEISSA, R., CRABTREE, G., DAVIS, M.M., PARHAM, P. - T-lymphocyte - antigens interactions in transplant rejection. **N. Engl. J. Med.**, 322: 510-17, 1990.
- LACAZ, C.S., BARUZZI, R.G., ROSA, M.C.B. **Doença de Jorge Lobo**. São Paulo: EDUSP, 1986. 92p.
- LACERDA, G.B., ARCE-GOMEZ, B., QUEIROZ TELLES FILHO, F. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med.Vet. Mycol.**, v.26, p.253-256, 1988.
- LAWLOR, D.A., WARREN, E., WARD, F.E., PARHAM, P. Comparison of class I alleles in human and apes. **Immunol. Rev.**, v.113, p.147, 1990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LOBO, J.O. Um caso de blastomicose produzido por uma espécie nova, encontrada em Recife. **Rev. Med. Pernambuco.** v.1, p.763-765,1931.
- MADEIRA, S., OPRMOLLA, D.V.A., BELONE, A.F.F., VILANI-MORENO, F.R. Inoculation of Balb/c mice with *Lacazia loboi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.42, p.239-43, 2000.
- McCONNEL, T.J., TALBOT, W.S., McINDOE, R.A., WAKELAND, E.K. The origin of MHC class II gene polymorphism within the genus, *Mus*. **Nature**, v.332, p.651, 1988.
- Mc DEVITT, H. O. Regulation of the immune response by the major histocompatibility system. **N. Engl. J. Med.**, v.303, p.1514-17, 1980.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S., CAMARGO, M.E., LACAZ, C.S., FERREIRA, A.W. Immuno-enzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.20, p.103-108, 1984.
- MIGAKI,G., VALERIO, M.G., IRVINE, B., GARDNER, F.M. Lobo's disease in Atlantic bottle-nosed dolphin. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.159, p.578-582, 1971.
- MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, p.1215-18, 1988.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MONACO, J.J. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. **Immunol. Today.**, v.13, p.173-179, 1992.

MORAES, M.A.P. Blastomicose tipo Jorge Lobo. Seis casos novos encontrados no Estado do Amazonas, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v.4, p.187-97, 1962.

MUNRO, A., BRIGHT, S. Products of the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response. **Nature.**, v.264, p.145-151, 1976.

MUSATTI, C.C., LOPES, R.M.E., BARUZZI, R.J., MENDES, N.F. Doença de Jorge Lobo em índios Caiabis. **Rev. Bras. Alergia Imunopat.**, v.2. p.160-161, 1980.

MUSSATI, C. C., DE LIMA, M. G. - Funções biológicas das moléculas HLA. **Rev. Bras. Alergia. Imunol.**, v.12, p.178-84, 1989.

OPROMOLLA, D.V.A., MADEIRA, S., BELONE, A.F.F., VILANI-MORENO, F.R. Jorge Lobo's disease: experimental inoculation in Swiss mice. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v.41, n.6, p.359-64, 1999 (a).

OPROMOLLA, D.V.A., TABORDA, P.R., TABORDA, V.B.A., VIANA, S., FURTADO, J.F. Lobomicose: relato de 40 casos novos. **An. Bras. Dermatol.**, v.74, p.135-41, 1999 (b).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PECHER, S. A., CROCE, J., FERRI, R.G. Study of humoral and cellular immunity in lobomycosis. **Allergol. Immunopatol.**, v.7, p.439-444, 1979.

PETZEL-ERLER, M.L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Cienc. Cult. (São Paulo)**. v. 51, p.199-211, 1999.

POELMA, F.G., DE VRIES, G.A., BLYTE-RUSSEL, E.A., LUYKX, MH.F. Lobomycosis in na Atlantic bottle-nosed dolphin in the Dolphinarium Harderwijk. **J. Aquat. Mammals.**, v.2, p.11-15, 1974.

POTTS, W.K., WAKELAND, E.K. Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. **Trends Ecol. Evol.**, v.5, p.181, 1990.

QVIGSTAD, E. The role of human class II molecules in activation of T4 lymphocyte. In: SOLHEIM, B. G., SOLDANO FERRONE (Eds.). HLA typing: methodology and clinical aspects. Berlim: Springer - Verlag, p. 473-88. 1982

RESTREPO, F.M., RESTREPO, M., RESTREPO, A.R. Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidimycosis. **Sabouraudia**, v.21, p.35-39, 1983.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RISCH, N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v.40, p.01-14, 1987.
- RODRIGUEZ-TORO, G. Lobomycosis. **Int. J. Dermatol.**, v.32, p.324-332, 1993.
- ROY, S., FRODSHAM, A., SAHA, B., HAZRA, S.K., MASCIE-TAYLOR, C.G., HILL, A.V. Association of vitamin D receptor with leprosy type. **J. Infect. Dis.**, v.179, p.187-91, 1999.
- SAMPAIO, M.M., DIAS, L.B. Experimental infection of Jorge Lôbo's disease in the cheek-pouch of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.12, p.115-120, 1970.
- SAMPAIO, M.M., DIAS, L.F., SCAFF, L. Bizarre forms of the aetiologic agents in experimental Jorge Lobo's disease in tortoises. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.13, p.191-93, 1971.
- SAMPAIO, M.M., DIAS, L.B. The armadillo *Euphractus sexcintus* as a suitable animal for experimental studies of Jorge Lôbo's disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.19, p.215-220, 1977.
- SAN-BLAS G. Paracoccidioides brasilienses, agente causal de una micosis sistémica de alta prevalencia en América Latina. **Gac. méd. Caracas**, v.101, p.218-26, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SASAZUKI, T., NISHIMURA, Y., MUTO, M., OHTA, N.
HLA-linked genes controlling immune response and
disease susceptibility. **Immunol. Rev.**, v.70, p.51-75, 1983.
- SCHOLOSSTEIN, L., TERASAKI, P.I., BLUESTONE, R.,
PEARSON, G.M. High association of a HL-A antigen, w27
with ankylosing spondylitis. **N. Engl. J. Med.**, v.288,
p.704-706, 1973.
- SCHURR, E., MORGAN, K., GROS, P., SKAMENE, E.
Genetics of leprosy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.44, p.4-11,
1991.
- SILVA, M.E., KAPLAN, W., MIRANDA, J.L. Antigenic
relationships between *Paracoccidioides lobo* and other
pathogenic fungi determined by immunofluorescence.
Mycopathologia, v. 36, p. 97-106, 1968.
- SILVA, D. Micose de Lobo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.6,
p.85-98, 1972.
- STASTNY, P. The human immune response region (HLA-D)
and disease susceptibility. **Immunol. Rev.**, v.70, p.113-53,
1983.
- STRACHAN, T. Molecular genetics and polymorphism of class
I HLA antigen. **Br. Med. Bull.**, v.43, p.01-14, 1987.
- STROMINGER, J.L. Structure of class I and class II HLA
antigens. **Br. Med. Bull.**, v.43, p.81-93, 1987.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SVEJGAARD, A., RYDER, L.P. Association between HLA and disease. In: DAUSSET J, SVEJGAARD, A., eds. **HLA and disease**. Copenhagen: Munksgaard; 1977. p.261-4.
- SVEJGAARD, A., PLATZ, P., RYDER, L.P. HLA and disease 1982 – A Survey. **Immunol. Rev.**, v.70, p.193-218, 1983.
- SVEJGAARD, A., RYDER, L.P. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. **Tissue Antigens.**, v.43, p.18-27, 1994.
- SYMMERS, W.St.C. A possible case of Lôbo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). **Bull. Soc. Path. Exot.**, v.76, p.777-784, 1983.
- TABORDA, P.R., TABORDA, V.A., MCGINNIS, M.R. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.2031-3, 1999.
- TERASAKI, P.I., BERNOCO, D., PARK, M.S., DZTURK, G., IWAKI, Y. Microdroplet testing for HLA-A, B, C and D antigens. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.69, p.103-120, 1978.
- THE CENTRAL DATA ANALYSIS COMMITTEE. Allele Frequencies, Section 6. 3 Splits Combined (Five Loci). In: INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP, 11, 1991. **The Data Book**. Yokohama, 1991. v.2, p.807-14.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

THORSBY, E. Structure and function of HLA molecules. **Transpl. Proc.**, v.19, p.29-35, 1987.

THORSBY, E. HLA-associated disease susceptibility – Which genes are primarily involved? **Immunology**, v.3, n.2, p.51-58, 1995.

THORSBY, E., RONNINGER, K.S. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility of resistance to type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia.**, v.36, p.371-377, 1993.

TIWARI, J.L., TERASAKI, P.I. **HLA and diseases associations**. New York: Springer Verlag, 1985. 472p.

TROWSDALE, J. Still more genes in the MHC. **Immunol. Today**, v.8, p.35-36, 1987.

TROWSDALE, J., CAMPBELL, R.D. In: CHARRON, D. WORKSHOP OF HISTOCOMPATIBILITY, 12, 1997, Paris. **Proceedings**. Paris, 1997. v. 1.

VISENTAINER, J.E.L., TSUNETO, L.T., MOLITERNO, R.A., TELLES FILHO, F.Q. Lack of association between paracoccidioidomycosis and HLA histocompatibility antigens. **Rev. Brasil. Genet.**, v.16, p.1035-41, 1993.

WILLIAMS, A.F., BACLAY, A.N. The immunoglobulin super family- dominans for cell recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v.6, p.381-405, 1988.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WOODWARD, J.C. Electron microscopic study of lobomycosis. (*Loboa lobo*). **Lab. Invest.**, v.27, p.606-612, 1972.

ZINKERNAGEL, R. M., DOHERTY, P. C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. **Adv. Immunol.**,v.27, p.51-177, 1979.

Reagentes utilizados na extração do DNA

1) Tampão para lise de células vermelhas 5 X:

548 g sucrose (concentração final 1,6M)

50 ml Triton-X (concentração final 5% v/v)

25 ml $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1M (concentração final 25 mM)

60 ml Tris-HCl pH 7,5 (concentração final 60 mM)

Dissolver a sucrose em 500 ml de água pura. Adicionar o Triton-X, MgCl_2 e o tris-HCl. Ajustar o volume para 1.000 ml com água pura. Estocar 4°C. Para uso diluir para 1X.

2) Tampão Proteinase K 5 X:

750 μl NaCl 5M (concentração final 0,375 M)

2,4 ml EDTA 0,5M pH 8.0 (concentração final 0,12M)

Ajustar o volume para 10 ml com água pura. Filtrar com millipore 0,45 μm . Estocar a 4°C.

3) Solução da enzima Proteinase K:

10 mg proteinase K

1 ml de água pura

Estocar a -20°C. Deve-se aliquotar em flaconetes antes de congelar para uso.

4) Solução de SDS 20%:

2 gr de SDS

Dissolver em 8 ml de água pura. Ajustar o volume para 10 ml.
Estocar em temperatura ambiente.

5) Solução de NaCl 6M:

350,6 g NaCl

Dissolver em 800 ml de água pura. Ajustar o volume para 1.000 ml. Preparar, deixar descansar 24 hs e retirar o sobrenadante para utilizá-lo. Autoclavar e estocar em temperatura ambiente.

6) Tampão TBE 10X:

108 g de tris base

55 g de ácido bórico

40 ml de EDTA 0,5 M pH 8.0

Dissolver o tris e o ácido bórico em 700 ml de água pura. Adicionar o EDTA. Ajustar o volume para 1.000 ml. Estocar em temperatura ambiente. Solução de uso: TBE 1X.