

Biomarcadores em Medicina

Biomarkers in Medicine

Albert Schriefer^{1,2} & Edgar M. Carvalho^{1,3}

Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia¹, Instituto de Ciências de Saúde da Universidade Federal da Bahia², Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública³; Salvador, BA, Brasil

Os biomarcadores podem ser definidos como variáveis genéticas, imunológicas e bioquímicas que se relacionam com expressão de doença. Nas doenças inflamatórias crônicas e nas doenças neoplásicas estes marcadores se relacionam com atividade ou remissão do processo patológico, contribuindo de modo importante como guia de tratamento. Nos processos infecciosos, como a expressão da doença varia de formas assintomáticas, oligossintomáticas à doença clássica, estes marcadores têm um papel importante como valor preditivo de evolução clínica. Do ponto de vista genético é amplamente conhecida a associação de doença com antígenos do sistema HLA e mais recentemente a expressão clínica de doenças tem sido associada com polimorfismos de genes. Entretanto poucos genes tem sido diretamente implicados com o desenvolvimento de uma determinada patologia. Na presente revisão ênfase é dada a marcadores biológicos utilizados no acompanhamento de doenças reumáticas sistêmicas e de marcadores biológicos associados com formas clínicas de doenças infecciosas como a doença de Chagas, infecção pelo HTLV-1 e leishmanioses. **Palavras-chave:** biomarcadores, sistema HLA, HTLV, doença de Chagas, leishmanioses.

Biomarkers can be defined by genetic immunologic or biochemical variables associated with disease expression. In chronic inflammatory diseases and in patients with cancer these markers can be associated with remission or activity of the disease and play a pivotal role in the decision about the type of therapy to be used. Disease expression is quite variable in infectious diseases, as infected individuals can be completely asymptomatic have in oligosymptomatic for of the infection or have full blown disease. In such case these markers may have predictive value regarding disease expression. For many years it is known that there is an association between HLA antigens and diseases but very few genes or their products have been correlated with pathology. In the present review emphasis is given to biomarkers that are used to monitor remission or activity of chronic inflammatory diseases and biomarkers associated with disease expression in infectious diseases such HTLV-1 infection, Chagas diseases and leishmaniasis.

Key words: Biomarkers, HLA antigens, Chagas diseases, leishmaniasis.

O melhor conhecimento da fisiopatologia tem permitido a identificação de marcadores genéticos, bioquímicos e imunológicos que contribuem não só com o diagnóstico das doenças, mas também com a atividade e remissão dos processos patológicos. Marcadores bioquímicos e imunológicos têm mostrado forte associação com câncer de próstata, câncer de intestino, câncer de fígado e de mama e têm sido amplamente utilizados como método auxiliar no diagnóstico das doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crônicas. Marcadores genéticos têm sido associados com várias doenças e espera-se para o século XXI um grande avanço no conhecimento sobre o papel de genes no desenvolvimento de doenças inflamatórias, neoplásicas e doenças infecciosas.

O desenvolvimento de doença depende de um conjunto de fatores extrínsecos envolvendo aspectos ambientais, infecções, hábitos de vida e fatores intrínsecos regulados principalmente por genes. Somente no fim do século XX

evidências passaram a serem acumuladas de que na dependência destes fatores, havia uma grande diversidade na expressão clínica de uma mesma doença. Estes aspectos tem sido melhor estudados nas doenças infecciosas, doenças auto-imunes, doenças inflamatórias crônicas e neoplasias. Obviamente que outros fatores principalmente relacionados com novas formas de terapia, tem influenciado a expressão clínica e o curso das enfermidades mas, nesta revisão, ênfase é dada a como as características próprias dos indivíduos interferem no desenvolvimento das doenças, e principalmente, a identificação de marcadores biológicos que se associam com expressão da doença e com resposta terapêutica. Estes marcadores quando acoplados a história clínica e exame físico do paciente são de grande valor para determinação do prognóstico, da gravidade da enfermidade e podem auxiliar a escolha terapêutica. A Tabela 1 mostra alguns marcadores biológicos e a significância destas variáveis.

Entretanto estes marcadores têm muito pouco valor quando analisados de forma dissociada da doença. Por exemplo, enquanto mais de 90% dos pacientes com síndrome de Reiter ou com espondilite ancilósante tem HLA-B27 positivo, quando este marcador é avaliado na população, documenta-se que a maioria dos indivíduos que tem HLA-B27, nunca desenvolverão síndrome de Reiter ou espondilite

Recebido em 20/12/2007

Aceito em 25/01/2008

Endereço para correspondência: Dr. Edgard M. Carvalho. Serviço de Imunologia, Hosp. Univers. Prof. Edgard Santos, UFBA. Rua João das Botas, s/n. 40110-160. Salvador, BA, Brasil.

Gazeta Médica da Bahia

2008;78 (Suplemento 1):47-51.

© 2008 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

Tabela 1. Biomarcadores associados a doenças auto-imunes e doenças neoplásicas.

Biomarcador	Significado
Anticorpo anti DNA	Diagnóstico e atividade do LES
Anticorpo anti SSA e anti SSB	Síndrome de <i>S. jorgren</i>
Anticorpo de anti citrulina	Pior prognóstico da Artrite Reumatóide
Antígeno prostático solúvel	Câncer de próstata
α feto proteína	Câncer de fígado
Antígeno carcino embrionário (CEA)	Câncer de cólon
CA 15.3	Câncer de mama
CA 125	Câncer de ovário

ancilosante. Esta tem sido a tônica da associação de doenças com antígenos do sistema HLA, como acontece com a artrite reumatóide, diabetes melitus, febre reumática e doença celíaca. Como até o momento não existe forma de prevenir o aparecimento destas doenças em indivíduos geneticamente susceptíveis, a identificação de marcadores pode até funcionar como um fator de constrangimento, desde que a presença destes marcadores não significa que o indivíduo desenvolverá a doença. Neste contexto os biomarcadores não devem ser utilizados isoladamente no diagnóstico de enfermidades, e sim, na monitorização clínica e terapêutica de pacientes e na monitorização clínica de indivíduos sadios que tem grande risco de desenvolvimento de uma determinada patologia.

Biomarcadores em Reumatologia

A Reumatologia é uma das áreas da medicina em que os biomarcadores têm um importante papel. As doenças reumáticas sistêmicas principalmente as doenças auto-imunes tem um espectro clínico amplo e evolução clínica heterogênea. Até a segunda metade do século 20 o diagnóstico destas doenças era feito com base em critérios clínicos e de exames complementares, que hoje são reconhecidos como presentes em formas graves ou estágios avançados destas doenças. São exemplos clássicos desta situação o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a artrite reumatóide. Em passado recente o LES era diagnosticado predominantemente quando o paciente apresentava uma lesão clássica em asa de borboleta em região para nasal, artrite e a presença das células LE no sangue por um método com baixa sensibilidade. Em muitos casos o diagnóstico do LES era feito já na vigência de doença renal. Por estas razões o LES era considerado invariavelmente uma doença grave com sobrevida de apenas 52% após 4 anos de doença (HARVEY, A.M.; SHULMAN, L.E.; TUMULTY, P.A., 1954). Hoje, principalmente devido à ajuda de biomarcadores como a identificação do anticorpo anti núcleo, anticorpos anti DNA e o anticorpo anti SSA é possível o reconhecimento de formas mais leves da doença. Este aspecto associado ao advento de novas formas de tratamento mudou consideravelmente a história natural da doença e hoje 90% dos pacientes com LES tem sobrevida superior a 20 anos, dados estes que contrastam com as observações feitas entre

as décadas de 1950 a 1990 (HARVEY, A.M.; SHULMAN, L.E.; TUMULTY, P.A., 1954; WARD, M.M.; PYERR, E.; STUDENS, K.S., 1995). Por outro lado, a presença de anticorpos anti DNA e a queda nos níveis séricos do complemento, principalmente níveis de C3 e C4, foram identificados como indicadores de atividade da doença (HARDIN, 1986; SHOENFELD, Y.; ISEMBERG, D.A. 1987). Desta forma alterações nestes parâmetros em indivíduos em fase de remissão da doença, indicam a necessidade de um acompanhamento e monitorização mais freqüente e re-introdução precoce de corticosteróides e drogas imuno moduladoras.

Uma outra entidade em que os marcadores biológicos tem tido uma participação importante é na artrite reumatóide, doença que no passado o diagnóstico dependia de achados radiológicos. Como as alterações radiológicas caracterizadas principalmente por erosões ósseas representam um estágio avançado da doença, esta confirmação diagnóstica tardia, terminava por retardar o tratamento e conseqüentemente interferir no prognóstico da artrite reumatóide. A identificação do fator reumatóide, e mais recentemente a documentação dos anticorpos citrulinados têm se constituídos marcadores biológicos que permitem a utilização precoce de formas mais agressivas de tratamento da doença (LEE, R.M.; SCHUR, P.H., 2003; MEYER, 2003; BRIDGES, JR., S.L.; DAVIDSON, P.E., 2005; LINDGVIST, 2007). Isto porque participam do tratamento da artrite reumatóide um número grande de drogas: 1) os antiinflamatórios não hormonais; 2) antiinflamatórios hormonais; 3) drogas modificadoras da artrite reumatóide representadas por vários medicamentos incluindo cloroquina, metotrexato, azatioprina e leflunomida entre outros e 4) os agentes biológicos representados principalmente pelos agentes inibidores do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o anticorpo contra o antígeno CD20 expresso em células B. Neste contexto, a documentação de que a presença de anticorpos anti citrulina (LEE, R.M.; SCHUR, P.H., 2003; MEYER, 2003) e títulos elevados de fator reumatóide (BRIDGES, JR., S.L.; DAVIDSON, P.E., 2005) se associam com gravidade da doença, tem feito com que a documentação destes biomarcadores, associados a apresentação clínica, permita a utilização cada vez mais precoce de drogas com maior potencial de controlar a doença como o methotrexato, a leflunomida e os agentes biológicos (LINDGVIST, 2007).

Biomarcadores em Doenças Infecciosas

O avanço no conhecimento sobre o binômio, infecção-doença, tem mudado o conceito das doenças infecciosas e os marcadores biológicos tem tido um importante papel nesta área. Algumas doenças infecciosas como as leishmanioses, doença de Chagas, hepatite viral e a síndrome de imunodeficiência adquirida foram descritas no século XX e a expressão clínica destas infecções é extremamente variável. Inicialmente a documentação de infecção por métodos indiretos como a presença de anticorpos contra antígenos dos agentes infectantes, permitiu o entendimento de que na maioria das doenças infecciosas o número de infectados é bem maior do que o número de doentes. Estima-se, por exemplo, que na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* 70% dos indivíduos são assintomáticos e somente cerca de 30% desenvolvem a forma clássica da doença de Chagas (ANDRADE, 1999). Hoje, se sabe que estes indivíduos assintomáticos denominados como portadores da forma indeterminada da doença podem ou não desenvolver doença cardíaca. Adicionalmente, entre os doentes, existem aqueles que se caracterizam predominantemente por apresentar arritmia, enquanto outros desenvolvem uma insuficiência cardíaca grave. Também tem sido observado que enquanto no passado a doença de Chagas era muito observada entre os jovens, hoje uma grande parcela dos pacientes com miocardiopatia chagásica são diagnosticados após os 40 anos de vida. Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de entender a imunopatogênese da doença de Chagas e hoje se sabe que a agressão ao músculo cardíaco é mediada principalmente pela resposta imune do hospedeiro (DRIGO, 2006; CUNHA-NETO, 2005; MACHADO, 2005). Uma deficiência nos mecanismos regulatórios da resposta imune leva a uma intensa resposta inflamatória e conseqüentemente dano tecidual. Com a finalidade de evitar que a resposta imunológica cause dano tecidual vários mecanismos regulatórios atuam no sentido de modular a resposta imunológica. Tem papel importante nesta modulação as células regulatórias e as citocinas. Dentre estas, a interleucina 10 (IL-10) tem um importante efeito modulador da resposta imune humana. Em contraste o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e relacionada com dano tecidual na infecção pelo *T. cruzi* (CUNHA-NETO, 2005; MACHADO, 2005). Indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas produzem significativamente mais IL-10 e menos TNF- α do que pacientes com miocardiopatia chagásica (SOUZA, 2007).

O vírus linfotrófico das células T humanas (HTLV-1) foi identificado em 1980 e é o causador da leucemia de células T do adulto (ATLL) e da mielopatia associada ao HTLV-1 ou paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). O HTLV-1 é um retrovírus que infecta predominantemente os linfócitos T e um dos genes do vírus, o TAX, tem a propriedade de transativar nas células humanas vários genes relacionados com ativação celular e secreção de citocinas (HOLLSBERG, 1999; MARINER, 2001). Assim os linfócitos T de indivíduos infectados pelo

HTLV-1 acham-se ativados, e em indivíduos infectados por este vírus, há uma produção elevada de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ), interleucina 15 (IL-15) por células mononucleares do sangue periférico cultivadas *in vitro* sem qualquer estímulo (HOLLSBERG, 1999; CARVALHO, 2001). Do ponto de vista imunológico, pacientes que apresentam HAM/TSP produzem mais IFN- γ e TNF- α e tem maior carga pró-viral, do que indivíduos portadores da infecção pelo HTLV-1 (NAGAI, 2001; SANTOS, 2004). Adicionalmente, enquanto nos portadores de HTLV-1 a principal fonte de IFN- γ são as células T CD4⁺, nos pacientes com HAM/TSP a principal fonte desta citocina são as células T CD8⁺ (SANTOS, 2004).

O HTLV-1 tem sido considerado um vírus de baixa morbidade, desde que ATLL e HAM/TSP só ocorrem em menos de 5% dos indivíduos infectados (EDLICH, R.; ARNETTE, J.; WILLIAMS, F., 2000). Todavia anormalidades imunológicas semelhantes às documentadas em pacientes com HAM/TSP, têm sido observadas em cerca de 45% dos portadores de HTLV-1 (CARVALHO, 2001). Como as alterações imunológicas têm uma relação estreita com a patogênese da doença, estudos têm sido realizados no sentido de comparar manifestações clínicas e neurológicas a em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com e sem alterações de resposta imune e em controles soro-negativos para o HTLV-1. Estes estudos têm mostrado que quando comparados com indivíduos soro-negativos para o vírus, indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam mais parastésias em membros inferiores, maior frequência de fraqueza muscular e mais manifestações urinárias, como noctúria, urgência miccional e incontinência urinária (CASKEY, 2007; CASTRO, 2007). Tem sido documentado que uma grande percentagem de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e com queixas urinárias tem um quadro de bexiga neurogênica documentada através de estudos urodinâmicos. Estes indivíduos com bexiga neurogênica associada ao HTLV-1 embora não preencham os critérios para HAM/TSP apresentam níveis elevados de IFN- γ , TNF- α e de carga pró-viral semelhantes aos observados a pacientes com HAM/TSP. A documentação de que produção elevada de IFN- γ , TNF- α e carga pró-viral são biomarcadores de doença neurológica é também bem caracterizada em crianças infectadas pelo HTLV-1, que tem uma doença denominada dermatite infectiva. A resposta imune na dermatite infectiva se caracteriza por uma grande produção de TNF- α e de IFN- γ e, nestas crianças, detecta-se uma elevada carga pró-viral. Estudos recentes mostram que diferente da maioria dos pacientes com HTLV-1 que desenvolvem HAM/TSP somente após a 5ª década, crianças com dermatite infectiva desenvolvem precocemente, ainda na adolescência HAM/TSP. Estes dados indicam que portadores de HTLV-1 que apresentam níveis elevados de IFN- γ , TNF- α e da carga pró-viral têm risco elevado para desenvolver HAM/TSP.

As leishmanioses constituem um espectro de doenças que ocorrem, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais do globo. Várias espécies de leishmania tem sido implicadas como

causadoras da doença no homem e fatores relacionados com o parasita e com o hospedeiro relacionam-se com a diversidade de expressão clínica após a infecção. A *Leishmania chagasi* é a causadora da leishmaniose visceral no Novo Mundo, mas 85% dos indivíduos infectados não desenvolvem doença (BADARÓ, 1986). A capacidade de células mononucleares de produzir IFN- γ após estímulo com antígeno de leishmania em crianças recém infectadas com *L. chagasi* é um biomarcador importante do controle da infecção, enquanto a ausência de produção de IFN- γ está fortemente relacionada com o desenvolvimento da doença (CARVALHO, 1992). A leishmaniose visceral pode ter evolução fatal e os exames laboratoriais assim como a pesquisa de parasita não são métodos fidedignos de resposta terapêutica. Vários marcadores solúveis tem sido associados com resposta terapêutica como a queda nos níveis do receptor solúvel da interleucina 2 (IL-2R) e da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) solúvel. Em contrapartida nos pacientes que não respondem a terapia antimonial as concentrações séricas do IL-2R solúvel e da ICAM-1 solúvel permanecem elevados (SCHRIEFER, 1995).

Com relação ao parasito a forte associação entre espécie de leishmania e forma de doença sugere um papel proeminente do conteúdo genético do parasito sobre os desfechos clínicos e prognósticos das infecções. A *Leishmania braziliensis* um dos agentes causadores da leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta um elevado grau de polimorfismo genético e fenotípico (KAHL, 1991; GOMES, 1995; CUPOLILLO, 2003; OLIVEIRA, 2004), o qual é acompanhado por um espectro de apresentações clínicas no hospedeiro humano, incluindo: leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). A LM é uma forma grave da doença que ocorre no curso ou após a cura da LC ou da LD. O desenvolvimento de biomarcadores de cepas parasitárias com capacidade preditiva sobre a evolução para LM seria de grande valor no manejo clínico dos casos de LTA pela *L. braziliensis*.

Estudos experimentais têm mostrado que *L. braziliensis* isoladas de pacientes com diferentes formas de doença apresentam comportamentos biológicos distintos em modelos animais (KAHL, 1991; OLIVEIRA, 2004), reforçando o raciocínio acima sobre a relação entre carga genética da cepa parasitária e evolução clínica do paciente.

Mais recentemente estudo de epidemiologia molecular revelou que a população de *L. braziliensis* de uma área hiperendêmica para LTA localizada no sudeste do estado da Bahia, chamada Corte de Pedra, é multiclonal estando as diferentes formas de LTA estatisticamente associadas a clones específicos naquela população (SCHRIEFER, 2004). Para testar a hipótese de que o polimorfismo parasitário estaria envolvido no espectro de doenças causadas pela *L. braziliensis*, e caracterizar acuradamente a estrutura populacional desses parasitos naquela área endêmica, 45 amostras de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LC, LM ou LD entre 1991 e 2001 foram genotipadas por RAPD (*Randomly amplified*

polymorphic DNA – DNA polimórfico randomicamente amplificado) e comparadas. O dendrograma de similaridade gerado a partir da comparação dos perfis eletroforéticos dos RAPDs obtidos para cada isolado revelou a existência de nove unidades discretas de tipagem agrupadas em cinco subpopulações ou clados. Mais importante, todas as formas de LTA apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em suas frequências entre os clados, indicando que infecções com os diferentes genótipos de *L. braziliensis* são provavelmente acompanhadas por manifestações clínicas específicas naquela área endêmica (SCHRIEFER, 2004).

O modo clonal de reprodução e a associação de genótipos de *L. braziliensis* com formas de LTA propiciam que cepas associadas a desfechos clínicos de leishmaniose possam ser distinguidas com base em marcadores moleculares bem definidos. Esses biomarcadores poderiam ser explorados no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas com valor prognóstico para o melhor manejo de casos humanos. Esta hipótese leva em conta que a reprodução clonal tenderia a segregar grandes quantidades de mutações clinicamente irrelevantes (e.g. indels ou mutações de ponto), juntamente com aqueles tratos genéticos realmente importantes para o desenvolvimento dos diversos desfechos da LTA, as quais poderiam ser detectadas por procedimentos diagnósticos altamente sensíveis e específicos como a reação em cadeia pela DNA polimerase (PCR).

Associação entre cepas e forma clínica da doença tem também sido documentada na infecção causada pela *Leishmania donovani*. Os melhores exemplos de estudos nesse sentido referem-se à distinção de cepas de *L. donovani* com maior propensão a causar leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL, *post-kalazar dermal leishmaniasis*) em pacientes com leishmaniose visceral (LV). Num desses estudos Das Gupta *et al.* (1991) clonaram um minicírculo do DNA mitocondrial do parasito, que usado como sonda é capaz de hibridizar apenas a parasitos isolados de casos de PKDL, mas não de LV por *L. donovani*. No outro estudo, Sreenivas *et al.* (2004) reportaram um ensaio de detecção de um polimorfismo localizado no gene codificante para a subunidade 28S do RNA ribossomal capaz de diferenciar cepas de *L. donovani* causadoras de PKDL daquelas causadoras de VL. Todos esses esforços acima deverão se intensificar e se mostrar ainda mais bem sucedidos nos próximos anos como consequência natural da divulgação das seqüências completas dos genomas das diferentes espécies de leishmania, dentre elas as já disponíveis on-line para a *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* (Sanger Institute).

Referências

1. ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94:71-80, 1999.
2. BADARÓ, R. *et al.*, New perspective in a sub-clinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 154:1003-1011, 1986.

3. BRIDGES, Jr., S.L. *et al.* Rheumatoid factor. In Koopman, W.J.; Moreland, L.W. (ed). *Arthritis and applied conditions 1* ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, p:1227-47, 2005.
4. CARVALHO, E.M. *et al.* Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T lymphotropic virus type I infected blood donors. *J Require Immuno Defic Syndr*, 27:1-6, 2001.
5. _____. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis*, 165:535-40, 1992.
6. CASKEY, M.F. *et al.* Clinical manifestations associated with HTLV-1 type I infection: A cross sectional study. *AIDS Res Human retroviruses*, 23:365-371, 2007.
7. CASTRO, N.M. *et al.* Urinary symptoms associated with Human T cell lymphotropic virus type I infection: Evidence of urinary manifestations in large group of HTLV-1 carriers. *J Urology*, 69:813-818, 2007.
8. CUNHA-NETO, E. *et al.* Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*, 167:305-313, 2005.
9. CUPOLILLO, E. *et al.* Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol*, 41: 3126-3132, 2003.
10. DAS GUPTA, S.; GHOSH D.K.; MAJUMDER, H.K. A cloned kinetoplast DNA mini-circle fragment from a *Leishmania* spp. specific for post-kala-azar dermal leishmaniasis strains. *Parasitology*, 102:187-191, 1991.
11. DRIGO, S.Z. *et al.* TNF- α gene polymorphism are associated with reduced survival in several Chagas disease cardiomyopathy patients. *Microbes and Infect*, 193:1394-1399, 2006.
12. EDLICH, R.; ARNETTE, J.; WILLIAMS, F. Global epidemic of human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-1). *J Emerg Med*, 18:109-111, 2000.
13. GOMES, R.F. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol*, 80: 681-687, 1995.
14. HARDIN, J.A. The lupus auto antigens and the pathogenesis of SLE. *Arthritis Rheum*, 29:457-462, 1986.
15. HARVEY, A.M.; SHULMAN, L.E.; TUMULTY, P.A. Systemic lupus erythematosus: Review of the literature and clinical analysis of 138 cases. *Medicine*, 33:291-295, 1954.
16. HOLLSBERG, P. Mechanism of T cell activation by human T cell lymphotropic virus type I. *Microbial Mol Biol Rev*, 63:308-333, 1999.
17. KAHL, L.P. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis*: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 44: 218-232, 1991.
18. LEE, R.M.; SCHUR, P.H. Clinical utility of anti CCP assay in patients with rheumatic diseases. *ANN RHEUM DIS*, 62:870-4, 2003.
19. LINDGVIST, E. *et al.* Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64:196-201, 2007.
20. MACHADO, F.S. *et al.* CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with trypanosoma *Cruzi*. *J Infect Dis*, 191:627-636, 2005.
21. MARINER, J.M. *et al.* Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-Kappa B site. *J Immunol*, 166:2602-2609, 2001.
22. MEYER, O. *et al.* Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predictive five years radio-graphic damage. *Annals of Rheum Dis*, 62:120-6, 2003.
23. NAGAI, M. *et al.* Increased HTLV-1 pro viral load and preferential expression of HTLV-1 Tax specific CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. *Ann Neurol*, 50:807-812, 2001.
24. OLIVEIRA, C.I. *et al.* *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes and Infection* 6:977-984, 2004.
25. Santos, S.B. *et al.* Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-1 asymptomatic carriers. *BMC Infectious Diseases*, 4:1-4, 2004.
26. Schriefer, A. *et al.* Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemic American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). *Infect Immun*, 72:508-514, 2004.
27. Schriefer, A.B. *et al.* Serum soluble markers in the evaluation of treatment of human visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, 102:535-540, 1995.
28. SHOENFELD, Y.; ISEMBERG, D.A. DNA antibody idiotopies: A review of their genetic, clinical and immune pathological features. *Seminar Arthritis Rheum*, 16:215-221, 1987.
29. SOUZA, P.E.A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas disease. *Infect Immuno*, 75:1886-1897, 2007.
30. Sreenivas, G. *et al.* DNA polymorphism assay distinguishes isolates of *Leishmania donovani* that cause kala-azar from those that cause post-kala-azar dermal leishmaniasis in humans. *J Clin Microbiol*, 42: 1739-1741, 2004.
31. WARD, M.M.; PYERR, E.; STUDENS, K.S. Long-term survival in systemic lupus erythematosus: Patients characteristics associated with poorer outcomes. *Arthritis Rheum*, 38:274-279, 1995.