

LUIZ FERNANDO JOB JOBIM

**SISTEMA HLA: CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS EXTRAÍDOS DE PLACENTAS,
APLICAÇÕES EM INVESTIGAÇÃO DE PATEERNIDADE, TRANSPLANTES RENAIIS
E ASSOCIAÇÕES COM DOENÇAS.**

CLÍNICAS

**TESE SUBMETIDA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE DOUTOR.**

ORIENTADOR: PROF. NELSON FIGUEIREDO MENDES

PORTO ALEGRE 1992



Bib. Fac. Med. UFRGS

T-0498

Sistema HLA

MED
T
WO680 J62s 1992

05187143

[000061125] Jobim, Luiz Fernando Job. Sistema
hla : caracterizacao de anticorpos extraidos de
placentas, aplicacoes clinicas em investigacao
de paternidade, transplantes renais e
associacoes com doencas. 1992. x, 278 f. : il.

000061125/03/03

AGRADECIMENTOS

Os resultados destas pesquisas, tornadas tese de Doutorado, foram possíveis pela colaboração de diversas pessoas em várias instituições. A minha gratidão especial é dirigida aos seguintes profissionais:

Prof. Nelson Figueiredo Mendes, Professor Titular de Imunologia da Escola Paulista de Medicina. Orientador e amigo desde o início da profissão.

Prof. J.P. Morris, Nuffield Professor of Surgery, Universidade de Oxford. Dr. John Todd, Chefe de Laboratório de Genética da Diabetes do Departamento de Cirurgia da Universidade de Oxford. Dr. Ken Welch, Chefe do Laboratório de Histocompatibilidade do Oxford Transplant Centre.

Prof. Gerhard Opelz, Professor Titular de Imunologia da Universidade de Heidelberg e coordenador do Collaborative Transplant Study.

Prof. Carlos Cesar Albuquerque e Prof. Pedro Gus, Presidente e Vice-Presidente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Prof. Gehrard Jacob e Prof. Diógenes Santos, ex-Reitor e ex-Diretor do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Dra. Maria Clara Correa, Dra. Maria de Lourdes Becker, Dra. Maria Regina Jobim, Dra. Maria del Carmen Muhr, Dra. Marisa Chesky, Sra. Lizete Furtado, Dr. André Becker, Dra. Sandra Fernandes, Dra. Heloisa Tarasconi e demais colaboradores e ex-colaboradores da Unidade de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Prof. Sergio Roberto Haussen, amigo e colega. Sua ajuda foi fundamental durante nossa permanência no exterior.

Especial referência aos médicos, funcionários e pacientes dos centros de transplante renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Santa Casa de Misericórdia, Hospital Maia Filho, Hospital Lazaroto e Hospital da PUC.

Este trabalho não teria sido realizado sem a colaboração da FINEP e do CNPq, sendo que a primeira financiou o desenvolvimento dos laboratórios da Unidade de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a segunda proporcionou a bolsa de estudo para a Universidade de Oxford, onde concluí estas pesquisas.

DEDICATÓRIA:

Esta tese é dedicada à Maria Regina, Mariana e Eduardo pela compreensão, carinho e companheirismo nas andanças pela fria Inglaterra onde concluí este trabalho, assim como pelo incentivo no perseguir de meus ideais de vida. Dedico também à memória de meu pai, Professor Homero Só Jobim, do qual assimilei o gosto pelo trabalho de laboratório e o amor pela profissão de Médico e Professor Universitário. Ao amor de minha mãe.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.	O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	1
1.1.1.	A HISTÓRIA DO SISTEMA HLA.....	1
1.1.1.1.	A DESCOBERTA DE DAUSSET.....	2
1.1.1.2.	OS ANTICORPOS ANTI-HLA APÓS A GESTAÇÃO.....	4
1.1.1.3.	OS "WORKSHOPS" INTERNACIONAIS E O DESENVOLVIMENTO DO HLA.....	7
1.1.2.	GENÉTICA E NOMENCLATURA.....	14
1.1.2.1.	ANTÍGENOS DE CLASSE I.....	15
1.1.2.2.	ANTÍGENOS DE CLASSE II.....	16
1.1.2.3.	ANTÍGENOS DE CLASSE III.....	19
1.1.2.4.	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	24
1.1.2.5.	CLASSIFICAÇÃO.....	25
1.1.2.6.	HLA E POPULAÇÕES.....	26
1.1.2.7.	HLA E INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE.....	26
1.1.3.	OS ANTÍGENOS HLA E A RESPOSTA IMUNE.....	34
1.2.	AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HISTOCOMPATIBILIDADE.....	41
1.2.1.	SOROLOGIA HLA.....	41
1.2.1.1.	IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS HLA.....	44
1.2.1.2.	REAÇÃO CRUZADA DOS ANTICORPOS ANTI-HLA.....	47
1.2.1.3.	PROVA CRUZADA.....	48
1.2.2.	CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS.....	50
1.2.3.	DNA-RFLP.....	55
1.2.3.1.	RFLP E SOROLOGIA HLA-DR.....	58
1.2.3.2.	RFLP E SOROLOGIA HLA-DQ.....	60
1.2.4.	TIPAGEM HLA COM OLIGONUCLEOTÍDIOS SINTÉTICO APÓS AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	64
1.3.	IMUNOBIOLOGIA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HLA E DOENÇAS.....	72
1.3.1.	CLASSIFICAÇÃO E METODOLOGIA.....	73
1.3.2.	MECANISMOS DE ASSOCIAÇÃO DE HLA COM DOENÇAS.....	78
1.3.3.	ASSOCIAÇÕES DE INTERESSE.....	81
1.3.3.1.	ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SÍNDROME DE REITER.....	81
1.3.3.2.	NARCOLEPSIA.....	82
1.3.3.3.	ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	83
1.3.3.4.	ARTRITE REUMATÓIDE.....	83
1.3.3.5.	DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE.....	85
1.3.3.6.	LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.....	93
1.4.	IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE RENAL.....	95
1.4.1.	INTRODUÇÃO.....	95
1.4.2.	IMUNOBIOLOGIA DAS REJEIÇÕES DOS ENXERTOS.....	98
1.4.3.	CLASSIFICAÇÃO DAS REJEIÇÕES.....	100
1.4.4.	RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAI.....	105
1.4.4.1.	DOADOR VIVO RELACIONADO.....	105
1.4.4.2.	DOADOR VIVO NÃO RELACIONADO.....	106
1.4.4.3.	DOADOR CADÁVER.....	107
1.4.5.	FATORES QUE INFLUENCIAM A SOBREVIVÊNCIA DO TRANSPLANTE.....	108
1.4.5.1.	IMUNOSSUPRESSÃO.....	108

1.4.5.2.	HISTOCOMPATIBILIDADE.....	109
1.4.5.3.	TRANSFUSÕES SANGÜÍNEAS.....	112
1.4.5.4.	"NIMAS ENIPAS".....	113
1.4.5.5.	IDADE DO DOADOR E RECEPTOR.....	114
1.4.5.6.	DOENÇAS ASSOCIADAS.....	114
1.4.5.7.	O EFEITO DO CENTRO TRANSPLANTADOR.....	115
1.4.5.8.	O EFEITO DA RAÇA.....	116

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1.	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.....	117
2.2.	A INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGENÉTICA HLA....	118
2.3.	RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL.....	120
2.4 .	AVALIAÇÃO DO SISTEMA HLA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.....	121
2.5.	ESTUDO DO SISTEMA HLA NA DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ANTÍGENOS E DOS GENES HLA NA POPULAÇÃO NORTE-AMERICA DE ORIGEM HISPÂNICA E ANGLO-SAXÔNICA.....	122

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1.	MATERIAL.....	127
3.1.1.	AMOSTRAS: INDIVÍDUOS, PACIENTES E CONTROLES.....	127
3.1.1.1.	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.....	127
3.1.1.2.	INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGENÉTICA HLA....	129
3.1.1.3.	RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL.....	129
3.1.1.4.	AVALIAÇÃO DO SISTEMA HLA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.....	131
3.1.1.5.	ESTUDO DO SISTEMA HLA NA DIABETES INSULINO-DEPENDENTE AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ANTÍGENOS E DOS GENES NA POPULAÇÃO NORTE-AMERICANA DE ORIGEM HISPÂNICA E ANGLO-SAXÔNICA	132
3.1.2.	REAGENTES.....	135
3.1.2.1.	CITRATO TRISSÓDICO.....	135
3.1.2.2.	ERITRÓCITOS CARNEIRO TRATADOS COM NEURAMINIDASE	135
3.1.2.3.	POLYBRENE.....	136
3.2.2.4.	TAMPÃO GIDEON GOLDSTEIN.....	136
3.1.2.5.	EOSINA Y.....	136
3.1.2.6.	FORMALINA 37%.....	137
3.1.2.7.	CORANTE PARA FLUORESCÊNCIA (M. DE MANCHESTER)....	137

3.1.2.7.	CORANTE PARA FLUORESCÊNCIA (M. DE MANCHESTER).....	137
3.1.2.8.	CORANTE PARA FLUORESCÊNCIA (M. DE GLASGOW).....	137
3.1.2.9.	TAMPÃO DE LISE DE ERITRÓCITOS.....	138
3.1.2.10.	a.TAMPÃO DE LISE NUCLEAR.....	138
3.1.2.10.	b.EDTA 0.5 M pH 8.0.....	138
3.1.2.11.	SOLUÇÃO DE PROTEASE K.....	138
3.1.2.12.	TAMPÃO TE 10.1.—pH 7.5.....	139
3.1.2.13.	AZUL DE BROMOFENOL.....	139
3.1.2.14.	TBE 2X.....	139
3.1.2.15.	SOLUÇÃO ESTOQUE DE BROMETO DE ETÍDIO.....	140
3.1.2.16.	REAGENTE OMEGA.....	140
3.1.2.17.	SOLUÇÃO 6 X "STOP MIX".....	140
3.1.2.18.	TAMPÃO TAE 50 X.....	140
3.1.2.19.	a. HCL 0.15 M.....	141
3.1.2.19.	b. HCL 0.15 M.....	141
3.1.2.20.	a. NAOH 0.2 M /NaCl 0.6m.....	141
3.1.2.20.	b. NAOH 0.4 M.....	141
3.1.2.21.	TRIS 0.5M pH 7.6/NaCl 1.5 M.....	141
3.1.2.22.	TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA.....	142
3.1.2.23.	FORMAMIDA DEIONIZADA.....	142
3.1.2.24.	SOLUÇÃO DENHARTS.....	142
3.1.2.25.	SSPE 30 X.....	143
3.1.2.26.	SULFATO DE DEXTRAN A 50%.....	143
3.1.2.27.	DNA DE ESPERMA DE SALMÃO.....	143
3.1.2.28.	TAMPÃO OLB.....	144
3.1.2.29.	SORO ALBUMINA BOVINA.....	145
3.1.2.30.	SOLUÇÃO PARA INTERROMPER A HIBRIDIZAÇÃO.....	145
3.1.2.31.	SSPE 20 X.....	145
3.1.2.32.	DILUIÇÃO DO DNA.....	145
3.1.2.33.	TWEEN 20 A 2%.....	146
3.1.2.34.	TAMPÃO TRIS pH 8.4 0.2 M.....	146
3.1.2.35.	SOLUÇÃO PARA "DOT-BLOT".....	146
3.1.2.36.	SSC 20 X.....	146
3.1.2.37.	TAMPÃO KINASE 10 X.....	147
3.1.2.38.	TE 10/1 pH 8.0.....	147
3.1.2.39.	TE 0.2 M NaCl.....	147
3.1.2.40.	TE 0.5 M NaCl.....	147
3.1.2.41.	TAMPÃO "STRIPPER".....	147
3.1.2.42.	TAMPÃO NEUTRALIZANTE 1 M TRIS pH 8/1.5 M NaCl.....	148
3.2.	MÉTODOS.....	149
3.2.1.	SOROLOGIA HLA.....	149
3.2.1.1.	PREPARAÇÃO DOS LINFÓCITOS.....	149
3.2.1.1.1.	ISOLAMENTO DOS LINFÓCITOS TOTAIS.....	149
3.2.1.1.2.	SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T E B POR ROSETAS.....	151
3.2.1.1.3.	SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS DE LINFONODOS.....	153
3.2.1.2.	TESTES DE LINFOCITOTOXICIDADE.....	154
3.2.1.3.	IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA.....	159
3.2.1.4.	MÉTODOS AUXILIARES EM SOROLOGIA HLA.....	160
3.2.1.4.1	COMPLEMENTO DE COELHO.....	160
3.2.1.4.2.	ABSORÇÃO COM PLAQUETAS.....	162
3.2.1.4.3.	CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE LINFÓCITOS.....	164
3.2.2.	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	165
3.2.3.	TIPAGEM HLA POR RFLP.....	167
3.2.3.1.	DIGESTÃO DO DNA COM ENDONUCLEASES.....	167
3.2.3.2.	ELETROFORESE EM AGAROSE.....	169
3.2.3.3.	DESNATURAÇÃO DO DNA E TRANSFERÊNCIA.....	170

3.2.3.5.	MARCAÇÃO DA SONDA E HIBRIDIZAÇÃO.....	174
3.2.3.6.	LAVAGEM DAS MEMBRANAS E AUTORADIOGRAFIA.....	175
3.2.3.7.	RETIRADA DA SONDA.....	176
3.2.3.8.	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	176
3.2.4.	TIPAGEM HLA COM OLIGONUCLEOTÍDIOS SINTÉTICOS.....	177
3.2.4.1.	INTRODUÇÃO.....	177
3.2.4.2.	AMPLIFICAÇÃO DO DNA (PCR).....	178
3.2.4.3.	PROTOCOLO PARA FIXAÇÃO DO DNA EM MEMBRANA.....	182
3.2.4.4.	MARCAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDIOS COM ³² P.....	183
3.2.4.5.	PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO.....	184
3.2.4.6.	HIBRIDIZAÇÃO.....	185
3.2.4.7.	LAVAGEM DOS FILTROS.....	185
3.2.4.8.	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	186
3.2.4.9.	RETIRADA DAS SONDAS PARA PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO.....	188
3.2.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	188
3.2.5.1.	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO.....	188
3.2.5.2.	AValiação DO RISCO RELATIVO.....	189
3.2.5.3.	PROBABILIDADE RELATIVA DE PATERNIDADE.....	192
3.2.5.4.	CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA.....	193

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1.	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.....	194
4.2.	INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGENÉTICA HLA....	199
4.3.	RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL.....	205
4.3.1.	PRIMEIRO TRANSPLANTE: HLA IDÊNTICO X 1 HAPLÓTIPO RELACIONADO X CADÁVER.....	205
4.3.2.	PRIMEIRO TRANSPLANTE X CICLOSPORINA.....	206
4.3.3.	PRIMEIRO TRANSPLANTE X SEM CICLOSPORINA.....	207
4.3.4.	TRANSPLANTE DOADOR CADÁVER.....	208
4.3.5.	EFEITO DO CENTRO	209.
4.3.6.	TRANSPLANTE COM DOADOR CADÁVER ANTES E APÓS A COORDENADORIA DE TRASPLANTES.....	210
4.3.7.	TRANSPLANTES COM DOADOR RELACIONADO COM DOIS HAPLÓTIPOS HLA DIFERENTES.....	211
4.3.8.	TRANSPLANTES COM RECEPTOR CAUCASÓIDE.....	212
4.3.9.	TRANSPLANTES COM RECEPTOR NÃO CAUCASÓIDE.....	213
4.3.10.	TRANSFUSÃO ESPECÍFICA DO DOADOR.....	214
4.3.11.	IDADE DO RECEPTOR: MAIOR DO QUE 40 ANOS.....	215
4.3.12.	IDADE DO RECEPTOR ENTRE 16 E 40 ANOS.....	215
4.3.13.	RETRANSPLANTES.....	217
4.3.14.	PRIMEIRO TRANSPLANTE: OS PAIS COMO DOADORES.....	218
4.4.	AValiação DO SISTEMA HLA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.....	220

4.5.	ESTUDO DO POLIMORFISMO HLA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE: AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO NORTE-AMERICANA DE ORIGEM HISPÂNICA E ANGLO-SAXÔNICA DO ESTADO DO COLORADO.....	230
------	---	-----

CAPÍTULO 5.

DISCUSSÃO

5.1.	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.....	241
5.2.	INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL.	242
5.3.	TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL.....	244
5.4.	AVALIAÇÃO DO SISTEMA HLA EM LEUCEMIA LINFÁTICA ..	249
5.5.	ESTUDO DO SISTEMA HLA EM DIABETE MELLITUS.....	251

CAPÍTULO 6.

CONCLUSÕES	256
BIBLIOGRAFIA.....	262

RESUMO

Esta tese reúne uma série de trabalhos com o sistema HLA. Inicia com a caracterização de 82 anticorpos de classe I e II no soro de 2600 placentas humanas, possibilitando reagentes para a organização de um Laboratório de Histocompatibilidade. A aplicação clínica da imunogenética HLA na investigação de paternidade e nos transplantes renais vem a seguir. Estudou-se 66 casos de perícia médica, sendo que a dúvida da paternidade foi solucionada pelo estudo HLA em 42 ocasiões (64%). Em 10 casos foi necessário acrescentar a pesquisa de grupos sanguíneos ABO, Rh (C,c,D,E,e) e MNSs. O número de exclusões de paternidade foi de 14 casos (21%). Os 250 transplantes renais analisados foram realizados com doador vivo (158) e doador cadáver (92). Os enxertos entre indivíduos relacionados HLA idênticos (30) apresentaram sobrevida de 96% para o 1º ano e 75.4% para o 2º. Os com um haplótipo de diferença (128) alcançaram 78.2% e 65.9%, respectivamente. Quando o doador foi cadáver, observou-se 62% e 43.9% de sobrevida actuarial. A análise dos resultados dos transplantes entre relacionados, HLA parcialmente idênticos, demonstrou um pior resultado para os que usaram a Ciclosporina A, ao contrário do esperado. Observou-se uma diferença na sobrevida entre os centros transplantadores, assim como uma tendência para melhores resultados, após a organização da "coordenadoria de transplantes" na cidade de Porto Alegre. Os pacientes de raça branca, aparentemente, tiveram melhores resultados do que os de raça negra, entretanto estes últimos são em número pequeno. Não foi observado o efeito da transfusão sanguínea específica do doador na sobrevida dos enxertos. Os resultados, quando os pais foram os doadores, não foram superiores quando as mães foram as escolhidas. A pesquisa da relação entre HLA e doenças foi realizada em relação à Leucemia Linfática Crônica (LLC) e Diabetes Mellitus Insulino-Dependente. No primeiro estudo, observou-se que a LLC não está associada positivamente ao sistema HLA, após tipagem de 120 pacientes. A associação negativa, relacionada com a proteção à doença, foi observada para o alelo HLA-A9 e HLA-Cw4. Paralelamente, foram observados raros pacientes com CLL que não apresentavam moléculas de HLA-DQ na membrana celular, tanto da forma homozigota como heterozigota. Estudaram-se estes casos com sondas moleculares, observando-se a presença dos genes ao nível do DNA, embora faltassem sua expressão ao nível de membrana. A tipagem HLA de pacientes diabéticos envolveu os locos HLA-A, B, DR, DQA e DQB. Estes pacientes foram provenientes do Estado do Colorado no Estados Unidos da América do Norte, tendo sido previamente observado, pelo Departamento de Epidemiologia da Universidade do Colorado, existir menos diabetes nos descendentes dos colonizadores de língua hispânica do que nos descendentes de língua inglesa. A remessa das células de pacientes e controles para o Laboratório de Genética da Diabetes na Univesidade de Oxford possibilitou esse estudo. Entre os diversos dados observados, deve-se destacar que não existem diferenças na

genética HLA entre os diabéticos hispânicos e os anglo-saxões, entretanto o mesmo não ocorre entre os controles, pois nos hispânicos não se observou a presença do haplótipo caucasóide e diabetogênico HLA-A1,B8,DR3. Nestes últimos encontrou-se frequência aumentada do HLA-A24, B35 e B16, fato somente encontrado entre orientais e Índios Americanos. Concluí-se que a população de hispânicos normais apresenta genes HLA de origem oriental, obtidos pelo seu entrecruzamento com os índios. A falta dos genes caucasóides que predispõe à doença, como DR3, DQW8 e o alelo A3 de DQA1 protegem estes indivíduos de adquirirem a diabetes, entretanto quando recebem estes genes pela mistura com o branco, ficam predispostos a mesma. As populações diabéticas estudadas apresentam os alelos DR3 , DQW8 e A3 (DQA1) em associação significativamente positiva com a doença, confirmando o encontrado em outras populações. Associações negativas aconteceram com DR5 e DQW7 nos hispânicos e DQW6 nos anglos. Todos os pacientes hispânicos e 96% dos anglos apresentaram um ou ambos os alelos sem ácido aspártico na posição 57 de DQB, enquanto nos controles observou-se 80% e 84%, confirmando outras pesquisas que demonstraram esta predisposição ao nível molecular. Os principais métodos utilizados nesta tese foram a tipagem HLA por sorologia, tipagem HLA por RFLP e também pela amplificação do DNA com a enzima Taq polimerase, utilizando oligonucleotídeos sintéticos como sondas radioativas.

INTRODUÇÃO

1.1. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

1.1.1. A HISTORIA DO SISTEMA HLA

A ciência é fascinante quando praticada da maneira como desenvolveu-se o estudo da histocompatibilidade humana. O marco inicial pode ser colocado no ano de 1958, quando Jean Dausset publicou a descrição de um grupo leucocitário que chamou de Mac (Dausset, 1958). Após esta descoberta, formou-se um grupo de cientistas, sendo que alguns já trabalhavam em torno deste tema e outros foram atraídos pelo filão recém encontrado. O fato é que o entusiasmo destes jovens, associado ao intenso intercâmbio científico que proporcionaram, contagiou uma geração e revolucionou a Medicina.

Na medida em que a história se desenvolve, surgem novos personagens que representam a Imunologia, a Hematologia, a

Genética, a Bioquímica, a Medicina Interna e a Cirurgia. O prazer de participar desta aventura foi dividido por muitos pesquisadores e , com certeza, quando Jean Dausset recebeu o Prêmio Nobel em 1980, todos sentiram-se homenageados.

A introdução da história do sistema HLA (Human Leucocyte Antigens) começa pelos estudos de tumores em camundongos, quando pela primeira vez foi usado o termo, "antígenos de transplante" (Gorer, 1937). Esse autor deu início aos estudos do sistema H-2 do camundongo, considerado como espelho biológico do HLA. Outros pesquisadores seguiram seus passos, entre eles, George Snell, também agraciado com o Prêmio Nobel em 1980.

Os capítulos mais importantes dessa aventura foram escritos em vários países, Jean Dausset (França) , Jon van Rood (Holanda), Rose Payne, Bernard Amos, Roy Walford, Fritz Bach e Paul Terasaki (USA), Walter Bodmer, Júlia Bodmer e Richard Batchelor (Inglaterra), Flemming Kissmeyer-Nilsen e Arne Svejgaard (Dinamarca) e Rugero Ceppellini (Itália).

1.1.1.1. A DESCOBERTA DE DAUSSET

Dausset, trabalhando interessado em leuco-aglutininas, misturou, em um lâmina, o soro de um paciente leucopênico e politransfundido com leucócitos isolados de outro indivíduo (1952). Foi observada a agregação inesperada das células, com formação de grumos. Tal fato poderia ser devido a autoanticorpos ou a aloanticorpos. A primeira hipótese foi imediatamente afastada pela falta de aglutinação de seus próprios leucócitos. Esse soro foi então testado contra um painel de diversos

indivíduos, aglutinando várias amostras, quando foi observada a possibilidade de que aloanticorpos possam reconhecer "grupos de leucócitos".

Os experimentos com leuco-aglutinação continuaram sem possibilidades de alguma classificação, até que Dausset transfundiu um paciente anêmico por várias vezes, com sangue do mesmo doador. Algumas semanas após, observou a presença de um anticorpo aglutinante que reagia com os leucócitos do doador, assim como com parte de um painel de células controle. Esse anticorpo era inativo contra os leucócitos do próprio paciente e recebeu o nome de "MAC", em homenagem a três indivíduos que serviram como voluntários para os experimentos. Cada letra corresponde a inicial dessas pessoas. Estava descoberto o primeiro antígeno leucocitário, também denominado MAC e hoje conhecido como HLA-A2 (Dausset, 1958)

A descoberta dos grupos sanguíneos influenciou os desbravadores no sentido da existência de diversos sistemas leucocitários, como acontecia a nível eritrocitário. Não imaginavam que os antígenos que começavam a descrever pertenciam a um complexo de histocompatibilidade. A seguir, van Loghem descobriu que as leuco-aglutininas causavam reações não hemolíticas durante algumas transfusões de sangue (van Loghem, 1956). Na mesma época, Dausset descreveu 4 soros de indivíduos transfundidos de maneira planejada que reconheciam o mesmo antígeno MAC num painel de 25 células.

1.1.1.2. OS ANTICORPOS ANTI-HLA APÓS A GESTAÇÃO

Um importante avanço foi a descoberta independente em Leiden (van Rood, 1958) e Palo Alto (Rose Payne, 1958) de que a gravidez pode induzir a formação de leuco-aglutininas. Pelo lado holandês, o fato aconteceu em 14 de Abril de 1958, quando observaram uma reação transfusional numa mãe de quatro filhos que recebeu sangue para corrigir um sangramento após o parto de gêmeos. Graças à descrição de van Loghem, foi diagnosticada e confirmada a presença de leuco-aglutininas. A partir de então, estudaram outros soros e iniciaram pesquisas em famílias. Estes achados foram apresentados num congresso em Roma (1958), aliás no mesmo em que Dausset mostrou seus dados sobre o MAC. Posteriormente o estudo das leucoaglutininas foi transformado em tese (van Rood, 1962-b). Alguns tiveram dificuldade em entender estes achados, tanto que num diálogo com o Diretor do Northern Blood Transfusion Center (Inglaterra), van Rood recebeu a seguinte observação, quando afirmou que a gravidez podia induzir a formação de anticorpos anti-leucocitários e que estes podiam ser absorvidos com plaquetas: "Well, I don't know but you might have to eat your hat". Outros, entretanto, esperavam por tais resultados, visto que, no mesmo dia, van Rood encontrou Dausset e Colombani discutindo a possibilidade das plaquetas absorverem os anticorpos leucocitários. Quando souberam que van Rood tinha conseguido a absorção, houve a exclamação de Dausset: "What did I say! Are you now convinced?" (van Rood, 1990).

A absorção das leuco-aglutininas não representava muito naquele momento, mas, posteriormente, possibilitou a tipagem dos

antígenos de classe II (HLA-DR, DQ e DP), expressos em linfócitos B.

Van Rood continuou seus experimentos com 60 soros de múltiparas que apresentavam leuco-aglutininas, testando-os contra um painel de leucócitos de 100 doadores. Pela primeira vez acontecia um procedimento utilizado até hoje em Workshops, a análise por computador das reações de todos os soros contra todas as células (van Rood, 1962-a e 1963). Este foi o início da identificação dos anticorpos que possibilitaram as tipagens HLA.

Pelo lado norte-americano, Rose Payne estudava os auto-anticorpos envolvidos na Anemia Hemolítica Adquirida, quando procurou demonstrar a afirmação de Dausset que as leucoaglutininas poderiam ser responsáveis por leucopenia. Organizou, então, um painel com soros de 350 pacientes com diversas doenças hematológicas que fez reagir contra leucócitos de 60 indivíduos normais. Encontrou os anticorpos em 10% dos doentes, mas também observou que muitos não eram leucopênicos e que o único fato em comum era o sangue que recebiam e que freqüentemente ocasionava reações pirogênicas. Pretendeu realizar transfusões com sangue pobre em leucócitos, mas não recebeu permissão por parte do seu superior. Dausset visitou seu laboratório no mesmo ano (1956) e, posteriormente, conduziu o experimento em Paris, provando correta a hipótese de Payne sobre a participação das leuco-aglutininas nas reações pirogênicas. Indivíduos transfundidos sistematicamente com sangue pobre em leucócitos não apresentavam reações, enquanto que com a fração rica destas células demonstravam febre e calafrios.

Rose Payne recebeu finalmente a permissão para conduzir experimentos com transfusões pobres em leucócitos. Em duas ocasiões em que foi necessário transfundir sangue rico em leucócitos para pacientes com leuco-aglutininas e que experimentavam reações prévias, não observou febre. Nesse momento surgiu a idéia de que pudessem existir tipos diferentes de leucócitos. Posteriormente, constatou que a freqüência de reação pirogênica era maior em mulheres e que metade delas apresentavam reações na primeira ou segunda transfusão. O mesmo não acontecia com homens que necessitavam de vários procedimentos para iniciarem com pirexia. Uma pesquisa na história obstétrica das pacientes concluiu que somente as com gestações anteriores apresentavam reações ao primeiro estímulo. A seguir, realizou a prova entre o soro materno e as células da criança, assim como as do pai. Na maioria dos casos, os soros aglutinaram as células testadas. Ficou definida a participação de anticorpos anti-leucocitários nas reações febris de casos em que não existiam anticorpos contra eritrócitos, assim como da imunização da mãe contra os leucócitos do filho durante a gestação (Payne, 1990).

Os estudos a seguir foram semelhantes aos de van Rood, procurando reações em comum entre soros de multíparas e leucócitos de um painel. Foram definidos grupos de anticorpos que definiam antígenos, LA1 e LA2 (Payne, 1964) e 4a e 4b (van Rood, 1962). Os últimos representam os atuais Bw4 e Bw6.

1.1.1.3. OS WOKSHOPS INTERNACIONAIS E O DESENVOLVIMENTO DO HLA.

Os encontros de trabalho (workshops) proporcionaram um rápido desenvolvimento da imunogenética do Sistema HLA. O primeiro foi realizado na Duke University por Bernard Amos (1964). No referido encontro, os diversos grupos tentaram tipar algumas células e confrontar técnicas; entretanto, os resultados foram decepcionantes (van Rood, 1990).

O segundo encontro foi em Leiden (1965), ocasião em que foi possível estudar células pela leuco-aglutinação, fixação do complemento e a recente e importante técnica de microlinfotoxicidade (Terasaki, 1964). Uma das dificuldades encontradas foi a nomenclatura utilizada. Existiria mais de um sistema? Dausset denominava HU-1, análogo ao do camundongo H-2; Rose Payne e Walter Bodmer LA1, LA2 (idêntico ao MAC); van Rood 4a e 4b. Durante esse workshop demonstrou-se que os antígenos HLA eram antígenos de transplante, pois foi observado que a imunização prévia do receptor de transplante de pele com leucócitos do doador, acelerava a rejeição (van Rood, 1965). Nesse encontro Walford, demonstrou a produção de soros anti-HLA após transplante de pele e Terasaki descreveu um método de criopreservação dos linfócitos (van Rood, 1990-a).

O teste de cultura mista de linfócitos foi descoberto nessa época por dois estudos independentes (Bach, 1964) e (Bain, 1964). O teste consistia em misturar "in vitro" as células de duas pessoas e observar a transformação blástica que se seguia. Bach desenvolveu a técnica após demonstrar sua utilidade em prever a sobrevida de transplantes de pele e definiu o método como "um

potente teste de histocompatibilidade" (Bach, 1964). O próximo passo foi o estudo de uma família de 17 filhos, no qual ficou demonstrado que, entre irmãos, 25% não se estimulavam mutuamente "in vitro" (Bach, 1966). A seguir, tornou-se evidente que os indivíduos que não se estimulavam, apresentavam os mesmos antígenos HLA (Bach, 1967) e que o teste da cultura mista de linfócitos e o teste sorológico pareciam predizer a sobrevida dos transplantes. Posteriormente, foi identificada uma família em que dois irmãos eram idênticos na sorologia, mas estimulavam-se em cultura. Isso deu origem à hipótese de existir uma nova região (HLA-D) ligada, mas não idêntica aos antígenos observados sorologicamente (Amos, 1968) e (Bach, 1969).

Os melhores estudos da utilização da cultura mista para caracterização HLA foram desenvolvidos em Leiden, alguns anos depois. Van Rood imaginou um teste que pudesse caracterizar especificidades pela cultura mista. As células deveriam ser homozigotas, ou seja, apresentarem o haplótipo HLA em dose dupla. Os candidatos para homozigose eram os filhos de casamentos entre primos e seria muito difícil encontrar esses indivíduos, entretanto, lembraram que a Igreja Católica não permitia tais casamentos, a não ser com o consentimento Papal. Van Rood escreveu para o Papa, solicitando utilizar a informação dos arquivos da Igreja. Passados alguns meses, recebeu uma carta para entrar em contato com o Bispo de Haarlem, do qual obteve a permissão para encontrar as famílias. O estudo demonstrou que era possível a tipagem pela cultura com células homozigotas (van Tweel e van Rood, 1973). Posteriormente, foram descobertos os antígenos HLA-DR, presentes nos linfócitos B e que segregavam,

quase sempre, com os padrões da tipagem por cultura com células homozigotas (van Rood, 1975)

Os transplantes começaram a ter grande interesse. Uma importante contribuição foi o estudo combinado de famílias com transplantes de pele, possibilitando observar a relação de compatibilidade HLA e rejeição (van Rood, 1966). Dausset e Rapaport também demonstraram que os grupos sanguíneos e o HLA eram importantes na rejeição de transplantes de pele.

O terceiro workshop foi realizado por Ceppellini em Turin (1967), quando ficou estabelecido que existia um único loco com dois sub-locos e uma reunião do comitê de nomenclatura do WHO definiu a sigla HL-A (Human Leucocyte Loco A). Treze grupos participaram do estudo de onze famílias e a segregação em haplótipos foi bem documentada. Nessa época, 13 antígenos já tinham sido descritos por vários grupos. Uma apresentação de importância foi a de Amiel que, pela primeira vez, relacionou o HLA com uma doença (Hodgkin). Van Rood apresentou os resultados de 25 transplantes realizados com avaliação do HLA, assim como Rose Payne. Ambos mostraram que alguns pacientes passavam bem, embora com a pior compatibilidade, mas, de maneira geral, existia uma relação do HLA com a sobrevida. Nessa reunião van Rood propôs a organização do Eurotransplant, entidade cooperativa para proporcionar tipagens de doadores e receptores e facilitar o intercâmbio de órgãos entre diversos centros Europeus. Essa organização começou a funcionar em 1968, sendo seguida pelo France-Transplante, UK Transplant Service e pelo Scandia Transplant (van Rood, 1990).

Um avanço na relação do HLA com os transplantes aconteceu quando foi demonstrado que anticorpos linfocitotóxicos eram produzidos após a rejeição de transplantes de rins (Morris, 1968). A seguir, foi observado por estudo retrospectivo que 24 dentre 30 pacientes com prova cruzada positiva apresentavam rejeição acelerada (Patel, 1969). Esse achado fez com que os cirurgiões acreditassem definitivamente na prova cruzada pré-transplante.

Outra importante contribuição foi a de que o teste HLA podia selecionar os irmãos idênticos para um transplante, favorecendo o resultado (Singal, 1969). Nesse momento, os grandes centros médicos abriam novos laboratórios de HLA. Na mesma época, foi realizado o primeiro transplante de medula óssea num paciente com Síndrome de Wiscott-Aldrich, após teste de cultura mista não reativo (Bach, 1968),

O quarto "Workshop" foi organizado por Terasaki em Los Angeles (1970). Pela primeira vez foram selecionados 160 soros de 21 laboratórios e enviados para os participantes. Tiparam-se 280 famílias e cerca de 27 especificidades antigênicas foram definidas. Nesse encontro, Thorsby e Kissmeyer-Nilsen apresentaram as primeiras evidências do terceiro loco (HLA-C) (Terasaki, 1990), assim como introduziram o método de Boyum para separação de linfócitos com Ficoll-Hypaque (Boyum, 1974).

Dausset organizou o quinto "Workshop" em Paris (1972), tendo concebido um estudo antropológico internacional. A tipagem HLA de variadas populações serviu para mostrar as diferenças entre os povos, em relação às frequências desses marcadores genéticos (Dausset, 1990).

O sexto "Workshop" foi organizado por Kismeyer-Nielsen em Arhus (1975), tendo sido importante pelos achados de reatividade de certos soros com linfócitos B, antecedendo a descoberta do loco HLA-DR. Este foi definitivamente demonstrado no sétimo "Worshop" organizado por Bodmer, em Oxford (1977). Os primeiros sete antígenos foram então definidos pelos laboratórios participantes, em número de 150 (Bodmer, 1990).

A produção de anticorpos monoclonais anti-HLA foi pela primeira vez conseguida contra o HLA-A2, posteriormente identificado como sendo anti-HLA-Aw69 (Parhan, 1978).

Terasaki organizou o oitavo "Worshop" em Los Angeles (1980) quando 37000 células foram estudadas, sendo possível caracterizar 78 especificidades. O tema oficial foi o estudo de transplantes, sendo tipados 1113 pacientes transplantados em diversos países. A relação do HLA-DR com a sobrevida do órgão foi novamente observada, especialmente em transplantes com doador cadáver realizados em pacientes não transfundidos (Terasaki, 1990).

A região do cromossoma 6, onde se encontram os locos HLA, passou a chamar-se de Complexo Principal de Histocompatibilidade, sendo formada pelos locos A, B, C, DR, DQ, DP e DZ. Os primeiros três locos apresentam os genes de classe I, enquanto os demais, os de Classe II (Fig.1.1). O HLA-DQ e DP surgiram por último, sendo o primeiro descoberto antes de oitavo "Worshop" (Duquesnoy, 1979) e melhor caracterizado no de Viena (1984). Nesse, foram conhecidas as especificidades sorológicas DQw1, DQw2, DQw3, enquanto as especificidades DP foram definidas pelo método do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP). Os transplantes de rins com doador cadáver e melhor

compatibilidade HLA-B, DR tiveram desempenho 22% superior aos com pior compatibilidade (van Rood, 1990).

A reação em cadeia da polimerase foi introduzida recentemente e trouxe um importante avanço no estudo da imunogenética do HLA (Saiki, 1985).

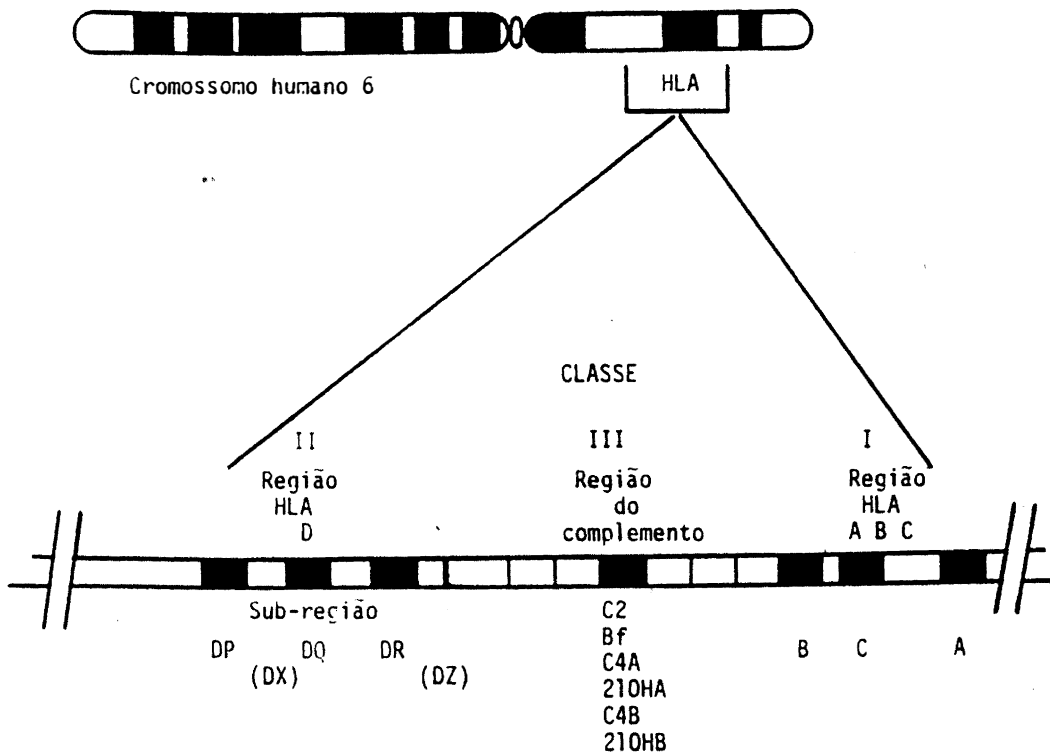


Fig. 1.1. Cromossomo nº 6 humano e a região HLA

O décimo "workshop" foi organizado por Bo Dupont em Nova York (1987), onde foi muito estudada a metodologia do RFLP, analisando-se diversas enzimas de restrição e seus respectivos fragmentos. O encontro teve 1500 participantes e os anais apresentam 1600 páginas.

Muitos pontos estão bem determinados em relação aos transplantes e a compatibilidade HLA, enquanto outros ainda encontram-se obscuros. Os transplantes de rim, com doador vivo relacionado, são muito favorecidos pela melhor histocompatibilidade. Os transplantes de medula óssea são os mais críticos em relação à compatibilidade, devendo-se observar uma cultura mista não estimulatória, entretanto, mesmo com indivíduos HLA idênticos, poderemos observar rejeições. Os transplantes de órgãos de doador cadáver acontecem a despeito da incompatibilidade HLA, sendo que o sucesso dos de coração e de pulmão, são independentes do HLA. Nos transplantes de rins com doador cadáver, ora observa-se relação com a melhor compatibilidade, ora diz-se que a imunossupressão com ciclosporina ou as transfusões tornam desnecessária a compatibilidade HLA. A maioria, entretanto acredita que a compatibilidade DR proporciona melhores resultados.

A relação do HLA com doenças é outra área em que se observaram inúmeras correlações com o HLA, mas ainda não se entendeu o mecanismo que predispõe os portadores de certos genótipos a adquirirem as doenças relacionadas. A introdução da biologia molecular com seus novos métodos de explorar os genes humanos, possivelmente trará essas respostas, dando continuidade à história do Sistema HLA.

Trinta anos após a descoberta do antígeno MAC, mostrou-se a imagem cristalográfica do mesmo (Fig. 2.1.). Trata-se de uma figura com se fosse um ninho e no seu interior observa-se um peptídeo (Bjorkman e Strominger, 1987). Revelou-se assim, a

principal função biológica do sistema HLA que é a apresentação de antígenos às células imunocompetentes (linfócitos T).

1.1.2. GENÉTICA E NOMENCLATURA

O Complexo Principal de Histocompatibilidade é hoje uma região bem conhecida do braço curto do cromossomo número 6 humano, sendo que no camundongo está localizado no de número 15. Nessa região é que se encontram os genes do sistema HLA. O rápido desenvolvimento da pesquisa desse sistema proporcionou a identificação de dois tipos diferentes de estruturas na membrana das células, os antígenos de classe I e os de classe II. Essas são glicoproteínas com forte capacidade imunogênica e representam a expressão fenotípica dos genes HLA. Praticamente todas as células do organismo apresentam tais antígenos na membrana, excetuando-se os eritrócitos.

Os antígenos de classe I são representantes dos locos HLA-A, HLA-B e HLA-C, enquanto os de classe II dos locos HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Foram identificados outros genes na região entre os locos HLA-B e HLA-DR que codificam para os componentes C2, C4 e Bf do sistema do complemento, para o Fator de Necrose Tumoral e para a 21-Hidroxilase. Os últimos são também conhecidos como genes de classe III (Fig. 1.1).

Os antígenos de classe I e II apresentam homologia estrutural com as imunoglobulinas, receptor antigênico de linfócitos T e com antígenos de diferenciação CD4 e CD8. A forma

globular dessa família de "supergenes" sugere especialização em mecanismos de interação e reconhecimento, como de fato acontece (Willians, 1987).

Desde os primórdios do conhecimento científico dessa região, observou-se que seus genes segregavam de forma mendeliana e codominante (Payne, 1964). Cada indivíduo herda um alelo de cada loco por cromossomo. Os antígenos no mesmo cromossomo formam um conjunto ou haplótipo. Sendo assim, recebemos um haplótipo de cada genitor. Entre irmãos há a probabilidade de que 25 % tenham os dois haplótipos em comum, 25 % de que sejam totalmente diferentes e 50 % de apresentarem um dos haplótipos em comum.

1.1.2.1. ANTÍGENOS DE CLASSE I

As moléculas de classe I são duas cadeias de polipeptídeos em associação não-covalente na superfície da célula. A cadeia pesada de 44000 daltons é reponsável pelos determinantes antigênicos e se insere na superfície celular. A cadeia leve de 12000 daltons não é produto HLA, mas uma β 2-microglobulina codificada no cromossomo 15 humano e, provavelmente, responsável pela estabilidade estrutural da cadeia pesada (Fig. 3.1).

A cadeia pesada apresenta três domínios na sua parte exterior, cada um com cerca de 90 resíduos de aminoácidos. As regiões antigênicas estão no primeiro (α 1) e segundo (α 2) domínios e a interação da cadeia leve com a pesada acontece por influência dos três domínios da última (Gussov, 1987). Existem três tipos de cadeia pesada, HLA-A, B, C, com a possibilidade de diversos alelos (Tab. 1.1).

Os antígenos de classe I são expressos na maioria das células, entretanto, os linfócitos são mais adequados para o estudo do HLA. A presença dessas proteínas no endotélio vascular é fator importante nos estudos das rejeições, sendo que em momentos de reação inflamatória, aumenta a densidade das referidas proteínas.

A estrutura do HLA-A2 foi determinada por cristalografia (Bjorkman e Strominger, 1987), demonstrando a forma de um ninho, onde a parte distal da membrana corresponde à região entre $\alpha 1$ e $\alpha 2$. As diferenças na reatividade sorológica desse antígeno são traduzidas por modificações nas margens do ninho, assim como na sua base. Os fragmentos antigênicos, possivelmente são acoplados nessa estrutura para posterior estímulo imunológico (Fig. 2.1)

1.1.2.2. ANTÍGENOS DE CLASSE II

As moléculas de classe II são formadas por duas cadeias de polipeptídios (α e β), não covalentemente ligadas, mas inseridas na membrana celular pela região COOH terminal (Fig. 4.1.). Cada cadeia tem aproximadamente 34000 e 28000 daltons respectivamente, sendo divididas em dois domínios semelhantes aos das imunoglobulinas. A expressão antigênica acontece de maneira polimórfica nos domínios externos ($\alpha 1$ e $\beta 1$). Os antígenos de classe II são mais limitados em expressão do que os de classe I. Encontramos essas proteínas nos linfócitos B, macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos T ativados. O endotélio vascular expressa antígenos de classe II, somente quando apresenta reação inflamatória associada. Tais antígenos

não são encontrados nas plaquetas, eritrócitos e linfócitos T em repouso (Blann, 1988).

Existem três tipos de moléculas de classe II, mas a situação é diferente das de classe I, pois ambas as cadeias apresentam codificação ao nível do DNA, podendo cada uma ter seu polimorfismo. O HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP são sub-regiões da região D e produto de dois genes adjacentes e ligados, um para cadeia α e outro para β (Fig. 5.1.). Os antígenos HLA-DR são formados, na maioria das vezes, por uma cadeia α não polimórfica e por uma cadeia β (DR1, DR2, DR3, DR4...). Outras vezes, a mesma cadeia α pode estar associada a uma cadeia β 3 (DRw52) ou a β 4 (DRw53).

A correlação da sorologia com RFLP é excelente, quando se utilizam sondas para DRB1 (Bell, 1987-b ; Cohen, 1984). Pode-se observar que alguns antígenos apresentam uma especificidade super-típica, como o DRw52 e DRw53. A família do primeiro abrange DR3, DR5, DR6, enquanto DR4, DR7 e DR9 pertencem ao grupo do DRw53.

Os antígenos HLA-DQ são produtos de uma cadeia α e uma β polimórficas e associadas. Essas são identificadas ao nível do cromossomo 6, como DQA1 e DQB1. Os antígenos HLA-DQ estão em forte desequilíbrio de ligação com os HLA-DR. Existe uma cadeia α e uma β de pseudo genes não expressos na membrana celular, tanto para HLA-DR como para HLA-DQ (DX), assim como existem outros pseudo genes com DZ e DO (Fig. 5.1.).

Os antígenos HLA-DQ não são facilmente detectados sorologicamente, sendo melhor analisados por tipagem com oligonucleotídeos sintéticos após amplificação do DNA.

O polimorfismo do HLA-DP não é identificado pela sorologia, sendo difícil sua caracterização pelo RFLP. Os primeiros resultados de sua variação alélica aconteceram com a utilização do método de tipagem com linfócitos previamente estimulados (PLT). Essa região não está em desequilíbrio com o grupo DR-DQ, podendo-se observar 4 alelos pelo PLT e diversos outros com tipagem com oligonucleotídeos (Bugawan, 1988)

O sequenciamento dos aminoácidos dos antígenos de classe II trouxe importantes informações ao entendimento do polimorfismo dessa região. A maioria dos dados foram obtidos a partir de sequenciamento clássico de clones de cDNA derivados de linhagens celulares com especificidades bem definidas. Recentemente, foi possível obter estas seqüências com produtos de PCR de DNA genômico (Saiki, 1986) e de cDNA (Todd, 1987).

Os resultados desse sequenciamento demonstram uma microheterogeneidade não observada pela sorologia ou pelo RFLP, o que é mais evidente em relação ao polimorfismo DQ, sendo muito mais extenso do que o esperado (Gregersen, 1986).

A sub-região DR foi dissecada, observando-se que o DRA não apresenta polimorfismo, sendo que este pode ser encontrado no locus DRB1. A maior parte deste polimorfismo está confinado no domínio distal à membrana celular e é restrito a três regiões de hipervariabilidade alélica entre os resíduos 9-13, 26-37, 67-74 (Bell, 1987-b). Quando os resíduos são comparados em cada um dos principais haplótipos DR, observa-se que somente quatro apresentam mais de cinco substituições de aminoácidos. Na maioria das posições, a variação em cada aminoácido está restrita a duas ou três possibilidades.

O polimorfismo em DQA1 e DQB1 também é traduzido por diferenças a nível de seqüências de aminoácidos como o observado em DRB1. Existem três regiões de hipervariabilidade alélica em DQB1 localizadas entre os resíduos 52-57, 70-77 e 84-90, enquanto somente uma em DQA1 (45-56).

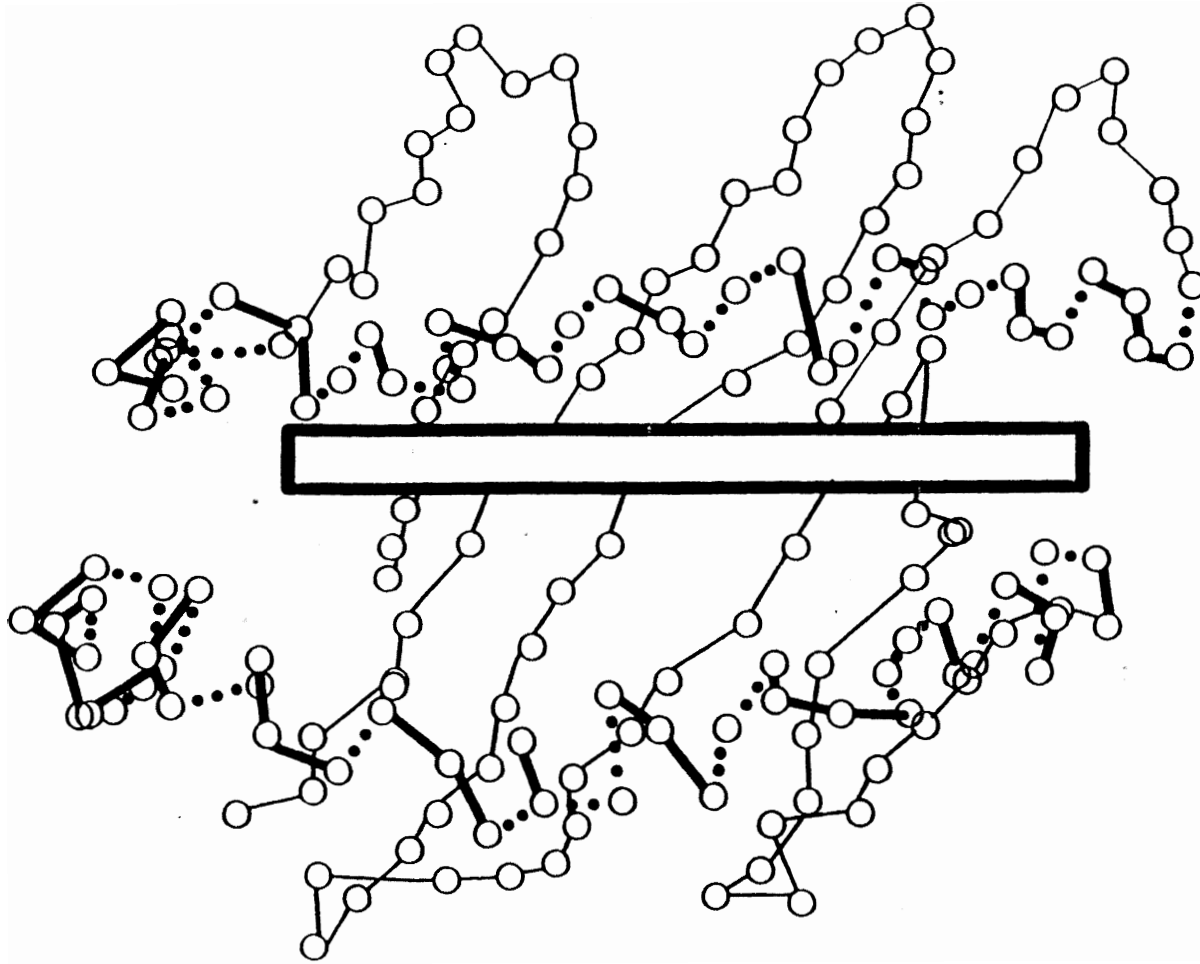
A determinação da estrutura cristalográfica da molécula do HLA-A2 permite a imaginação de que os antígenos de classe II também apresentem estrutura semelhante (Brown, 1988).

1.1.2.3. ANTÍGENOS DE CLASSE III

Os genes de C2, C4a, C4b, Bf, fator de necrose de tumores e 21-hidroxilase encontram-se na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade, sendo conhecidos como "antígenos de classe III". Eles são ativamente secretados, sendo que C2 e Fator B são proteases que atuam em associação com os outros componentes do sistema do complemento (C4 e C3 respectivamente), formando C3 convertase. Desta ativação teremos estímulos à fagocitose, assim como lise de células antigênicas (Fu, 1974 e Meo, 1976).

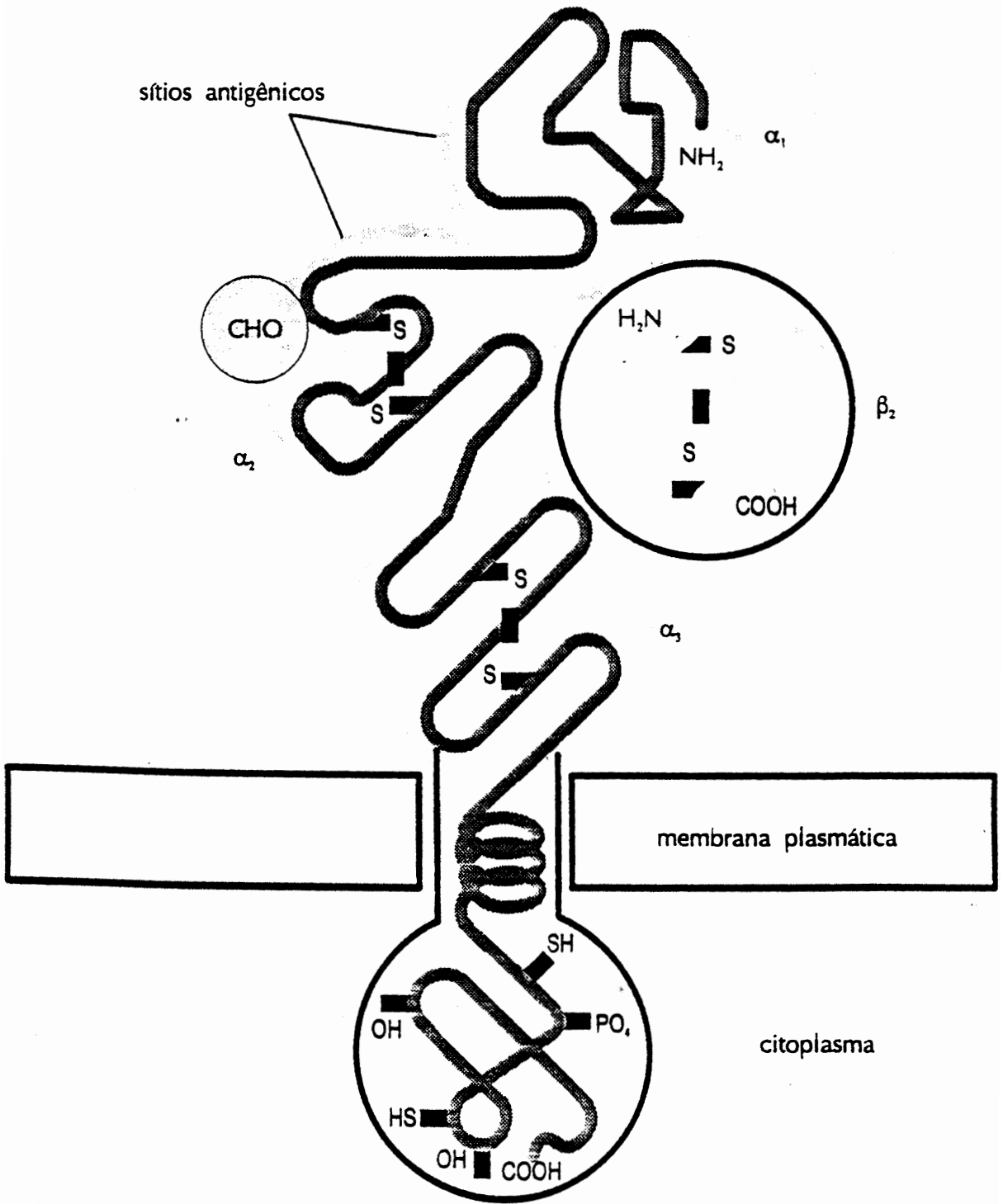
O fator de necrose tumoral é uma citoquina produzida por monócitos e macrófagos, frequentemente após estímulo com antígenos de polissacáride de bactéria. Esta molécula de 17000 daltons apresenta funções "in vitro" e "in vivo" relacionadas à citotoxicidade. A 21-hidroxilase é uma enzima importante na biogênese dos esteróides, principalmente do cortisol (Blann, 1988)

Fig. 2.1. Estrutura molecular do HLA-A2



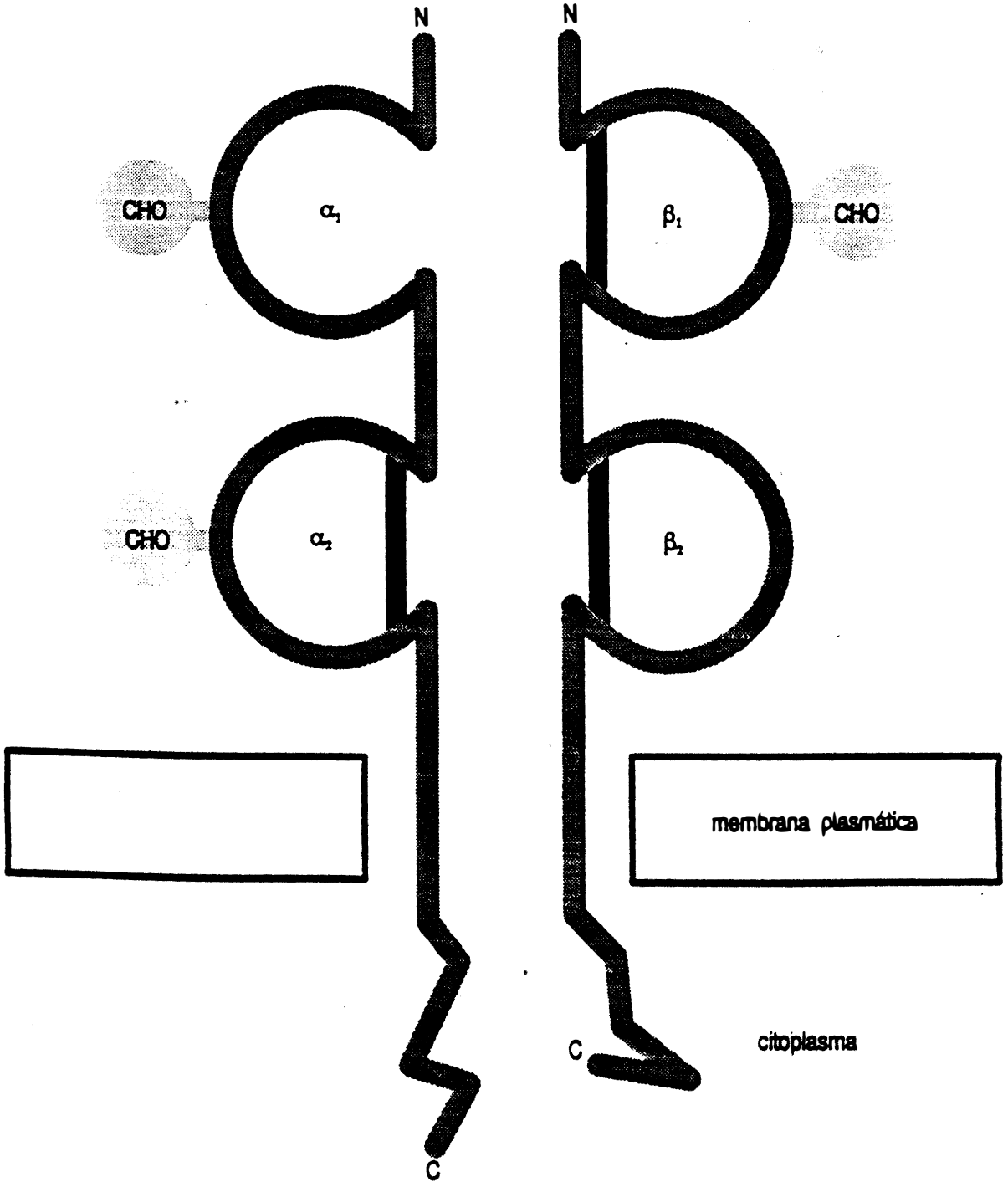
Estrutura observada por cristalografia de raio X, representando a molécula de HLA de classe I, com o material eletrodensso no seu interior (antígeno). (Bjorkman, 1987).

Fig. 3.1. Estrutura de um antígeno HLA de classe I (HLA-A, B, C)



As cadeias que formam o antígeno HLA apresentam três domínios globulares (α_1 , α_2 e α_3). O domínio α_3 está intimamente associado a um peptídeo, não codificado pelo complexo principal de Histocompatibilidade (β_2 -microglobulina). Os determinantes antigênicos estão localizados nos domínios α_1 e α_2 .

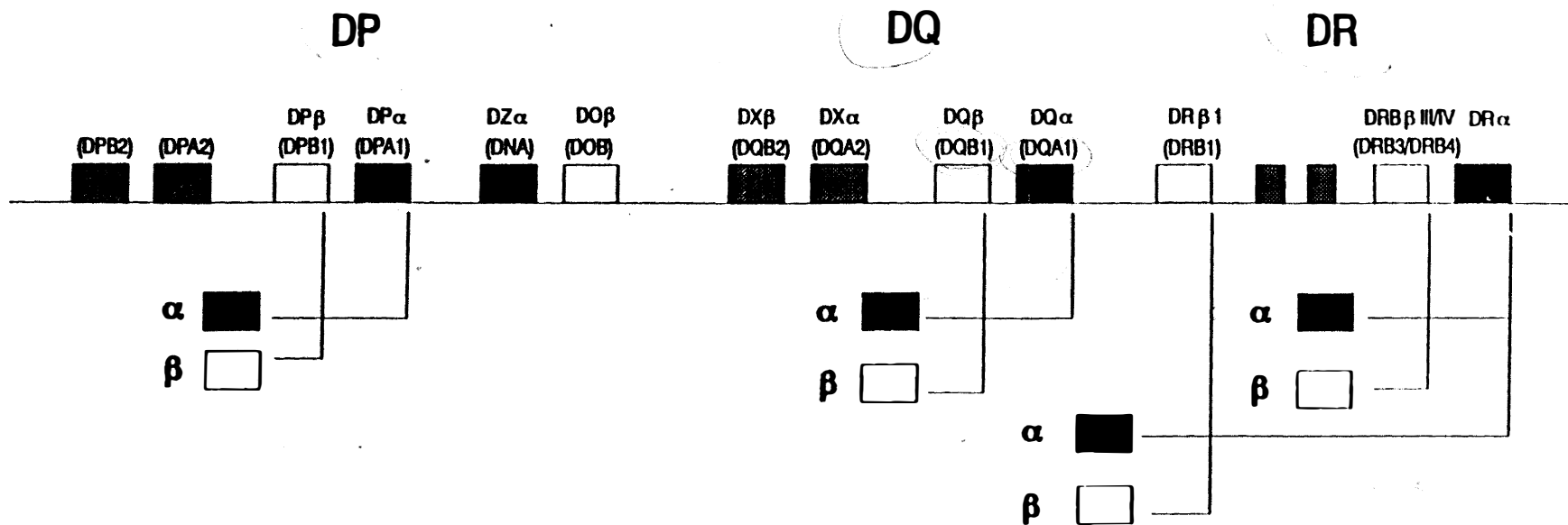
Fig. 4.1. Estrutura de um antígeno HLA de classe II (HLA-DR)



A molécula do HLA-DR é representada por dois peptídeos diferentes (α e β), não covalentemente ligados, os quais atravessam a membrana pelo C terminal. O polimorfismo antígenoico acontece em β₁.

Fig. 5.1. Genes e proteínas HLA de classe II

Genes HLA de Classe II



Proteínas HLA de Classe II

Os locos para cadeias alfa estão representados em negro, os beta em branco e os locos não expressos na membrana celular em listados. Na figura, a nova nomenclatura encontra-se entre parênteses.

1.1.2.4. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

A associação preferencial de alelos HLA no mesmo cromossomo foi observada precocemente no estudo desse sistema. É como se certos genes tivessem a preferência para estarem juntos nos haplótipos HLA. O exemplo pode ser dado com o haplótipo HLA-A1/HLA-B8. A frequência esperada da associação A1-B8 seria calculada pela multiplicação da frequência do alelo A1 pela do B8 ($0.15 \times 0.10 = 0.015$), entretanto, a frequência observada é de 0.07. Este número é 5 vezes maior do que a frequência esperada por combinações dos dois alelos ao acaso e representa um dos mais típicos desequilíbrios de ligação da raça branca (caucasóide).

É razoável a expectativa de que alelos de genes, intimamente ligados e próximos, sejam passados juntos, em um haplótipo, dos pais para os filhos. Não seria de esperar, entretanto, que em algumas populações, certos haplótipos fossem mantidos mais frequentes do que outros, especialmente pelo fato de existir uma frequência de entre-cruzamento ("crossing over") de 0.8 % entre o locus A e B (Belvedere, 1975).

Este fenômeno de combinações alélicas preferenciais é chamado de "associação gamética" ou "desequilíbrio de ligação" (Bodmer, 1977). O valor de delta (Δ) simboliza a diferença entre a frequência observada e a esperada. No exemplo anterior, $\Delta = (0.07 - 0.015) = 0.06$.

Os desequilíbrios acontecem em poucas combinações de alelos e envolvem as regiões adjacentes do cromossomo. Sendo assim, o haplótipo anterior completo é HLA-A1, B8, Cw7, DR3, DQW2.

Outros desequilíbrios típicos de caucasóides são: A3, B7, Cw7, DR2 e A2, B12, Cw5, DR4.

O desequilíbrio de ligação serve para estudar a migração de povos, para avaliar o grau de isolamento ou de mistura de raças. Novos desequilíbrios podem acontecer após intensa fusão de populações, assim como após forças de seleção sobre o sistema HLA (Blann, 1988).

1.1.2.5. CLASSIFICAÇÃO

Atualmente existe um Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde para Fatores do Sistema HLA. A preocupação dos seus membros é possibilitar uma classificação baseada nos estudos sorológicos, nas tipagens celulares e nas seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos, resultado das tipagens moleculares.

Os critérios para inclusão de um gene ou alelo são de existam os clones dos quais as seqüências derivaram, as respectivas linhas celulares e a publicação da seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos.

Os trabalhos de sorologia utilizam a classificação em especificidades ou antígenos HLA. As tipagens moleculares ao nível de classe II podem usar a mesma classificação, de acordo com as normas publicadas (Bodmer, 1990) (Tab. 1.1., 2.1., 3.1.). Deve-se lembrar da importância da relação das tipagens HLA-D, definidas por métodos celulares para a caracterização dos alelos e antígenos HLA. Estas definem melhor os produtos dos genes do que a sorologia. A associação entre HLA-DR e DQ é de grande

importância para a melhor caracterização dos indivíduos (Tab. 4.1.)

1.1.2.6. HLA E POPULAÇÕES

A frequência dos fenótipos e genótipos HLA são importantes parâmetros na caracterização de grupos populacionais (Tab. 5.1., 6.1, 7.1 e 8.1) . Os métodos para o cálculo dessas frequências serão apresentados posteriormente (Material e Métodos).

Existem diferenças importantes entre os haplótipos das diversas raças (Dausset, 1985), observando-se que HLA-A1, A3 e B8, ocorrem mais freqüentemente entre caucasóides; HLA-A24, B16, B54(22) e B61(40) entre orientais; HLA-A23, A30, B17 e B42 entre negros.

O polimorfismo do HLA, associado à raridade de muitos de seus alelos, possibilitou sua utilização nos estudos de migrações de povos, assim como na investigação de paternidade.

1.1.2.7. HLA E INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE

Existem algumas condições necessárias para que um sistema possa ser utilizado na investigação de paternidade. A transmissão genética deve ser bem conhecida, presente desde o nascimento e permanecendo por toda vida. Os testes devem ser fiéis e reproduzíveis. O sistema HLA preenche todos estes critérios.

Na investigação de paternidade estuda-se a mãe, o possível pai e a criança. O sistema HLA é codominante, ou seja, os genes

transmitidos para o filho estão presentes no pai e na mãe. Sendo assim, o exame dos antígenos HLA da mãe e do filho, possibilita o conhecimento do haplótipo materno transmitido para o filho, sendo que o outro haplótipo, presente no último, deverá ser de origem paterna (Terasaki, 1978).

Existem duas possibilidades de resultados para uma investigação. O acusado é excluído da paternidade ou não. O sistema HLA, devido ao seu polimorfismo, apresenta um índice elevado para a probabilidade de exclusão (97.5%). Esta probabilidade diminui em sistemas com menor polimorfismo, sendo de 37% para o da fosfatase ácida (3 alelos) e 19% para o MN (Wiener, 1968).

A verificação da probabilidade de exclusão de 252 trios de raça branca e negra, onde o "possível" pai era sabido não ser o pai biológico, foi realizada com os testes do ABO, Rh, MNS e HLA. Os resultados demonstraram que 244 dos 252 (96.8%) foram excluídos, sendo que 97 dos 100 trios de raça negra (97%) e 147 dos 152 de raça branca (Silver, 1987).

O sistema HLA mostrou a possibilidade de identificação das paternidades de dois gêmeos não idênticos, ou seja, gêmeos com pais diferentes (Terasaki, 1978).

A perícia de 866 casos de investigação de paternidade realizada com HLA e grupos sanguíneos (Davey, 1984), demonstrou 194 casos de exclusão (22%). O sistema HLA possibilitou sozinho a exclusão de 92% destes casos, enquanto os grupos sanguíneos sem HLA proporcionaram 8%. Quando somente o HLA era testado, 43% dos casos apresentavam probabilidade de paternidade acima de 95%, enquanto com a combinação HLA e grupos sanguíneos chegavam a 69%

Uma análise crítica da determinação de paternidade dos casos realizados na Carolina do Norte (EUA) demonstrou que a exclusão chegou a 40% em negros e a 30% nos brancos, assim como somente 10% dos casos analisados ficaram sem conclusão (Heise, 1983).

A Biologia Molecular trouxe, recentemente, avanços no estudo de paternidades duvidosas, como a utilização de sondas para as regiões de hipervariabilidade conhecidas como "minisatélites", após a clivagem do DNA por enzimas de restrição. Este método também utiliza o RFLP e é conhecido como "impressão digital do DNA" ("DNA fingerprint") , entretanto não será motivo de apreciação neste trabalho.

TABELA 1.1. LISTA DE ESPECIFICIDADES HLA-A, B, C, D, P.

HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-P
A1	B5	B55 (22)	CW1	DW1	DPW1
A2	B7	B56 (22)	CW2	DW2	DPW2
A9	B8	B57 (17)	CW3	DW3	DPW3
A10	B12	B58 (17)	CW4	DW4	DPW4
A11	B13	B59	CW5	DW5	DPW5
AW19	B14	BW60(40)	CW6	DW6	DPW6
A23 (9)	B15	BW61(40)	CW7	DW7	
A24 (9)	B16	BW62(15)	CW8	DW8	
A25 (10)	B17	BW63(15)	CW9(W3)	DW9	
A26 (10)	B18	BW64(14)	CW10(W3)	DW10	
A28	B21	BW65(14)	CW11	DW11(W7)	
A29 (19)	BW22	BW67		DW12	
A30 (19)	B27	BW70		DW13	
A31 (19)	B35	BW71(70)		DW14	
A32 (19)	B37	BW72(70)		DW15	
AW33(19)	B38 (16)	BW73		DW16	
AW34(10)	B39 (16)	BW75(15)		DW17(W7)	
AW36	B40	BW76(15)		DW18(W6)	
AW43	BW41	BW77(15)		DW19(W6)	
AW66(10)	BW42			DW20	
AW68(28)	B44 (12)	BW4		DW21	
AW69(28)	B45 (12)	BW6		DW22	
AW74(19)	B46			DW23	
	B47			DW24	
	B48			DW25	
	B49 (21)			DW26	
	B50 (21)				
	B51 (5)				
	B52 (5)				
	BW53				
	BW54(22)				

TAB. 2.1. LISTA DE ALELOS E ESPECIFICIDADES HLA-DR

ALELO HLA	ANTIGENO HLA	HLA-D	LINHA CELULAR
DRB1 0101	DR1	DW1	LG2
DRB1 0102	DR1	DW20	NASC
DRB1 0103	DR'BR'	DW'BON'	RAI, BG
DRB1 1501	DRW15(2)	DW2	PGF
DRB1 1502	DRW15(2)	DW12	BGE, DHO
DRB1 1601	DRW16(2)	DW21	AZH, MN-2
DRB1 1602	DRW16(2)	DW22	REM, (RML)
DRB1 0301	DRW17(3)	DW3	RAJI, WT49, AVL
DRB1 0302	DRW18(3)	DW'RSH'	2041
DRB1 0401	DR4	DW4	WT51, GM3103
DRB1 0402	DR4	DW10	FS
DRB1 0403	DR4	DW13	SSTO
DRB1 0404	DR4	DW14	LS40, BIN40
DRB1 0405	DR4	DW15	KT3
DRB1 0406	DR4	DW'KT2'	KT2
DRB1 0407	DR4	DW13	JHF
DRB1 0408	DR4	DW14	M36, RA1
DRB1 1101	DRW11(5)	DW5	SWEIG
DRB1 1102	DRW11(5)	DW;JVM'	JVM
DRB1 1103	DRW11(5)	-	UA-S2
DRB1 1104	DRW11(5)	DW'FS'	FPA (FPF)
DRB1 1201	DRW12(5)	DW'DB6'	HERLUFF
DRB1 1301	DRW13(W6)	DW18	HHKB, APD
DRB1 1302	DRW13(W6)	DW19	WT46
DRB1 1303	DRW13(W6)	DW'HAG'	HAG
DRB1 1401	DRW14(W6)	DW9	4/W6, TEM
DRB1 1402	DRW14(W6)	DW16	AMALA
DRB1 0701	DR7	DW17	BURKHADT
DRB1 0702	DR7	DW'DB1'	LBF
DRB1 0801	DRW8	DW8.1	MADURA
DRB1 0802	DRW8	DW8.2	SLP

TAB. 2.1. LISTA DE ALELOS E ESPECIFICIDADES HLA-DR (Cont.)

ALELO HLA	ANTIGENO HLA	HLA-D	LINHAGEM CELULAR
DRB1 0803	DRW8	DW8.3	TAB089
DRB1 0901	DR9	DW23	ISK,DKB
DRB1 1001	DRW10	-	RAJI
DRB3 0101	DRW52a	DW24	AVL,HHKB
DRB3 0201	DRW52B	DW25	4/W6,WT49
DRB3 0202	DRW52B	DW25	SWEIG
DRB3 0301	DRW52C	DW26	WT46
DRB4 0101	DRW53	DW4,DW10...	LBF,DKB...
DRB5 0101	DRW15(2)	DW2	PGF
DRB5 0102	DRW15(2)	DW12	BGE,DHO
DRB5 0201	DRW16(2)	DW21	BGE,DHO
DRB5 0202	DRW16(2)	DW22	REM(RML)

TAB. 3.1. LISTA DE ALELOS E ESPECIFICIDADES HLA-DQ

ALELO HLA	ANTIGENO HLA	HLA-D	LINHAGEM CELULAR
DQA1 0101	-	DW1, W9	LG2, BML
DQA1 0102	-	DW2, W21, W19	PGF, LB, WT46..
DQA1 0103	-	DW18, W12, , W8	APD, TAB, FPF
DQA1 0201	-	DW7, W11	LG10, BEI
DQA1 0301	-	DW4, W10, W13..	JY, DKB, ISK..
DQA1 0401	-	DW8, DW' RSH'	MADURA, ARC
DQA1 0501	-	DW3, W5, W22	RAJI, SWEIG
DQA1 0601	-	DW8	LUY
DQB1 0501	DQW5 (W1)	DW1	LG2, BML, MLV
DQB1 0502	DQW5 (W1)	DW21	AZH
DQB1 0503	DQW5 (w1)	DW9	WT52, HU129
DQB1 0601	DQW6 (W1)	DW12, W8	DQBS4, BGE, TAB
DQB1 0602	DQW6 (W1)	DW2	PGF, DQBS5
DQB1 0603	DQW6 (W1)	DW18, DW' FS'	WVB, APD, FPF
DQB1 0604	DQW6 (W1)	DW19	DAUDI, CMCC
DQB1 0201	DQW2	DW3, W7	QBL, WT49, CMCC
DQB1 0301	DQW7 (W3)	DW4, W5, W8, W13	LUY, SWEIG, NIN
DQB1 0302	DQW8 (W3)	DW4, W10, W13	PE117, BIN40
DQB1 0303	DQW9 (W3)	DW23, W11	DBB, FS, BIN40
DQB1 0401	DQW4	DW15	KT3
DQB1 0402	DQW4	DW8, DW' RSH'	ARC, OLN, 2041

TAB. 4.1. ASSOCIAÇÕES HLA DE CLASSE II

HLA-DR	HLA-DQ	HLA-D
DR1	DQW5(W1)	DW1, DW20
DRW15(2)	DQW6(W1)	DW2, DW12
DRW16(2)	DQW5(W1)	DW21
DRW16(2)	DQW7(W3)	DW22
DRW17(3)	DQW2	DW3
DRW18(3)	DQW4	RSH
DR4	DQW7(W3), DQW8(W3)	DW4, DW10, DW13
DR4	DQW4	DW15
DRW11(5)	DQW7(W3)	DW5
DRW12(5)	DQW7(W3)	DB6, HERL
DRW13(W6)	DQW6(W1)	DW18(W6), DW19
DRW13(W6)	DQW7(W3)	HAG
DRW14(W6)	DQW5(W1)	DW9
DRW14(W6)	DQW7(W3)	DW16
DR7	DQW2	DW17(W7)
DR7	DQW9(W3)	DW11(W7)
DRW8	DQW4, DQW7(W3)	DW8
DR9	DQW9(W3)	DW23
DRW10	DQW5(W1)	SHY
BR	DQW5(W1)	BON

1.1.3. OS ANTÍGENOS HLA E A RESPOSTA IMUNE

A função mais importante do Complexo Principal de Histocompatibilidade é a de participar na apresentação de antígenos aos receptores dos linfócitos T. Estes sómente reconhecem um antígeno no contexto do seu próprio HLA (self) e não independentemente (Boilston, 1989; Haskins, 1984; Reinherz, 1983). Foi observado que os linfócitos T citotóxicos reconhecem um vírus, desde que este seja apresentado por intermédio de uma célula com os mesmos antígenos de classe I (self) na membrana. Esse fenômeno é conhecido como "restrição" ("HLA restricted") e, sendo assim, a citotoxicidade está restrita ao reconhecimento do antígeno viral associado ao antígeno de classe I do próprio indivíduo (Zinkernagel, 1977). Posteriormente foi observado fenômeno similar, em relação à resposta proliferativa primária ou secundária, sendo necessária a identidade entre os antígenos de classe II do linfócito T auxiliar (helper) e da célula apresentadora do antígeno (Blann, 1988).

As moléculas CD4 estão presentes nos linfócitos T que reconhecem antígenos em associação com o HLA de classe II (locos DR, DQ e DP), enquanto as CD8 estão presentes nos linfócitos T citotóxicos. Existem fortes evidências de que estas moléculas são responsáveis por funções de fortalecimento da ligação do receptor da célula T ao complexo HLA-antígeno (Auffray, 1986).

Os antígenos externos, quando penetram no organismo são fagocitados por monócitos, células dendríticas ou por outras células "apresentadoras de antígenos". Esse processo culmina pelo

aparecimento de um epítopo antigênico na membrana celular, localizado no "ninho" formado pela molécula do HLA, quando então, acontece a apresentação do antígeno que, de acordo com a sua natureza e respectiva molécula HLA, irá estimular os linfócitos auxiliares ("helper") ou citotóxicos. Estes últimos serão CD4+ ou CD8+ e apresentam o receptor de célula T associado, de forma não covalente, ao complexo trimolecular conhecido como CD3 (T3). O conjunto T3-Ti, como é conhecida a unidade de reconhecimento do linfócito T, reconhece o antígeno em associação. A seguir, a cadeia γ do CD3 transmite o sinal para a ativação celular que proporcionará diversos eventos enzimáticos a nível do citoplasma e do núcleo, culminando com a blastogênese e divisão celular (Boilston, 1988).

Anticorpos anti-CD3 (OKT3) são utilizados nas crises de rejeições para destruir ou bloquear a imunidade celular no seu ponto de reconhecimento do antígeno.

As células apresentadoras do antígeno, excetuando-se as células dendríticas, produzem a interleucina-1 (IL-1) em resposta a esse reconhecimento. Essa citocina liga-se a receptores para IL-1 existentes na membrana dos linfócitos reconhecedores, estimulando a síntese de receptores para interleucina-2 (IL-2) e posteriormente a produção da molécula IL-2. Essa última citocina é outro potente estímulo à proliferação de linfócitos citotóxicos, possibilitando também a produção de gama-interferon e fatores de ativação de linfócito B (interleucina 4 e 5) pela célula T sensibilizada. Desta maneira acontece a ativação de linfócitos citotóxicos, produtores de citolisinas, assim como pode haver estímulo aos linfócitos B, produtores de anticorpos.

Entre as citolisinas destaca-se a perforina, capaz de ocasionar poros na membrana da célula alvo de maneira semelhante ao complemento sérico (Bloiston, 1988).

Durante a sensibilização, diversas células são ativadas, especialmente os linfócitos e macrófagos, havendo a produção de diversos fatores que culminam pela eliminação do antígeno. Nesse processo, devemos levar em consideração, que células normais podem também ser destruídas pela simples presença no local (expectadoras inocentes), ou por apresentarem o antígeno em sua membrana. Todos os fatos citados acontecem após o reconhecimento do antígeno e dos produtos de classe I ou II, apresentado pelos macrófagos às células T.

TABELA 5.1. FREQUÊNCIAS DE FENÓTIPOS E GENÓTIPOS HLA-A

ALELOS HLA	CAUCASOIDE		ORIENTAL		NEGROIDE	
	FENOT.	GENOT.	FENOT.	GENOT.	FENOT.	GENOT.
A1	26.4	14.2	2.0	1.0	15.5	8.2
A2	49.4	28.9	48.3	28.1	31.9	17.5
A3	24.7	13.2	3.0	1.5	13.0	6.7
A11	12.2	6.3	22.0	11.7	3.8	1.9
A23	2.8	1.4	0.2	0.1	15.4	8.0
A24	19.5	10.3	52.9	31.4	9.4	4.8
A25	4.7	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0
A26	6.3	3.2	13.9	7.2	8.8	4.5
A28	9.2	4.7	4.2	2.1	18.8	9.9
A29	5.7	2.9	0.8	0.4	9.6	4.9
A30	6.9	3.5	4.5	2.3	20.8	11.0
A31	5.7	2.9	10.1	5.2	3.2	1.6
A32	7.6	3.9	0.8	0.4	4.5	2.3
AW33	2.8	1.4	11.6	6.0	7.6	3.9
AW34	0.2	0.1	0.6	0.3	9.9	5.1
AW43	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	1.3
AW66	0.4	0.2	1.0	0.5	0.6	0.3

* Fonte: Dausset, J. & Pla, M. (1985). HLA - Complexe Majeur D'Histocompatibilité de L'Homme. Flammarion Medecine-Science.

TAB. 6.1. FREQUÊNCIAS DE FENÓTIPOS E GENÓTIPOS HLA-B

ALELOS	CAUCASÓIDE		ORIENTAL		NEGROIDE	
	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.
B7	21.7	11.5	9.2	4.7	22.7	12.1
B8	18.3	9.6	0.4	0.2	10.7	5.5
B13	5.7	2.9	7.5	3.8	3.2	1.6
B18	10.7	5.5	0.6	0.3	8.2	4.2
B27	6.7	3.4	3.2	1.6	3.8	1.9
B35	19.9	10.5	19.4	10.2	13.7	7.1
B37	3.2	1.6	1.2	0.6	2.6	1.3
B38	4.9	2.5	1.4	0.7	3.2	1.6
B39	1.0	2.0	0.8	0.4	0.0	0.0
BW41	1.8	0.9	0.1	0.1	4.5	2.3
BW42	0.4	0.2	1.0	0.5	11.3	5.8
B44	23.1	12.3	11.6	6.0	14.8	7.7
B45	0.8	0.4	0.2	0.1	4.5	2.3
BW46	0.2	0.1	7.1	3.6	0.0	0.0
BW47	0.4	0.2	0.8	0.4	0.0	0.0
BW48	0.0	0.0	3.2	1.6	0.0	0.0
B49	3.6	1.8	0.6	0.3	4.5	2.3
BW50	2.2	1.1	0.6	0.3	1.2	0.6
B51	12.0	6.2	15.0	7.8	3.8	1.9
BW52	4.0	2.0	14.1	7.3	1.2	0.6
BW53	1.0	0.5	0.6	0.3	13.0	6.7
BW54	0.2	0.1	13.0	6.7	0.0	0.0
BW55	3.2	1.6	4.2	2.1	0.0	0.0
BW56	2.2	1.1	3.0	1.5	0.6	0.3
BW57	5.7	2.9	1.4	0.7	5.7	2.9
2BW58	3.6	1.8	4.9	2.5	20.6	10.9
BW59	0.0	0.0	2.4	1.2	0.0	0.0
BW60	7.5	3.8	12.6	6.5	4.5	2.3
BW61	4.2	2.1	22.0	11.7	3.0	1.5

TAB. 6.1. FREQUÊNCIA DE FENÓTIPOS E GENÓTIPOS HLA-B (CONT.)

ALELOS		CAUCASÓIDES		ORIENTAIS		NEGROÍDES	
HLA	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.	
BW62	11.8	6.1	18.3	9.6	5.1	2.6	
BW63	1.4	0.7	0.0	0.0	3.8	1.9	
BW64	2.2	1.1	0.0	0.0	2.6	1.3	
BW65	5.1	2.6	0.4	0.2	3.2	1.6	
BW67	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	
BW71	0.2	0.1	0.8	0.4	1.6	0.8	
BW72	0.6	0.3	1.0	0.5	13.7	7.1	
BW73	0.2	0.1	0.4	0.2	0.0	0.0	

TAB. 7.1. FREQUÊNCIA DE FENÓTIPOS E GENÓTIPOS HLA-C.

ALELOS		CAUCASÓIDES		ORIENTAIS		NEGROÍDES	
ALELOS	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.	
CW1	6.5	3.3	29.9	16.3	2.0	1.0	
CW2	8.0	4.1	2.0	0.10	22.4	11.9	
CW3	23.6	12.6	47.1	27.3	15.9	8.3	
CW4	21.9	11.6	10.3	5.3	26.0	14.0	
CW5	13.3	6.9	1.2	0.6	5.9	3.0	
CW6	16.5	8.6	7.5	3.8	24.1	12.9	
CW7	42.7	24.3	22.7	12.1	42.4	24.1	
CW8	7.3	3.7	0.6	0.3	6.9	3.5	

TAB. 8.1. FREQUÊNCIA DE FENÓTIPOS E GENÓTIPOS HLA-DR.

ALELOS	CAUCASÓIDES		ORIENTAIS		NEGRÓIDES	
	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.	FENÓT.	GENÓT.
DR1	18.1	9.5	9.8	5.0	9.9	5.1
DR2	29.1	15.8	27.9	15.1	27.9	15.1
DR3	22.6	12.0	3.6	1.8	27.6	14.9
DR4	23.8	12.7	38.8	21.8	14.6	7.6
DR7	22.6	12.0	5.7	2.9	24.7	13.2
DRW8	5.9	3.0	14.1	7.3	1.6	0.8
DR9	1.6	0.8	21.7	11.5	3.0	1.5
DRW10	1.6	0.8	1.0	0.5	4.5	2.3
DRW11	23.1	12.3	7.8	4.0	30.3	16.9
DRW12	4.0	2.0	13.9	7.2	6.7	3.4
DRW13	10.5	5.4	5.7	2.9	7.5	3.8
DRW14	11.3	5.8	13.1	6.8	20.3	10.7

1.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HISTOCOMPATIBILIDADE

1.2.1. SEROLOGIA HLA

Os antígenos HLA foram inicialmente detectados por métodos sorológicos; depois por testes celulares; e, recentemente, pela análise molecular do DNA. Os primeiros testes sorológicos foram os de leucoaglutinação (Dausset, 1954), entretanto não eram práticos por utilizarem grandes volumes de reagentes e por proporcionarem freqüentes reações falso-positivas por agregação espontânea dos leucócitos. O teste de linfocitotoxicidade (Terasaki & McClelland, 1964) possibilitou rápido desenvolvimento da tipagem tecidual, com a descoberta de diversas especificidades HLA. Este método tornou-se universalmente usado devido a sua simplicidade e reprodutibilidade. Trata-se de um micro-teste, realizado em placa com diversas escavações, onde os linfócitos analisados reagem com anticorpos anti-HLA específicos previamente colocados nos locais de reação. Após a incubação inicial, adiciona-se soro de coelho como fonte de complemento e, depois de uma hora, o corante eosina amarela e formalina. Nos locais em que os anticorpos reagiram com os antígenos HLA observa-se, por microscopia com contraste de fase, as células coradas devido à perfuração dos linfócitos pelo complemento. Nos locais onde a reação é negativa, as células

apresentam-se brilhantes, pequenas e não coradas. Pela análise de várias reações chega-se a conhecer as especificidades antigênicas das células testadas.

Diversas modificações desse teste aconteceram, algumas com recente aceitação pela maioria dos laboratórios. A imunofluorescência é de grande valor na identificação dos antígenos de Classe II (DR e DQ) . O fato deve-se ao reforço oferecido pela nova técnica de separação de linfócitos B com pérolas magnéticas revestidas de anticorpos monoclonais (Dynabeads) que reagem com as referidas células, possibilitando rápida e eficiente separação magnética dos linfócitos B e T . O método de imunofluorescência é uma modificação da citotoxicidade complemento dependente ((Blann, 1988).

O teste de linfocitotoxicidade pode ser realizado com linfócitos totais ou com linfócitos B. No primeiro podem-se identificar antígenos de Classe I (HLA-A, B, C), sendo que no segundo é possível a classificação dos de Classe II (HLA-DR, DQ, e alguns DP). O testes são realizados em linfócitos do sangue periférico, do baço ou de linfonodos, dependendo da disponibilidade do material. A separação das células é necessária desde que se necessite linfócitos B em bom grau de pureza para a tipagem HLA-DR, DQ. Neste ponto, encontram-se os primeiros problemas, como a contaminação com outras células, principalmente monócitos e linfócitos T, acarretando falsos-negativos em testes para tipagem DR. A contaminação com plaquetas também pode prejudicar o resultado, sendo necessária sua eliminação, quando em grande quantidade.

A sorologia para Classe II necessita muitas vezes de absorção dos anticorpos (soro de múltipara) com concentrado de plaquetas de no mínimo 100 doadores. Isto é importante, porque muitas vezes, encontram-se anticorpos de Classe I e classe II no mesmo soro. Como as plaquetas não expressam antígenos de Classe II na sua membrana, elas retiram os anticorpos de Classe I, tornando o soro passível de ser utilizado para tipagens HLA-DR e DQ. Deve-se ressaltar que algumas vezes é difícil a absorção dos anticorpos HLA-B8, HLA-B12 e os do loco C, pois são expressos fracamente nas plaquetas (Bender, 1984).

Desde o início do estudo da histocompatibilidade, foi observada a necessidade de trabalhos cooperativos, pois os diversos laboratórios estavam identificando antígenos e anticorpos com nomenclatura diferente. Intercâmbios de soros possibilitaram que os laboratórios pudessem contar com painel de anticorpos anti-HLA que anteriormente não possuíam. O soro de mulheres após gestação continua a ser a principal fonte de reativos para os laboratórios dedicados ao estudo do sistema HLA, havendo necessidade crescente de bons volumes de soros para atender à demanda crescente de testes para transplante e para Pesquisa clínica da relação de HLA com doenças.

1.2.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA

As fontes mais comuns desses anticorpos são: a sua pesquisa no soro de mulheres após a primeira gestação, a identificação em indivíduos que receberam transfusão sanguínea, a imunização de voluntários com leucócitos autólogos ou a produção de monoclonais.

Nas três primeiras modalidades, os anticorpos são formados como o resultado da transfusão de linfócitos e de plaquetas. O soro de indivíduos politransfundidos freqüentemente contém diversos anticorpos anti-HLA, impossibilitando a utilização dos mesmos como reagentes. A imunização planejada, em que se escolhem os antígenos adequados para estimular o receptor, é talvez o método de maior sucesso na obtenção de bons anticorpos (Thorsby & Kissmeyer-Nielsen, 1968 ; Legrand, 1971) , entretanto pode acarretar algum risco para o indivíduo, especialmente após o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Este método utiliza voluntários que são imunizados com pequenas transfusões sanguíneas de doadores escolhidos por apresentarem antígenos raros.

Na imunização das gestantes, as células fetais devem entrar em contato com a circulação sanguínea da mãe para que os anticorpos anti-HLA sejam formados contra os antígenos HLA de origem paterna, existentes nessas células. Existem diversas publicações que demonstram a passagem de linfócitos fetais para circulação materna (Schroeder, 1974 ; Schroeder, 1972), fato inclusive utilizado para a identificação do sexo dos bebês (Siebers, 1975).

A frequência e a especificidade dos anticorpos citotóxicos no soro de múltiparas foram estudados por diversos autores (Ahrons, 1971 ; Nyman, 1971 ; Kissmeyer-Nielsen , 1970) . De acordo com esses autores, 10 a 15 % das mulheres apresentam anticorpos anti-HLA após as gestações. O número de gestações parece ser importante, sendo a sensibilização maior entre as múltiparas com maior número de filhos (Nyman, 1971). O mesmo autor encontrou , como outros , que o anticorpo mais freqüente é o HLA-A2 e que , excetuando-se este caso, não existe correlação com a frequência dos fenótipos. Anticorpos anti-Classe II são mais facilmente encontrados do que os de Classe I (Tovey, 1973.) De acordo com este autor o HLA-A10 é "o mais" e o HLA-A3 "o menos" imunogênico no loco A. No loco B os antígenos B13, B27 e B35 induzem anticorpos mais freqüentes do que esperados e B12 e B15 muito raramente. Anticorpos monoespecíficos são menos comuns do que os com várias especificidades. A presença de anticorpos com reação cruzada é freqüente e estes não podem ser separados por absorção com células que contenham um dos respectivos antígenos, pois normalmente removem os demais anticorpos (Mayr, 1971). O mesmo autor observou que algumas especificidades são encontradas frequentemente em combinação no soro de múltiparas: HLA-A1+A3+A11; HLA-A1+A10+A11; HLA-A10+complexo 19; HLA-A2+A28; HLA-A2+A9; HLA-B5+B35+B17+B15+B18+B53; HLA-B7+B22+B40+B27; HLA-B13+B40+B47; HLA-B8+B14; HLA-B27+B47.

Os anticorpos contra antígenos HLA-DR e HLA-DQ são mais difíceis de pesquisar no soro de múltiparas , pois é necessária a prévia absorção com plaquetas para eliminar os anticorpos contra antígenos HLA-A, B e C. Além disso, é importante a

utilização de um painel de linfócitos de pacientes de leucemia linfática crônica . Tais células são, na maioria, linfócitos B e expressam muito bem os antígenos DR e DQ na membrana, assim como HLA-A,B e C, motivo para a absorção dos soros com plaquetas (Baricordi, 1977 ; Vassali, 1979 ; Decary, 1979 ; Stern & Rittner, 1981). Os três últimos autores observaram que os anticorpos anti-DR são encontrados com maior frequência em associação com anticorpos anti-HLA-A,B e C. Vassali observou 2.25 % de anti-DR em soros que não apresentavam HLA-A,B e C ("DR puros"), enquanto que 7.31 % de soros DR em associação com especificidades HLA-A,B e C. Decary encontrou 4.8 % e 16% respectivamente, enquanto Stern & Rittner acharam 18.49 % de anti-DR em soros que igualmente continham anticorpos anti-HLA-A,B e C.

A pesquisa de especificidade HLA nos soros de multíparas é realizada por citotoxicidade, fazendo-se reagir os diversos soros com painéis de linfócitos com fenótipos conhecidos. Os painéis de linfócitos de pacientes de leucemia linfática crônica servem para testar os possíveis soros anti- HLA-DR e DQ, após adsorção com plaquetas. Os painéis de linfócitos totais servem para identificar os HLA-A,B e C. Diversas análises estatísticas podem ser feitas para qualificação adequada dos anticorpos encontrados. A maioria pode utilizar programas específicos de computação que facilitam muito os resultados.

Após a identificação dos anticorpos, os laboratórios procuram coletar mais sangue das mulheres identificadas. Nesse ponto pode-se encontrar dificuldades, pois é frequente a recusa da doação, especialmente enquanto os filhos são pequenos. Após

o parto, os anticorpos costumam diminuir de título ou desaparecer completamente, entretanto alguns podem permanecer por muitos meses e até por anos em circulação.

A produção de anticorpos monoclonais anti-HLA foi iniciada após a descoberta dessa tecnologia (Kohler & Milstein, 1975). Segundo o método, é possível produzir grande quantidade de anticorpos homogêneos, provenientes de um só clone de célula de mieloma, após a fusão com célula produtora de anticorpos anti-HLA. Essa técnica costuma ser muito trabalhosa, com resultados comumente desapontadores devido aos anticorpos conseguidos, muitas vezes, não serem fixadores de complemento ou apresentarem múltiplas reações cruzadas, especialmente por não ser anticorpo humano, mas sim de camundongo. As dificuldades são compensadas, quando identificado um anticorpo de qualidade, pois o reagente pode ser produzido indefinidamente em cultura. Recentemente foi possível a obtenção de monoclonais humanos pela transformação de células humanas (multíparas) produtoras de anticorpos anti-HLA pelo vírus Epstein-Bahr (Ferrara, 1989.)

1.2.1.2. REAÇÃO CRUZADA DOS ANTICORPOS ANTI-HLA.

Uma das características do sistema HLA é a reação cruzada que acontece com alguns soros (Svejgaard, 1968), não importando ser monoclonal ou proveniente de múltipara. O fato acontece por existirem grupos de antígenos com determinantes antigênicos comuns, conhecidos como determinantes "públicos". Alguns anticorpos são formados contra esses alvos, provocando reações positivas com diversos antígenos do mesmo loco, razão porque

podemos encontrar soros de múltipara com anticorpos contra antígenos ausentes nas células do pai (Fig. 6.1 e 7.1). São raras as reações entre os diferentes locos, porém algumas exceções existem, como a reatividade entre HLA-A2 e HLA-B17. As reações cruzadas são responsáveis por inúmeros problemas na sorologia HLA e motivo para utilização de mais de um anticorpo para cada especificidade a ser conhecida.

1.2.1.3. PROVA CRUZADA

Os mesmos testes sorológicos de linfocitotoxicidade utilizados para tipagem HLA servem para a pesquisa de anticorpos anti-HLA existentes no sangue de alguns candidatos a transplante de órgão. Os pacientes adquirem esses anticorpos, após transfusões sanguíneas, prejudicando a futura escolha de um doador.

A prova cruzada é realizada entre o soro do receptor e os linfócitos do doador. Esse teste é obrigatório na véspera ou no mesmo dia do transplante, sendo sua positividade para anticorpos IgG anti-HLA-A, B e C considerada contra-indicação para a cirurgia. Os testes podem também identificar anticorpos IgM anti-linfocitários, considerados atualmente como autoanticorpos (Ting & Morris, 1978), não prejudicando a sobrevida do enxerto (Ting & Morris, 1983).

Utiliza-se o Dithiothritol (DTT) na reação de linfocitotoxicidade. Esse produto destrói a IgM existente no soro do doador e, portanto, deve-se manter um controle com teste sem DTT. Reações positivas nos testes com DTT e sem DTT demonstram

presença de IgG anti-HLA, sendo, por conseguinte, contra-indicação ao transplante. Reações negativas nos testes com DTT e positivas nos sem DTT indicam a presença de auto-anticorpos IgM (Taylor, 1987)

A prova cruzada pode ser realizada com linfócitos T ou com linfócitos B. Reações positivas com T e B denotam a presença de anticorpos anti-HLA-A,B e C, enquanto que a positividade somente com células B indicam anticorpos anti-HLA-DR. Muitos centros realizam transplantes com prova cruzada anti-célula B positiva, pois não a consideram indicativa de rejeição, entretanto outros procuram não realizar o procedimento (Carpenter, 1978; Taylor, 1987).

A prova cruzada deve ser procedimento de rotina nos pacientes em lista de espera para transplante renal. A maioria dos centros pesquisa a reatividade do soro dos pacientes após duas semanas de cada transfusão sanguínea e também a cada 3 a 5 meses. Os testes são realizados contra um painel de linfócitos de no mínimo 40 indivíduos, permitindo observar a reatividade de cada paciente. Muitos permanecem negativos contra o painel, portanto, não apresentando anticorpos anti-HLA. Outros demonstram sensibilização moderada, e poucos ficam fortemente sensibilizados. Esses últimos permanecem nas listas de espera por muito tempo e são transplantados com doadores praticamente HLA idênticos e com prova cruzada negativa.

Os transplantes realizados entre indivíduos com prova cruzada IgG-positiva são candidatos à rejeição hiper-aguda e de difícil prognóstico (Kissmeyer-Nielsen, 1966). Outra prova de importância no pré-transplante é a tipagem de grupo sanguíneo,

devendo-se respeitar a compatibilidade como se fosse uma transfusão de sangue.

Pacientes com atual prova cruzada negativa, porém com teste anterior positivo não eram transplantados no passado. Hoje admite-se esta hipótese, embora prefira-se o contrário (Ting, 1988).

Raros laboratórios realizam a prova cruzada anti-monócito, utilizando soro do receptor contra monócitos do doador. Nem todos os centros acreditam na possibilidade de sensibilização dos pacientes com antígenos do sistema endotélio-monócito e, por isso, tal prova não é muito popular.

1.2.2. CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS

A observação de que a cultura da suspensão de linfócitos de dois indivíduos não relacionados promove a transformação blástica das células (Hirschhorn e Bach, 1963; Bain, 1964) conduziu ao estudo de que o fato estava relacionado com o sistema HLA (Bach & Amos, 1967). Esses autores demonstraram que a cultura entre pessoas HLA idênticas não era seguida de transformação linfocitária, ou seja, de duplicação de DNA e posteriores mitoses. A metodologia recebeu incentivo com a possibilidade de medida do grau de síntese de DNA, incorporando um precursor radioativo do mesmo (timidina marcada com trítio) e observando o número de contagens por minuto num contador de radiação Beta. Outro passo importante foi a possibilidade de inativar uma das células em cultura pelo tratamento com Mitomicina C (Bach & Voynow, 1966) ou pela irradiação. O teste é conduzido de maneira

que a população linfocitária inativada serve como estimulatória da outra que prolifera ou responde, desde que existam diferenças entre a região HLA-D dos dois indivíduos. A população de células estimulatórias é formada de linfócitos B e monócitos, enquanto a que responde é formada de linfócitos T.

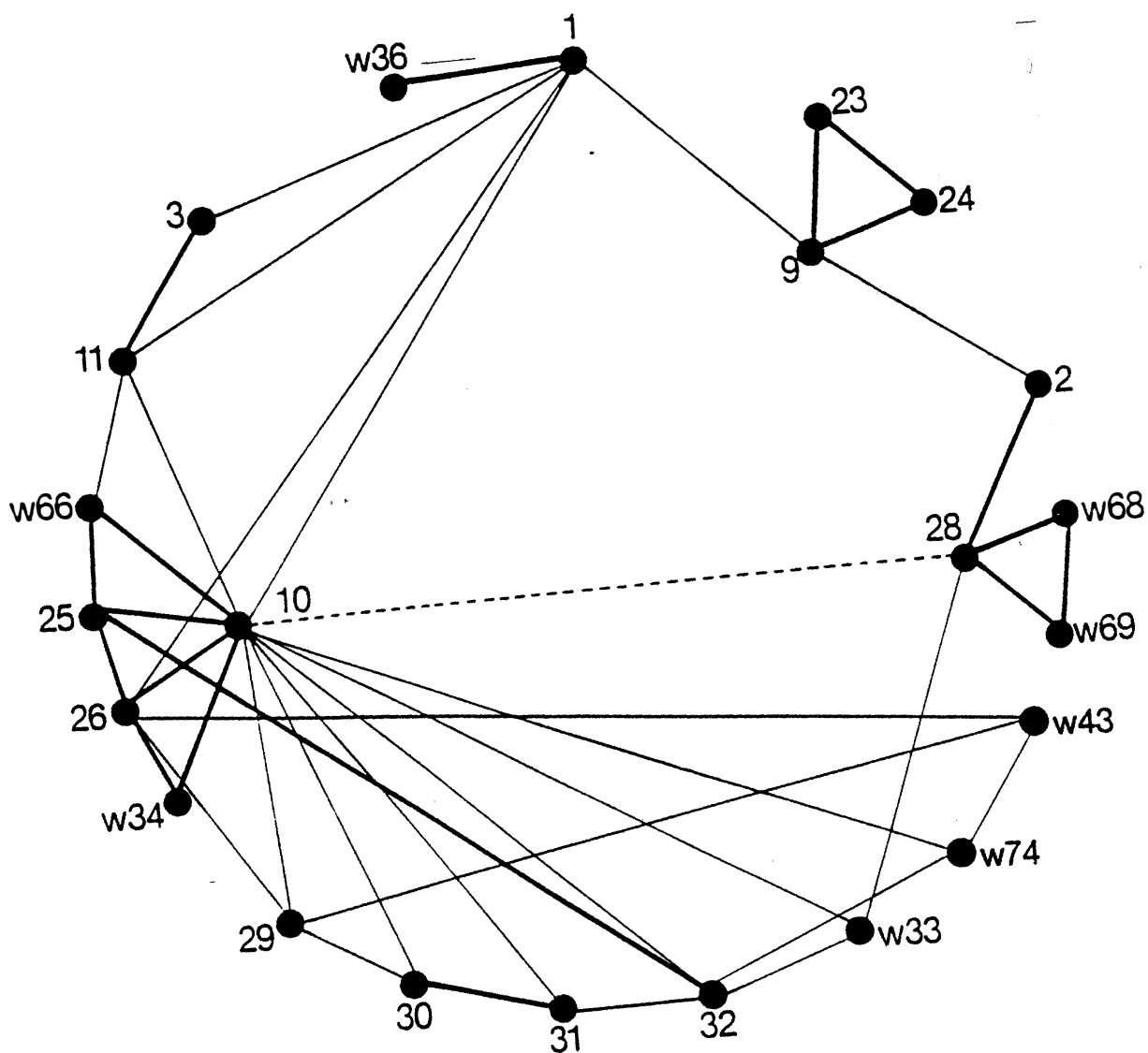
A possibilidade de tipar a região HLA-D por cultura mista de linfócitos aconteceu com o uso de células homozigotas para os antígenos HLA, identificadas em casamentos consangüíneos. Dessa maneira, cultivam-se linfócitos de um indivíduo com células de tipagem homozigotas que tratadas servem como estimulatórias (Mempel, 1973). Um padrão de reações é observado após a cultura com diversas células homozigotas. Cada reação positiva, traduzida por número importante de contagens por minuto, é decorrente de incompatibilidade entre as duas populações celulares. Uma reação negativa é sinal de compatibilidade, ou seja, que a célula estimuladora tem as mesmas características da célula respondedora. As especificidades HLA-D são 23 e estão intimamente associadas à combinação de antígenos HLA-DR/ HLA-DQ e não são consideradas um produto de um loco, mas sim o resultado da reação dos linfócitos respondedores contra a combinação de locos DR-DQ (Tab. 4.1.)

A cultura mista é utilizada especialmente na avaliação de candidatos a transplante de medula óssea e raramente para transplante de rins com doador vivo relacionado. O teste é considerado uni-direcional, quando uma das células é tratada com Mitomicina ou irradiada e bi-direcional, quando ambas as populações celulares respondem e estimulam ao mesmo tempo.

Outra possibilidade de avaliação da região HLA-D é pelo método dos linfócitos T previamente estimulados (primed lymphocyte typing, PLT). Nesse teste, estimula-se os linfócitos em cultura, durante 9 a 14 dias, contra outra célula que difere em um haplótipo, quase sempre a célula de um indivíduo contra a célula de um dos pais. Os linfócitos respondedores são então congelados para formar um painel de células para tipagens futuras (Sheehy & Bach, 1976). Desejando-se realizar um teste para a região HLA-D, cultivam-se os linfócitos pré-sensibilizados com os do paciente, obtendo-se uma resposta proliferativa rápida, em 24 horas, caso essas células contenham determinantes HLA-D idênticos à célula estimuladora da cultura original. Uma das vantagens do método é que o resultado que identifica uma especificidade é observado por uma reação positiva, ao contrário da cultura mista tradicional.

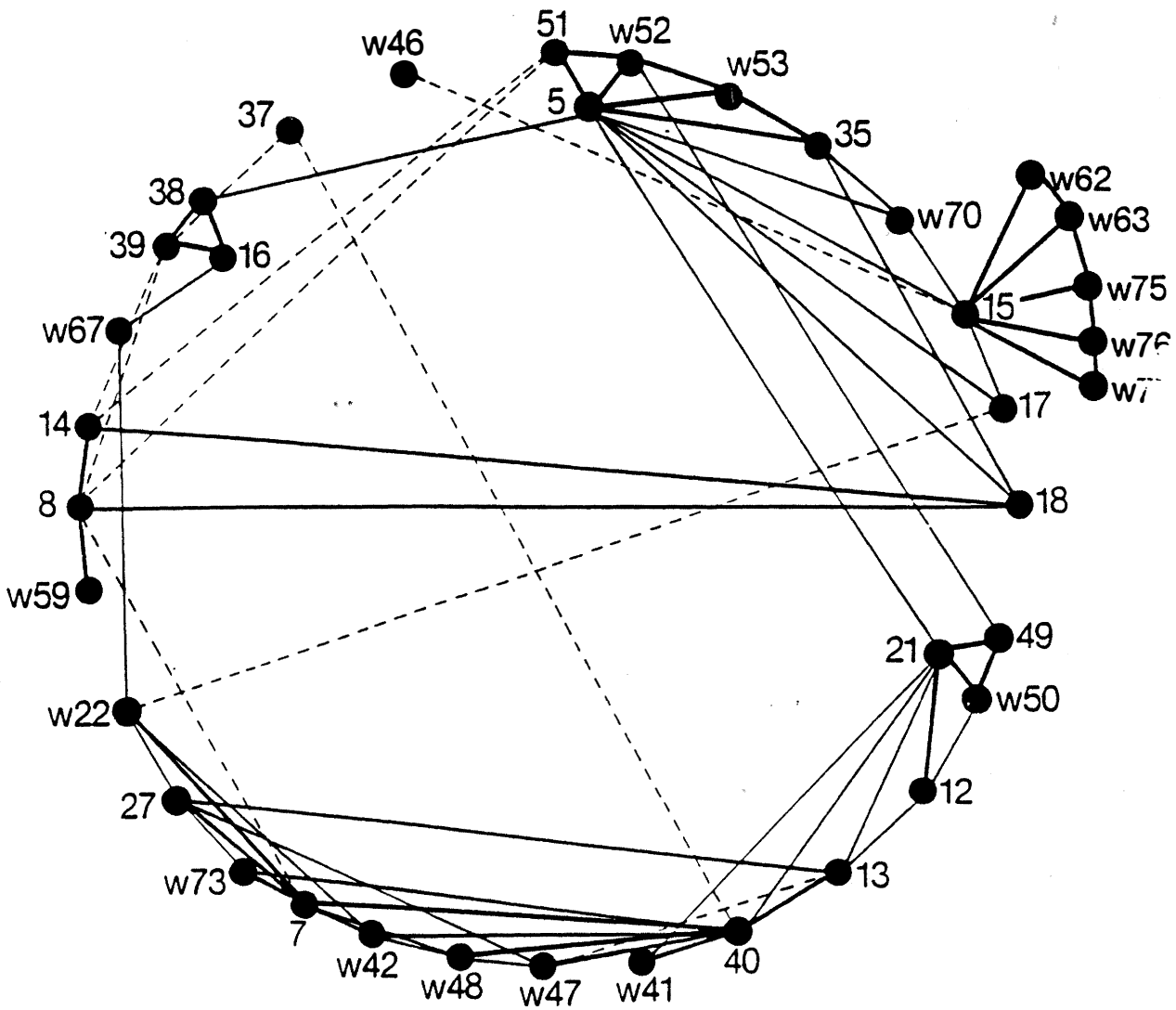
Capítulo 1

Fig. 6.1. Reações cruzadas entre os antígenos HLA-A.



Obs. Os antígenos com mais forte, média e fraca reação cruzada estão unidos por traços grossos, finos e tracejados respectivamente. (Bender, 1984, com modificações).

Fig. 7.1. Reações cruzadas entre os antígenos HLA-B (Bender, 1984, com modificações)



Obs. Os antígenos com mais forte, média e fraca reação cruzada estão unidos por traços grossos, finos e tracejados respectivamente. (Bender, 1984, com modificações).

1.2.3. DNA-RFLP (DNA RESTRICTION FRAGMENT POLYMORPHISM)

A Biologia Molecular determinou avanços surpreendentes no conhecimento dos antígenos HLA na última década. As dificuldades encontradas, especialmente na identificação dos antígenos de classe II, foram neutralizadas por métodos moleculares.

O polimorfismo dos antígenos de classe II (HLA-DR,DQ,DP e Dw) pode ser reconhecido fenotipicamente pela sorologia, pela cultura mista de linfócitos ou PLT. Tais métodos formam a base para a avaliação de um paciente para transplante. A novidade com os testes moleculares é que o polimorfismo passa a ser avaliado por reconhecimento genotípico (Hui, 1985).

O primeiro trabalho reportado (Wake, 1982) foi a investigação do polimorfismo da região HLA-DR, utilizando um clone de cDNA para DRB1 e análise em "Southern blot". Os resultados sugeriram a possibilidade de tipar os antígenos desse loco por essa técnica que ficou conhecida por "DNA Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP). O título da técnica em Inglês é muito descritivo, mas poderia ser traduzido por "Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição do DNA".

O seqüenciamento dos antígenos HLA-DR,DQ e DP revela que a variação alélica observada pela sorologia, cultura mista e PLT é o resultado de seqüências hipervariáveis de nucleotídios em exons de DRB, DQB , DPB e DQA localizados distalmente à membrana. A clonagem e seqüenciamento permitiram a identificação de seqüências de nucleotídios que codificam ou estão em desequilíbrio de ligação com os epítomos definidos pelos anticorpos ou células T reativas (Bidwel,1988a).

O princípio do método está baseado na extração do DNA das células em estudo e tratamento com enzimas de restrição (veja material e métodos) . Essas clivam o DNA sempre em lugares determinados e conhecidos, determinando milhares de pedaços de DNA de diversos tamanhos. Realiza-se com esse produto uma eletroforese em agarose, dispersando os fragmentos ao longo do gel. A seguir o DNA é desnaturado quimicamente, abrindo sua fita dupla para permitir a hibridização; entretanto, antes do último passo o DNA é transferido para uma membrana de nitrocelulose ou de nylon por intermédio da técnica de Southern (Southern, 1975). Dessa maneira o DNA encontra-se na membrana como estava no gel, somente que em fita única. A seguir, utiliza-se a sonda radioativa de cDNA que hibridiza no DNA para a qual foi concebida. O sinal radioativo (Fósforo 32) será observado após auto-radiografia, demonstrando diversas bandas que correspondem aos fragmentos de DNA (Fig. 8.1). Existem sondas de cDNA derivadas dos genes de classe II (DRB, DQB e DQA) , que detectam sinais loco-específicos e, sendo assim, quando utilizadas possibilitam definir os fragmentos que correspondem aos alelos correspondentes.

Pode-se usar diversas enzimas de restrição, observando-se muitos padrões de resultados. As enzimas mais usadas são a TaqI e MspI, pois geralmente revelam extenso polimorfismo e maior facilidade de interpretação. Na realidade, o polimorfismo observado não é devido às seqüências de DNA do DRB, DQB ou DQA , responsáveis pelos epítomos na membrana das células , mas sim ao polimorfismo de lugares de restrição enzimática em forte desequilíbrio de ligação com os genes anteriores (Bell, 1987).

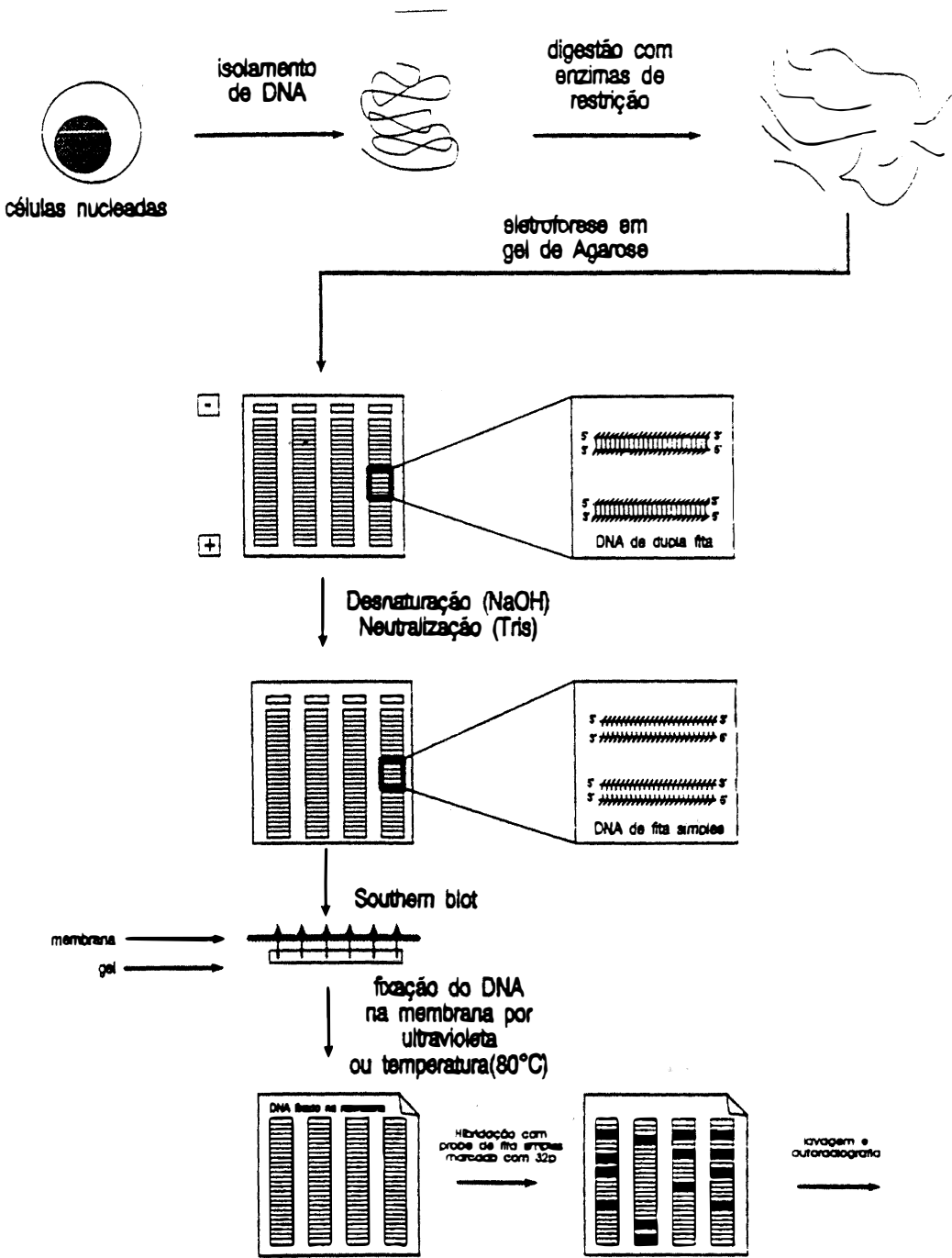


Fig. 8.1. Sumário do método DNA-RFLP

1.2.3.1. RFLP E SOROLOGIA HLA-DR

Os melhores sinais têm sido observados usando-se probes curtos como o pRTV1 e digestão do DNA com a enzima Taq1 (So, 1984; Bidwell 1988a). Pode-se utilizar, para estudo comparativo com a sorologia, células homozigotas para os antígenos HLA, pois os sinais são mais fáceis de interpretar, observando-se vários padrões alelo-específicos (Tab. 9.1). Durante tipagens de rotina, pode-se incluir o DNA destas células, junto a alguma amostra duvidosa. Existem problemas em discriminar alguns alelos entre DRB17 (DR3) e DRB13 (DRw13-DQw5 e DQw6), entre DRB7 (DR7-DQw3) e DRB9 (DR9-DQw9). Essas reações de difícil interpretação poderiam ser esperadas devido à estreita homologia entre a seqüência de nucleotídeos entre DR3 e DRw6. Estes alelos são discriminados de acordo com a especificidade HLA-DQ, pois existe um forte desequilíbrio de ligação entre DR e DQ, demonstrável tanto pela sorologia como pelo RFLP (Bidwell, 1988-a).

Os RFLP de células com antígenos sorologicamente não identificados ("blank") demonstram que a maioria são homozigotas ou não definidas por dificuldade sorológica, particularmente em antígenos como DRw6, DRw8 e DRw10. Uma exceção é DQw1 associado com DR negativo, pois o RFLP identifica neste caso o DR'Br', indistinguível do HLA-DRB1 (DR1).

O probe DRB identifica alguns 'splits' de HLA-DR. DR3 é caracterizado por dois RFLP: DRB17 associado com o haplótipo HLA-B8 e DRB17a com HLA-B18. O DRw6 que normalmente é mal definido pela sorologia está caracterizado por sete RFLP: DRB13a*,

DRB13a** e DRB13a*** (associados com DRw13-DQw5 e DQw6-Dw18), DRB13b (associado com DRw13-DQw7), DRB14a (associado com DRw14-DQw5-Dw9) e DRB14b (associado com DRw14-DQw7-DW16). Finalmente, DRB7 é caracterizado por dois RFLP: DRB7 (associado com DR7-DQw2-Dw7) e DRB7a (associado tanto com DR7-DQw2-Dw7 e HLA-B13 ou HLA-B50 como com DR7-DQw3-Dw11 e HLA-B57). Identificação dos 'splits' de RFLP de DRw6 e DR7 é possível devido ao desequilíbrio com DQB e DQA (Bidwel, 1988b).

Um fato de interesse são os sinais que se correlacionam com as especificidades supertípicas DRw52 e DRw53. Observa-se que o sinal de 14.8 kb representa o DRw53 e este é associado com DR4, DR7 e DR9. O mesmo sinal também é encontrado no DR2 curto (DR2s). Os sinais de 11.1 e 13.0 kb correlacionam-se com DRw52a e DRw52b. Os grupos que apresentam reação cruzada na sorologia, também fornecem sinais comuns no RFLP (isogenotopos). DR1, DR10 e Dr'Br' têm um mesmo sinal de 4.4 kb, enquanto DR4, DR7 e DR9 apresentam combinações de 14.8, 6.1, 4.1, 2.7 e 2.6 kb. DRw6 e DR3 têm em comum 13.0, 11.1, 7.8, 4.3, 4.2 e 4.1 kb, enquanto DR5 e DRw6-DQw3 com 6.5 kb.

Os sinais que representam alelos específicos (fragmentos específicos ou alogenotopos), são: DR2 (12.5, 1.6 e 1.3 kb), DR2s (1.5 e 1.45 kb), DR4 (5.4 kb), DR7 (2.6 kb), DRw8 (9.6 kb) e DRw10 (13.9 kb) (Bidwell, 1988).

A tipagem genotípica por RFLP do HLA-DR baseia-se nos sinais alelo-específicos de hibridização. Sendo assim, a análise de células heterozigotas pode apresentar alguma dificuldade devido à existência de mais de um sinal. A discriminação de dois alelos que apresentam o mesmo isogenotopo é feita por intermédio das

especificidades HLA-DQ em desequilíbrio de ligação com HLA-DR.

1.2.3.2. RFLP E SOROLOGIA HLA-DQ

Os padrões de sinais de hibridização revelados por sondas de cDNA para DQB e DQA correlacionam-se bem com as especificidades HLA-DQ definidas pela sorologia e com as especificidades definidas pela cultura mista. A análise de haplótipos caucasóides demonstra que é possível definir pelo RFLP as especificidades DQw1, DQw2 e DQw3, assim como subdividi-las de acordo com o desequilíbrio de ligação com DR e Dw (Bidwel, 1988-b).

A série alélica definida por RFLP para DQA parece independente das especificidades sorológicas, todavia apresenta forte desequilíbrio de ligação com DRB e DQB visto pelo RFLP (Bidwel, 1988-a). Desta maneira é possível definir quase todas especificidades ao nível de genótipo, combinando-se os RFLP de DRB, DQB e DQA, incluindo os splits sorológicos de DR5 (DRw11 e DRw12) e DRw6 (DRw13 e DRw14) (Tab. 10.1. e 11.1.).

Uma exceção acontece na diferenciação entre os DQw3-Dw "splits" do DR4 (Dw4, Dw10, Dw13 e Dw14), onde RFLP não é convincente. De algum interesse é o fato demonstrado de que a associação DRw8-DQw3 nem sempre é revelada pela sorologia, pois muitos fenótipos DRw8 e DQ "blank" são na realidade DRw8-DQw3 pelo RFLP (Bidwell, 1988).

Tab. 9.1. Sinais de hibridização observados com Taq1/DRB

DRβ RFLP:			1	15	16	17 ¹	17 ²	4	11	12	13a ¹	13a ³	13a ⁴	13b	7 ¹	7 ²	8	9	10	4x	X3	1/2
			Br								14b		14a	18								
tamanho(kb)																						
Banda nº	local ¹	XWS ²																				
1	14.8 ^a	13.81			■			■							■	■			■			□
2	13.9	-																		■		
3	13.0 ^b	11.48					■		■	■			■									
4	12.5	11.11		■																		□
5	11.1 ^c	9.79					■				■	■		■								□
6	9.6	8.66																		■		
7	7.9	7.23													■						□	
8	7.8	7.00					■	■			■	■	■									
9	6.5	6.08							■					■								
10	6.1	5.80	■					■								■			■			□
11	5.4	5.22						■													□	
12	4.4	4.40	■																	■		
13	4.3	4.12																				
14	4.2	4.12					■	■		■	■		■									□
15	4.1	4.12								(■)	■		■		■	■	■		■			(□)
16	2.7	2.69						■														
17	2.6	2.60													■						□	
18	1.6	1.72		■																		
19	1.5	1.72			■																	
20	1.45	1.69			■																	
21	1.3	1.42		■																		□

Os sinais de hibridização gerados pelo probe curto de cDNA para identificação de DRB1 (pRTV1) estão representados em negro e correlacionam-se com as especificidades sorológicas DR (1 com DR1 e DR'BR'; 15 com DR2 (DRw15); 16 com DR2 (DRw16); 17¹ e 17² com DR3 (DRw17); 18 com DR3 (DRw18); 4 com DR4; 11 com DR5(DRw11); 12 com DRw12; 13a¹, 13a³ e 13a⁴ com DRw6 (DRw13). DQw1 (DQw5 e DQw6); 13b com DRw6 (DRw13). DQw3 (DQw7); 14a com DRw6 (DRw14). DQw1 (DQw5); 14b com DRw6 (DRw14). DQw3 (DQw7); 7¹ e 7² com DR7; 8 com DRw8; 9 com DRw9; 10 com DRw10). RFLPs novos em quadrados brancos, ()= sinal fraco. Banda 1 correlaciona-se com DRw53. Banda 3 com DRw52b-Dw25. Banda 5 com DRw52a e DRw52c-Dw26.

Tab. 10.1. Principais sinais de hibridização observados com TaqI/DQA

			Gel de corrida longa							
			Gel de corrida curta							
DQ α RFLP	tamanho (kb)		1a	1b	1c	2	3	4	3b	
Banda nº	local ¹	XWS ²								
1	7.4	6.99			■					
2a	6.7	6.19		■						
(2b	6.4)							■		
3	5.8	5.53					■			
(4a	4.9)									
4b	4.8	4.56				■				
5	2.7	2.78	■							
6	2.1	2.45	■	■	■	■	■	■	■	— DQA2U
7	2.0	2.09	■	■	■	■	■	■	■	— DQA2L

A sonda DQA1, pDCH1, identifica 5 DQ α -RFLP específicos (DQ α 1a, 1b, 1c, 2 e 3) em eletroforeses de curta duração (18h e 55V). As bandas 2a e 2b, assim como 4a e 4b, não podem ser resolvidas nestas condições. Eletroforese de 52h e 30V é necessária para tanto. Além destas bandas específicas para DQA1, pode-se observar dois RFLP que definem alelos do gene de reação cruzada DQA2 (DQA2U e DQA2L).

Tab. 11.1. Sinais de hibridização observados com TaqI/DQ B

DQβ RFLP:			1a	1b	x	2a	2b	3a	3b	2c
Banda n°	tamanho (kb)									
	local ¹	XWS ²								
	1	7.2	6.69							
	2	5.5	5.34	■			■			
	3	4.6	4.62			■			■	
	4	4.55	4.50			■				
DQB2	5	4.5	4.44	■	■	■	■	■	■	()
	6	4.0	-							()
	7	2.8	2.87		■					
	8	2.7	-			■	■		■	()
	9	2.5	2.46							
	10	2.4	2.35					■		
	11	1.9	1.90					■		
	12	1.6	1.58			■	■			()

A sonda DQB p11-β-1 identifica 7 RFLPs que se correlacionam com as especificidades sorológicas DQ (DQβ1a com DQw1 (DQw5); DQβ1b e DQβx com DQw1 (DQw6); DQβ2a e 2b com DQw2; DQβ3a com DQw3 (DQw8 e DQw9) e DQ'wa' (DQw4); DQβ3b com DQw3 (DQw7)). A banda 5 representa o sinal da hibridização cruzada do gene não polimórfico DQB2. Os quadrados brancos representam novos RFLP, observados em negro. O peso molecular: local (Bidwell,1988) e XWS, 10° Workshop Internacional de Histocompatibilidade.

1.2.4. TIPAGEM HLA COM OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS APÓS AMPLIFICAÇÃO DO DNA.

A Biologia Molecular trouxe diversas possibilidades de avaliarmos nossos genes, influenciando profundamente a pesquisa médica e a sua aplicação clínica imediata. O recente desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki, 1985; Scharf, 1986; Saiki, 1986; Mullis, 1987; Saiki, 1988; Erlich, 1988) possibilitou a imediata utilização na área do estudo dos genes do sistema HLA, especialmente dos de classe II devido a sua importância nos transplantes, na sua relação com doenças e pela dificuldade de reagentes sorológicos. Este método tem sido também muito utilizado no diagnóstico de defeitos genéticos, na identificação forense de indivíduos, assim como na caracterização de vírus e bactérias.

Utiliza-se a reação em cadeia da polimerase para amplificação de segmentos específicos do DNA que contém genes HLA de interesse, para depois identificá-los com oligonucleotídeos sintéticos desenhados para hibridizar cada alelo específico. Esse método foi desenvolvido por um grupo de cientistas da empresa Cetus e é baseado na repetição cíclica de três reações simples, onde a única variante é a temperatura. Todas as três reações ocorrem no mesmo pequeno tubo de ensaio e utilizam reagentes estáveis para as diversas temperaturas. Os ciclos repetitivos são automatizados por intermédio de aparelhos que alternam a temperatura de acordo com programação prévia (termociclos). O PCR é um método para sintetizar seqüências específicas de DNA, utilizando duas fitas simples de oligonucleotídeos "primers",

sintetizados para serem complementares às seqüências conhecidas do DNA a ser analisado e uma enzima termo-estável, a Taq polimerase. Esta enzima foi engenhosamente isolada da bactéria termofílica, *Thermus aquaticus*.

A primeira etapa do procedimento é a desnaturação térmica do DNA nativo de dupla hélice a ser analisado. O DNA rompe as pontes de hidrogênio a 95°C, tornando-se de hélice simples e possibilitando um posterior re-anelamento com outro DNA de fita simples, que possua seqüência complementar. Uma grande vantagem desse método é necessitar de quantidades mínimas de DNA. Experiências demonstram que é suficiente poucas moléculas de DNA (Saiki, 1988), qualificando a técnica como a reação mais sensível para a análise de seqüências específicas do DNA (Fig.9.1 e 10.1).

A segunda etapa do ciclo é realizada em temperatura inferior, quando os dois primers são anelados às seqüências complementares e opostas da amostra de DNA desnaturado. Esses primers vão identificar o segmento de DNA desejado, que servirá como um molde e para o qual foram desenhados de maneira complementar, definindo os dois pontos finais de cada segmento. Os dois primers não podem anelar-se entre si e seus locais de início de reação devem ser relativamente distantes para permitir a síntese subsequente de novos produtos. A especificidade da reação é devida à precisão da reação de anelamento DNA-DNA, mesmo com primers curtos,

A terceira etapa é a síntese da nova fita complementar do DNA com a ajuda da Taq polimerase, ocasionando a extensão de cada primer anelado em presença de excesso de desoxiribonucleosídeos trifosfato. Uma nova fita única de DNA será sintetizada para cada

primer anelado e cada uma consiste do primer no seu final 5' atrelado a um colar de nucleotídeos complementares aos correspondentes do molde. No PCR cada produto sintetizado servirá como molde para novas reações de extensão do primer, a cada ciclo. O resultado será uma reação em cadeia de amplificação geométrica de segmentos de DNA específicos. Os primers são as sementes de todas as fitas novas de DNA, assim como os quatro desoxiribonucleosídeos trifosfato agem como tijolos na construção dessas novas fitas e, sendo assim, devem estar presentes em excesso relativo à quantidade do substrato (DNA). A interessante especificidade da reação de anelamento e a geométrica amplificação dos produtos pela reação em cadeia da polimerase conferem juntas uma extraordinária sensibilidade na detecção do DNA desejado.

Após a extensão do primer, o ciclo é repetido, primeiramente por elevação da temperatura e conseqüente conversão das fitas duplas em fitas simples. Nesse momento, todo trabalho de polimerização que vinha sendo feito é paralisado. A seguir, a temperatura diminui, favorecendo a etapa de anelamento e, após, a de extensão. Devido ao fato de que cada produto sintetizado serve como molde para dois novos produtos a cada ciclo, faz com que o número de cópias de DNA duplique a cada vez. Após 20 ciclos teremos a amplificação de milhões de vezes o segmento de DNA inicial, entretanto os primers e desoxiribonucleosídeos são progressivamente depletados, não sendo aconselhado ultrapassar de 32 ciclos por cada reação.

As primeiras cópias do segmento de DNA desejado são mais longas, porém o produto alcança o tamanho exato do segmento alvo

após o terceiro ciclo. A partir deste momento, a amplificação é geométrica, chegando no final com o produto, praticamente puro de cópias curtas. Como se pode observar, esse método é de grande utilidade na síntese de fragmentos específicos de DNA em quantidades ilimitadas, propriedade comparada com a clonagem de genes, entretanto necessita de conhecimento prévio da sequência dos genes para a fabricação dos primers sintéticos.

As aplicações da reação em cadeia da polimerase estão se multiplicando, mas podemos citar: a tipagem de doadores e receptores para transplante com doador vivo, pois o método é demorado para a utilização com doador cadáver; a pesquisa da relação de HLA com doenças, como a identificação de alelos associados com Diabete mellitus e Penfigus vulgaris (Tood, 1987; Rogers, 1989; Horn, 1988; Sinha, 1988; Scharf, 1988); a determinação de agentes infecciosos, por amplificação do DNA do patógeno, existindo a possibilidade da detecção do DNA do vírus HIV precocemente, quando os métodos convencionais ainda não são positivos, como em crianças nascidas de mães HIV positivas (Rogers, 1989); diagnóstico pré-natal de doenças genéticas (Saiki, 1985; Kogan, 1987; DiLella, 1988; Saiki, 1988; Willians, 1988; Rogers, 1989).

Uma das grande virtudes da reação em cadeia da polimerase está em ser extremamente sensível, podendo qualquer contaminação com outro DNA trazer problemas de interpretação. Os maiores cuidados devem ser tomados para evitar a presença de contaminação com DNA de amplificações prévias ou até do próprio pesquisador (Paabo, 1988; Lo Y-M, 1988; Krawczak, 1989). Pode-se imaginar o problema de contaminação com DNA de HIV amplificado no mesmo

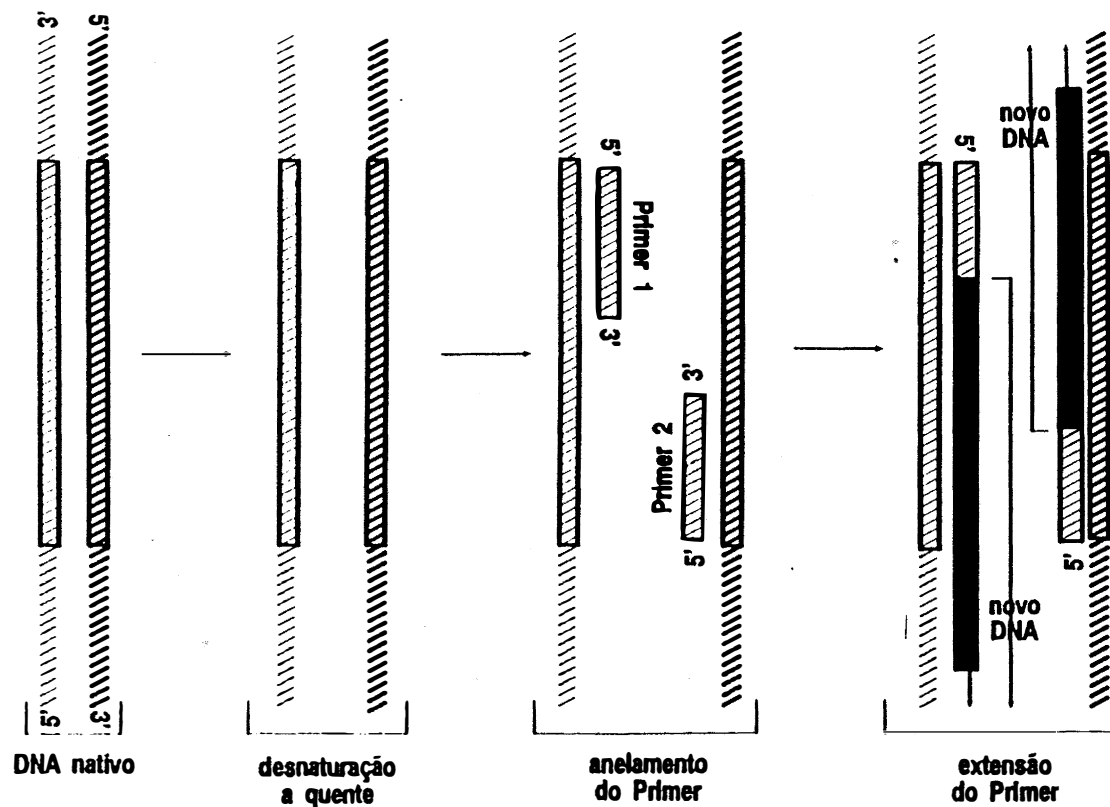
laboratório em que está sendo realizado um teste diagnóstico para esta infecção. Os laboratórios devem preocupar-se em manter uma rotina enérgica, utilizando material descartável e separação dos locais de processamento e de amplificação do DNA (White, 1989; Kwok, 1989).

O polimorfismo dos genes de classe II do sistema HLA está localizado no segundo exon do domínio externo (NH₂ terminal). Usando primers para as regiões conservadas, conseguiu-se amplificar o segundo exon dos locos de classe II de diversos indivíduos e observar por clonagem e seqüenciamento o grau de diversidade alélica (Erlich, 1989).

A identificação do DNA amplificado para tipagem HLA é feita com auxílio de sondas de oligonucleotídeos sintéticos desenhadas e construídas de acordo com as seqüências que permitem diferenciar um alelo de outro ao nível do DNA. Cada sonda é alelo-específica e, portanto, devem ser utilizadas individualmente. Sendo assim, é necessário usar o procedimento de fixar o material amplificado em membrana de nitrocelulose ou de nylon após a transferência (dot blot). Hibridiza-se com cada sonda alelo-específica marcada com Fósforo 32 e após a lavagem para retirar os sinais não específicos (cada sonda tem uma temperatura ótima para lavagem) realiza-se a auto-radiografia, possibilitando observar as reações negativas e as positivas (veja material e métodos). Pode-se também utilizar outros marcadores não radioativos como biotina ou digoxigenina. As membranas com o DNA amplificado podem ser utilizadas diversas vezes, simplesmente retirando a sonda radioativa anterior por lavagem especial e hibridizando com a próxima. Este método é interessante

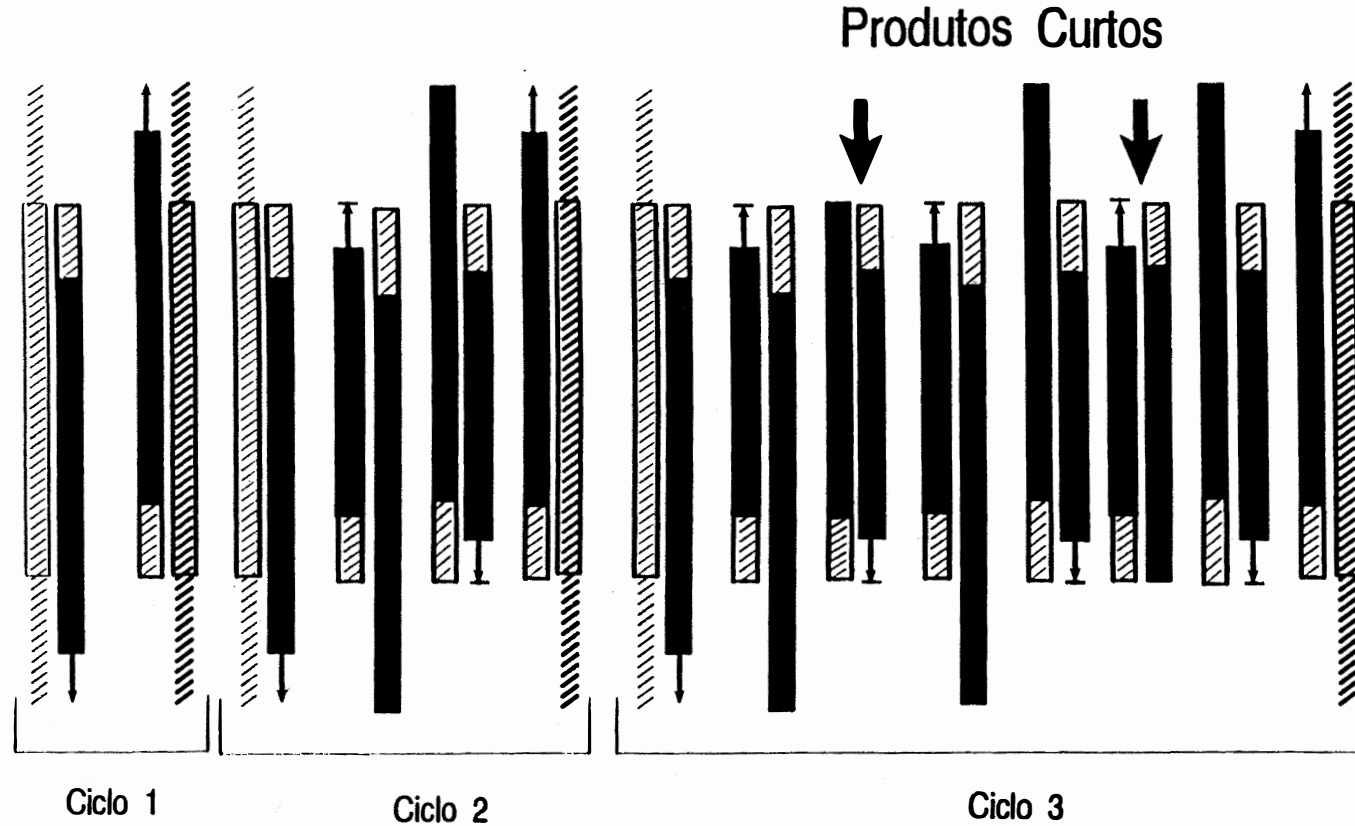
para amostras numerosas, quando se coloca na membrana diversos produtos de indivíduos diferentes; entretanto, para poucas amostras é um tanto trabalhoso. Um método reverso pode ser utilizado, immobilizando-se um painel de sondas na membrana para posterior hibridização com o produto marcado durante a amplificação com primers biotinilados (Ochman, 1989). Este poderá ser prático, para utilização com poucas amostras.

Fig. 9.1. Primeiro round da reação em cadeia da polimerase



O elemento chave desta reação é a repetição dos ciclos térmicos de desnaturação, anelamento e extensão. A cada ciclo as barras negras denotam o acúmulo de DNA sintetizado e as setas a direção da polimerase. Os produtos sintetizados nos ciclos prévios servem como molde para os próximos ciclos e o número de produtos curtos aumenta geometricamente a cada ciclo (os três primeiros são mostrados). Após o término de 30 ou mais ciclos, os produtos curtos serão a maioria absoluta e possivelmente os únicos detectáveis na mistura.

Fig. 10.1. Produtos finais no início dos ciclos da reação em cadeia da polimerase



O ciclo básico da reação em cadeia da polimerase consiste em três etapas, realizadas no mesmo microtubo de ensaio, mas em diferentes temperaturas. A temperatura elevada na primeira etapa dissolve o DNA de dupla fita em DNA de fita simples. Logo que a temperatura diminui para a segunda etapa, os dois oligo-primers dirigidos em oposição anelam-se nas seqüências complementares do DNA alvo, que age como molde. Durante a 3ª etapa, também realizada em temperatura baixa, a enzima Taq polimerase estende os primers covalentemente na presença de excesso de deoxiribonucleosídeos trifosfato, “os tijolos da síntese do novo DNA”. As seqüências alvo de DNA nativo, as quais foram tremendamente amplificadas como “produtos curtos” nos ciclos subseqüentes, aparecem fechadas. O vetor da ação da polimerase é representado por setas projetadas para o novo DNA sintetizado (barras negras).

1.3. IMUNOBIOLOGIA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HLA E DOENÇAS

O Complexo Principal de Histocompatibilidade tem sido extensivamente estudado, procurando-se relações entre HLA e doenças. O motivo certamente está relacionado com a descoberta no camundongo dos genes de resposta imune na região cromossômica correspondente ao CPH humano (McDevitt, 1968). A existência de genes que predispõem uma boa resposta contra determinado antígeno, assim como genes que não proporcionam resposta, já foi observada no homem. Entre eles estão os que determinam a resposta imunológica contra pólenes (cedar) e contra antígenos estreptocócicos (Sasazuki, 1983). O entusiasmo com a pesquisa nessa região, proporcionou a descoberta de mais de 40 doenças associadas aos alelos HLA, especialmente de natureza auto-imune (Stastny, 1983).

Recentemente, muitos objetivos estão sendo alcançados com o conhecimento da organização e polimorfismo dos genes HLA. A introdução das técnicas de biologia molecular, o conhecimento da estrutura tri-dimensional dos antígenos de classe I e de como estas moléculas apresentam antígenos aos linfócitos ocasionaram uma nova concepção a essa matéria.

Os mecanismos de reconhecimento do antígeno pelo linfócito T não estão completamente definidos. A relação do peptídeo antigênico com o HLA parece ser de grande importância no

reconhecimento pela célula T e, talvez, fundamental para o entendimento da relação HLA com doenças. É importante lembrar que as moléculas HLA não somente participam da apresentação de antígenos às células T, mas também de peptídios autólogos. Estes não estimulam resposta imunológica em situações normais, porque pertencem ao próprio organismo ("self"). Não sabemos, entretanto, como acontece o reconhecimento dos auto-antígenos nas doenças por auto-imunidade.

1.3.1. CLASSIFICAÇÃO E METODOLOGIA

As doenças estudadas em relação ao sistema HLA podem ser divididas em quatro grupos (Tivary, 1985). O maior é o das doenças auto-imunes, onde a lesão tecidual é mediada pela resposta imune celular ou humoral e onde a inflamação ocorre de maneira sistêmica. Os auto-anticorpos, imunocomplexos e infiltração mononuclear são a regra. Essas doenças afetam diversos órgãos e sistemas como o endócrino (diabete insulino-dependente e tireoidites), o fígado (hepatite crônica ativa), os rins (síndrome de Good Pasture e lupus sistêmico), as articulações (artrite reumatóide e lupus), o sistema nervoso (miastenia gravis e esclerose múltipla) (Tab. 12.1)

Outro grupo são doenças com nenhuma associação com auto-imunidade, acreditando-se que sejam decorrentes de alterações em outros genes dentro do CPH. A hemocromatose e a deficiência de

21-hidroxilase são exemplos de doenças com possíveis defeitos genéticos em genes não HLA.

O grupo das doenças infecciosas é pequeno, devendo-se ressaltar a lepra lepromatosa em estudos de segregação de haplótipos em famílias (Serjeantson, 1983). É de estranhar que os alelos HLA não definam susceptibilidade a vários patógenos, especialmente quando se sugere que façam parte de genes de resposta imune. Este fato pode ser explicado pela necessidade de se pesquisar a redução da frequência de um alelo em indivíduos afetados, o que deve ser feito com grande número de indivíduos. A maioria dos estudos não realiza tantos testes e muitos procuram uma associação positiva.

O grupo das doenças malignas inclui o carcinoma de nasofaringe, leucemias e a doença de Hodgkin, sendo que muitos estudos foram feitos com outros tumores sem que se observassem associações.

A metodologia para a pesquisa da correlação de HLA com doenças está baseada em estudos de associação e de ligação. Os primeiros acontecem na pesquisa em populações de doentes sem relação de parentesco. O segundo são estudos de famílias com mais de um filho afetado, procurando-se haplótipos mais frequentes nos doentes do que o esperado ao acaso. Neste último caso, os mesmos antígenos HLA não necessitam estar presentes nas diversas famílias, pois servem como um simples marcador de um gene de susceptibilidade. Quando a distância entre o gene marcador e o gene de susceptibilidade é mínima, como poderia ser o caso da espondilite anquilozante, encontraríamos todos (ou quase todos)

os pacientes com o mesmo marcador, pois seria muito difícil acontecer entrecruzamento (crossing over). Quando a distância é maior, o entrecruzamento faria que em estudos populacionais não se observassem o mesmo marcador, sendo somente encontrados entre membros afetados de cada família.

A origem étnica do grupo em estudo é de fundamental importância devido à heterogeneidade das doenças e das frequências HLA nas diversas populações. Utiliza-se o cálculo do risco relativo para conhecimento do risco de desenvolvimento de determinada doença, quando se é portador do marcador HLA, comparando-se com o risco dos que não possuem este marcador. Um risco superior a 1 demonstra uma susceptibilidade; igual a 1 denota neutralidade; enquanto abaixo de 1, qualificamos como resistência. A comparação entre controles e doentes é feita pelo teste do X^2 (Tiwari, 1985).

Tab. 12.1. Associações Entre HLA e Doenças

Doenças	Raça	Estudos Pacientes			Controles	
		nº	nº	%+	%+	RR
Artrite Reumatóide						
B27	C	17	861	16	9	2.0
DR4	C	17	1127	68	25	3.8
BW54	O	3	221	24	11	2.5
DR4	O	5	348	66	39	2.8
DR4	N	3	109	40	10	5.4
Artrite Reumatóide Juvenil						
B27	C	15	1146	25	9	3.3
DR5	C	5	422	34	15	3.3
Espondilite Anquilozante						
B27	C	40	2130	89	9	69.1
B27	O	7	211	85	15	207.9
B27	N	2	33	58	4	54.4
Uveíte Anterior Aguda						
B27	C	10	520	47	10	8.2
Doença de Reiter						
B27	C	25	906	80	9	37.1
Diabete Juvenil						
B8	C	39	4322	40	21	2.5
B15	C	36	4052	22	14	2.1
DR3	C	13	1174	46	22	3.3
DR4	C	12	1051	51	25	3.6
BW54	O	8	453	39	11	5.6
DR3	O	4	139	38	14	4.8
DR4	O	4	139	49	25	2.6
DR3	N	3	135	57	28	3.2
DR4	N	3	135	46	11	6.7
Doença de Grave's						
B8	C	18	1445	43	23	2.5
DR3	C	4	333	56	25	3.7
B35	O	3	162	42	14	4.4
Doença Celíaca						
B8	C	16	696	68	22	7.6
DR3	C	5	194	79	22	11.6
DR7	C	4	137	60	15	7.6

C= caucasóide O= oriental RR= risco relativo
N= negro J= judeu %+= percento positivo

Tab. 12.1. Associações Entre HLA e Doenças (cont.)

Doenças	Raça	Estudos				RR
		<u>Pacientes</u>	<u>Controles</u>			
		nº	nº	%+	%+	
Narcolepsia						
DR2	C	2	45	100	22	129
DR2	O	1	92	100	34	358
Dermatite Herpétiforme						
B8	C	14	498	75	22	9.8
DR3	C	4	126	82	20	17.8
Pênfigo Vulgar						
A26	J	5	117	60	20	4.8
B38	J	5	117	59	21	4.6
DR4	J	3	62	91	32	14.6
Psoríase Vulgar						
B13	C	36	2579	19	5	4.1
B17	C	35	2515	19	7	5.3
B37	C	15	804	7	2	3.9
CW6	C	7	353	56	15	7.5
DR7	C	5	296	48	23	3.2
B13	O	5	336	24	8	3.3
B17	O	4	224	12	9	1.9
B37	O	3	206	20	2	8.4
CW6	O	4	262	27	4	8.5
DR7	O	2	148	10	1	7.6
Doença de Behcet						
B5	C	6	150	31	12	3.8
B5	O	6	199	68	33	4.5
Hemocromatose Idiopática						
A3	C	11	493	72	28	6.7
B7	C	11	493	48	26	2.9
B14	C	10	481	19	6	2.7
Lupus Eritematoso Sistêmico						
B8	C	17	855	40	20	2.7
DR3	C	9	316	42	21	2.6
Síndrome de Goodpasture						
DR2	C	2	25	88	27	13.8
Esclerose Múltipla						
B7	C	38	4964	37	24	1.8
DR2	C	13	1051	51	27	2.7
Miastenia Gravis						
B8	C	12	747	44	19	3.3

Fonte: HLA and Diseases Associations (Tiwari, 1985).

1.3.2. MECANISMOS DE ASSOCIAÇÃO DE HLA COM DOENÇAS

Existem diversas propostas para explicação dessa associação. Sendo assim, antecipa-se a falta de conhecimento e a dificuldade da matéria.

Uma das primeiras hipóteses foi que as moléculas HLA serviam como receptores para agentes infecciosos (Tiwari, 1985). Procurava-se explicar assim, que a molécula do HLA-B27 servia como receptor para um agente que ocasionava a Espondilite Anquilosante e a Síndrome de Reiter. Reforçou este argumento, o achado de que as proteínas codificadas pelos locos HLA no homem e H-2K e H-2D no camundongo agiam como receptores para o vírus Semliki (arbovírus) (Helenius, 1978). Diversos outros experimentos com vírus não chegaram a reforçar essa hipótese.

O mimetismo molecular defende a possibilidade de que algumas moléculas HLA possam apresentar estrutura semelhante a um agente infeccioso e, sendo assim, quando o organismo é infectado com o mesmo, não consegue responder imunologicamente. Esse fato conduz a uma infecção crônica e à sintomatologia. A teoria do mimetismo aproveita a situação de que se desconhece o agente etiológico da maioria das doenças em enfoque. A Espondilite Anquilosante é uma doença que também se ajusta a esse mecanismo, devido aos achados de reações cruzadas entre o HLA-B27 e a bactéria *Klebsiella* (Ebringer, 1980; Welsh, 1980).

→ Outra hipótese muito considerada é a que confere ao HLA o papel de marcador de um gene de susceptibilidade à determinada

doença e que se encontra muito próximo do mesmo. As associações ao nível de estudos populacionais estariam refletindo desequilíbrios de ligação entre os genes marcadores e os de susceptibilidade (Dausset, 1985). A esclerose múltipla poderia ser um exemplo dessa teoria, onde um gene de susceptibilidade estaria muito próximo do loco DR e o gene marcador seria o HLA-DR2. A presença de doença em somente uma mínima fração de indivíduos portadores do gene marcador pode ser explicada. (1) A doença pode ser heterogênea e possuir mais de uma etiologia ou o agente etiológico possuir mais de um peptídeo imunodominante. (2) A exposição a fatores ambientais, como a infecção com determinado vírus, é necessária para que os indivíduos com genes de susceptibilidade possam desenvolver a doença. (3) Fatores genéticos não ligados ao HLA podem também contribuir para a susceptibilidade (doenças poligênicas).

Os genes de resposta imune devem ser importantes na proteção ou susceptibilidade a várias doenças. Estes genes estariam muito próximos do complexo HLA e em desequilíbrio de ligação com determinados alelos. Esses genes foram localizados na região I do cromossoma 15 do camundongo (Shreffler, 1975; Benacerraf, 1975; Benacerraf, 1978; Winchester, 1979). Por essa hipótese os indivíduos apresentariam genes de susceptibilidade ou de resistência a determinados agentes infecciosos, produzindo ou não anticorpos contra os mesmos.

Um argumento favorável a essa hipótese no homem é o de que doenças com associação fraca com antígenos do loco HLA-B são mais intensamente associadas com o loco HLA-DR, DQ. Na diabete

insulino-dependente encontrou-se associação com HLA-B8 e B15, sendo que posteriormente observou-se forte associação com HLA-DR4 e DR3 e talvez mais ainda com DQw8 e DQw2. Desta maneira o gene de susceptibilidade estaria mais próximo do loco DQ e a associação com o loco B seria secundária. Outro fato favorável a esses genes é que existem ligações com alelos diferentes do mesmo loco, o que pode ser observado na doença de Graves, encontrando-se associação com HLA-B8 em caucasóides e com HLA-B35 em japoneses (Bodmer, 1977).

A tendência atual é de procurar definir melhor o polimorfismo HLA com o auxílio de métodos desenvolvidos pela Biologia Molecular e tentar definir associações com regiões da molécula HLA que podem inclusive participar de mais de um alelo (regiões de hipervariabilidade alélica). Essas regiões podem explicar a associação de certas doenças (artrite reumatóide e diabetes juvenil) com mais de um antígeno HLA.

1.3.3. ASSOCIAÇÕES DE INTERESSE

1.3.3.1. ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SÍNDROME DE REITER

A descoberta da associação aconteceu simultaneamente (Schlosstein, 1973; Brewerton, 1973). A média da frequência do HLA-B27 nos doentes varia entre 88% a 96%, enquanto nos controles fica entre 4% a 8%. Esses resultados foram confirmados entre pacientes de diversas raças.

Os pacientes negros americanos apresentam a frequência do B27 (58%) inferior a dos brancos (Ruderman, 1977), enquanto que nos japoneses ela é de 81%.

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência da doença é de 10 a 15 por 1000 indivíduos (Calin, 1976). A comparação entre pacientes B27 positivos e B27 negativos demonstra que não existem diferenças em relação à radiologia, à duração da doença, ao início dos sintomas, à severidade da doença, ao sexo e ao prognóstico. A uveíte anterior é encontrada somente nos pacientes B27 positivos (Nahir, 1979; Khan, 1980).

A reação cruzada entre anticorpos anti-Klebsiela e linfócitos de pacientes com espondilite anquilosante trouxe esperanças quanto à etiologia (Ebringer, 1980; Welsh, 1980). Um fato de muito interesse é que os anticorpos anti-Klebsiela reagem com linfócitos de pacientes B27 positivos, enquanto não reagem com os de pacientes B27 negativos, sugerindo a identificação de um antígeno B27 "modificado" (Seager, 1979).

A doença de Reiter está também associada com o HLA-B27, sendo que 80% dos doentes apresentam este marcador, contra 8% nos controles normais. Esse é a média de diversos trabalhos em vários países, não havendo diferenças significantes. A uveíte anterior aguda, febre alta e perda de peso são mais freqüente nos pacientes com B27 do que nos que não apresentam este antígeno.

1.3.3.2. NARCOLEPSIA

Narcolepsia é uma rara doença caracterizada por cochilos diurnos recorrentes, durante pelo menos seis meses, associados à crise comprovada de cataplexia. Esta última caracteriza-se por perda súbita e bilateral do tônus muscular, após forte emoção. Essa doença apresenta completa associação com o HLA-DR2-DQw1, ou seja 100% dos pacientes apresentam este haplótipo contra 33,5% de controles (Honda, 1986; Matsuki, 1989). O último autor estudou 206 pacientes japoneses, sendo todos positivos para DR2-DQw1.

Foi também encontrada associação significativa para a hipersonia essencial, doença caracterizada por excessiva sonolência diurna, sem cataplexia, ocorrendo diariamente por, no mínimo, seis meses. Foram tipados 46 pacientes, encontrando-se DR2-DQw1 em 57% (Matsuki, 1989).

1.3.3.3. ESCLEROSE MÚLTIPLA

Muitos trabalhos foram publicados sobre a relação entre a esclerose múltipla e o sistema HLA, sendo que a maioria apresentou resultados contraditórios. Os achados mais significantes foram os da associação com HLA-A3, HLA-B7 e com HLA-DR2-DW2. As primeiras duas associações foram encontradas entre caucasóides da Europa e América do Norte, enquanto que a última foi observada na maioria das populações estudadas, com exceção de judeus israelenses e japoneses (Sachs 1977).

A média da frequência do HLA-A3 é de 34% nos pacientes e 27% nos controles, com um risco relativo de 1.46. A média para o HLA-B7 é de 44% nos pacientes e 26% nos controles, com um risco relativo de 2.26, enquanto para HLA-DR2 é de 51%, 27% e 2.78 respectivamente (Tiwari, 1985).

A relação do prognóstico da doença com as associações mostraram resultados contraditórios, assim como com relação a títulos de anticorpos para sarampo, caxumba e rubéola (Walker, 1982).

1.3.3.4. ARTRITE REUMATÓIDE

Os antígenos HLA de classe II são os candidatos mais fortes a representantes de genes associados às doenças auto-ímmunes. O alelo HLA-DR4 apresenta-se associado à doença na maioria das raças (Stasty, 1978; Christiansen, 1984), não tendo sido observadas associações com antígenos de classe I.

O HLA-DR4 pode ser subdividido por tipagens celulares (tipagem com células homozigotas ou PLT) em DW4, DW14 e DW10. A associação acontece somente com os dois primeiros haplótipos (DR4-DW4 e DR4-DW14). Estudos populacionais mostraram que o HLA-DR1 e DRW10 também estão associado à doença (Duquesnoy, 1984; Goronzi, 1986).

O antígeno HLA-DR4 encontra-se presente em 67% dos pacientes, contra 33% de controles normais (RR=4.1), enquanto o HLA-DR1 participa em 32% e 18% respectivamente (RR=2.1). Os pacientes DR4 negativos apresentam 53% de positividade para o DR1. A relação com DR4 está associada à positividade para o fator reumatóide, pois pacientes com a prova do látex negativa não apresentam risco significante (Stastny, 1989).

A artrite reumatóide apresenta-se em 25% dos casos com manifestações extrarticulares. Na síndrome de Felty, caracterizada por esplenomegalia e neutropenia, o DR4 é positivo em 100% dos casos, assim como o fator reumatóide. Nos pacientes com vasculites, o DR4 está presente em 85% (Stastny, 1989).

O polimorfismo dos genes DR4 pode ser estudado, utilizando-se sondas de oligonucleotídeos que identificam DW4 e DW14. Os resultados obtidos demonstram que 93% dos pacientes hibridizam com um ou outro probe (Nepon, 1989).

O polimorfismo dos alelos HLA pode ser definido pelo estudo das sequências de aminoácidos de DR β , DQ α e DQ β . Em todos os haplótipos associados à doença, observa-se que a terceira região de hipervariabilidade alélica de DR β é idêntica, com exceção da simples troca de arginina por lisina no resíduo 71 e glicina por

arginina no 70. Essa distribuição é completamente diferente para os demais alelos de DR β (Todd, 1988; Bell, 1989). A possibilidade de que as próprias moléculas DR apresentem um peptídeo da própria sinóvia ou de outro tecido a clones de linfócitos T deve ser cogitada. Estes últimos passariam a estimular a produção de auto-anticorpos, dando início à artrite reumatóide.

1.3.3.5. DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE

A diabete juvenil ou insulino-dependente afeta 0.5% da população caucasóide e atinge os indivíduos antes dos 20 anos de idade. A destruição seletiva das células beta pancreáticas por auto-anticorpos leva à hiperglicemia, acidose e coma. Associado a esses fatos, acontece à infiltração pancreática por linfócitos T e B, fortalecendo o caráter de doença auto-imune (Rossini, 1985).

A diabete insulino-dependente é uma doença complexa do ponto de vista genético, sendo encontrada em famílias, em que a frequência de irmãos afetados é de somente 6%. Os gêmeos idênticos apresentam uma concordância de 36%, enquanto os irmãos HLA idênticos alcançam 12%. Estes dados indicam que o desenvolvimento da doença depende de fatores dependentes do meio ambiente, assim como da ação de diversos genes independentes ou não (Todd, 1990).

As raças de camundongos NOD (nonobese diabetic mouse) e BB (Bio-Breeding) são ótimos modelos para a doença humana. Esses animais desenvolvem precocemente (dez semanas de idade),

hiperglicemia e cetose, associadas à insuficiência de insulina pela destruição auto-imune das ilhotas (Einsenbarth, 1986). Os estudos com os modelos animais, também indicam o caráter poligênico dessa doença.

O primeiro estudo da associação do HLA com diabetes não obteve resultados relevantes (Finkelstein, 1972). A associação com HLA-B15 foi demonstrada um ano após, encontrando-se a frequência de 36% nos pacientes, contra 10% dos controles (Singal, 1974). Posteriormente inúmeros trabalhos apresentaram diversas associações com a doença.

As associações mais frequentes em caucasóides são: B8, B15, B18, Cw3, DR3, DR4, DW3 e DW4 (Tiwari, 1985). A análise combinada de diversos trabalhos demonstra que os alelos mais significantes são B8, B15, DR3, DR4, DQW2, DQW3. A associação com B8 e B15 é devida ao desequilíbrio de ligação existente com DR3 e DR4 respectivamente, tendo ficado esclarecido que a associação primária é com os antígenos de classe II (Farid, 1979; Solow, 1979). A frequência de DW3-DW4 heterozigotos é mais alta nos pacientes do que nos controles (50% e 5%), assim como também foi reportado para DR3-DR4 (25% e 3.8%) e com o risco relativo de 7.62 (Sachs, 1980; Farid, 1979). Poucas doenças apresentam uma associação tão forte com os alelos de classe II, sendo que foi observado que 95% dos pacientes apresentam HLA-DR3 ou HLA-DR4, contra 45% a 54% dos controles (Johnston, 1983; Svejgaard, 1980).

A relação HLA-DQB1 com a diabetes foi posteriormente encontrada por intermédio de métodos moleculares (Kim, 1985; Tood 1987), existindo forte associação com os genes DQW2 e DQW8. Os

haplótipos DR3-DQW2 e DR4-DQW8 são muito encontrados nos pacientes, devido ao extremo desequilíbrio de ligação, sendo esse o motivo para a observação anterior da alta frequência dos alelos DR. O último autor encontrou os seguintes resultados em 39 pacientes e controles: DR4 (72% e 32%), DR3 (64% e 22%), DR3-DR4 (44% e 3%), DR2 (0% e 26%), DR4-DQW8 (93% e 76%), DR4-DQW7 (7% e 24%). Outro estudo demonstrou que o haplótipo DR4-DQW8 aconteceu em 100% dos pacientes e que dos 23 pacientes, 17 (74%) apresentaram o DW4 e 6 eram DW14 (Nepon, 1989). Resultados semelhantes foram encontrados em outro trabalho, sendo observado DR4-DQW8 em todos os pacientes contra 60% nos controles, assim como não foi identificado nenhum paciente com DR4-DQW7, contra 40% nos controles (Semana, 1989).

Os genes DQB1 foram considerados pela maioria dos autores como possíveis genes na predisposição ao diabetes tanto na raça branca, quanto na negra, existindo três categorias de associação: positiva, neutra e negativa (Tabela 13.1).

Nos japoneses diabéticos não foi encontrada a frequência aumentada do alelo DQW8 (22% contra 19%). Os alelos mais frequentes nessa raça, estudados por sorologia, foram DR4 e DR9 com os riscos relativos de 4.62 e 2.22 respectivamente. A tipagem molecular apresentou DQW4 positivamente associado com a diabetes, com 3.95 de risco relativo. A amplificação de DQA1 foi realizada e a tipagem com os probes específicos demonstrou que o alelo A3 está associado com a doença (45% contra 16%, RR= 19.7) (Todd, 1990).

Os resultados da tipagem de DQA1 nas populações caucasóide e negra também apontam o alelo A3 em associação positiva, sendo que o haplótipo DR4-DQW8 quase sempre apresenta A3. Na raça negra, o alelo A3 ocorre em conjunto com DQW2 em dois haplótipos DR7 e DR9 em associação positiva. Neste ponto, o autor sugere que os alelos A3 e DQW2 são os principais determinantes de susceptibilidade ao diabetes (Todd, 1990), aventando que o risco aumentado nos caucasóides heterozigotos DR3-DR4 ocorre por transcomplementação, sendo que, na realidade, o importante é a presença de A3-DQW2 (A3 do haplótipo DR4 e DQW2 do DR3). Nos negros diabéticos, a associação DQW2-A3 representa 50% dos pacientes contra 9% dos controles, com um risco relativo de 10.4. O alelo DQW2 está positivamente associado à susceptibilidade no haplótipo DR3, entretanto não apresenta a mesma qualidade com DR7 ou somente quando em associação com A3 em negros.

O seqüenciamento do primeiro domínio das cadeias DQB isolados de pacientes diabéticos e controles demonstra que existe algo em comum na seqüência de aminoácidos. O exame dessa seqüência nos antígenos DQW8 (associação positiva) e DQW7 (associação negativa) de diabéticos encontra diferenças nos resíduos 13, 26, 45 e 57. A conclusão de que a posição 57 está associada à doença veio da comparação com os demais alelos de importância. Todos os alelos DQB1 associados positivamente à diabetes (DR4-DQW8, DR3-DQW2, DR1-DQW5, DR2-DQW5) apresentaram Ala, Val ou Ser na posição 57. O ácido aspártico (Asp) foi encontrado no resíduo 57 em quase todos os alelos considerados neutros ou negativos em relação à associação (Todd, 1987).

Recentemente, outro trabalho demonstrou que entre 87 pacientes diabéticos noruegueses, 82% apresentavam alelos DQB1 que não codificam para Asp na posição 57, comparados com 27% dos controles. Outro dado interessante é que somente 2% dos pacientes eram aparentemente Asp 57 homozigotos, contra 22% dos controles (Ronningnen, 1989)

Na raça negra, observa-se que DR3 está associado aos alelos DQW2 e DQW4. A frequência desses haplótipos são parecidas entre os controles, mas entre os doentes só encontramos o haplótipo DR3-DQW2 (Ala na posição 57). O haplótipo DR3-DQW4 apresenta Asp na referida posição.

Nos camundongos NOD a situação é semelhante, pois apresentam o resíduo Ser na posição 57 do primeiro domínio da cadeia A β , homóloga à DQB1 humana, sendo que as demais raças de camundongos não susceptíveis apresentam Asp nesta posição (Todd, 1987). Uma tentativa de esclarecimento poderia surgir com a introdução de um transgene ASP positivo no camundongo NOD, o que teoricamente deveria prevenir a doença.

Esses resultados sugerem que, na maioria dos casos, a presença de Asp na posição 57 da cadeia beta da molécula de HLA-DQ confere proteção contra a doença, enquanto outro aminoácido predispõe para a mesma. Como a estrutura, função e expressão das cadeias alfa e beta das moléculas de classe II são interdependentes, o produto de um gene com maior possibilidade de influenciar a função da cadeia DQ beta é a própria cadeia DQ alfa.

Os achados desses trabalhos sugerem que tanto o loco DQB1, quanto o DQA1, contribuem para a susceptibilidade para a diabetes. A análise combinada de famílias com no mínimo dois locos de susceptibilidade sugere que o determinante associado com DR4 é o mais diabetogênico e é herdado de forma dominante. O alelo A3 do loco DQA1 é o mais forte candidato a determinante associado ao DR4, e os alelos que fornecem cadeias beta Asp negativas são permissivos para a doença. Os alelos que conferem cadeias beta Asp positivas correlacionam-se com diminuição da susceptibilidade e não com proteção dominante, excetuando-se os haplótipos com DQW6-DR3 e DQW6-DRW13 que parecem conferir proteção dominante. A susceptibilidade associada com DR3 na ausência de DR4 parece ser recessiva, sugerindo-se que o DQW2 é um dos alelos determinantes. Isto é reforçado pelo fato de somente 5-10% dos pacientes caucasóides apresentarem-se DR3-DR3 homozigotos e que podem apresentar uma forma mais amena da doença do que os pacientes DR4 positivos (Todd, 1990).

A sugestão de que o $\alpha\beta$ heterodímero A3-DQW2 pode apresentar um auto-antígeno, ou um vírus, aos linfócitos T deve ser levada em consideração, tanto no homem quanto no camundongo. Indivíduos heterozigotos Asp 57 positivos / Asp 57 negativos apresentam redução do risco de doença. Deve-se enfatizar que os alelos diabetogênicos não são suficientes para causarem a doença, devendo-se levar em conta a presença de outros genes que talvez previnam normalmente contra a auto-imunidade, assim como outros fatores ainda não conhecidos, entre eles a possibilidade de um vírus que inicie todo o processo de auto-imunidade.

A resistência à diabetes pode ser observada em relação aos haplótipos DR2(DRW15)-DQW6, sendo que a proteção encontrada no haplótipo DRW13-DQW6, sugere novamente que o determinante protetor corresponde mais ao DQ do que ao DRB1. O DR2(DRW16)-DQW5(AZH) é encontrado mais freqüentemente entre os pacientes do que nos controles, sendo o único haplótipo com DR2 que apresenta um alelo DQB1 que não possui uma cadeia beta com Asp na posição 57 (Todd, 1989; Todd, 1990).

Tab. 13.1. Haplótipos HLA-DR, DQ e Resíduo 57. Associações com a Diabete Juvenil.

DRB1	DQB1	DQA1	Resíduo 57 Cadeia DQB	Raça	
				Caucasóide	Negra
DR1	DQW5 (W1)	A1	VAL	+	+
DRW15 (DR2)	DQW6 (W1)	A1	ASP	-	-
DRW16 (DR2)	DQW5(W1.AZH)	A1	SER	+	-
DR4	DQW7 (W3.1)	A3	ASP	-	-
DR4	DQW8 (W3.2)	A3	ALA	+	+
DRW13 (DRW6)	DQW6 (1.18)	A1	ASP	-	-
DRW14 (DRW6)	DQW5 (1.9)	A1	ASP	N	
DRW13 (DRW6)	DQW6 (1.19)	A1	VAL	+	
DRW17 (DR3)	DQW2	A4	ALA	+	+
DRW18 (DR3)	DQW4	A4	ASP		N
DR5	DQW7	A4	ASP	N	N
DR7	DQW2	A2	ALA	N	N
DR7	DQW2	A3	ALA		+
DR8	DQW4	A4	ASP	N	
DR9	DQW9 (3.3)	A3	ASP	N	
DR9	DQW2	A3	ALA		N

Associações positivas +, negativas -, neutras N. A antiga nomenclatura para os alelos DRB1 e DQB1 encontra-se entre parênteses. Espaços em branco em lugar de associações denotam insuficiência de dados disponíveis (Todd, 1990a, Todd, 1990b).

1.3.3.6. LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA

A leucemia linfática crônica (LLC) apresenta diversas alterações imunológicas e cromossômicas, associadas à fantástica produção de linfócitos B não funcionantes ou de atuação precária. A característica linfocitose B acontece em cerca de 95% dos doentes, podendo existir remissões temporárias, sendo que outro grupo de pacientes (5%) produzem linfócitos T exageradamente. Outra característica é a deficiência na produção de imunoglobulinas, acarretando eventuais infecções importantes (Jobim, 1975).

O fato de que a linfocitose destes pacientes é acentuada faz com que muitos laboratórios de histocompatibilidade mantenham um banco de linfócitos destes pacientes para auxiliar na identificação de anticorpos anti-HLA de classe II. Os linfócitos congelados são praticamente células B puras, com pouca contaminação, servindo perfeitamente para a caracterização de anticorpos anti-HLA-DR e DQ.

Estudos recentes demonstram que 53% dos pacientes apresentam cariótipos anormais, sendo que a trissomia 12 é a alteração mais comum neste pacientes (Bird, 1989; Juliusson, 1988).

A associação HLA com LLC tem sido estudada, produzindo resultados conflitantes. Os resultados combinados das frequências de 48 pacientes Suiços (Jeannet, 1976), 83 Norte Americanos (Pollack, 1977), 44 Franceses (Fingold, 1971) e 70 Russos (Tananov, 1981) não demonstraram diferenças significantes entre pacientes e controles (Tiwari, 1985).

O estudo de 38 pacientes germânicos demonstrou um aumento significativo do HLA-B18 nos pacientes (15.8%) contra 600 controles normais (1.5%)(Richter, 1973).

O loco HLA-DR foi pela primeira vez testado em pacientes franceses, sem observarem associação significativa (De Mousson, 1977). Posteriormente, foi encontrado 62% de DR5 nos pacientes Norte-Americanos com LLC, contra 21% nos controles.

Recentemente, foi realizado uma pesquisa com 88 pacientes caucasóides e 14 negros. Os resultados apontaram o antígeno HLA-CW6 como fortemente associado com a doença em brancos (Linnet, 1988).

1.4. IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE RENAL

1.4.1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é o melhor tratamento para a maioria dos pacientes com insuficiência renal crônica terminal, sendo, atualmente, uma rotina em muitos hospitais. O sucesso desse procedimento está relacionado a diversos avanços da Medicina, entretanto, muitos pontos ainda são obscuros, necessitando de continuado esforço de pesquisa.

O transplante do tecido de um doador para um receptor costuma despertar uma reação imunológica. Os antígenos de histocompatibilidade do doador são apresentados para os linfócitos do receptor e estes desencadeiam ou não uma reação que procura destruir o novo órgão, como se fosse um agente infeccioso indesejável.

O desejo de que o órgão permaneça no receptor leva-nos a procurar diminuir a incompatibilidade entre o doador e o receptor e também enfraquecer a resposta imunológica do último. Isso é conseguido pela compatibilização dos antígenos HLA e ABO dos participantes e pela imunossupressão do receptor.

Os transplantes podem ser realizados com doador vivo relacionado ou com doador cadáver. Entre os primeiros, os

indivíduos HLA idênticos (2 haplótipos iguais) e ABO compatíveis, possibilitam os melhores resultados possíveis nessa modalidade de transplante. Os resultados observados nos transplantes com um haplótipo em comum são intermediários entre os primeiros e os totalmente diferentes (2 haplótipos diferentes). Estes últimos apresentam a mesma sobrevida daqueles com doador cadáver, não havendo razão para esta escolha, desde que exista disponibilidade relativa de doadores.

Os transplantes com órgãos de cadáver são estimulados na maioria dos países, obtendo-se resultados muito razoáveis, graças à imunossupressão cada vez mais adequada, melhor conservação dos órgãos e esforço na procura do melhor receptor para o órgão disponível. Ainda existem dúvidas da necessidade de procurar-se uma melhor compatibilidade para os transplantes com órgãos de cadáver, pois é um esforço dispendioso que envolve diversas equipes de cirurgia e de laboratório, sendo que o resultado pode, ou não ser evidente, ou não ultrapassar os 15% na sobrevida dos enxertos com melhor compatibilidade, comparados aos com nenhuma (Matas, 1988). Além disso, devemos levar em conta, que os órgãos viajam para encontrar o melhor receptor, fato não muito aconselhado e que seria desejável evitar.

Diversos centros cooperativos como o Eurotransplante, o France Transplant, o Scandiatransplant e o United Kingdom Transplant Service procuram alcançar a melhor compatibilidade para seus receptores, dando importância para o ABO e, por ordem de preferência, HLA-DR, HLA-B, HLA-A.

O polimorfismo do sistema HLA é muito maior do que se imaginava e isto está sendo demonstrado pelos métodos moleculares como a tipagem com RFLP e com oligonucleotídeos sintéticos, após amplificação do DNA pelo método do PCR. Caso compararmos a diferença entre um indivíduo HLA-B7 e um HLA- B51/ B52, diríamos, no passado, que existia somente uma incompatibilidade, pois B51/52 eram divisões ("splits") do HLA-B5. Hoje pode-se dizer que existem 25 incompatibilidades em relação à seqüência dos aminoácidos. Algumas dessas incompatibilidades serão ineficientes em estimular uma reação por parte do receptor, pois são inacessíveis ao reconhecimento das células T por estarem dentro do "ninho" da molécula HLA. Resta a dúvida de quantas poderão agir como um epítipo alogênico, e se o extremo polimorfismo observado atualmente tem importância clínica, pois esse polimorfismo ainda não é levado em consideração para os transplantes (Terasaki, 1990).

Além dessas dúvidas referentes à seleção dos receptores, podemos apontar outros pontos, intimamente relacionados a elas, como o fato de selecionarmos pacientes por intermédio da tipagem com anticorpos anti-HLA que irão reconhecer os antígenos respectivos na membrana celular das células do doador. No entanto, a rejeição quase sempre acontece por intermédio de reação de linfócitos T com as células do doador e, certamente, esta reação é diferente da primeira. O que uma célula T identifica não é necessariamente o mesmo que um anticorpo reconhece.

1.4.2. IMUNOBIOLOGIA DAS REJEIÇÕES DOS ENXERTOS

As rejeições são ainda o obstáculo maior ao transplante renal, entretanto o número de episódios agudos irreversíveis, após a primeira semana não são usuais, como no passado. Este fato deve-se ao tratamento imunossupressor com a ciclosporina, droga que revolucionou o transplante renal e permitiu o transplante cardíaco, hepático, entre outros. Mesmo com o atual tratamento, observa-se resposta imunológica contra o enxerto na maioria dos casos, sendo necessário, vez por outra, aumentar a imunossupresão.

Os antígenos HLA de classe I e II do doador despertam o sistema imunológico do receptor para a fase efetora da rejeição do enxerto. Esses antígenos são apresentados aos linfócitos T auxiliares (helper), necessários para o estímulo secundário aos linfócitos B e aos linfócitos T citotóxicos, assim como aos macrófagos. Os primeiros produzem os anticorpos que podem destruir o enxerto com a ajuda do sistema do complemento ou por intermédio da atividade da célula K, também conhecida como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Os linfócitos T citotóxicos e os macrófagos desenvolvem reação direta contra as células do enxerto, causando citólise. A maioria dos linfócitos T auxiliares apresentam o fenótipo CD4 que interage com os antígenos de classe II, entretanto os citotóxicos apresentam CD8 que reagem com os de classe I (Dallman, 1988).

Os linfócitos T reagem com os antígenos do enxerto após a degradação e processamento dos últimos por células dendríticas ou macrófagos do receptor. Os peptídios imunogênicos do doador são apresentados pelas células anteriores aos linfócitos do receptor, junto com as moléculas do HLA, localizando-se no interior de uma fenda ou "ninho" na estrutura da molécula (Fig. 2.1.). O estudo cristalográfico do HLA-A2, com o material eletrodenso em seu interior, proporcionou o entendimento desse mecanismo (Bjorkman, 1987). A Fig. 11.1. demonstra como deve acontecer a apresentação para o receptor, do peptídeo proveniente do doador. Observando-se este esquema, podemos imaginar que se pode tentar impedir a ação da célula T, agindo diretamente sobre ela (drogas, globulina antilinfocitária) ou por intermédio de anticorpos anti-CD4 (Pearson, 1990).

A estimulação dos linfócitos B pode ocorrer por intermédio do T auxiliar ou diretamente pela interação com os antígenos do doador, via imunoglobulinas de superfície. As linfocinas como a IL4, derivadas do T auxiliar, estimulam a proliferação e diferenciação das células B em plasmócitos, produtores dos anticorpos anti-HLA.

O polimorfismo do sistema HLA dificulta a possibilidade de encontrar-se receptores idênticos aos doadores cadáveres. Sendo assim, a imunossupressão é sempre necessária, podendo ocorrer rejeição devido a esses antígenos, aos antígenos do sistema endotélio-monócito e a outros menos importantes (antígenos "minor") (Dallman, 1988).

O estímulo à resposta imunológica pode ocorrer de maneira central, dentro do rim transplantado, pela apresentação dos antígenos HLA do doador para os linfócitos T do receptor, por intermédio de células dendríticas (leucócitos passageiros). Essas células do receptor são muito ricas em antígenos HLA e podem estimular o processo de rejeição. A outra maneira de sensibilização acontece na periferia, quando antígenos HLA do doador saem do rim, são fagocitados e apresentados aos linfócitos do receptor no tecido linfóide periférico.

1.4.3. CLASSIFICAÇÃO DAS REJEIÇÕES

As rejeições aos transplantes renais podem ocorrer de seis diferentes maneiras. (1) A **rejeição hiperaguda** é dominada por um quadro de coagulação intra-renal, acontecendo imediatamente após ou durante a cirurgia. Essa modalidade é mediada por anticorpos pré-formados devido a gestações, transfusões ou transplantes prévios. Estes são anticorpos IgG anti-HLA ou ABO que estimulam o complemento, causando destruição endotelial e coagulação intravascular (Kissmeyer-Nielsen, 1966; Starzl, 1968). A rejeição pode ser evitada pela realização da prova cruzada pré-transplante com linfócitos T ou com linfócitos totais, entretanto muitas outras causas podem mimetizar essa reação, como enxertos primariamente não funcionantes associados à nefrocitotoxicidade da ciclosporina, anticorpos anti-membrana basal dos glomérulos,

agregação de eritrócitos por aglutininas séricas a frio ou por coagulação intravascular disseminada no doador.

A rejeição pos-DST acontece em menos de 4 dias após o transplante. São reações celulares agressivas que acontecem em pacientes submetidos à imunossupressão convencional. Recentemente foi observado que existe nestes casos um aumento dos índices da cultura mista de linfócitos como se houvesse uma pré-sensibilização celular (Burlingham, 1987). Reações desse tipo podem também ocorrer por sensibilização prévia humoral por baixo nível de anticorpos anti-HLA, não detectáveis pela prova cruzada (Braun, 1985).

A rejeição hiperaguda retardada surge em média ao redor dos 12 dias pós-transplante de um órgão que acusou boa função inicial. As lesões apresentam-se como uma reação hiperaguda atenuada com necrose fibrinóide, hemorragia intersticial, agregação plaquetária e deposição de fibrina que eventualmente, leva à trombose, necrose cortical e perda do enxerto. Essa rejeição acontece especialmente em indivíduos HLA idênticos e com cultura mista não estimulatória (Montoliu, 1979). Foram encontrados anticorpos anti-endoteliais, que com frequência reagem cruzadamente com os monócitos, em cerca de 75% dos casos (Cerilli, 1985).

A rejeição acelerada ocorre entre os 30 e os 90 dias após a cirurgia, apresentando progressivo deterioramento da função renal, associado à severa lesão permanente ou perda do enxerto de 1 a 6 meses. A patologia desta reação é de lesão vascular, acreditando-se que é devida a anticorpos anti-HLA pré-formados

e não observados pelos testes usuais de prova cruzada. Poucos autores aceitam que indivíduos com prova cruzada positiva anti-*linfócito B*, possam desencadear com maior frequência essa rejeição (Braun, 1983).

A rejeição celular aguda é a forma mais comum de rejeição, manifestando-se como uma "crise", na qual as evidências sistêmicas de inflamação coincidem com as mudanças funcionais no enxerto. Clinicamente, esta rejeição inicia com febre, mal-estar, aumento do peso por retenção de sódio e água e aumento da creatinina. Cerca de 90% dessas crises respondem aos esteróides e aos anticorpos anti-*linfocitários*.

A rejeição aguda é ocasionada, predominantemente, por uma reação de hipersensibilidade retardada, em que os *linfócitos T* auxiliares estimulam os *linfócitos T* de hipersensibilidade, responsáveis pelo estímulo à produção de *linfocinas* e aos *macrófagos*. A destruição do tecido renal acontece mediada por *enzimas lisossômicas* e por *linfocinas* (Willians, 1986).

A maioria dos patologistas concorda que a *vasculite* é o achado mais importante nos rins biopsiados durante episódios de rejeição e que a inflamação intersticial costuma ser intensa, mas pode também ocorrer de forma suave na ausência de rejeição.

O tratamento precoce com pulso de esteróides e anticorpos antilinfocitários consegue, na maioria das vezes, reverter o quadro de rejeição aguda.

A rejeição crônica apresenta características imunológicas, diferentes mediadores imunológicos e talvez mecanismos não imunes no deterioramento contínuo da função renal.

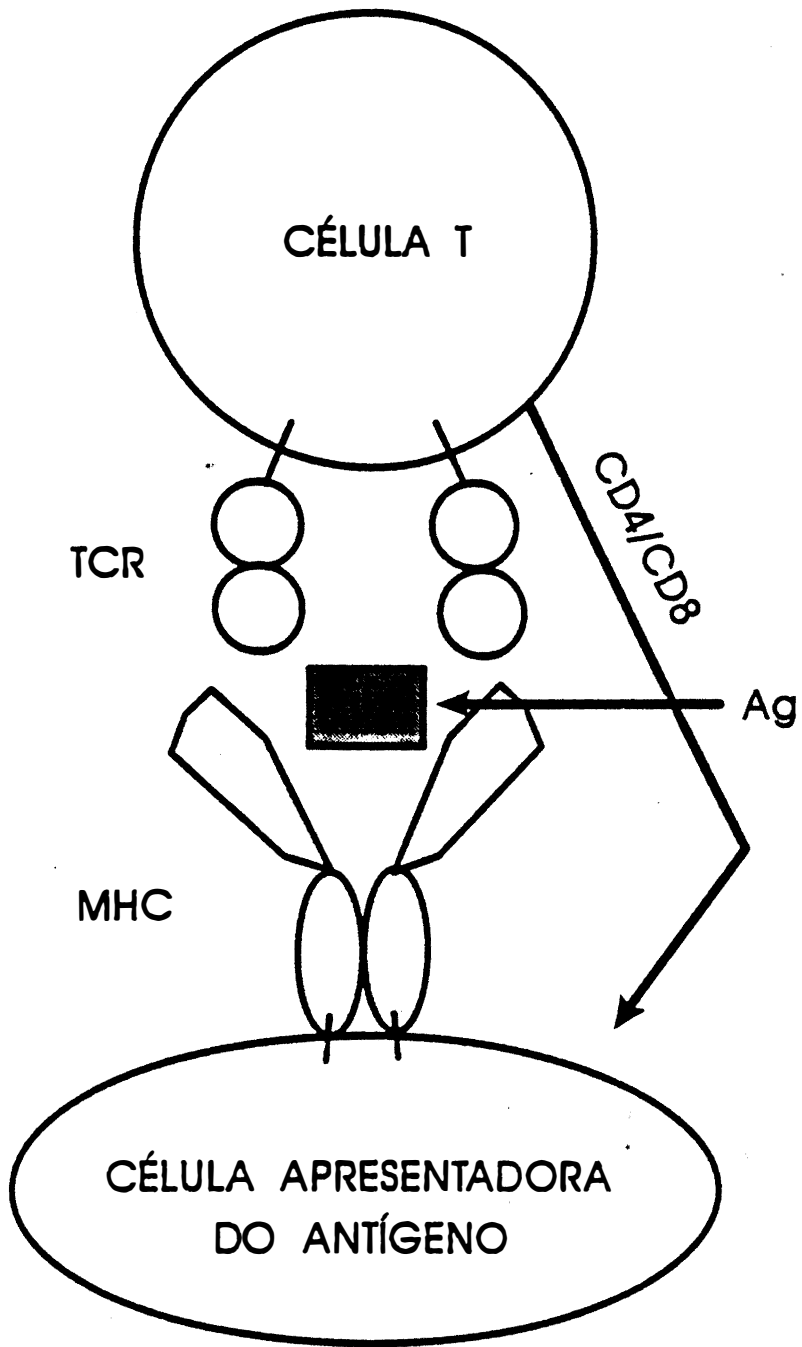
Clinicamente, é caracterizada pelo início tardio (meses ou anos após o transplante) e pela progressiva deterioração da função renal que se correlaciona com as mudanças histológicas.

A patologia envolve os quatro componentes principais do rim. O interstício apresenta fibrose e infiltrados esparsos de pequenos linfócitos e células plasmáticas. Os túbulos são diminuídos pela expansão da fibrose intersticial. Os vasos apresentam a íntima espessada, com comprometimento do lúmen. Os glomérulos podem apresentar-se desde normais até completamente hialinizados e esclerosados, ou com espessamento da membrana basal, aumento da matrix mesangial e fibrose peri-glomerular.

Os mecanismos imunológicos da rejeição crônica não são totalmente entendidos. Os anticorpos parecem ter um papel significativo, existindo uma correlação estreita entre a arterite obliterante característica e a presença de anticorpos antidoador (Jeannet, 1970). Esses anticorpos parecem atuar via ADCC (Bush, 1979). Outro achado nessa rejeição são os monócitos e macrófagos, infiltrando os vasos, interstício e ocasionando a deposição de fibrina.

Não seria surpreendente que esse tipo de rejeição fosse irreversível, mas é possível, algumas vezes, ser estabilizada com o aumento da dose de ciclosporina ou de azatioprina, ou pelo uso combinado das duas drogas em doses modestas (Williams, 1986).

Fig. 11.1. Apresentação do antígeno para linfócito T



1.4.4. RESULTADOS DO TRANSPLANTE RENAL

O transplante com doador relacionado acontece com maior frequência nos países em desenvolvimento, sendo que os com doador cadáver são mais realizados nos países desenvolvidos.

1.4.4.1. DOADOR VIVO RELACIONADO

O transplante entre gêmeos idênticos é o que apresenta melhores resultados; entretanto, podem ocorrer insucessos devido a problemas técnicos ou recorrência da glomerulonefrite. A casuística do Peter Bent Brigham Hospital em seus 30 transplantes entre gêmeos mostra que 8 dos insucessos foram devido à recorrência da glomerulonefrite e que a sobrevida do enxerto após 25 anos foi de 55%, enquanto a do paciente alcançou 65%

Dentro de famílias, os irmãos HLA idênticos são os pares ideais para o procedimento. No registro da Universidade da Califórnia (UCLA) existem 1514 transplantes entre esses irmãos, sendo a sobrevida do enxerto em 1 e 5 anos de 91 e 78% respectivamente (Terasaki, 1986). Resultados de 95% após o primeiro ano foram encontrados independente do uso de ciclosporina (Cats, 1985). O fato é que mesmo sendo HLA idênticos, podem apresentar rejeições por sensibilização a antígenos "menores". A imunossupressão é feita nos transplantes

HLA idênticos com azatioprina e doses pequenas de esteróides. (Morris, 1988).

Os resultados dos transplantes com um haplótipo idêntico, entre os pais e os filhos ou entre irmãos, melhoraram de forma dramática nos últimos 10 anos. Os motivos foram primeiramente o uso das transfusões sanguíneas específicas do doador e o tratamento com a ciclosporina; entretanto, os números são diversos. A sobrevida do enxerto em 1 ano alcança 80% a 95% quando é utilizada a ciclosporina (tríplice terapia) ou a transfusão específica do doador (Flechner, 1984; Glass, 1985; Salvatierra, 1985). Nos centros onde não são tipados os doadores para o sistema HLA, a sobrevida varia de 70 a 90% (Anderson, 1984; Bentley, 1984; Najarian, 1978).

1.4.4.2. DOADOR VIVO NÃO RELACIONADO

Os transplantes com doador vivo não relacionado acontecem especialmente entre casais ou entre pessoas com fortes laços de amizade. Os resultados são semelhantes aos feitos com o cadáver sem nenhuma compatibilidade. Na Inglaterra, os cuidados para que não aconteçam casos de transplantes com doador vivo não relacionados (comércio de órgãos), tornaram obrigatórios os testes de RFLP com sondas para DRB1, a fim de confirmar a relação familiar entre doador e receptor. Os casos entre casais e amigos são avaliados por uma comissão de ética.

1.4.4.3. DOADOR CADÁVER

Os transplantes com doador cadáver foram muito realizados nos últimos 10 anos, sendo que na Europa alcançam 85% do total dos transplantes (Morris, 1988).

Transplantes realizados após transfusão sangüínea e tratados com tríplice terapia apresentam uma sobrevida do enxerto de 75% no primeiro ano (Spees, 1985; Terasaki, 1985). Valores mais altos são conseguidos com compatibilidade HLA para o locus DR ou B/DR. Em Oxford, a sobrevida do enxerto em 1 ano é 80%, 66% e 59% para 0, 1 e 2 incompatibilidades HLA-DR, respectivamente. A sobrevida do paciente também obteve um bom resultado, alcançando 95% no primeiro ano e 80% no final do quinto ano (Ting, 1988).

Recentemente, o Collaborative Transplant Study (CTS) publicou a estimativa de sobrevida dos enxertos a longo prazo. Após 10 anos, o grupo que não usou a ciclosporina apresentou os seguintes resultados: 69% dos transplantes entre irmãos HLA idênticos estariam funcionando, assim como 46% dos com doador vivo relacionado (1 haplótipo em comum) e 31% dos com doador cadáver. No grupo que usou a ciclosporina, encontrariam 73%, 52% e 40%, respectivamente, entretanto, analisando os que receberam rins de cadáver (com ciclosporina) sem incompatibilidades HLA-A+B+DR chega-se a 50% de sobrevida do enxerto em 10 anos, enquanto os com 4 incompatibilidades apresentariam 38%. (Opelz, 1990).

1.4.5. FATORES QUE INFLUENCIAM A SOBREVIVÊNCIA DO TRANSPLANTE

Muitos são os fatores que influenciam favoravelmente os transplantes, enquanto outros agem negativamente. A combinação dos primeiros é sempre tentada em cada tipo de transplante, assim como em diferentes grupos de pacientes. As drogas são as principais aliadas dos transplantadores e, felizmente, existe na atualidade um bom desenvolvimento terapêutico.

1.4.5.1. IMUNOSSUPRESSÃO.

Os transplantes ficariam restritos entre gêmeos idênticos se não existisse a imunossupressão. A azatioprina e os esteróides foram o suporte dos transplantes nos últimos 20 anos. No início, as doses eram excessivas e os pacientes morriam de infecção, mas, com o tempo, as doses terapêuticas ideais foram determinadas para o benefício de milhares de pacientes.

A globulina antilinfocitária foi a primeira modalidade de terapêutica biológica a ser utilizada profilaticamente ou para reverter as rejeições agudas. A seguir, os anticorpos monoclonais anti-CD3 (OKT3) substituíram a última com grande eficácia.

A ciclosporina tornou-se a droga de escolha nos transplantes renais, entretanto não é livre de efeitos secundários importantes como a nefrotoxicidade, hipertensão, neurotoxicidade e hirsutismo (Borel, 1986). Recentemente uma nova droga o FK 506 começou a ser usada como imunossupressor. As duas drogas são metabólitos distintos de fungos, exercendo importante ação inibidora na

ativação dos linfócitos T auxiliares CD4+, assim como na secreção de IL2 e outras linfocinas, incluindo fatores de crescimento celular e γ -interferon. Ambas inibem a expressão dos receptores de IL2 nas células T, assim como a geração e proliferação de linfócitos T citotóxicos, quando administradas para os pacientes (Thompson, 1989). O FK 506 tem demonstrado ser importante na substituição da ciclosporina, quando esta apresenta efeitos indesejáveis significativos, revertendo rejeições incontroláveis nos transplantes de fígado (Fung, 1991).

1.4.5.2. HISTOCOMPATIBILIDADE

A compatibilidade HLA já foi discutida anteriormente, mas seria interessante reforçar que a melhor compatibilidade é para os antígenos DR seguida de HLA-B e HLA-A e que para HLA-DQ parece não influenciar os resultados (Bushell, 1989). A análise de sobrevida apresenta melhores resultados quando os números são expressivos, assim como os 7000 transplantes analisados por Opelz e Terasaki em 1979. Esses autores encontraram (na fase pré-ciclosporina e transfusões) sobrevida em um ano de 54% para os transplantes com órgãos de cadáver com compatibilidade HLA e 42% para os sem nenhuma compatibilidade. O Eurotransplante demonstrou em 1982 que a sobrevida em 5 anos de 2000 transplantados com rins de cadáver era de 51% para os "compatíveis", contra 32% para os sem nenhuma compatibilidade (Ting, 1988).

A compatibilidade para os locos HLA-A e B é significativa em relação à sobrevida nos transplantes com órgãos de cadáver, mas

isso não é observado em todos os grupos, entretanto, a diferença entre os "compatíveis" e os sem compatibilidade não alcança 10% em 5 anos. Os resultados com compatibilidade HLA-A,B e DR foram analisados pelo Eurotransplant em 1985, observando-se sobrevidas do enxerto de 73% com compatibilidade DR e de 82% com a compatibilidade "total" (Ting, 1988)

Após a introdução da ciclosporina, muitos grupos deixaram de observar o efeito da compatibilidade HLA. No estudo do grupo escandinavo, a sobrevida de 1 ano para transplante com doador cadáver foi de 74%, 78% e 79% para 0, 1 e 2 incompatibilidades. No CTS foi observado que a compatibilidade HLA-DR possibilita 10% a mais de sobrevida em 1 ano, tanto nos receptores que usam ciclosporina como nos que não a utilizam (Opelz, 1987).

A prova cruzada é um teste de fundamental importância no transplante renal, mas seu significado tem mudado após o dogma dos anos 60 de que "uma prova cruzada positiva é contra-indicação para o transplante". Esse dogma baseia-se no quadro de rejeição hiperaguda observado nos pacientes que realizaram a cirurgia após um teste positivo. Depois de 12 anos de pesquisas, sabe-se que é possível existir uma prova cruzada positiva sem prejuízo para o transplante.

Os auto-anticorpos antilinfocitários não são prejudiciais ao transplante e para esta observação é necessário realizar a prova cruzada contra as células do doador e também contra as do próprio receptor. A positividade para ambos é a favor da presença desses anticorpos, sendo comum que reajam contra todo um painel de células alogênicas.

O sucesso dos transplantes com prova cruzada positiva com linfócito B e negativa com linfócitos T foi observado em 1976 por Patel e Terazaki. Esses anticorpos costumam ser da classe IgM e podem ser auto-anticorpos, entretanto existem várias publicações que mostram o efeito deletério desses anticorpos. Em Oxford, a observação de prova cruzada positiva contra células B foi dividida para análise em dois grupos. O primeiro, com melhor sobrevida, foi o de prova cruzada anti-B (auto-anticorpos), sendo que o segundo grupo (não auto-anticorpos) apresentou sobrevida inferior (Ting, 1989a).

Os anticorpos anti-HLA classe I reagem na prova cruzado com linfócitos T e B, os anticorpos anti-classe II reagem contra linfócitos B e os auto-anticorpos reagem com ambas as células ou somente com as células B. O fato é que os auto-anticorpos não são prejudiciais, o que parece ser ignorado por muitos centros. As características desses anticorpos são de reagirem com células autólogas e com células B de painel, assim como reagem fracamente com linfócitos de pacientes com leucemia linfática crônica e são IgM (Ting, 1989b).

Existem dados que sugerem que uma prova cruzada positiva por anticorpo anti-classe II não é prejudicial, entretanto esse é um ponto onde não existe um conceito firme, devendo-se evitar tais resultados. Outro fato, confirmado por muitos, é que os pacientes com prova cruzada positiva no passado e negativa na época do transplante apresentam uma boa sobrevida, apesar de que alguns apresentem rejeição irreversível, devendo-se, portanto, ter muito cuidado nestas indicações. A classe de imunoglobulina

parece ser importante, pois os com prova cruzada prévia com IgM parecem ter melhores resultados (Ting, 1989a).

1.4.5.3. TRANSFUSÕES SANGUÍNEAS

A transfusão sangüínea foi um dos marcos na história do transplante renal. A princípio não era aconselhado o uso de transfusões com o receio da sensibilização HLA. Posteriormente foi descoberto o efeito benéfico das transfusões e, a partir desse momento, todos os pacientes foram transfundidos pelo menos uma vez. Os resultados chegaram a 15% de melhora na sobrevida do enxerto, considerando-se transplantes de órgãos de cadáver (Opelz, 1988). Um fato extremamente curioso aconteceu a partir de 1984, quando o CTS não conseguiu mais demonstrar o efeito positivo das transfusões deliberadas (Opelz, 1987). Esse fato não foi demonstrado nos registros da UCLA (Terasaki, 1986), entretanto outros autores confirmaram o CTS. Não se conhece a razão desse fato, mas a sugestão de se deva ao uso da ciclosporina deve ser lembrada.

A transfusão específica do doador foi muito utilizada nesses últimos 10 anos, com aparente aumento significativo da sobrevida do enxerto nos transplantes com doador vivo relacionado com um ou dois haplótipos de incompatibilidade (Salvatierra, 1983). Esses resultados também declinaram após 1984, mas ainda se utiliza tal tipo de tratamento preventivo. O inconveniente deste tipo de procedimento é a possível sensibilização HLA de receptores.

O efeito da compatibilidade HLA é mais influente nos pacientes que não receberam transfusões antes da cirurgia (Cecka, 1989).

Existem evidências recentes de que é importante existir uma disparidade nos antígenos de classe II (HLA-DR) para que seja observado o efeito benéfico da transfusão específica do doador nos transplantes entre relacionados. Os pacientes com uma incompatibilidade DR tiveram 40% menos rejeições do que os compatíveis para este loco (Lazda, 1990). É possível que a importância dessa disparidade, seja o motivo do desaparecimento do efeito da transfusão, tanto nos com transfusão específica do doador, quanto naqueles com transfusões aleatórias para transplante com órgão de cadáver.

1.4.5.4. "NIMAS E NIPAS"

Os antígenos HLA não herdados da mãe e que possivelmente tiveram contato com o organismo do feto (NIMA, "non inherited maternal HLA antigens"), teoricamente podem não ser imunogênicos devido à tolerância despertada "in útero". Isto talvez contribuísse para que os indivíduos fossem tolerantes aos haplótipos maternos não recebidos das mães. Os primeiros resultados oriundos dessa hipótese demonstram que metade dos pacientes hiperimunizados em lista de espera não apresentam anticorpos contra os NIMA, enquanto este não é o caso para os "NIPAS" ("non inherited paternal HLA antigens") (Van Rood, 1990),

o que poderá ser uma oportunidade para que muitos pacientes recebam o órgão desejado.

1.4.5.5 IDADE DO DOADOR E RECEPTOR

A sobrevida dos transplantes renais tem relação com a idade do doador e do receptor, procurando-se evitar os transplantes com doadores acima de 55 e menores de 3 anos. A idade do receptor também tem influência, especialmente se tem menos de 10 ou mais de 60 anos (Morris, 1988).

1.4.5.6. DOENÇAS ASSOCIADAS

É natural que outras doenças que não as renais possam diminuir a sobrevida, assim como a doença sistêmica original que determinou a insuficiência renal. A nefropatia diabética invariavelmente diminui a sobrevida do enxerto, em relação à outras nefropatias como pielonefrites e glomerulonefrites, devendo-se avaliar a situação cardiovascular dos pacientes, inclusive realizando angiografia, procurando prevenir as mortes por infarto do miocárdio. O lupus eritematoso sistêmico também ocasiona diminuição da sobrevida dos órgãos transplantados (Morris, 1988).

1.4.5.7. O EFEITO DO CENTRO TRANSPLANTADOR

O centro transplantador é um dos principais fatores que influenciam a sobrevida dos transplantes. Até hoje não se conhece as razões pelas quais existem diferenças marcantes entre um centro e outro. Acredita-se que essas diferenças não são relacionadas a fatores que reconhecidamente afetem a sobrevida, mas, talvez, ao atendimento clínico. O eficiência do centro transplantador pode variar em até 40%, entre a sobrevida do melhor e do pior centro. O uso da ciclosporina parece influenciar no sucesso do centro, pois na Inglaterra o percentual de sobrevida do enxerto que variava de 60% a 78% entre os diversos centros passou a ser de 75% a 82% após a introdução dessa droga (Morris, 1988).

As diferenças entre os resultados da tipagem HLA de um único centro (que realiza grande número de transplantes por ano) em relação aos de multicentros (CTS, UCLA) parecem estar relacionadas especialmente com os protocolos de imunossupressão. Nos centros com mais forte indução da imunossupressão, os resultados da tipagem HLA não são observados, enquanto nos resultados de múltiplos centros, onde diversos protocolos de imunossupressão são utilizados, a tipagem HLA é demonstrada ser de importância. O fato de iniciar-se com uma dose sub-ótima de imunossupressão faz com que as diferenças aloantigênicas sejam notadas (Burdick, 1991).

1.4.5.8. O EFEITO DA RAÇA

A raça negra parece ter uma sobrevida dos enxertos pior do que as demais raças, assim como os enxertos de órgãos de doadores negros têm sobrevida diminuída quando transplantados em receptores brancos. Não são conhecidas as razões para essas diferenças, mas especula-se que possam estar relacionadas à incidência cinco vezes maior de hipertensão maligna em negros, assim como existe maior facilidade na tipagem HLA na raça branca. Outros acreditam que exista a influência do centro transplantador (Kerman, 1989).

OBJETIVOS

2.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.

Os anticorpos anti-HLA podem ser identificados no sangue de múltiparas, de politransfundidos, de indivíduos imunizados premeditadamente com linfócitos ou enxerto de pele e de indivíduos que rejeitaram transplantes renais.

A necessidade de reagentes para desenvolver nosso laboratório clínico para tipagem de doadores e receptores para transplante de órgãos no Rio Grande do Sul (RS), determinou o início desta pesquisa na Unidade de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A identificação destes anticorpos no soro de placentas está relacionada, exclusivamente, ao volume de reagente obtido, pois a doação de sangue por parte de mulheres após o parto é sempre difícil.

A tipagem dos primeiros transplantes e dos primeiros painéis de indivíduos para o sistema HLA no RS foi realizada com soros do National Institute of Health (NIH-USA), entretanto esta ajuda

terminou após dois anos do início de nossas atividades. A identificação de anticorpos anti-HLA no soro de placentas possibilitou a continuidade do trabalho de tipagem de doadores e receptores para mais de 1300 transplantes renais em nossa região.

Os soros de placentas foram inicialmente analisados para a identificação de anticorpos anti-HLA de classe I, realizando-se a prova cruzada desses soros contra um painel de células de indivíduos com as especificidades HLA-A e B conhecidas. Posteriormente, os soros com reatividade antilinfocitária, foram utilizados para a pesquisa de anticorpos anti-DR e DQ, utilizando-se um painel de células de pacientes com leucemia linfática crônica. Esta última etapa foi realizada no Laboratório de Tipagem Tecidual do Nuffield Department of Surgery, Universidade de Oxford.

2.2. A INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGENÉTICA HLA.

Os problemas relativos à aceitação da paternidade é um capítulo importante da Medicina Legal, assim como um dos casos mais frequentes nas varas de família dos tribunais estaduais brasileiros. Muitos desses casos ficavam insolúveis no passado, acarretando uma grande injustiça, quase sempre para as mães pobres, que ficavam desamparadas após o parto. A situação

continua a mesma, onde a imunogenética não está estabelecida.

O marco do desenvolvimento científico na resolução deste problema foi a descoberta dos grupos sanguíneos por Landsteiner em 1900. A utilidade dos testes de paternidade aumentou com a identificação de novos sistemas de grupos sanguíneos. Os avanços maiores aconteceram entre 1940 e 1970, devido à descoberta do sistema Rh e à aplicação dos testes HLA.

A exclusão de um possível pai, falsamente acusado, é o principal objetivo de uma perícia médica, entretanto a análise estatística tem proporcionado importantes resultados quando o acusado não é afastado da paternidade. A inclusão de paternidade não é possível ser afirmada, porém a estimativa matemática tem sido aceita pelos tribunais. O polimorfismo do sistema HLA e a raridade de muitos de seus alelos faz com que seja um dos principais testes na investigação de paternidade.

A tipagem HLA, como teste de paternidade, foi utilizada por nós pela primeira vez em 1986, quando aconteceu um caso de troca de crianças num hospital de Porto Alegre. A seguir os juízes iniciaram a solicitar perícias em diversos casos, possibilitando o estudo da aplicação da imunogenética HLA em Medicina Legal. O objetivo principal dessa pesquisa clínica é demonstrar a importância desse sistema genético na solução de casos de paternidade duvidosa em nossa comunidade, analisando os resultados obtidos até 1990.

2.3. RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL.

O transplante renal é realizado na cidade de Porto Alegre desde o início dos anos 70. Muitos hospitais executaram transplantes durante esses 20 anos, entre eles o Hospital de Clínicas, a Santa Casa de Misericórdia, o Hospital Conceição, o Hospital Lazaroto, o Hospital Maia FO, o Hospital da PUC, o Hospital Divina Providência e o Hospital Ernesto Dornelles. O transplante renal tem sido também realizado no interior do Estado, nas cidades de Pelotas, Passo Fundo, Cruz Alta, Caxias e Canoas.

Mais de 1300 transplantes foram efetuados por diversas equipes clínico-cirúrgicas nesses hospitais. A maioria foram transplantes com doador vivo relacionado, sendo que os transplantes com doador cadáver tiveram incentivo após a criação de um escritório de procura de órgãos em 1988.

Os primeiros testes de histocompatibilidade foram executados em 1976. A partir desta data, a Unidade de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, passou a avaliar todos os transplantes acontecidos.

Os dados da maioria dos transplantes realizados no Rio Grande do Sul foram perdidos e nunca analisados em conjunto. O objetivo desse estudo é avaliar a sobrevida dos transplantes realizados nos últimos anos, procurando esclarecer fatos que possibilitem melhores resultados futuros.

2.4. AVALIAÇÃO DO SISTEMA HLA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.

A leucemia linfática crônica (LLC) é uma doença de interesse imunológico, tanto pelo seu aspecto de doença proliferativa linfóide quanto pela imunodeficiência secundária associada.

O quadro clínico é bem definido, o diagnóstico é relativamente simples, entretanto a etiologia não é conhecida. Alterações cromossômicas foram descritas por vários autores, mas associações genéticas com o sistema HLA não são constantes nos diversos grupos estudados.

A tipagem HLA de pacientes com LLC e respectivos controles normais foi realizada, procurando-se diferenças genéticas entre os alelos desse sistema que viessem a conferir um risco aumentado de alguns indivíduos adquirirem a doença.

Durante este estudo foi também possível detectar alguns pacientes que aparentemente não apresentavam moléculas de HLA-DQ na membrana celular. Uma avaliação desses indivíduos com o método de RFLP foi realizada.

O estudo de 114 pacientes com LLC foi desenvolvido não só com a intenção da pesquisa da relação HLA e doença, mas também da organização de um painel de linfócitos B. Este último tem utilidade para a identificação e caracterização de anticorpos anti-HLA-DR no soro de placentas humanas.

2.5. ESTUDO DO SISTEMA HLA NA DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ANTÍGENOS E DOS GENES HLA NA POPULAÇÃO NORTE-AMERICANA DE ORIGEM HISPÂNICA E ANGLO-SAXÔNICA.

A incidência da Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (DMID) está relacionada à variabilidade geográfica e só recentemente este fato tem sido reconhecido. Os registros internacionais demonstram que uma criança na Finlândia tem 60 vezes mais chance de vir a ter DMID do que uma criança da Coreia (Rewers, 1988). Este fato é peculiar nesta patologia e parece não ocorrer de forma marcante em outras doenças crônicas como a doença coronariana ou o câncer (Keys, 1970; Doll, 1980). A distribuição geográfica parece ser, até o momento, um dos mais importantes fatores de risco para a diabetes.

O estudo da etiologia da DMID passa certamente pela avaliação das razões dessa variabilidade. A especulação científica tem sido dirigida para a ação dos fatores genéticos e ambientais como de grande importância no desencadear da doença; entretanto, estudos populacionais adequados necessitam ser realizados (LaPorte, 1985).

Os estudos de migrações indicam que os migrantes estão sujeitos aos riscos do novo ambiente (Siemiatycki, 1988), existindo uma necessidade de identificar-se populações em diversas partes do mundo que apresentem os mesmos ancestrais, mas com diverso grau de mistura com os habitantes nativos e adaptação

aos costumes regionais. Esses grupos podem ser muito informativos no entendimento dos determinantes genéticos e ambientais da DMID (Moy, 1989).

As populações de origem espanhola e portuguesa podem ser ideais para o estudo da relação descrita, pois estão dispersas na América, ambientadas e misturadas com o sangue indígena. Uma variabilidade entre a população de origem espanhola já pode ser demonstrada em relação à diabetes, existindo uma diferença de no mínimo 10 vezes no risco da doença entre indivíduos de origem espanhola da cidade do México e do Colorado.

O registro do estado do Colorado (EUA) aponta uma incidência de 15.2/100.000 habitantes, entretanto no vale de São Luis, onde existe um grande número de descendentes de espanhóis, a incidência é de 6.8/100.000 (Hamman, 1990). Outros estudos demonstram que as populações de origem espanhola apresentam menos diabetes do que a população norte-americana (Hamman, 1985; Lorenzi 1985, Gay, 1989). A diabetes apresenta uma incidência elevada nos europeus do norte e é praticamente inexistente entre os índios Pima (Knowler, 1979).

O registro da cidade do México aponta para uma das menores incidências da doença, 0.58/100.000 habitantes (Robles, 1987). Os registros sobre populações de origem portuguesa são escassos, entretanto um recente estudo de São Paulo indica uma incidência de 3.0/100.000 habitantes (Franco, 1988). Não existem dados de Portugal para comparação, mas se a incidência for semelhante a da Espanha, a doença terá uma incidência em Portugal 3 vezes a do Brasil. A incidência de DMID na Espanha foi de 10.6/100.000

habitantes (Milan Guasch, 1988).

A DMID é considerada doença auto-imune e sua predisposição genética é determinada, em parte, por um ou mais genes codificados no complexo principal de histocompatibilidade. Estudos de populações e de famílias com mais de um indivíduo afetado, indicam que pelo menos um gene está intimamente associado aos genes HLA de classe II.

A DMID é uma doença com forte relação com o sistema HLA (capítulo 1.3.3.5.), devendo-se salientar às associações com HLA-B15, B8, DR3, DR4, DQW2, DQW8, A3 (DQA1) (Singal, 1974; Svejgaard, 1980; Sachs, 1980; Johnston, 1983; Farid, 1979; Kim, 1985; Tiwari, 1985; Todd, 1987; Nepon, 1989; Semana, 1989). Os haplótipos DR3-DQW2 e DR4-DQW8 são mais freqüentes entre os doentes nas raças branca e negra. O alelo DQW8 não é positivamente associado em japoneses, assim como DQW2. A associação maior nesta última raça é com o alelo A3 de DQA1. O HLA-DR3 é raro entre os japoneses e índios americanos (Todd, 1990).

Recentemente, ficou estabelecida a existência de três categorias de associações com a DMID. A associação positiva está relacionada com uma frequência estatisticamente mais elevada de certos alelos ou haplótipos nos pacientes, em comparação com os controles (risco relativo acima de 1 e X^2 significante) . A associação negativa relaciona-se com o oposto (RR abaixo de 1), enquanto a neutra não demonstra associação (Todd, 1987).

O seqüenciamento do primeiro domínio das cadeias de DQB dos alelos de pacientes com a DMID e controles possibilitou a

demonstração de que o aminoácido da posição 57 é um ácido aspártico (Asp), quando os alelos são de associação negativa e Ala, Val ou Ser, quando a associação é positiva (Tab.13.1.). Isto equivale a dizer que a presença do ácido aspártico na molécula de DQ correlaciona-se com proteção à doença, enquanto a presença de outro aminoácido predispõe para a mesma (Todd, 1987; Todd, 1988). Os resultados encontrados na literatura demonstram que 90% dos pacientes caucasóides apresentam-se homozigotos para DQ β Asp negativo, enquanto nenhum foi encontrado homozigoto para Asp positivo (Todd, 1987). Outro estudo apresentou resultados semelhantes, como 96% dos pacientes homozigotos para Asp negativo (Morel, 1988)

Diversos grupos têm investigado o sistema HLA entre os descendentes de espanhóis com DMID. Foi encontrado um excesso de fenótipos HLA-DR3 e DR4 em mexicanos e negros norte-americanos (Zeidler, 1980). Outro trabalho demonstrou a esperada associação com o HLA-DR3 e DR4 entre mexicanos diabéticos; entretanto, também foi encontrada forte associação com HLA-DQW3 (Rodríguez, 1987). Os resultados da tipagem de diabéticos na Espanha demonstrou a freqüência elevada de HLA-B18, HLA-DR3 e DR4 (Arnaiz-Villena, 1984). Um estudo realizado entre descendentes de espanhóis na cidade de Nova York demonstrou também existir excesso de HLA-DR3 e DR4 entre os doentes, assim como foi encontrada uma freqüência de somente 9% de DR3 entre os controles (Rubinstein, 1990). No Brasil foi encontrada uma freqüência elevada de HLA-DR3 e DR4 entre os pacientes com DMID (Eizirick, 1987).

O objetivo deste estudo está em procurar conhecer as causas da baixa incidência de DMID nos indivíduos de descendência hispânica, habitantes do Estado do Colorado. A cooperação científica entre o Laboratório de Genética Molecular da Diabete (Departamento de Cirurgia da Universidade de Oxford) e o Departamento de Epidemiologia da Universidade do Colorado (EUA) é que possibilitou o estudo do polimorfismo HLA nos pacientes e controles.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. AMOSTRAS : INDIVÍDUOS, PACIENTES E CONTROLES

3.1.1.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.

Um total de 2600 placentas foram coletadas na maternidade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Santa Casa de Misericórdia, assim como em hospitais de Curitiba e Belo Horizonte.

As placentas foram obtidas no momento do parto e imediatamente colocadas em sacos plásticos duplos e refrigeradas. Antes de decorridas 24 horas, foram cortadas em pedaços grandes (dentro do próprio saco) e colocadas num funil de vidro, drenando o soro para dentro de um Becker. As placentas foram delicadamente espremidas após 2 horas, esperando-se mais 30 minutos para

coletar o soro. Esse foi separado, após duas centrifugações, por 10 minutos a 2500 rpm. O volume final variou de 35 a 120 ml de soro, sendo descartadas as amostras com volume inferior. As placentas maiores são as que produzem mais soro, sendo preferentemente aproveitadas e o soro congelado a -20°C . Um ponto de máxima importância é a centrifugação de todos os soros de placenta imediatamente antes do uso nas placas de Terasaki, pois sempre precipita alguma proteína que pode prejudicar a leitura.

A pesquisa de anticorpos de classe I foi realizada pelo método de linfocitotoxicidade de acordo com o descrito no capítulo 3.2.1.2., utilizando-se placas de 60 orifícios com 1 ul de cada soro por lugar. A cada 360 placentas (6 placas), realizamos uma prova cruzada contra células de um painel de 50 indivíduos normais com o HLA bem caracterizado.

Todas as placentas positivas foram separadas para posterior pesquisa de anticorpos anti-classe II, realizada após a absorção dos anticorpos de classe I com plaquetas humanas (capítulo 3.2.1.4.2.). Utilizou-se concentrado de paquetas de pelo menos 100 doadores. A encubação dos soros com as plaquetas, proporciona a retirada dos anticorpos anti-HLA-A,B e C que aderem aos respectivos antígenos presentes nas plaquetas. Como essas células são desprovidas de antígenos de classe II, os anticorpos anti-DR e DQ permanecem no soro a ser testado contra um painel de 30 células de pacientes portadores de leucemia linfática crônica (LLC). Essas células são linfócitos B e foram caracterizadas previamente para seus antígenos HLA, permanecendo congeladas em N líquido até o uso (capítulo 3.2.1.4.3.). O mesmo método de linfocitotoxicidade foi utilizado para a prova cruzada entre os

soros de placenta absorvidos com plaquetas e as células de LLC. A única diferença foi a encubação com o complemento de coelho, utilizando-se 2 horas na pesquisa de anticorpos anti-classe II, contra 1 hora na de classe I. A necessidade da utilização de células B deve-se ao fato de que os antígenos de classe II não são expressos em linfócitos T, pelo menos em condições normais.

3.1.1.2. INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGENÉTICA DO HLA.

A utilização do sistema HLA nos casos de investigação de paternidade foi introduzida no RS em 1986, tendo sido avaliados somente 4 casos neste ano. A seguir foram realizadas 15 avaliações em 1987, 11 em 1988 e 36 em 89-90, totalizando 66 casos.

Os testes utilizados foram a tipagem HLA-A e B para a maioria dos casos, sendo que a tipagem dos grupos sanguíneos ABO, Rh (CcDEe) e MNSs foi também associada em casos especiais. A referida tipagem foi necessária para alcançar a significância desejada, ou para resolver problemas relativos ao teste HLA. Utilizou-se o método de linfocitotoxicidade descrito no capítulo 3.2.1.2. e a aglutinação em tubo para os grupos sanguíneos.

3.1.1.3. RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL.

O estudo foi realizado a partir de 250 transplantes, sendo 158 com doadores vivos relacionados e 92 com doadores cadáveres. Esses transplantes foram realizados em diversos hospitais de

Porto Alegre.

Os pacientes renais crônicos, candidatos a transplante com doador vivo-relacionado, foram tipados junto com seus possíveis doadores para o sistema HLA-A e B, assim como realizaram a prova cruzada. O método utilizado foi o de linfocitotoxicidade descrito no capítulo 3.2.1.2.

Os pacientes candidatos a transplante com rins de cadáver foram colocados em lista de espera, sendo avaliados para a presença de anticorpos anti-HLA a cada 5 meses, utilizando-se um painel de células de, no mínimo, 40 indivíduos normais. A avaliação pré-transplante foi a prova cruzada simples com soro dos receptores contra os linfócitos do doador. A compatibilidade com o grupo sanguíneo ABO foi sempre realizada e os pacientes foram agrupados de acordo com esse sistema. Quando o doador era identificado, o seu grupo sanguíneo era classificado e os soros dos receptores compatíveis eram testados contra os linfócitos retirados dos linfonodos do doador (capítulo 3.2.1.1.3.). Os transplantes foram realizados sem avaliação da compatibilidade HLA entre o doador e o receptor.

Alguns pacientes transplantados com rins de doador vivo-relacionado, realizaram transfusão específica do doador (DST), utilizando o método de Salvatierra (capítulo 1.4.5.3.).

A partir de 1988, foi organizado um escritório para a procura de doadores cadáveres. Este foi um marco para uma melhor captação de rins e córneas, estimulando também os transplantes de coração, pâncreas e pulmão em Porto Alegre.

3.1.1.4. AVALIAÇÃO DO SISTEMA HLA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.

Os pacientes (120) foram diagnosticados no Departamento de Hematologia do Hospital John Radcliffe, em Oxford. A avaliação inicial constou de exame físico, provas laboratoriais e medulograma. Amostras de sangue (10 ml) foram coletadas durante os exames de rotina mensal. Os linfócitos foram separados por gradiente de Ficoll-Hypaque e congelados em nitrogênio líquido (capítulo 3.2.1.4.3.). As amostras congeladas foram as que continham grande predominância linfocitária B, tendo sido possível estocar regular número delas.

A tipagem HLA foi realizada na primeira amostra de cada paciente, possibilitando organizar um painel de células bem caracterizadas para os antígenos HLA-A, B, C, DR, DQ. Devido ao grande número de linfócitos B no sangue dos pacientes, não foi necessário separar as sub-populações. As tipagens foram realizadas pelo método de linfocitotoxicidade, inicialmente pelo contraste de fase (Terasaki, 1964) e posteriormente por imunofluorescência com Dynabeads (cap. 3.2.1.2.) com 120 anticorpos para os antígenos de classe I e 120 para os de classe II. A diferença maior entre as tipagens foi a utilização de complemento de coelho puro para classe I (60 min de incubação) e com 5% de soro humano AB para classe II (120 min. de incubação).

Os controles para este estudo foram 367 indivíduos saudáveis pertencentes ao painel do Laboratório de Tipagem de Tecidos do Nuffield Department of Surgery, Universidade de

Oxford. Os linfócitos desses pacientes já tinham suas características HLA conhecidas, não tendo sido selecionados, mas simplesmente utilizados todos os pertencentes ao painel. Ambas as amostras são provenientes de indivíduos ingleses de raça branca, oriundos da mesma região da Inglaterra.

O estudo constou de tipagem do painel de LLC, procurando definir o maior número de antígenos, cálculo da frequência de fenótipos e genótipos de ambas as amostras, assim como o risco relativo e testes de significância (capítulo 3.2.5.).

A tipagem HLA de classe II por RFLP está descrita com detalhes no capítulo 3.2.3. (Bidwell, 1990), mas, em resumo, procedeu-se a extração do DNA pelo método de Miller (salting-out) (capítulo 3.2.2.) para após digerir o DNA com a enzima TaqI. A eletroforese foi realizada, seguida da transferência de Southern dos fragmentos de DNA para uma membrana de nylon. A hibridização foi feita com as sondas pRTV1 e p11- β -1, para a identificação de alelos de DRB1 e DQB1. A auto-radiografia possibilitou a análise das bandas características do polimorfismo HLA de classe II.

3.1.1.5. ESTUDO DO SISTEMA HLA NA DIABETES INSULINO-DEPENDENTE: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ANTÍGENOS E DOS GENES NA POPULAÇÃO NORTE-AMERICANA DE ORIGEM HISPÂNICA E ANGLO-SAXÔNICA.

O estudo do sistema HLA na Diabetes Mellitus Insulino-Dependente foi realizado em pacientes e controles provenientes do Estado do Colorado (EUA). Todos os pacientes pertencem ao

Registro de DMID daquele Estado e foram diagnosticados antes dos 18 anos de idade. Os controles foram indivíduos normais, selecionados para apresentarem as mesmas condições de idade, sexo e etnicidade. A pesquisa envolveu 53 diabéticos descendentes de espanhóis (hispânicos), 48 controles hispânicos, 64 diabéticos caucasóides não hispânicos (anglos) e 67 controles anglos. A coleta do sangue dos indivíduos foi realizada pela equipe de epidemiologia da Universidade do Colorado. Os linfócitos do sangue periférico foram separados por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque, congelados em nitrogênio líquido e enviados para o estudo do polimorfismo HLA na Universidade de Oxford.

Os testes sorológicos foram realizados com o método de linfocitotoxicidade (Terasaki, 1964) descrito no Capítulo 3.2.1.1 a 3.2.1.3., utilizando-se uma bateria de anti-soros que permitiram a tipagem HLA-A, B, DR e DQ. Os resultados de DQ não foram levados em consideração por serem limitados, por este loco não ser bem definido pela sorologia e por dispormos dos resultados da tipagem por DNA, considerados superiores.

A tipagem molecular utilizou leucócitos do sangue periférico que foram separados após centrifugação e congelados à -80°C até o momento da extração do DNA (Miller 1988), descrito minuciosamente no capítulo 3.2.2.

A amplificação do DNA foi realizada pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR), com o auxílio da enzima Taq polimerase e com o termociclo da Perkin Elmers-Cetus (Saiki, 1985; Horn, 1988; Morel, 1987; Saiki, 1986; Todd, 1987). O protocolo utilizou duas reações de amplificação com 32 ciclos cada uma e com volumes de 25 ul e 50 ul respectivamente. DQA1 foi

amplificado com os primers 26a e 27a na primeira reação e 1 ul deste produto foi amplificado novamente com os primers 26a e 27b na segunda reação. DQB1 foi amplificado com os primers GAMPDQXB2 e GLPDQB3 na primeira reação, sendo que 1 ul deste produto foi amplificado na segunda reação com os primers GAMPDQXB2 e GLPDQB2 (Todd, 1990).

A hibridização com as sondas de oligonucleotídios sintéticos marcados com ^{32}P e a posterior auto-radiografia possibilitou a identificação dos alelos de DQB1 (DQW4, DQW5, DQW6, DQW7, DQW8 e DQW9) e dos de DQA1 (A1, A2, A3, A4). Os alelos de DQA1 estão associados com especificidades HLA-DR e tem sido classificados em 4 famílias (Scharf, 1986; Todd, 1990): A1 associado com DR1, DR2 e DRW6; A2 com DR7; A3 com DR4 e DR9; A4 com DR3, DR5 e DRW8. Cada alelo foi determinado por sua sonda complementar específica em hibridização em membranas de nitrocelulose e lavadas de acordo com a temperatura específica de cada sonda (Tab. 2.3). Os resultados positivos são observados como manchas negras na auto-radiografia e os negativos como espaços em branco entre os positivos (Fig. 2.3.). O DNA de células homozigotas, imortalizadas pelo vírus de Epstein Bar, foi utilizado como controle das hibridizações. As seguintes amostras homozigotas provenientes do United Kingdom Transplant Service, foram amplificadas e adicionadas em cada membrana: DBB 38 (DR7, DW11, DQW9), HOM (DR1, DW1, DQW5), PGF (DR2, DQW6), QBL (DR3, DQW2), LUYA (DRW8, DQW4), MADURA (DRW8, DQW4), PE 117 (DR4, DQW8, A3). Os detalhes da reação do PCR podem ser encontrados no capítulo 3.2.4.

A análise estatística utilizou o teste do risco relativo de

Wolf-Aldane , o cálculo da variância, o cálculo do X^2 e o valor da probabilidade (p). O último valor foi multiplicado pelo número de alelos estudados, sendo de 22 para os de classe II e 50 para os de classe I , considerando-se "significante" valores acima de $p=0.05$. Os detalhes e exemplos podem ser encontrados no capítulo 3.2.5.

3.1.2. REAGENTES

3.1.2.1. Citrato Trissódico (CTS-anticoagulante)

Dissolver 76 gm CTS em 2 litros de H₂O deionizada (solução de CTS a 3.8%). Esterilizar com filtro de 22 micron e guardar na temperatura ambiente. Usar 2.5 ml para cada 20 ml de sangue.

3.1.2.2. Eritrócitos de Carneiro Tratados com Neuraminidase

Dissolver Neuraminidase (Tipo V, Sigma) em água destilada para dar a concentração de 1 unidade/ml. Guardar congelada a -40 °C, em alíquotas de 150 ul, prontas para uso.

1. Lavar os eritrócitos 3 x com salina, centrifugando por 7 min/1800 rpm. Retirar a camada rica em leucócitos (buffy coat)

antes de cada centrifugação.

2. Para 10 ml de PBS adicionar 0.6 ml de sedimento de eritrócitos e 300 ul de neuraminidase.

3. Misturar e encubar 30 min a 37 °C, com agitação intermitente.

4. Lavar os eritrócitos tratados por 2 vezes com PBS e ressuspender em 50 ml de PBS.

5. Guardar a solução à 4 °C por 1 semana. Se as células apresentarem um pouco de hemólise, lavar novamente com PBS ou descartar.

3.1.2.3. Polybrene (Sigma Comp.)

Preparar uma solução estoque de 5% em água destilada. Guardar à 4 °C e para o uso, diluir 1:30 em PBS. Deve ser preparada fresca a cada dia.

3.1.2.4. Tampão Gideon Goldstein

Misturar 8.29 g de NH₄CL, 37 mg de EDTA dissódico e 1 gr de KHCO₃ em 1 litro de água destilada. Ajustar o pH para 7.3 (notar que o pH deste tampão não é estável quando deixado aberto o recipiente, sendo melhor aliquotá-lo em tubos com cerca de 10 ml).

3.1.2.5. Eosina Y (Sigma Comp.)

Preparar solução a 5% em água destilada e filtrar. Guardar a temperatura ambiente. Filtrar uma vez por semana.

3.1.2.6. Formalina (37-40% w/v Formaldeído, BDH)

Para uso o formaldeído é diluído- 4 partes de formaldeído e 6 partes de salina normal. Adicione vermelho de fenol, ajuste o pH para 7 com 0.1 N NaOH e filtre. O pH deve ser medido regularmente e a formalina filtrada 3 x por semana.

3.1.2.7. Corante para Fluorescência (M. de Manchester)

100 g	Hemoglobina bovina	(15% w/v)
140 mg	Brometo de Etídio	(0.2 mg/ml)
70 mg	Acridine Orange	(0.1 mg/ml)
16.5 g	NaEDTA	(2.5 % w/v)
667 ml	PBS	

Esta solução é utilizada no método de Manchester e pode ser congelada em alíquotas de 4 ml.

3.1.2.8. Corante para Fluorescência (M. de Glasgow)

Solução Estoque

Acridine Orange - 20 mg dissolvidas em 1 ml de etanol absoluto, completar para 20 ml com PBS.

Brometo de Etídio - 40 mg dissolvidas em 1 ml de etanol absoluto, completar para 20 ml com PBS.

Diluyente do Corante

PBS + 0.5% EDTA dissódico

Solução Cocktail

300 ul Acridine Orange (estoque)

300 ul Brometo de Etídio (estoque)

300 ul Tinta (Higgins item nº 44011 Faber-Castell)

4 ml Diluente.

3.1.2.9. Tampão de Lise de Eritrócitos

0.144 M NH₄Cl

1 mM NaHCO₃

Guardar na temperatura ambiente.

3.1.2.10a. Tampão de Lise Nuclear

10 mM Tris HCl pH 8.2

0.4 M NaCl

2 mM Na₂EDTA pH 8.0 (da sol. estoque, reag. 10b)

3.1.2.10b. 0.5 M EDTA pH 8.0

Adicionar 186,1 g de Na₂EDTA.2H₂O a 800ml de H₂O bidestilada. Agitação magnética vigorosa, ajustando o pH para 8.0 com pérolas de NaOH (aprox. 20 g). O EDTA não dissolverá até que o pH chegue a 8.0. Adicione H₂O dest até 1 l. e autoclavar 100°C 30 min.

3.1.2.11. Solução de Protease K (pronta para uso)

2 mg/ml de protease K diluída no tampão estoque (- 20°C).

Nota: Pode-se preparar uma sol. 5x concentrada (10 mg/ml)

para ser usada em encubação de 3 horas/55°C.

Solução Tampão Estoque

SDS 1% w/v

2 mM Na₂EDTA pH 8 (diluir reagente 10b)

Guardar na temperatura ambiente.

3.1.2.12. Tampão TE 10.1. pH 7.5 (para sol. de DNA)

2 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5

0.4 ml 0.5 M Na₂EDTA pH 8 (reagente 10b)

Completar para 200 ml. com H₂O bidest.

3.1.2.13. Azul de Bromofenol

0.05% de azul de bromofenol em TEA com 30% de glicerol para gel de 20 x 25 cm.

0.05% de azul de bromofenol em TBE com 30% de glicerol para minigel.

0.05 Azul de Xyanol para gel LMP com o tampão de preferência.

3.1.2.14. 2 x TBE

21.8 Tris base

11.12 g borato

1.86 g Na₂ EDTA

Completar par 1 l, acertar pH para 8.3

3.1.2.15. Solução Estoque de Brometo de Etídio (10mg/ml)

CUIDADO !! Este reagente é cancerígeno ! Usar luvas e máscara!

0.1 g de brometo de etídio em 10 ml de H₂O bidest..Este reagente pode ser comprado já nesta concentração (Sigma).

3.1.2.16. Reagente Omega.

1 vol. 6 x reagente de parar a reação "stop mix" (reag. 17)

3 vol. TE (reagente 12)

Adicionar 2 vol. de Omega para 1 vol. do DNA digerido (4 ul+2ul) para correr o minigel.

3.1.2.17. Solução 6 x "Stop Mix"

3 g Ficoll 400

2 ml 0.2% w/v de azul de bromofenol

2 ml 0.3% de w/v de xylene cyanole FF

2.4 ml 50 x TAE (reag. 18)

Completar para 20 ml com H₂O bidest.

3.1.2.18. Tampão 50 x TAE

121 g de Tris base

28.5 ml ac. acético glacial

50 ml 0.5 M Na₂ EDTA pH 8.0 (reag. 10b)

Completar para 500 ml com H₂O bidest.

3.1.2.19a. 0.15 M HCl

6.6 ml HCl conc. em 500ml H₂O bidest.

Adicionar o ácido aos poucos na H₂O.

3.1.2.19b. 0.25 M HCl

11ml HCl conc. em 500 ml H₂O bidest.

Adicionar o ácido aos poucos na H₂O.

3.1.2.20a. 0.2 M NaOH/0.6 M NaCl

4 g NaOH

17.5 g NaCl

Completar para 500 ml com H₂O. Preparar nova sol. cada vez.

3.1.2.20b. 0.4 M NaOH

8 g NaOH

Completar para 500 ml com H₂O bidest. Preparar nova sol. cada vez.

3.1.2.21. 0.5 M Tris pH 7.6/ 1.5 M NaCl

121 g Tris-base em 1600 ml H₂O bidest. Ajustar o pH para 7.6 com HCl conc..Adicionar 175,2 g NaCl e completar para 2 l com H₂O bidest.

3.1.2.22. Tampão de Transferência

7.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

7.1 g Na_2HPO_4

Completar para 2 l com H_2O bidest.

3.1.2.23. Formamida Deionizada

Adicionar 50 g de resina de troca de ions (BDH Amberlite MB-1, código 55007) em 1 l de formamida e agitar por 30 min/temp. ambiente. Filtrar 3 vezes em papel de filtro e alíquotar a -20°C .

3.1.2.24. Solução Denharts(1) Preparar 100ml de BSA 2%

Adicionar 2 g BSA a 80 ml H_2O bidest.

Ajustar o pH para 3.0 com 2N HCl (2N HCl prepara-se com 17.5 ml HCl conc., completando-se para 100ml com H_2O bidest).

Colocar em água fervendo por 15 min.

Colocar no gelo por 10 min. Ajustar para pH 7.5 com 2N NaOH no gelo. Completar com H_2O para 100ml e verificar se o pH é 7.5.

(2) Preparar 100 ml de 2% w/v polivinilpirrolidona (PVP)/2% w/v Ficoll 400

Autoclavar por 30 min a 100°C . Esfriar para temp. ambiente.

(3) Misturar os 100 ml BSA e os 100 ml PVP/Ficoll resfriado

Guardar em alíquotas a -20°C . Deixar descongelar na temperatura ambiente no momento de usar. Não descongelar com água quente.

3.1.2.25. 30 x SSPE

Adicione num Becker:

316 g NaCl

46.8 g NaH₂PO₄.2H₂O

11.2 g Na₂EDTA

Completar para 800 ml com H₂O bidest.. Aquecer com agitação para dissolver e alcançar o pH de 8.0 com 10N NaOH. Completar para 1 l com H₂O bidest.. Um precipitado será formado. Utilizar o sobrenadante.

3.1.2.26. Sulfato de Dextran a 50%

Adicionar 100 g de sulfato de dextran num Becker e completar com H₂O bidest. para 200 ml. Agitar com espátula até estar completamente dissolvido. Guardar em alíquotas de 20 ml a -20°C.

3.1.2.27. DNA de Esperma de Salmão

Adicionar 1 g de esperma de salmão a 100 ml de H₂O bidest. e deixar num aro de rotação até dissolver completamente. Transferir alíquotas de 20 ml para frascos de vidro e sonicar no alto da corrente por 2 a 3 min. Colocar os frascos em água fervendo por 10 min. Resfriar no gelo por 5 min. e guardar a -20°C.

3.1.2.28. Tampão OLB (Feinberg, 1984)(1) Solução Estoque O

1.25 M Tris-HCl pH 8.0/0.125 M MgCl₂

Guardar a 4°C

(2) Solução estoque A

1 ml solução O

18 ul 2-mercaptoetanol REAGENTE PERIGOSO! USAR CAPELA.

5 ul dATP, 0.1 M * (PM= 589.2 dissolver 10 mg em 169 ul)

5 ul dGTP, 0.1 M * (PM= 551.2 dissolver 10 mg em 181 ul)

5 ul dTTP, 0.1 M * (PM= 570.2 dissolver 10 mg em 175 ul)

* Cada dNTP é dissolvido em 3 mM Tris-HCl pH 7.0/0.2 mM Na₂EDTA.

Guardar a -20°C.

(3) Solução Estoque B

2 M HEPES (pH 6.0 com 4N NaOH)

Guardar a 4°C.

(4) Solução Estoque C.

Hexadeoxyribonucleotides (Pharmacia cod. 27-2166-01). O conteúdo tem 50 U. Dissolver em 550 ul do tampão TE (reag.12). Guardar a -20°C.

(5) Solução de Trabalho

0.1 ml sol. A

0.25 ml sol. B

0.15 ml sol. C

Misturar e guardar a -20°C.

3.1.2.29. Soro Albumina Bovina (BSA)

10 mg/ml BSA em H₂O bidest.

Usar BSA sem DNA-ase se possível. Guardar a 4°C e trocar com frequência.

3.1.2.30. Solução para Interromper a Hibridização

40 ul 5 M NaCl

0.2 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5

40 ul 0.5 M Na₂EDTA pH 8.0 (reagente 10b)

0.25 ml 10% w/v SDS

Completar para 10 ml com água bidest.. Guardar a 4°C e aquecer a 37°C antes do uso para redissolver o SDS.

3.1.2.31. 20 x SSPE

174 g NaCl

31.2 g NaH₂PO₄·2H₂O

7.4 g Na₂EDTA

Completar para 800 ml com H₂O bidest.. Aquecer para dissolver, pH 7.4 com 10N NaOH, completar para 1 l com H₂O.

3.1.2.32. Diluição do DNA

Usar diluído em TE (10/0.1, pH7.5)

P.ex: a conc. do DNA é 25 ng/ul (=ug/ml). Caso necessitar 40 ul com a conc. de 5 ng/ul, conc. / 5 = x, 40 / x = y (vol. DNA), 40 - y = vol. TE. Logo: 8 ul de DNA + 32 ul TE.

3.1.2.33. Tween 20 a 2 %

20 ul em 1 ml de H₂O

3.1.2.34 Tampão Tris pH 8.4 0.2M (1ml)

Observar valores na tabela de tampão Tris.

Usar soluções a 2M. Dividir por 2 para ter a 1M. Dividir por 1000 porque a tabela é para 1 l e queremos 1 ml. Dividir por 5, porque estamos em 1M e deseja-se 0.2M.

Tris base 2M: $649/10.000 = 0.0649 \text{ ml} = 64.9 \text{ ul}$

Tris HCl 2M: $351/10.000 = 0.0351 \text{ ml} = 35.1 \text{ ul}$

H₂O bidest.= 900 ul

3.1.2.35. Solução para "Dot-Blot"

DNA em 100 ul de TE (10/0.1) p. ex. 10 ul+ 90 ul TE. Adicionar 6 ul de 0.5 M EDTA (con. final de 0.026 M) + 8 ul de 6M NaOH (conc. final de 0.42M).

250 x 12 ul 0.5 M EDTA = 3 ml

250 x 16 ul 6.0 M NaOH = 4 ml

250 x 180 ul TE (10/0.1)= 45 ml

Obs. Sol. DNA para 2 amostras de DNA /membrana (dose dupla).

3.1.2.36. 20 x SSC

Dissolver 174 g de NaCl, 27.6 g de citrato de sódio (ac. cítrico = trisodium dihydrate) em 800 ml de H₂O bidest. Ajustar o pH para

7.4 com NaOH (≈ 6.5 ml de sol. 10N). Ajustar vol para 1 l, autoclavar e dispensar em alíquotas.

3.1.2.37. 10 x Tampão Kinase (Mg-Tris)

0.5 M Tris HCl, 0.1 M MgCl₂, 50 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM spermidine, 1 mM EDTA.

3.1.2.38. TE 10/1 pH 8.0

250 ul 2 M Tris pH 8.0

100 ul 0.5 M EDTA pH 8.0

Completar para 50 ml

3.1.2.39. TE 0.2M NaCl

$50 \div 250 \text{ ml} = 0.25 = 250 \text{ ul} \dots\dots 2\text{M Tris pH } 8.0 \text{ } 25^{\circ}\text{C}$

$50 \div 500 \text{ ml} = 0.1 = 100 \text{ ul} \dots\dots 0.5 \text{ M EDTA pH } 8.0$

2 ml.....5 M NaCl

Completar até..... 50 ml.....H₂O bidest.

3.1.2.40. TE 0.5M NaCl

250 ul..... 2 M Tris pH 8.0

100 ul..... 0.5 M EDTA pH 8.0

5 ml..... 5 M NaCl

Completar para 50 ml com H₂O bidest.

3.1.2.41. Tampão "Stripper"

<u>1 litro</u>	<u>2 litros</u>	<u>1 l (5xconc.)</u>
10 g NaOH	20 g NaOH	50 g NaOH
100ml 5 M NaCl	200 ml 5 M NaCl	146.1 g NaCl
4 ml 0.5 M EDTA	8 ml 0.5 M EDTA	20 ml 0.5 M EDTA
Completar 1 l	Completar 2 l	Completar 1 l

3.1.2.42. Tampão Neutralizante 1M Tris pH8/ 1.5M NaCl

A) 2M Tris pH 8.0 (224 ml 2M Tris-base + 276 ml 2M Tris-HCl)

B) 3M NaCl (400 ml 5M NaCl + 264 ml H₂O bidest.)

Misturar 500 ml de A com 500 ml de B.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. SOROLOGIA HLA

3.2.1.1. PREPARAÇÃO DOS LINFÓCITOS.

3.2.1.1.1. Isolamento dos Linfócitos Totais do Sangue Periférico

Método Comum

1. Coletar 20-40 ml de sangue com heparina sem conservante (Liquemine, Roche), solução de citrato TSC (reagente 1) ou alternativamente usar sangue desfibrinado, adicionando 4 pérolas de vidro por cada 20 ml e agitar por 10 minutos.

2. Diluir o sangue 1:2 em salina normal ou Hank's e colocar 7 ml. em diversos tubos de 10 ml.

3. Colocar pipetas Pasteur com ponta longa em cada tubo e adicionar Ficoll-Hypaque, de maneira que esta solução levante a coluna de sangue presente nos tubos. Alternativamente, pode-se

colocar 2.5 ml de Ficoll-Hypaque em cada tubo e, delicadamente adicionar o sangue até completar os 10 ml. A densidade do Ficoll-Hypaque deverá ser de 1077 g/ml e testada a cada nova preparação com densímetro.

4. Centrifugar por 20 min/2000 rpm a 18 °C.

5. Transferir todas as células da interfase para um ou mais tubos plásticos de 10 ml. A importância do plástico está em que os linfócitos B aderem vigorosamente ao vidro e se quisermos tipar DR é necessário usar o primeiro.

6. Lavar as células em Hank's por duas vezes durante 8 min. a 1300 rpm.

7. Desprezar o sobrenadante e ajustar as células com MacCoy ou Hanks e acertar a concentração para $2-3 \times 10^6$ /ml para tipagem com linfócitos totais, alternativamente acertar para $2-6 \times 10^6$ /ml em caso de separação de T e B.

8. Quando contar o nº de células observar se existe contaminação com plaquetas. Caso positivo, lavar mais 2 vezes por 5 min a 1300 rpm.

Método para obter suspensões puras.

1. Colocar num Erlenmeyer 10 ou mais ml de sangue e adicionar uma pitada de pó de ferro para retirar monócitos. Agitar e encubar por 10 min a 37 °C.

2. O sangue é transferido para um tubo de 15x170 mm e misturado com 2.5 ml de Dextran a 5% em PBS (PM >180.000). O tubo é encubado a 37 °C durante 60 min, com uma inclinação de 45°.

3. 5 ml do sobrenadante é adicionado em 2.5 ml de Ficoll-Hypaque e centrifugado por 25 min 700 g. Coletar a interfase e lavar em Hanks, PBS ou McCoy por 10 min/700g. (retirar plaquetas)

4. A suspensão das células em HANK'S ou RPMI é feita para conter 3×10^6 /ml.

3.2.1.1.2. Separação de Linfócitos T e B por Rosetas.

1. Adicionar em tubo de 50 ml com fundo redondo, volumes iguais da suspensão de linfócitos e eritrócitos de carneiro, tratados com neuraminidase (reagente 2). Adicionar 0.1 ml da solução de polibrene (diluir 1:30 da sol. estoque com PBS, ou seja, 100ul+3ml de PBS) (reagente 3).

2. Misturar e centrifugar 5 min/800 rpm a 4°C. Manter de 0°C a 4°C por 15 min para as rosetas serem formadas.

3. Ressuspender as células por intermédio de movimentos rotatórios muito delicados, podendo-se adicionar a espuma do meio de McCoy para ajudar a retirar o sedimento. Este é um dos pontos mais importantes deste método, pois as rosetas podem romper-se com a agitação, trazendo contaminação de linfócitos T no final.

4. Colocar esta solução em gradiente de Ficoll-Hypaque para separar os linfócitos T e B, durante 15 min/1500 rpm e 18 °C. A temperatura de uso do gradiente deve ser ao redor da temperatura de preparo do mesmo, pois, caso contrário, a densidade fica alterada.

5. Na interfase encontram-se os linfócitos B e no sedimento os T. Transferir os B para um tubo plástico de 5 ml e completar com meio de cultura. O mesmo será feito com o sedimento que contém os linfócitos T. Centrifugar e desprezar o sobrenadante, para então adicionar 2 ml de tampão de lise Gideon Goldstein em ambos os tubos (reagente 4). Deixar à temperatura ambiente por 3 min, no máximo. Completar com meio McCoy e centrifugar por 5 min/2000 rpm.

5. Lavar outra vez as células e ajustar os T para 3×10^6 /ml. Os B deverão passar pela fase de retirada dos monócitos e neutrófilos.

Remoção dos Monócitos da Suspensão de Linfócitos B.

1. Ressuspender as células B em 1-3 ml de McCoy e pipetar em uma placa de Petry (plástico) com 6 cm de diâmetro e encubar por 30 min a 37 °C.

2. Transferir as células não aderentes para um tubo plástico de 5 ml. As células não aderentes são removidas da superfície da placa por intermédio de jatos de meio de cultura, utilizando-se uma pipeta Pasteur. Verificar no microscópio a relação de células aderentes para linfócitos. As primeiras são típicas por serem mais escuras e maiores. Retirar os linfócitos ao máximo.

3. Centrifugar as células B por 5 min/1500 rpm, ressuspender e ajustar para 2 a 3×10^6 /ml.

3.2.1.1.3. Separação de Linfócitos de Linfonodos.

Os linfonodos devem ser dissecados da gordura e cortados, dentro de uma placa de Petry, contendo Hanks ou outro meio. Utilizar uma seringa para injetar meio de cultura nos linfonodos e assim liberar os linfócitos junto com eritrócitos.

Repetir o processo até utilizar 10 ml de meio. Lavar 2x em PBS e encubar a suspensão por, no mínimo, 15 min/37 °C, pois assim as células expressam melhor os antígenos.

3.2.1.2. TESTES DE LINFOCITOTOXICIDADE.

Método Usual (Terasaki, 1964).

1. A técnica é realizada em placas de Terasaki, contendo óleo mineral (Nujol). É importante que o óleo seja suficiente para encher os orifícios e não mais do que isto.

2. Os anticorpos anti-HLA, os soros para prova cruzada ou os soros de múltiplos (de acordo com a utilização do método) são colocados nos orifícios que contêm óleo (1 ul em cada lugar). Estas placas podem ser congeladas a - 20 °C até o momento do teste, que inicia com o passo a seguir.

3. Adicionar 1 ul da suspensão de linfócitos (3000/ ul células) nas placas de Terasaki e encubar a 22 °C por 30 min. As células devem ser dispensadas com a técnica do "não me toque", evitando carregar amostras de um orifício para outro.

4. Adicionar 5 ul de complemento de coelho e encubar por 60 min. a 22 °C (tipagem de antígenos de classe I) ou encubar com 5 ul de complemento de coelho com 5% de soro humano AB, durante 120 min a 22 °C (tipagem classe II).

5. Adicionar 3 ul de eosina Y filtrada (reagente 5) e após 2 min adicionar 3 ul de formalina (reagente 6). Caso as placas necessitem ser lidas imediatamente, será importante o uso do método da "gota suave", ou seja, aspirar primeiro um pouco de ar na microseringa Hamilton, ou similar, e após a eosina ou formalina. Isto fará com que a gota não seja impulsionada (jato) no orifício (quando acionada a microseringa), mas simplesmente

apareça na ponta da agulha que será então tocada na superfície do líquido existente nos orifícios. A mistura acontecerá automaticamente, mas as células depositadas no fundo dos orifícios não serão ressuspensas.

6. Não colocar a lamínula imediatamente, mas somente no momento da leitura. Isto evitará o aparecimento de bolhas, quando a leitura acontecer mais tarde. Utilizar um microscópio invertido com contraste de fase, equipado com objetivas 10X, 12.5X ou 16X e com oculares 10X.

Leitura dos Resultados.

As reações são avaliadas pela contagem (percentual) de linfócitos mortos, comparados com a percentagem de células mortas observadas no controle negativo. Este último é representado por células do mesmo indivíduo, encubadas com soro de uma pessoa normal do grupo sanguíneo AB e complemento de coelho. Caso a percentagem de células mortas seja igual ou até 10% acima do controle, o resultado é negativo. Caso o resultado seja acima de 10 % o seguinte escore é utilizado:

<u>% de células mortas (acima do controle)</u>	<u>Reação</u>
10-20	Negativa duvidosa
20-40	Positiva duvidosa
40-80	Positiva
80-100	Positiva forte

A melhor distinção entre positivo e negativo é conseguida com a eosina Y, pois penetra nas células positivas que ficam de

cor escura e aumentadas de tamanho. As negativas ficam pequenas e brilhantes pela ação do contraste de fase.

Observações:

A sensibilidade da reação depende de vários parâmetros, mas principalmente do tempo de incubação, da temperatura e do complemento.

A incubação prolongada permite que anticorpos com baixa afinidade fixem-se nas células, assim como a ação do complemento pode ser mais enérgica. Normalmente utiliza-se 60 min para HLA-ABC e 120 min para HLA-DR, DQ.

A temperatura acima de 25 °C faz com que o complemento seja ativado pela via alternada, enquanto que incubações abaixo de 20 °C possibilitam que auto-anticorpos (anticorpos a frio) positivem o teste.

Método da Fluorescência com Dynabeds (Manchester)

Este método pode ser usado para células frescas ou células guardadas com meio de Terasaki-Park (Gibco) ou RPMI (Gibco).

1. Isolar linfócitos (Ficoll-Hypaque) e ressuspender num máximo de 10×10^6 células por 2 ml.

2. Remover o mínimo de células para a tipagem de classe I.

3. Adicionar as demais células num tubo de criopreservação com fundo redondo Nunk (cat. nº 3-63452A, 5 ml). Adicione 30 µl de Dynabeads HLA class II (ressuspender antes de usar). Misturar

gentilmente. (As dyneabeads podem ser guardadas em alíquotas de 30 ul à -20 °C.)

4. Colocar o tubo em gelo moído por no máximo 5 min. Misturar por rotação ocasional.

5. Colocar o tubo no magneto "concentrador de partículas" por 3 min.

6. Remover o sobrenadante usando pipeta plástica, enquanto o tubo está em contato com o magneto. As células do sobrenadante podem ser congeladas (depletadas de B).

7. Remover o tubo do magneto e ressuspender as células B (rosetas) em 2 ml de PBS. Misturar gentilmente.

8. Usar o magneto por 45 segundos para concentrar as células B.

9. Pipetar o sobrenadante antes de remover o magneto.

10. Ressuspender as células B (rosetas) em 70 ul de PBS para tipagem de uma placa de 60 orifícios.

11. Encubar por 30 min a 22 °C com os antisoros. Adicionar complemento e encubar por 30 min a 22°C, antes de corar com 1 ul de solução corante, brometo de etídio/acridine orange (reagente 7).

12. O teste pode ser lido imediatamente. A melhor leitura será até 2 horas da coloração.

As células positivas devem ficar escuras e as células negativas fluorescem.

Método de fluorescência com Dyneabeads (Glasgow)

Este método permite tipar HLA de classe I, usando células T e HLA classe II, usando células B tratadas com Dynabeads. Além disso é possível separar e tipar células congeladas em N líquido.

1. Separar linfócitos com Ficoll-Hypaque, lavar com meio RPMI e ressuspender em 1 ml (PBS + 0.2% Na₂ EDTA + 1% FCS). A concentração celular não deve ser maior do que 10×10^6 .

2. Colocar este 1 ml em um tubo cônico e adicionar 20 ul de Dynabeads. Misturar muito gentilmente e encubar por 5 min à temperatura ambiente.

3. Encher o tubo até a metade com PBS+0.2% Na₂ EDTA e colocar no magneto por 2 min.

4. Remover o sobrenadante (linfócitos), enquanto o tubo permanece no magneto (o sobrenadante pode ser usado para tipagem de classe I).

5. Ressuspender os linfócitos B (rosetas) em PBS+0.2% Na₂ EDTA, enchendo o tubo até a metade. Colocar no magneto por 2 min.

6. Repetir 4 e 5, entretanto usar PBS sem aditivos.

7. Remover o sobrenadante e ressuspender as células B em 130 ul de meio RPMI.

8. Testar a viabilidade e concentração (5 ul FCS + 1 ul de células + 1 ul da solução "cocktail" (reagente 8)).

9. Ajustar a concentração e adicionar as células nas placas, com os antisoros.

10. Encubar por 30 min a 22 °C e então adicionar 5 ul de complemento de coelho e encubar mais 30 min.

11. Adicionar 3 ul do cocktail e deixar a placa na geladeira a 4 °C por 15 min , antes da leitura.

12. Os resultados são observados no microscópio invertido, fluorescente. As células positivas serão vistas em vermelho escuro e as células negativas fluorescentes.

3.2.1.3. IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA.

A prova cruzada para identificação de anticorpos anti-HLA no soro de pacientes da lista de espera para transplante foi realizada contra um painel de linfócitos de 50 indivíduos tipados para os antígenos de classe I. Essas células são provenientes da rotina do laboratório, tendo seu HLA conhecido e o método é o de linfocitotoxicidade. Os resultados são expressos em % de positividade e as especificidades são referidas quando identificadas, devendo a amostra do soro ser congelada para posterior prova cruzada com provável doador cadáver. A pesquisa de anticorpos contra painel foi realizada a cada 4 meses. A prova cruzada contra as células de doador cadáver foi sempre realizada com os soros testados contra painel e com as amostras coletadas por motivo dos pacientes terem recebido transfusões.

A pesquisa de anticorpos em soro de placentas foi realizada contra um painel de linfócitos semelhante ao anterior. Os soros positivos são posteriormente testados contra um novo painel de linfócitos totais, assim com painel (congelado) de linfócitos B,

proveniente de pacientes com leucemia linfática crônica (LLC). Antes de testar os soros positivos foi realizada a absorção dos anticorpos de classe I com plaquetas (100 doadores).

Os resultados foram analisados manualmente e posteriormente com o auxílio de um computador VIG II-AT e de programas específicos.

3.2.1.4. MÉTODOS AUXILIARES EM SOROLOGIA HLA.

3.2.1.4.1. Complemento de Coelho.

O complemento de coelho utilizado para a maior parte do trabalho foi coletado durante o abate para consumo da carne e aproveitamento da pele. O sangue de não menos de 100 animais/vez foi coletado em frascos de 700 ml, esterilizados e sem anticoagulante. As amostras foram deixadas por 15 min na temperatura ambiente e após colocadas em um isopor com gelo (4°C). Os frascos foram centrifugados após 3 horas da coleta e o sobrenadante novamente centrifugado, sempre na temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram misturados e congelados a menos 80°C em bolsas de sangue. Para uso, cada bolsa foi posteriormente descongelada e o soro dividido em alíquotas e congelados a -80°C.

O teste do complemento foi realizado, pois estes animais podem ter anticorpos naturais contra os eritrócitos e linfócitos humanos (IgM).

1. Indivíduos heterozigotos para o sistema HLA foram identificados como doadores de células para o teste.

2. Anticorpos específicos para os antígenos do doador foram identificados. Na maioria das vezes utilizou-se um monoclonal anti-HLA-A3, preparando-se diluições de puro até 1:16, em McCoy com 20% de FCS ou equivalente.

3. Diluições do complemento foram realizadas com o mesmo meio e mantidas geladas até o uso.

4. Placas de Terasaki foram preparadas com 1 ul do antisoro por orifício de acordo com o protocolo da Tabela 1.3.

5. Em cada orifício, colocou-se 1 ul de células com o antígeno correspondente e encubou-se por 30 min/20°C.

6. Adicionou-se 5 ul das diluições do complemento e encubou-se por 60 min/20°C

7. A coloração foi realizada com eosina e a fixação com formalina. A viabilidade e o escore foram observados.

8. O complemento será utilizado numa diluição abaixo do melhor resultado, onde houver reação 8+ com a maior diluição do anticorpo e do complemento. Dificilmente consegue-se usar o complemento acima de 1:2 para tipagens de classe I.

Tab. 1.3. Protocolo para titulação do complemento

Diluições do Anticorpo

1:1									
1:2									
1:4									
1:8									
1:16									
MEIO									
1:1	2:3	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14	1:16

Diluições do Complemento

3.2.1.4.2. Absorção com Plaquetas

1. Centrifugar 500 ml de sangue citratado por 15 min a 700g, utilizando-se bolsa plástica. Transferir o sobrenadante rico em plaquetas para outra bolsa. As plaquetas ficam logo acima da camada de leucócitos ("buffy coat").

2. Centrifugar por 30 min/2000 rpm. Ressuspender o sedimento em 8 ml de plasma e adicionar 10% de citrato.

3. Centrifugar novamente num tubo de vidro por 15 min/800 rpm (70 g).

4. Remover o sobrenadante rico em plaquetas para outro tubo e encher com PBS + 10% ACD. Centrifugar novamente na mesma velocidade.

5. Repetir este procedimento outras 3 vezes para remover os eritrócitos e linfócitos.

6. Finalmente as plaquetas são sedimentadas e lavadas 3 vezes em PBS contendo 0.1% de Azida Sódica.

7. Guardar a suspensão de plaquetas em PBS+0.1% de azida até 1 ano à 4°C. Lavar as plaquetas antes do uso 5 x em PBS+0.1% azida.

Procedimento para absorção:

As plaquetas apresentam antígenos HLA-A,B e C, mas não possuem DR, podendo ser utilizadas para absorção dos anticorpos anti-classe I em soros que devem ser testados para DR. Um número elevado de doadores de plaquetas deve ser utilizado para que a maioria das especificidades HLA estejam presentes, mas devendo-se lembrar que os antígenos HLA-B8 e B12 não são bem expressos em plaquetas, podendo ser de difícil absorção.

O seguinte procedimento pode ser usado para soros com título de anti-HLA-A,B e C até 1:8:

1. Lavar as plaquetas 5 x em PBS + 0.1% Na-azida.

2. Centrifugar as plaquetas num tubo Ependorf por 5 min/17000 g (4°C). Preparar um sedimento sem PBS, para evitar a diluição do soro. Remover o excesso de líquido com papel de filtro.

3. Misturar 1 volume de soro com 1 volume de plaquetas, utilizando-se uma pipeta Pasteur. Encubar...

4. A absorção poderá ser repetida caso necessário. Antes de testar o soro, centrifugar 5 min/4000g/4°C.

3.2.1.4.3. Congelamento e Descongelamento de Linfócitos.

Solução para congelamento

Preparar individualmente para cada célula a ser congelada uma mistura contendo 10% DMSO (Sigma nº d-5879) e 90% soro autólogo inativado pelo calor (ou soro AB).

Notas:

1. As células devem ser frescas, evitando-se guardá-las no refrigerador para usá-las no outro dia. Caso seja muito necessário, não separe as células, guarde o sangue total na geladeira até o outro dia.

2. Identificar os tubos antes de iniciar o procedimento (nome e data). Retirar a tampa dos tubos Beckman de 400 ul, pois elas costumam explodir no descongelamento.

3. Todo trabalho deve ser conduzido no gelo.

Procedimento de Congelamento

1. Preparar os linfócitos de acordo com o método convencional, centrifugar e ressuspender o sedimento na solução de congelamento (gelada). Usar uma concentração de $5-15 \times 10^6$ /ml.

2. Dispensar 350 ul em tubos Beckman e 1 a 1.5 ml em tubos Nunc com rosca.

3. Colocar os tubos numa caixa de isopor com algodão no interior e esta irá para o freezer a -80°C . No próximo dia os tubos estão prontos para irem rapidamente para o N líquido.

Procedimento para Descongelamento.

É importante que as células sejam descongeladas rapidamente e transferidas de imediato para um volume adequado de meio de cultura gelado.

1. Retirar os tubos do N líquido e colocá-los num Becker contendo N líquido. Descongelar as amostras individualmente por aquecimento na palma da mão.

2. Transferir as células para um tubo rotulado com 2ml de McCoy e coloque sobre 1 ml de solução de Ficoll-Hipaque. Centrifugar por 12 min/2000 rpm.

3. Transferir as células da interfase para outro tubo, completar com meio e centrifugar por 5 min a 2000 rpm. Remover o sobrenadante e acertar o número de células para a concentração desejada. Verificar a viabilidade.

3.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.

Método de Miller (salting-out), (Miller, 1988)

1. Centrifugar 10 ml de sangue com EDTA. Coletar o creme leucocitário (buffy coat) em tubo de 50 ml de volume e adicionar 40 ml do tampão de lise de eritrócitos (reagente 9) e deixar por 20 min/temperatura ambiente.

2. Centrifugar por 10 min/3000 rpm, retirar o sobrenadante e repetir a lavagem com tampão de lise após ressuspender o sedimento. O sedimento deverá ficar sem eritrócitos.

3. Resuspender o sedimento que agora contém somente leucócitos em 3 ml da solução de lise nuclear (Reagente 10a). Adicione 600 ul de sol. de Protease K (Reagente 11) e 200 ul de 10 % (w/v) SDS (sodium dodecylsulfato). Misturar bem. Neste ponto a solução pode ser guardada a -20°C.

4. Agitar por 18 horas a 42°C.

5. Adicionar 1 ml de NaCl 6 M a cada 4 ml da solução, agitar e deixar por 20 min/40°C para completar a precipitação das proteínas.

6. Centrifugar por 25 min/800g (3000 rpm). Transferir o sobrenadante que contém o DNA para um tubo de 50 ml e adicionar volume igual de isopropanol para precipitar o DNA. Desprezar o sedimento que contém as proteínas.

7. Remover o DNA que precipitará com cautela, talvez com a ajuda de uma Pasteur com ponta selada pelo calor, e colocar em tubo Ependorf. Lavar 3 x com etanol a 70 %, usando a microcentrífuga.

8. Secar o DNA e redissolver após em 0.5-1 ml de tampão TE (reagente 12).

9. Guardar o DNA no refrigerador por 18 horas para que entre em solução. Algumas vezes é necessário diluir mais com TE para que entre em solução.

3.2.3. TIPAGEM HLA POR RFLP

O método de RFLP utilizado para tipagem de HLA-DR e DQ difere em alguns pontos do empregado no XX Workshop Internacional de Histocompatibilidade, tendo sido apresentado na IV Conferência Européia de Histocompatibilidade (Bidwell, 1990). A análise está baseada no uso de TaqI, Hind III e MspI como enzimas de restrição para cortar as moléculas de DNA a serem posteriormente hibridizadas com sondas curtas de cDNA para DRB1, DQB1, DQA1 (Fig. 8.1.).

3.2.3.1. DIGESTÃO DO DNA COM ENDONUCLEASES.

Concentração de DNA:

Preparar uma diluição do DNA 1:50 (15 ul DNA + 750 ul TE). Medir a densidade óptica no espectrofotômetro em 260 (DNA) e 280 (proteína). A relação DNA/proteína é 2:1.

Na faixa de 260 uma DO de 1 = 40 ug/ml, então:

$DO_{260} \times 40 \times 50 \times \text{vol. DNA em ml} = \text{ug (DNA total)}$.

Dividir DNA pelo volume em ul da amostra = ug/ul

Correr um gel de agarose para observar a quantidade e qualidade do DNA, para tanto, acertar uma diluição do DNA para 50 ng/ul e então usar 10 ul em cada lugar do gel. O controle será 500 ng de DNA Lambda. Para calcular a diluição que deve ser feita:

$\text{ug/ul} \times 1000 = \text{ng/ul}$

$\text{ng/ul} \div 50 = \text{fator de diluição (FD)}$

$FD \times 10 \text{ (vol)} - 10 = \text{volume de azul de bromofenol (reag 13)}$

Vol. de DNA = 10 ul

Por exemplo: concentração do DNA lambda = 500ug/867ul

$500/867 = 0.576 \text{ ug/ul} \times 1000 = 576 \text{ ng/ul}$

$576\text{ng/ul} \div 50 = 11.52 \text{ ng/ul}$

$11.52 \text{ ng/ul} \times 10 \text{ (vol.)} - 10 = 105 \text{ ul de azul de bromofenol}$

Volume de DNA = 10 ul Concentração final = 50 ng/ul

É importante o DNA estar em solução, talvez seja necessário aquecê-lo a 50°C por 10 min. para então correr o gel.

Minigel:

Preparar 30 ml de agarose 0.8% em 1x TBE (reagente 14) (0.24 g em 30 ml TBE), aquecendo em microonda ou no fogo do Bunsen. Deixar esfriar até 60 °C, quando será incorporado 4.5 ul de brometo de etídio (10 mg/ml). Este último reagente é carcinogênico, devendo-se ter todo o cuidado (reagente 15).

O gel é derramado na cuba que estará preparada com o pente, deixando-se solidificar a 4°C ou na temperatura ambiente. Será aplicado uma corrente de 70 V por 1 hora. Alguns incorporam o brometo de etídio também no tampão TBE na concentração de 0.5 ug/ml. O nível do TBE deverá ser 2 a 3 mm acima do nível do gel.

Protocolo de digestão:

1. A reação acontece em tubos de centrifugação de 0.75 ml.:
 - ◆ 8.25 ug de solução de DNA
 - ◆ 0.1 volume de tampão de restrição 10X (veja fornecedor)
 - ◆ 42 U de enzima de restrição, adicionada em duas ocasiões de 21 U com 90 min de intervalo.

♣ Água bidestilada para 20 ul de volume final.

2. Encubar em banho maria por 3 horas na temperatura ideal para cada enzima. TaqI = 65°C, MspI = 37°C, HindIII = 37°C. No tubo com TaqI é interessante adicionar 2 gotas de óleo mineral para evitar a evaporação.

3. Observar se a reação alcançou seu final, após 3 horas. Retirar 2 ul da solução e adicionar 4 ul da solução Ômega (reagente 16) e correr um minigel (70V/1hora). O DNA digerido adequadamente produz uma mancha uniforme. Durante a eletroforese o tubo de digestão deverá estar no banho maria. No caso do minigel ser satisfatório, adicionar 3.6 ul da solução que interrompe a reação (reagente 17). No caso da TaqI, retirar o DNA digerido do fundo do tubo, evitando o óleo, para então adicionar os 3.6 ul da solução.

4. Realizar a eletroforese das amostras em gel de 20x 25 cm.

3.2.3.2. ELETROFORESE EM AGAROSE (GEL DE 20 X 25 CM.)

Preparar agarose a 0.7% (Sigma tipo V) (2.1 g de agarose + 300ml TAE + 15 ul de brometo de etídio). Caso desejar-se dividir a membrana usar um pente de 40 lugares (2 x 20)

Correr a eletroforese a 55-60 V, por 16-20 horas em tampão TAE (reagente 18), contendo 0.5 ug/ml de brometo de etídio. Usar o fago Lambda, digerido com HindIII, como marcador do peso molecular. Terminar a corrida quando o marcador de 2 KB percorreu 16 cm.

3.2.3.3. DESNATURAÇÃO DO DNA E TRANSFERÊNCIA (SOUTHERNBLOT)

Método : Pré-desnaturação, Hybond N (RPN 203 N)

Desnaturação:

1. Remover o gel do tanque, visualizar os marcadores de peso molecular no transiluminador de ultra-violeta (302 nm) e anotar as distâncias percorridas. Não expor demasiadamente o gel com DNA genômico à ultravioleta.

2. Colocar o gel em prato com 500 ml de 0.15 M HCl (reagente 19a). Agitar gentilmente por 10 min. numa plataforma rotatória.

3. Lavar por 30 seg. em água bidestilada.

4. Imergir o gel em prato com 500 ml de 0.2 M NaOH/0.6 M NaCl (reagente 20a).

5. Lavar por 30 seg. em água bidestilada.

6. Imergir o gel em 500 ml de 0.5 M Tris-HCl pH 7.6/1.5 M NaCl (reagente 21). Agitar gentilmente por 30 min.

7. Trocar para 500 ml de tampão de transferência (reagente 22) e agitar por 5 min. Proceder a transferência Southern.

Transferência de Southern.

1. Utilizar um sistema com um tanque de plástico com anteparo de vidro central (ou câmara de eletroforese invertida) onde ficará o gel, deitado numa superfície plana, antes porém

coloca-se 2 folhas de papel 3 MM, molhados no tampão de transferência. Retirar bolhas de ar rolando uma pipeta (Fig. 1.3.)

2. Colocar uma folha de papel 3 MM (molhado no tampão de transferência) 2 cm maior em comprimento e largura do que o gel.

3. Colocar o gel com todo cuidado para não quebrar no centro do anteparo. Selar as bordas com parafilme.

4. Depositar em cima do gel uma folha de membrana Hybond N (Amersham), 1 cm maior do que o gel (não é necessário molhar previamente). Retirar bolhas.

5. Depositar mais duas folhas de papel 3 MM molhadas e 2 cm maiores do que o gel. Retirar bolhas.

6. Colocar 10 cm de papel adsorvente em cima deste sistema de transferência.

7. Colocar um prato invertido e um peso de 2 KG por último.

8. Encher o recipiente (tanque plástico) com 1 litro de tampão de transferência e deixar por 18 horas.

9. Após a transferência, deitar o "sandwich" (membrana-gel) com a membrana na parte de baixo, numa folha de papel Whatman 3 MM. Marcar a posição dos orifícios do gel com uma caneta e então desprezar o gel.

10. Lavar rapidamente a membrana em 500 ml de tampão de transferência por 10 min e secar ao ar.

11. Irradiar a membrana com o transiluminador de ultravioleta por 3-5 min (face do DNA para baixo). A dose ótima talvez tenha que ser testada para cada transiluminador, veja as instruções incluídas com as membranas Hybond N.

12. Guardar a membrana em superfície plana a 4 °C em envelope de politeno selado pelo calor, contendo 60 ml de tampão TE (reagente 12). Verifique que exista pelo menos 2 cm de espaço em um dos lados, tornando possível cortar e fechar o envelope numa segunda etapa.

3.2.3.4. PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO.

1. Para cada membrana de 20 x 25 cm, preparar a seguinte solução:

- ◆ 25 ml de formamida deionizada (reagente 23)
- ◆ 5 ml de solução de Denharts (reagente 24)
- ◆ 8.3 ml 30X SSPE (reagente 25)
- ◆ 5 ml de 10% w/v SDS
- ◆ 5 ml de 50% w/v sulfato de dextran (reagente 26)

2. Remover 20 ml e colocar num frasco esterilizado, para ser usado na hibridização. Aos restantes 28.3 ml, adicionar 1.2 ml de DNA de salmão sonificado e fervido (reagente 27)

3. Esvaziar o envelope que contém a membrana em TE, substituindo-o por 29.5 ml de solução de pre-hibridização. Remover o ar e selar com calor. Realizar uma massagem na membrana para ter certeza de que o fluido está tendo contato com a mesma. Preparar um outro envelope para colocar o anterior. Selar com calor.

4. Encubar em banho maria a 42°C de 4-18 horas. O envelope deverá ficar plano (não pressionado) e mergulhado na água.

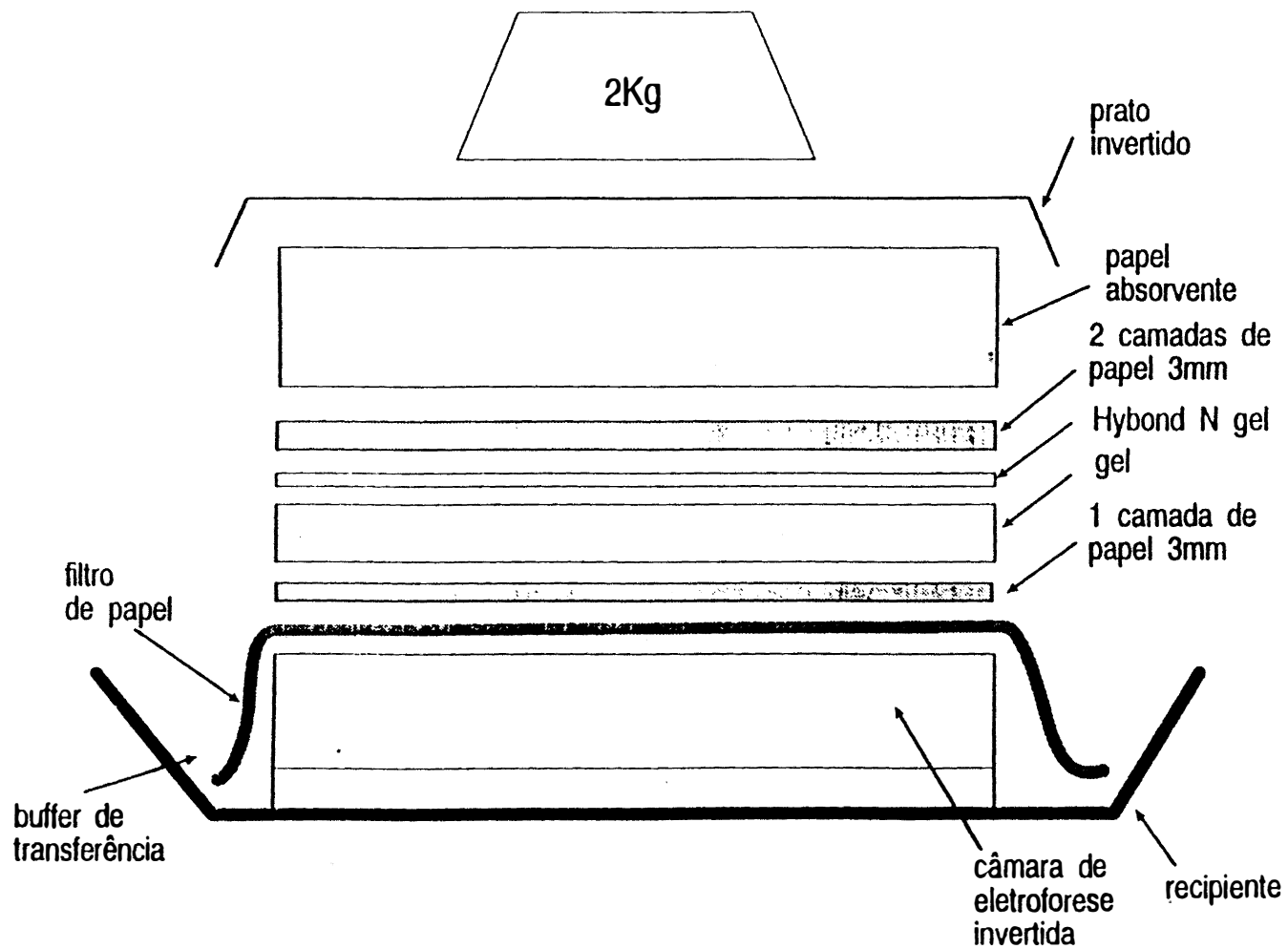


Fig. 1.3. Aparelho para southern blot

3.2.3.5. MARCAÇÃO DA SONDA E HIBRIDIZAÇÃO.

Os probes de DNA devem ser guardados em alíquotas de 40 ul a -20°C em tubos de microcentrifugação de 1.5 ml.

1. Descongelar uma alíquota da sonda e colocar em água fervendo por 4 min. Guardar a 37°C até o uso.

2. Num tubo de microcentrifugadora de 1.5 ml, iniciar a seguinte reação de 50 ul:

- ♣ 10 ul de tampão OLB (reagente 28)
- ♣ 2 ul de BSA (10 mg/ml) (reagente 29)
- ♣ 30 ul da sonda de DNA
- ♣ 5 ul de [α 32 P] dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham PB10205)
- ♣ 3 ul de DNA polimerase (6 unidades) - fragmento Klenow

3. Vortex e centrifugar momentaneamente na microcentrifugadora. Encubar a 37°C por 3 horas (ou durante a noite, na temperatura ambiente).

4. Adicionar 0.2 ml da solução para interromper a reação (reagente 30) e 0.5 ml DNA sonificado de esperma de salmão, fervido (reagente 27). Vortex e centrifugar momentaneamente. Fazer um furo na tampa do tubo (para sair ar) e colocá-lo em água fervendo por 10 min e então em banho de gelo por 5 min.

5. Remover a mistura para uma seringa de 10 ml com agulha grossa. Na mesma seringa aspirar 5 ml da solução de hibridização previamente preparada e 4 ml de ar. Misturar gentilmente o

conteúdo e filtrar em membrana de 0.45 µm para dentro dos 15 ml restantes de solução de hibridização. Usar o ar no interior da seringa para forçar a passagem do resíduo de líquido original pela membrana. Misturar.

6. Cortar o canto do envelope de pré-hibridização e espremer a solução. Usar uma seringa nova para adicionar a solução de hibridização (20 ml). Remover bolhas e selar. Massagear o envelope, colocá-lo em outro envelope e selar. Retornar para o banho maria a 42°C de 18-40 horas.

3.2.3.6. LAVAGEM DAS MEMBRANAS E AUTORADIOGRAFIA.

1. Remover a membrana de hibridização do envelope e colocar em caixa de politeno com tampa.

2. Lavar da seguinte maneira, usando uma plataforma rotatória (para lavagens na temperatura ambiente) e um banho maria, com agitação, para as lavagens a 65 °C:

♣ 2 x 5 min em 500 ml 2X SSPE (diluir reagente 31)-
temperatura ambiente.

♣ 2 X 15 min em 500 ml 2 X SSPE/0.5%SDS - 65°C.

♣ 1 X 15 min em 500 ml 0.2 X SSPE/0.5%SDS - 65°C.

3. Secar a membrana no ar e embrulhar em papel "clinfilm". Colocar no casete intensificador e expor ao filme de raio X (Kodak X-Omat AR5 ou equivalente) durante a noite a -80°C. Re-expor entre 3 e 6 dias de acordo com a intensidade do sinal.

3.2.3.7. RETIRADA DA SONDA (DESIBRIDIZAÇÃO).

As membranas podem ser re-ibridizadas seqüencialmente com outras sondas como DRB, DQB e DQA, após a retirada da sonda anterior.

1. Lavar as membranas em 500 ml 0.1N NaOH, 15 min na temperatura ambiente.

2. Lavar duas vezes em 500 ml 2X SSPE, 5 min à temperatura ambiente.

3. Secar no ar, colocar em envelope de políteno e guardar com tampão TE. Usar quando necessário.

3.2.3.8. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.

Os resultados dependem da experiência do técnico em interpretar os sinais de hibridização que se referem a cada alelo HLA de classe II. Para tanto é aconselhado o estudo em DNA de células homozigotas, procurando identificar primeiramente os sinais referentes a cada antígeno, assim como é de interesse interpretar os resultados de posse de tabelas que mostrem os locais das bandas para cada alelo (Tab. 9.1, 10.1, e 11.1.).

3.2.4. TIPAGEM HLA COM OLIGONUCLEOTÍDIOS SINTÉTICOS-PCR.

3.2.4.1. INTRODUÇÃO.

A identificação dos alelos HLA-DQA1 e DQB1 por hibridização com oligonucleotídeos sintéticos, após amplificação com o método de PCR, foi realizada de acordo com a literatura (Saiki, 1985; Horn, 1988; Morel, 1988; Saiki, 1986; Todd, 1987). As seqüências de 7 DQB1 e 4 DQA1 oligonucleotídeos específicos foram descritas (Morel, 1988; Todd, 1987; Todd, 1990) e encontram-se na tabela 2.3.

O protocolo para a amplificação do DNA com TAQ polimerase (Perkin Elmers-Cetus, Norwalk, CT) utilizou duas reações de PCR, com 32 ciclos cada uma e com volumes de 25 ul para a primeira e 50 ul para a segunda. DQA1 foi amplificado com os primers 26a e 27a na primeira reação e 1 ul deste produto foi amplificado novamente com os primers 26a e 27b ("nested primers") na segunda reação (seqüências dos primers na tabela 2.3.). DQB1 foi amplificado com os primers GAMPDQXB2 e GLPDQB3 na primeira reação, sendo que 1 ul deste produto foi amplificado na segunda reação com os primers GAMPDQXB2 e GLPDQB2 ("nested primer").

Essa conduta de amplificação, já descrita anteriormente (Todd, 1989), possibilita sinais mais fortes e reduz ambigüidades. Os alelos de DQA1 têm sido classificados em 4 famílias (Scharf, 1986; Todd, 1990): A1 associado com DR1, DR2 e DR6; A2 com DR7; A3 com DR4 e DR9; A4 com DR3, DR5 e DR8. Esses grupos podem ser distinguidos por 4 sondas de oligonucleotídeos

(Tab. 2.3.). Os alelos de DQB1 são: DQW5 (1.1), DQW6 (1.2), DQW2, DQW7 (3.1-57), DQW7 (3.1-26), DQW8 (3.2), DQW4, DQW9 (3.3) e podem ser reconhecidos pelos óligos descritos na mesma tabela.

A extração do DNA foi realizada pelo método de "salting out" (veja extração de DNA), sendo que, após a amplificação, 20% do DNA foi transferido para um filtro de nitrocelulose ("dot-blot"), utilizando-se um multi-dispensador com vácuo (B.R.L. manifold). O DNA foi fixado na membrana por aquecimento a 80 °C durante 2 horas e após foi pré-hibridizado a 42 °C e hibridizado durante a noite na mesma temperatura. No outro dia, as membranas foram lavadas na temperatura específica de cada probe de acordo com a fórmula proporcional ao número de bases: $[T_d = 4(G+C) + 2(A+T)]$.

3.2.4.2. AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

A reação é feita em microtubo de ensaio próprio para o termo-ciclo, onde é adicionado em primeiro lugar o DNA e após a mistura de amplificação (preparada à parte). No final adicionar 1 gota de óleo para evitar a evaporação.

A reação do PCR

1. DNA 250 ng/reação (100 ng/ul) usar 2.5 ul.

Veja diluição do DNA (reagente 32)

2. Tampão 10 X PCR

dNTP'S	(4 mM)	1.25 ul
MgCl 2	(40 mM)	1.25 ul
KCL	(1M)	1.25 ul
Tween 20	(2%)	1.25 ul (reagente 33)
Tris/HCl pH 8.4	(200mM)	1.25 ul (reagente 34)

3. Primers (500 ug/ml)

A. 0.25 ul

B. 0.25 ul

4. Taq polimerase 0.125 ul

5. Água autoclavada 15.6 ul

TOTAL 25 ul/reação

*Condições para amplificação de DQA1*32 ciclos de:

Desnaturação 94°C 1 min

Anelamento 55°C 1 min

Extensão 72°C 30 seg

Após o término, a extensão será prolongada por 10 min/72°C, finalizando com o resfriamento a 10°C até o momento de retirarmos as amostras da máquina (Termo-ciclo, Perkin Elmer-Cetus, EUA.)

Condições para amplificação de DQB1

	<u>1 ciclo de:</u>		<u>31 ciclos de:</u>	
Desnaturação	93°C	5 min	93°C	2 min
Anelamento	39°C	3 min	39°C	2 min
Extensão	64°C	3 min	64°C	2 min

Após o término, a extensão será prolongada por 10 min/72°C, finalizando com o resfriamento a 10°C até o momento de retirarmos as amostras da máquina (Termo-ciclo, Perkin Elmer-Cetus, EUA.)

Obs. É importante trabalhar com os reagentes no gelo. A Taq virá direto de -20 °C para ser utilizada. A Taq polimerase deve ser colocado por último e o DNA por primeiro. Caso deva-se usar mais DNA, diminuir o volume de água.

Esta é uma receita para 1 amplificação, mas normalmente são feitas diversas, logo costuma-se misturar o tampão + primers + água num mesmo tubo e deixar por 15 min no ultravioleta de 254 a 300 nm (profilaxia da contaminação). Após adiciona-se a Taq e mistura-se (vortex).

Dispensar 22.5 ul em cada tubo que já deverá conter 2.5 ul de DNA. Misturar (vortex) e centrifugar. Adicionar 1 gota de óleo previamente irradiado no ultravioleta por 15 min. É aconselhável preparar um tubo controle com água em lugar do DNA que servirá de controle de possível contaminação.

Realizar eletroforese (minigel) para observar a existência de banda do produto amplificado. Usar agarose a 2% (0.8 g + 40 ml de TBE, tampão TBE (50 ml 5x TBE + 200 ml de água), 50 V durante 1 hora (80 mA).

Tab. 2.3. Primers, sondas e temperaturas de lavagem

DQA1	SEQUÊNCIA	°C	DQB1	SEQUÊNCIA	°C
GH 26a	GGTGTAACCTTGTACCAG		GAMPDQXB2	CCACCTCGTAGTTGTGTCTGCA	
GH 27a	GGTAGCAGCGGTAGAGTTG		GLPDQB3	GATTTCGTGTACCAGTTTAAGG	
GH 27b	GTAGAGTTGGAGCGTTA		GLPDQB2	TGCTACTTCACCAACGGGAC	
A1	TGAGTTCAGCAAATTTG	46	DQ5 (1.1)	GGCGGCCTGTTGCCGAG	62
A2	TCTAAGTCTGTGGAACA	48	DQ6 (1.2)	GGCGGCCTGATGCCGAG	64
A3	TTCCGCAGATTTAGAAG	48	DQ2	GCTGGGGCTGCCTGCCG	62
A4	GTTTGCCTGTTCTCAGA	48	DQ4	TGGAGGAGGACCGGGCG	62
			DQ7 (3.1-57)	GGCCGCCTAACGCCGAG	68
			DQ7 (3.1-26)	CGTGCGTTATGTGACCA	52
			DQ8 (3.2)	GGCCGCCTGCCGCCGAG	65
			DQ9 (3.3)	(3.1-57) posit. (3.1-26) neg.	

3.2.4.3. PROTOCOLO PARA FIXAÇÃO DO DNA EM MEMBRANA.

O DNA após a amplificação deve ficar a 40C ou congelado. No caso de desejarmos sua fixação em membrana de nitrocelulose, devemos preparar a solução para "dot-blot" (reagente 35) e seguir os seguintes passos:

1. Rotular tubos Ependorf com a identificação das amostras.
2. Adicionar 10 ou 20 ul de DNA em cada tubo. Em caso de desejarmos ter 2 cópias do mesmo DNA em filtros iguais (hibridizações com sondas diferentes), utilizamos a reação em dose dupla e dispensamos duplamente na membrana, a qual será posteriormente dividida, fornecendo dois pedaços iguais e com a mesma disposição dos produtos DNA.
3. Adicionar 104 ou 208 ul da solução "dot-blot"
4. Deixar 10 min no gelo.
5. Adicionar 114 ou 228 ul de 2 M NH₄ acetato. Neste momento pode-se congelar o material para prosseguir no outro dia, ou,
5. Preparar o aparelho para a transferência ("manifold B.R.L.), com 2 membranas de papel 3 MM e o filtro de nitrocelulose do tamanho correto. Escrever no filtro a sua identificação, pois esta é a melhor oportunidade (filtro sêco). Não deixar de escrever o mapa no caderno com a localização de cada amostra no(s) filtro(s).
6. Lavar inicialmente os orifícios com 114 ou 228 ul de 1 M NH₄ acetato
7. Colocar 110 ul da solução que contém o DNA em cada orifício e sem demora,

8. Lavar com 200 ul de 1 M NH₄ acetato.
9. Lavar os filtros por 5 seg. em 6 X SSC (diluir r.36).
10. Secar os filtros no ar por 20 min.
11. Colocar na estufa a 80°C por 2 horas.
12. Guardar entre papel 3 MM até o uso.

3.2.4.4. MARCAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDIOS COM ³²P.

Os oligonucleotídios foram sintetizados no aparelho DNA Synthesizer 380 B (Applied Biosystem Com.) e marcados pela técnica da T4 Polinucleotide Kinase.

Reação de kinase:

1. Água bi-destilada 22.4 ul
2. 0.1 M DTT (Dithiothreitol) 1 ul (sol.2.2M)
3. 10 X tampão kinase (Mg-Tris) (reag. 37) 3 ul
4. 500 ug/ml oligonucleotídio 0.8 ul
5. Polinucleotide kinase (5U/ul) 0.8 ul (-20°C)
(Pharmacia cat. 27 90734-02) 1000 U
6. ³²P-Gama-ATP 2 ul (ou 1 ul)
7. Centrifugar
8. Encubar 37°C/40 min.
9. Aquecer 70°C/10 min.
10. Rápida centrifugação.
11. Purificação em coluna de Sepharose DE 52
 - a. DE Sepharose 1 ml (produz leito de 0.5 ml)
 - b. Lavar com 5 ml de TE 10/1 pH8 (Reagente 38)
 - c. Adicionar 70 ul TE aos 30 ul da oligo-mistura

d. Colocar os 100 ul na coluna e a seguir 1 ml TE 10/1

e. Eluir a gama ATP livre com 5 ml TE 10/1 + 0.2 M NaCl

f. Eluir óligos c/ TE 10/1+0.5 M NaCl (3 vezes/0.5ml)

Coletar 3 amostras de 0.5 ml em Ependorfs. Examinar a radiotividade e guardar a "mais quente" a -20°C (quase sempre é a segunda). Veja TE 10/1+0.2M NaCl (reagente 39) e TE 10/1+ 0.5 M NaCl (reagente 40).

3.2.4.5. PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO

Lavar as membranas rapidamente com 6 X SSC (diluir reag. 36) (60 ml de 20 X SSC + 140 ml de água). As soluções a seguir podem ser utilizadas para 1 ,2 ou 4 filtros.

<u>Solução 1 x 5 ml</u>	<u>2 x 5 ml</u>	<u>4 x 5 ml</u>
3 ml H ₂ O	5.8	12
0.25 ml 100 x Denhardt's	0.5	1
0.25 ml 10% SDS	0.5	1
1.50 ml 20 x SSC	3	6
50 ul tRNA (20 mg/ml)	0.1	0.2

Colocar num envelope de polieteno e encubar 42°C/20 min com movimento suave. Não esquecer de massagear o envelope com as membranas antes da encubação.

3.2.4.6. HIBRIDIZAÇÃO

A hibridização acontece com a retirada do líquido de pré-hibridização e substituição pelo de hibridização. O trabalho deverá acontecer atrás de escudo de proteção contra a irradiação, assim como deve ter acontecido na marcação dos óligos.

<u>Solução de 2.5 ml</u>	<u>2.5 x 4 ml</u>	<u>2.5 x 15 ml</u>
25 ul 10% SDS	100 ul	375 ul
0.75 ml 20 x SSC	3 ml	11.25 ul
1.75 ml H2O	7 ml	26.25 ml
50 ul da sonda	100 ul	130 ul

Encubar em politeno duplo a 42°C durante a noite.

3.2.4.7. LAVAGEM DOS FILTROS.

Lavar os filtros na temperatura adequada (TM) para cada óligo (Tab. 2.3.) - 2 vezes 30 min. em 6 x SSC/0.1% SDS (180 ml 20 x SSC + 410 ml H2O + 10 ml SDS 10%).

A solução deve ser aquecida a 4°C acima da TM e colocada na caixa de vidro ou plástico que deverá estar dentro do banho maria na temperatura TM (usar leve agitação). É importante manter a temperatura correta, mesmo na troca da solução.

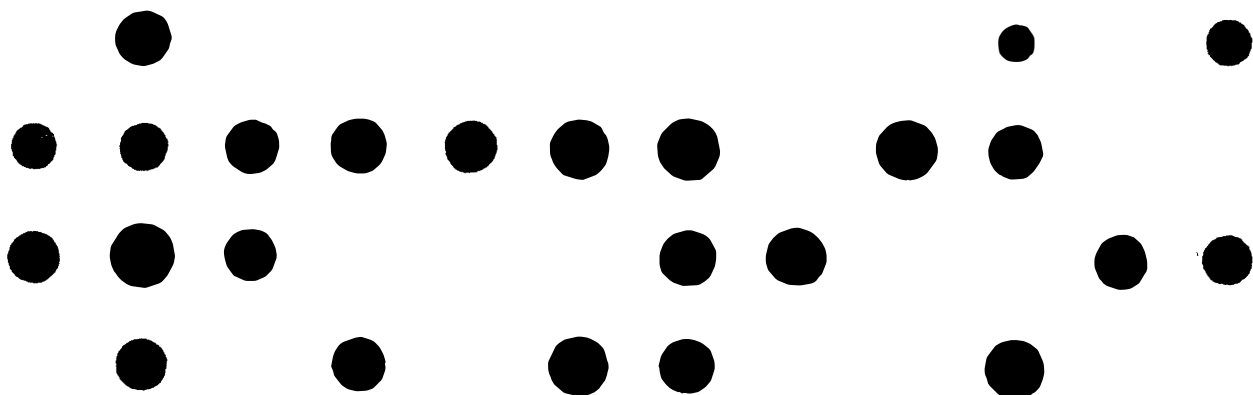
As membranas não podem secar. Cobrir com clinfilm imediatamente! Controlar a radioatividade com o Geyger, aproximando-o da membrana. Auto-radiografar durante 1 hora e observar a necessidade de deixar mais tempo.

3.2.4.8. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os controles da reação são DNA de células homozigotas para o sistema HLA. Uma especificidade de cada alelo deve estar presente para demonstrar o controle positivo com cada óligo. O controle de contaminação será H₂O no lugar de DNA.

As membranas terão funcionado adequadamente, caso observarmos distintas manchas ("dot spots) em alguns locais e ausência em outros. O local do DNA controle será positivo. As sondas são capazes de revelar o filme de Rx, quando encontram a respectiva porção específica de DNA. Somente o lugar onde estava fixado este DNA ficará positivo, enquanto nos demais lugares não será observado o sinal (Fig. 2.3.).

Fig. 2.3. Resultados da tipagem HLA-DQW8 pela técnica do PCR



As manchas negras correspondem aos produtos da reação do PCR de indivíduos portadores de HLA-DQW8, sendo que os indivíduos negativos encontram-se horizontalmente entre os positivos, correspondendo aos espaços em branco.

3.2.4.9. RETIRADA DAS SONDAS PARA RE-HIBRIDIZAÇÃO.

As sondas podem ser retiradas das membranas sem alterar o DNA fixado, portanto basta seguir o protocolo e após hibridizar com outra sonda.

1. Lavar 2 vezes no tampão "stripper" (reagente 41)
2. Lavar rapidamente no tampão de neutralização (reag.42)
3. Lavar 2 x 20 min em 5 x SSPE (200 ml 20xSSPE+600ml H₂O)

É importante que os filtros não sequem. Manter entre clinfilm ou em 2 x SSC.

3.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

3.2.5.1. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO

As especificidades dos anticorpos anti-HLA no "screening" de anticorpos em placentas foram identificadas por intermédio de um programa de computação para microcomputador PC que avalia o grau de associação em tabelas 2x2, calculando o valor da coeficiente de correlação (R). $R = \sqrt{X^2/N}$, onde X^2 = qui quadrado e N = tamanho da amostra. Somente valores acima de 0.4 foram considerados para fins de análise. Os melhores soros terão R de 1, ou próximo da unidade, entretanto soros muito úteis podem existir com valores mais abaixo.

3.2.5.2. AVALIAÇÃO DO RISCO RELATIVO

O método utilizado para comparar doenças em diferentes populações foi o desenvolvido por Woolf e modificado por Aldane (Woolf, 1955; Aldane, 1956). Nestes estudos são necessários a frequência dos antígenos HLA na população afetada e no grupo controle. A análise dos dados inicia com uma tabela 2x2, contendo o número de indivíduos positivos e negativos para o antígeno no grupo de pacientes e controles.

	<u>Número de Indivíduos</u>	
	<u>Positivos p/</u> <u>o Antígeno</u>	<u>Negativo p/</u> <u>o Antígeno</u>
Pacientes	a	c
Controles	b	d

A incidência da doença nos indivíduos positivos para o antígeno será a/b x alguma constante e para os indivíduos negativos, c/d x a mesma constante. A incidência relativa X definida por Woolf é:

$$\chi = \frac{a/b}{c/d} = \frac{ad}{bc} \quad (1)$$

Obs. A constante que estaria presente no numerador e denominador foi cancelada.

Na literatura que trata da relação HLA com doenças o termo "risco relativo" foi adotado para o valor de X (Simons, 1984;

Tiwari, 1985). O risco relativo (RR) representa, quantas vezes a doença é mais freqüente nos indivíduos positivos para determinado antígeno do que nos negativos para o mesmo.

Caso a/c e b/d forem similares, então o RR será próximo da unidade. Caso < 1 , o antígeno é menos freqüente nos pacientes do que nos controles. Quando > 1 , o antígeno é mais freqüente nos pacientes do que nos controles.

A fórmula de Haldane é mais utilizada para amostras pequenas, podendo ser representada por:

$$\chi = \frac{(2a + 1)(2d + 1)}{(2b + 1)(2c + 1)} \quad (2)$$

A seguir calcula-se:

$$y = \log_e X \quad (3) \quad \text{e após a variância:}$$

$$v = \frac{1}{a + 1} + \frac{1}{b + 1} + \frac{1}{c + 1} + \frac{1}{d + 1} \quad (4)$$

$$\text{então, o peso de } V \text{ será } W = 1/V \quad (5)$$

$$\text{para finalmente: } X^2 = W \times y^2 \quad (6)$$

O $X^2 > 3.84$ indica que o RR é significativamente superior a 1, ou seja, o antígeno está associado à doença. O nível de significância é analisado em termos de valores de probabilidade (p). Quanto menor o valor de p, maior é a chance de que o valor do RR não tenha sido ocasionado por chance ao acaso. Para dados biológicos, aceita-se valores de $p \leq 0.05$. O valor de p para um $X^2 = 3.84$ é o próprio 0.05.

A relação do HLA com doenças compara muitos antígenos de cada locus. Deve-se utilizar a fórmula de Bonferoni para eliminar a possibilidade de uma relação irreal de associação, devido ao

número elevado de comparações. Para tanto, multiplica-se o valor encontrado para "p" pelo número de antígenos testados.

O valor dos limites de confiança devem ser calculados e para tanto necessitamos conhecer o desvio padrão (SD):

$$SD = \sqrt{\text{variância}} \quad (7)$$

$$y (\log_e RR) \pm 2 SD \quad (8)$$

$$y + 2 SD = a$$

$$y - 2 SD = b$$

O valor superior será: e^a função e^x (9)

O valor inferior será: e^b " (10)

Para o cálculo do X^2 com o respectivo valor de p, existem diversos pacotes de programas de computação que facilitam os cálculos, assim como oferecem números mais aproximados. Este foi o caso com os cálculos realizados para os capítulos a seguir.

Exemplo de cálculo manual:

Associação do antígeno HLA-DR4 na população branca com pênfigo, comparada com controles normais.

Pacientes positivos para DR4: n₀ = 89. %+ = 44

Controles positivos para DR4: n₀ = 128 %+ = 10

a=39,16 c=49,84 b=12,80 d=116,20

RR= 6.854 (2) W= 7.937 (5) $e^a=2.62$ elev. $e^x=13.80$ (9)

y=1.925 (3) $X^2=29.412$ (6) $e^b=1.22$ elev. $e^x=3.40$ (10)

V=0.126 (4) SD=0.35 (7) 95% LC= 3.40 - 13.80

3.2.5.3. PROBABILIDADE RELATIVA DE PATERNIDADE (PRP)

O teorema de Bayes (1763) é a base para os cálculos utilizados na investigação de paternidade, quando utiliza-se o sistema HLA. Para exemplificar, vamos utilizar um caso fictício:

Qual a probabilidade de que um pai A1,A2,B7,B8 transmita o haplótipo A1,B7 ? O fenótipo anterior permite existir dois genótipos correspondentes: A1,B7/A2,B8 e A1,B8/A2,B7. Vamos supor que exista a possibilidade de recombinações entre os locos A e B na freqüência π ($=0.08$). A probabilidade de que um indivíduo A1,B7/A2,B8 transmita o haplótipo A1,B7 para seu filho será:

$$P1: \frac{0.5 [1-\pi] 2p_1p_2 + 2\pi p_3p_4}{2(p_1p_2 + p_3p_4)} \quad (1)$$

onde, p_1, p_2, p_3, p_4 são as freqüências respectivas dos haplótipos A1,B7; A2,B8; A1,B8; A2,B7. A fórmula (1) pode ser simplificada, anulando-se o 0,5 e o primeiro 2 do numerador, assim como substituindo π por 0.08.

$$P1: \frac{0.92 \times p_1p_2 + 0.16 \times p_3p_4}{2(p_1p_2 + p_3p_4)} \quad (2)$$

P2 é igual a probabilidade de transmissão do mesmo haplótipo ou alelo A1,B7 por um indivíduo da população ao acaso. Neste caso o valor é o da freqüência do mesmo A1,B7.

Existem hipóteses formuladas para a probabilidade. A hipótese "a priori", relaciona-se com a presunção de que o pai biológico é o acusado. As outras hipóteses são a de neutralidade e a de que o acusado é improvável de ser o verdadeiro pai. Para

cada uma utiliza-se valores diferentes na fórmula do teorema de Bayes . Na prática, utiliza-se o valor de 0.50 (neutro) na fórmula anterior à referida abaixo (simplificada).

$$P3: \frac{1}{1 + \frac{P2}{P1}} \quad (3)$$

Para o cálculo, substituir os valores de P1 e P2 em P3. Os valores das freqüências são importantes e sempre que possível deve-se usar valores locais e de acordo com a raça.

Internacionalmente, aceita-se os seguintes valores para os resultados: probabilidade muito forte de paternidade, acima de 95%; probabilidade provável, entre 80% e 95% e improvável abaixo de 80%.

3.2.5.4. CURVAS DE SOBREVIDA

As curvas de sobrevida dos transplantes foram computadas de acordo com o método de Kaplan-Meier (tabelas de sobrevida actuarial), sendo empregado o teste estatístico "log rank" na comparação entre duas tabelas.

RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.

Foram identificadas 468 placentas com reatividade anti-
linfocitária, após a prova cruzada contra um painel de linfócitos
totais. Este número corresponde a 16% do total, estando entre a
média de pesquisas anteriores (Thorsby, 1970), entretanto a
reatividade não quer dizer presença de anticorpos utilizáveis
cl clinicamente. A maioria dos soros foram fracos ou
multiespecíficos, não sendo possível caracterizar
especificidades, para uso como reagente HLA. Nas tabelas 1.4.,
2.4. e 3.4. estão relacionados os soros de valor encontrados
nesta pesquisa.

Foram identificados 24 soros anti-HLA-A e 32 anti-HLA-B.
Estes 56 soros correspondem a 11.96% das placentas com
reatividade anti-
linfocitária. Outros 26 soros anti-DR e DQ foram
caracterizados com o painel de linfócitos B de pacientes com
leucemia linfática crônica (LLC), alcançando a frequência de
5,55%. O total de anticorpos de qualidade alcançou a 82,

correspondendo a somente 17.5% dos soros com reatividade e a 3.15% do número total de placentas.

A freqüência de sensibilização nas multíparas alcançou 16.41% nas primíparas, 35,82% nas com duas gestações, 22.38% nas com três e 25.37% nas com quatro ou mais gestações. Este resultado já era esperado por observações anteriores (Nymand, 1971).

Os anticorpos mais freqüentemente encontrados foram HLA-A2, sendo 9 monoespecíficos, 6 associados com A28 e um com CW6. No loco B os anticorpos anti-HLA-B5/B35, B17 e B7 foram os mais frequentes, enquanto os anti-HLA-DR7 e DR4 foram os mais encontrados contra os antígenos de classe II.

Tab. 1.4. Resultados da Pesquisa de Anticorpos Anti-HLA Classe I no Soro de Placentas.

SORO Nº	HLA	R	% REAÇÕES FORTES
JO 7001	A1	0.74	80
	B8	0.60	78
RE 0138	A1	0.74	94
	A11	0.70	94
RS 2726	A2	0.83	100
PR 2315	A2	0.82	100
PR 2036	A2	0.90	98
RE 1946	A2	0.86	94
CA 7025	A2	0.77	82
PR 850	A2	0.76	78
PR 0267	A2	0.82	95
PR 0432	A2	0.80	96
CE 7007	A2	0.78	90
ML 7009	A2	0.77	96
	A28	0.60	80
PR 1114	A2	0.79	96
	A28	0.56	85
PR 0636	A2	0.60	93
	A28	0.55	86
RE 2484	A2	0.80	96
	A28	0.75	90
PR 2398	A2	0.82	96
	A28	0.78	87
PR 1736	A2	0.71	99
	A28	0.70	90
PR 2382	A2	0.78	93
	Cw6	0.54	87
RS 2742	A3	0.95	100
MG 0081	A3	0.73	87
IV 7042	A9	0.55	82
CL 7008	A9	0.71	60
PR 1136	A9	0.66	85
CE 7002	A30	0.90	90
	B13	0.87	90

Obs. R é o valor do coeficiente de correlação. A percentagem de reações 6+ e 8+ na leitura do teste de linfocitotoxicidade pode ser observada na coluna da direita.

Tab. 2.4. Resultados da Pesquisa de Anticorpos Anti-HLA Classe I no Soro de Placentas

SORO Nº	HLA	R	% REAÇÕES FORTES
PR 2433	B5	1	100
RO 7077	B5	0.87	68
	B35	0.80	75
PR 1218	B5	0.75	66
	B35	0.60	70
RE 0139	B5	0.66	62
	B35	0.65	74
PR 2335	B5 (51)	0.75	77
	B35	0.66	64
PR 2245	B5 (51)	0.80	50
RE 2113	B35	0.88	80
PR 2364	B35	0.80	85
PR 2439	B7	0.78	92
PR 0594	B7	0.93	90
RO 7000	B7	0.65	75
	B27	0.54	70
RS 2277	B7	0.64	82
	B62	0.40	82
RE 2141	B8	0.77	66
PR 0578	B8	0.54	78
PR 2490	B12	0.94	91
RE 1888	B12 (44)	0.87	80
PR 0517	B17	0.70	71
PR 2334	B17	0.63	40
RE 2042	B17	0.64	66
	B44	0.60	64
PR 2418	B17	0.51	75
	B27	0.50	75
LU 7006	B17	0.46	75
	B7	0.46	75
PR 0515	B18	0.54	63
	B5	0.51	50
PR 0689	B22	0.47	80
RS 2676	B27	0.55	75
	A24	0.60	75
VK 7087	B40	0.90	60
RS 2353	B40	0.75	90
RE 1869	B40	0.66	93
RE 2646	B40	0.40	80
	B44	0.60	80
RE 2207	B57	0.64	71
	A11	0.61	75
RE 2196	Bw4	0.57	82
PR 0607	Bw4	0.50	83
RE 2125	Cw7	0.57	76

Tab. 3.4. Resultados da Pesquisa de Anticorpos Anti-HLA Classe II no Soro de Placentas.

SORO Nº	HLA	R	% REAÇÕES FORTES
RE 2042	DR2	0.71	75
RS 2714	DR3	0.89	80
RE 2126	DR3	0.62	100
RE 2141	DR3	0.55	90
	DR7	0.65	87
LU 7006	DR4	0.76	77
RE 2147	DR4	0.78	50
PR 1909	DR4	0.70	80
PR 2433	DR5	0.85	90
PR 2418	DR5	0.52	76
RE 2300	DR7	0.76	77
VE KAMP	DR7	0.67	85
PR 2335	DR7	0.91	85
PR 2494	DR7	0.91	100
RS 2678	DR7	0.78	50
CA 7025	DR7	0.67	66
RS 2716	DR7	0.67	50
RS 2643	DR8	1.00	70
RE 1869	DR8	0.68	50
RE 2196	DR8	0.64	87
PR 0515	DR8	0.87	100
CL 7008	DR11	1.00	40
RE 2548	DRw52	0.46	100
PR 2811	DQW1	0.94	90
PR 0565	DQ1	0.71	55
RE 2232	DQ2	0.60	40
RE 2169	DQ5	0.79	100

4.2. INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGENÉTICA HLA.

A exclusão da paternidade é possível de acordo com duas regras muito simples:

a) Um indivíduo é excluído da paternidade quando a criança apresentar um alelo ausente, tanto na mãe como no próprio.

b) A criança deve apresentar um genótipo compatível com o fenótipo dos pais biológicos.

Pode-se observar ser possível excluir o hipotético pai, mesmo na ausência da mãe. Para tanto é necessário que todos os alelos da criança e do acusado sejam expressos. O filho deverá apresentar metade dos alelos paternos, caso contrário haverá exclusão.

A probabilidade relativa de paternidade é o melhor resultado estatístico que se pode calcular, quando o possível pai não é excluído na perícia. O método mais utilizado é derivado do teorema de Bayes, considerando-se como índice de forte probabilidade os resultados acima de 95%, de provável paternidade entre 80% a 95% , sendo improvável a paternidade com números entre 60% a 80% . O cálculo da probabilidade de paternidade está descrito no capítulo 3.2.5.3.. Existem diversos programas de computação que permitem realizar, com facilidade, o cálculo deste índice, assim com possibilitam o somatório de resultados de diversos sistemas genéticos utilizados. Os resultados apresentados foram analisados pelo programa "Det-Pater" da Oblea Solutions Company (EUA), alimentado com frequências gênicas e

haplotípicas da população caucasóide do RS (dados não incluídos).

Os resultados são observados na tabela 4.4.. A maioria dos casos é proveniente do interior do Estado (76%), sendo que 42% foram casos encaminhados pela Justiça. Dos 66 casos investigados, 42 (64%) foram solucionados exclusivamente pelo estudo do sistema HLA. Em 10 casos, houve a necessidade de acrescentarem-se os grupos sanguíneos ABO, MNSs e Rh (CcDEe). Os resultados expressam-se em "probabilidade cumulativa de paternidade" (Tab. 5.4.). O número de exclusões foi de 14 (21%) (Tab. 6.4.).

A média de probabilidade relativa de paternidade nos casos resolvidos pela tipagem HLA foi de 96.85%. Nos casos em que os grupos sanguíneos foram associados, a probabilidade cumulativa média foi de 98.20%, sendo que a maioria foi acima de 99%.

Tab. 4.4. Resultados da Investigação de Paternidade pela Tipagem HLA.

CASO Nº	MÃE HLA-A/HLA-B	FILHO HLA-A/HLA-B	POSSIVEL PAI HLA-A/HLA-B	PRP %
1	1 28 17 35	28 2 35 7	1 2 7 17	97
2	2 11 12 16	3 11 14 16	3 10 5 14	96
3	1 - 8 38	1 10 8 7	1 10 7 17	97
4	11 9 5 12	11 2 5 13	2 10 13 -	95 *
5	2 3 38 35	2 11 38 7	11 3 7 35	98
6	2 - 13 35	2 9 7 35	9 2 7 35	97
7	2 28 17 35	2 28 40 35	2 29 40 7	95
8	2 9 12 14	9 29 12 -	9 29 12 7	95 *
9	2 - 5 35	2 9 18 5	9 31 18 16	95
10	9 11 60 12	9 31 60 12	1 31 12 5	95 *
11	29 1 12 37	3 29 35 12	3 30 35 -	95
12	10 11 35 12	9 11 15 35	2 9 15 -	96
13	3 - 22 16	1 3 60 22	1 10 60 15	97
14	2 9 35 -	2 11 35 5	11 1 5 -	96
15	2 - 16 5	2 9 16 12	9 - 12 17	97
16	2 - 60 5	2 9 60 7	9 11 7 -	97
17	2 5 12 8	2 - 8 15	2 - 10 15	95 *
18	1 - 12 15	1 10 16 15	10 9 16 18	96
19	1 - 17 35	1 29 17 18	28 29 5 18	99
20	2 11 35 7	11 3 35 7	1 3 7 12	96 *
21	9 10 5 7	10 3 5 15	2 3 5 15	96
22	2 22 5 -	2 29 5 35	9 29 7 35	99
23	2 9 17 21	9 32 5 21	1 32 12 5	98
24	3 30 21 -	2 3 12 21	2 29 12 -	95
25	1 11 8 40	1 11 8 17	1 29 12 17	97 *
26	1 - 8 42	1 11 8 21	11 - 14 21	99
27	1 30 35 17	30 32 35 18	11 32 5 18	99
28	1 9 12 17	1 32 17 18	1 32 18 35	99
29	2 3 7 41	2 - 35 41	2 - 35 18	97 *

Tab. 4.4. Resultados da Investigação de Paternidade pela Tipagem HLA (Cont.)

CASO Nº	MÃE	FILHO	POSSÍVEL PAI	PRP %
30	3 29 22 12	3 29 13 12	3 32 13 35	95 *
31	2 3 13 35	1 3 12 35	1 - 8 12	99
32	2 5 -	2 9 5 17	28 9 16 17	98
33	10 11 5 -	11 28 5 7	28 10 7 -	98
34	1 - 8 14	9 - 14 16	3 9 16 40	98
35	2 - 14 19	2 - 14 5	2 - 5 17	95 *
36	2 29 12 35	2 10 27 35	10 28 16 27	96
37	2 - 15 35	2 9 15 17	9 28 17 40	99
38	2 - 12 14	2 9 12 18	9 - 18 35	99
39	1 29 12 17	29 11 12 35	10 11 40 35	96
40	3 30 5 -	3 10 5 40	10 31 5 40	98
41	2 9 35 -	9 - 35 12	1 9 35 12	95
42	2 - 12 14	10 2 16 12	10 2 16 35	99

* Casos resolvidos com o estudo de outros membros da família, procurando a melhor caracterização dos haplótipos.

Tab. 5.4. Resultados da Investigação de Paternidade pela Tipagem HLA Combinada com Grupos Sanguíneos [ABO, MNSs, Rh (CcDEe)]

CASO Nº	MÃE	FILHO	POSSIVEL PAI	PCP %
1	3 10 12 17 A MNS CcDe	9 10 12 17 A MNS CcDEe	1 9 8 12 A MNS CcdEe	99
2	2 10 5 - O M CcDe	2 10 12 - O MN CDe	2 29 12 14 O MN CDe	99
3	9 32 12 14 A M CcDe	9 28 12 - AB M CcDe	3 28 7 - B MN CDEe	99
4	3 - 5 35 A Ms cDEe	3 32 5 - O MNS cDEe	9 32 16 - O Ns cDE	99
5	1 28 27 - AB Ns CDe	1 32 27 14 A NSs CDe	3 32 5 14 O MNS CcDe	99
6	3 32 40 12 A MS CcDEe	32 29 40 16 A MSs CcDEe	10 29 16 5 A MNSs CcDe	98
7	1 9 7 12 O MNS CcDEe	1 30 7 18 B MNSs CcDe	3 30 7 18 B MSs cde	99
8	9 10 27 - O N cDEe	9 - 14 27 A N CcDe	9 28 14 5 A MN CcDe	99 *
9	2 3 5 21 A MNSs CDe	2 30 13 5 O Ms CDe	1 30 13 17 O MNS CDce	99
10	1 11 35 16 O MSCDe	1 11 35 12 O MSs CDe	1 2 5 12 O MNSs CcDEe	92

Tab. 6.4. Resultados da Exclusão da Paternidade pelo Sistema HLA

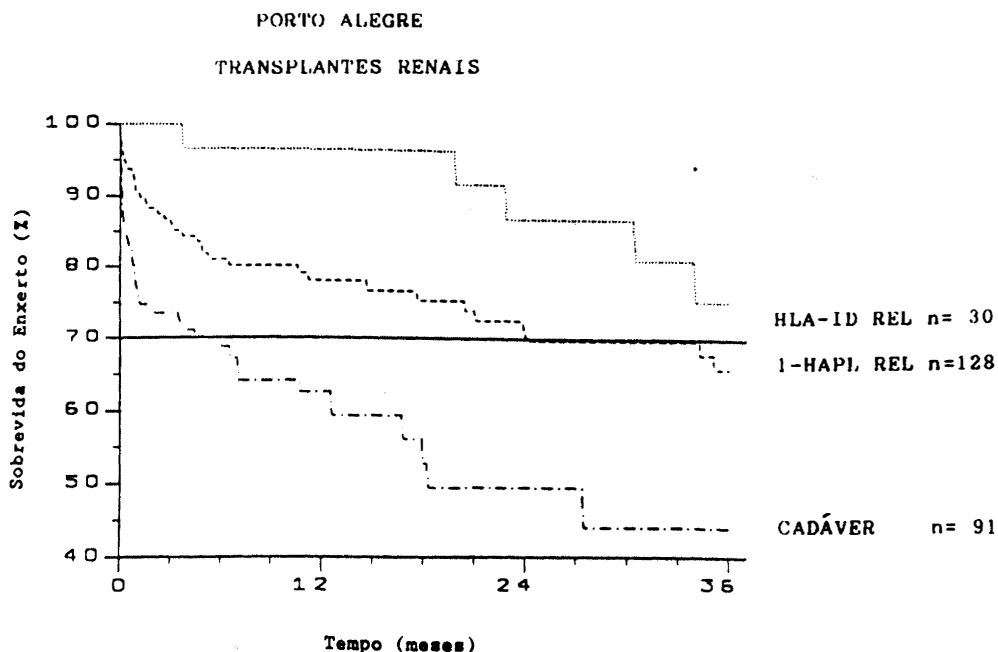
CASO Nº	MÃE	FILHO	ACUSADO
1	31 10 40 -	31 2 5 40	3 - 7 27
2	3 32 35 -	3 28 35 40	1 9 16 -
3	1 31 5 16	1 31 5 16	28 - 22 12
4	3 32 17 35	3 31 15 35	9 10 5 16
5	1 29 12 22	1 2 5 22	3 - 7 35
6	2 - 40 -	2 - 40 5	1 2 15 7
7	9 29 14 7	9 11 14 35	2 32 5 35
8	9 3 12 37	9 - 12 15	2 3 5 -
9	1 9 12 5	1 9 12 14	10 33 60 14
10	2 - 18 5	2 30 18 27	2 3 7 12
11	1 30 35 17	30 32 35 18	10 11 5 -
12	9 11 5 12	11 29 5 12	29 30 7 13
13	falecida	1 30 8 15	9 10 27 -
14	2 10 16 -	2 11 18 -	2 29 17 -

4.3. RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL.

4.3.1. PRIMEIRO TRANSPLANTE: HLA IDÊNTICO x 1 HAPLÓTIPO
RELACIONADO x CADÁVER.

Os resultados comparativos de transplantes realizados entre irmãos HLA idênticos (30), com um haplótipo de diferença (128) ou com doador cadáver (91), apresentaram os seguintes resultados (Fig. 1.4.): No 1º ano as sobrevidas do enxerto foram 96.7%, 78.2% e 62.5%. No 3º ano 75.4%, 65.9% e 43.9%. A relação estatística entre as curvas foi significativa entre a primeira e a terceira ($p < 0.0009$) e entre a 2ª e 3ª ($p < 0.009$).

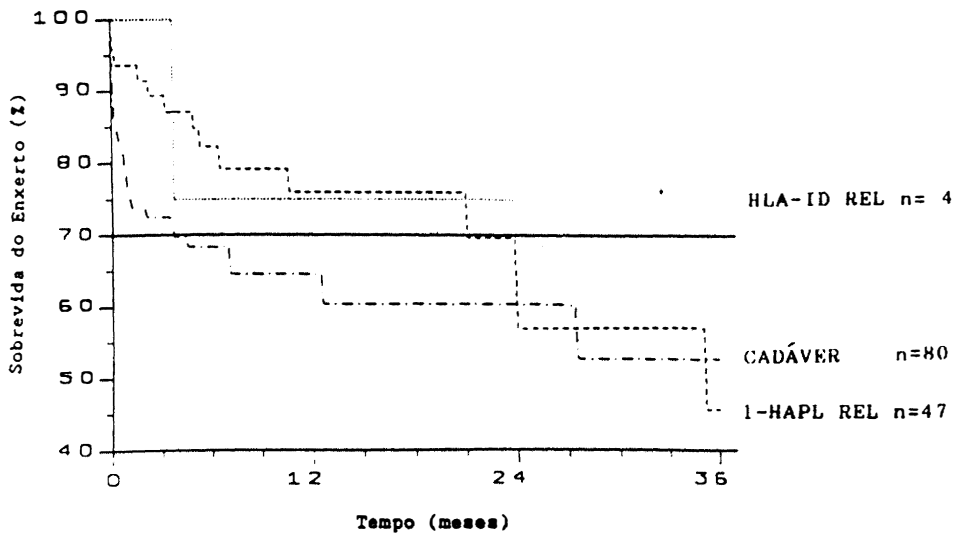
Fig. 1.4. Tipagem HLA em tranplantes com doador HLA idêntico, parcialmente idêntico (relacionado) e com doador cadáver.



4.3.2. PRIMEIRO TRANSPLANTE x CICLOSPORINA

A importância da Ciclosporina nos transplantes motivou esta observação entre pacientes transplantados com e sem esta terapêutica. Na Fig. 2.4. pode-se observar a sobrevida do enxerto em transplantes com doador HLA idêntico (4), 1 haplótipo relacionado (47) e cadáver (80). Os resultados no primeiro ano foram 75%, 76% e 64.5%, sendo que os HLA idênticos ainda não completaram o 3º ano, mas continuam com 75% de sobrevida no 2º. No 3º ano observa-se 45.6% para os com 1 haplótipo relacionado e 52.7% para os com doador cadáver. Estatisticamente, a significância não foi alcançada entre as curvas.

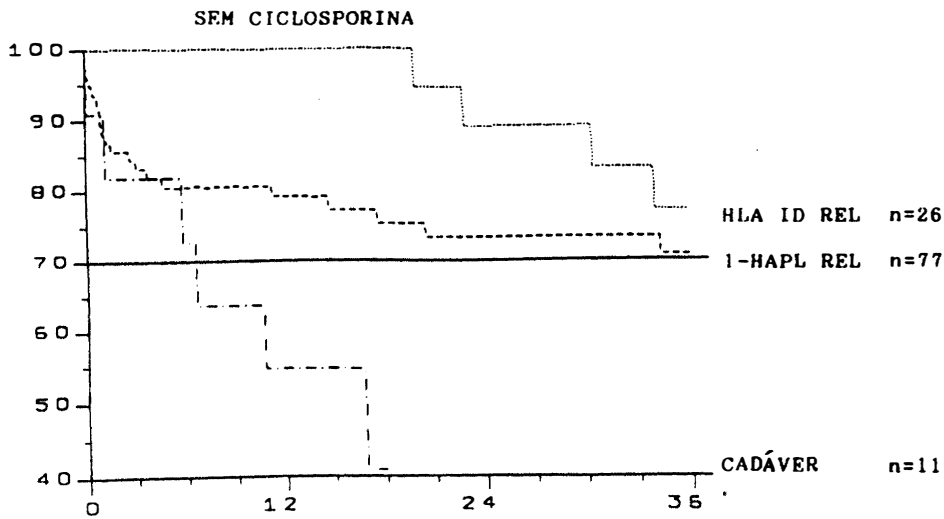
Fig. 2.4. Transplante renal e uso de Ciclosporina A



4.3.3. PRIMEIRO TRANSPLANTE x SEM CICLOSPORINA.

A Fig. 3.4. relaciona os transplantes com doadores HLA idênticos (26), 1 haplótipo em comum (77) , assim como com doador cadáver (11). Os resultados após o primeiro ano foram de 100%, 79% e 54.5%. No 3º ano, 77%, 70.7% e 42%. A significância estatística aconteceu entre a 1ª e 3ª linha de sobrevivência ($p < 0.00019$) e entre a 2ª e a 3ª ($p < 0.00019$).

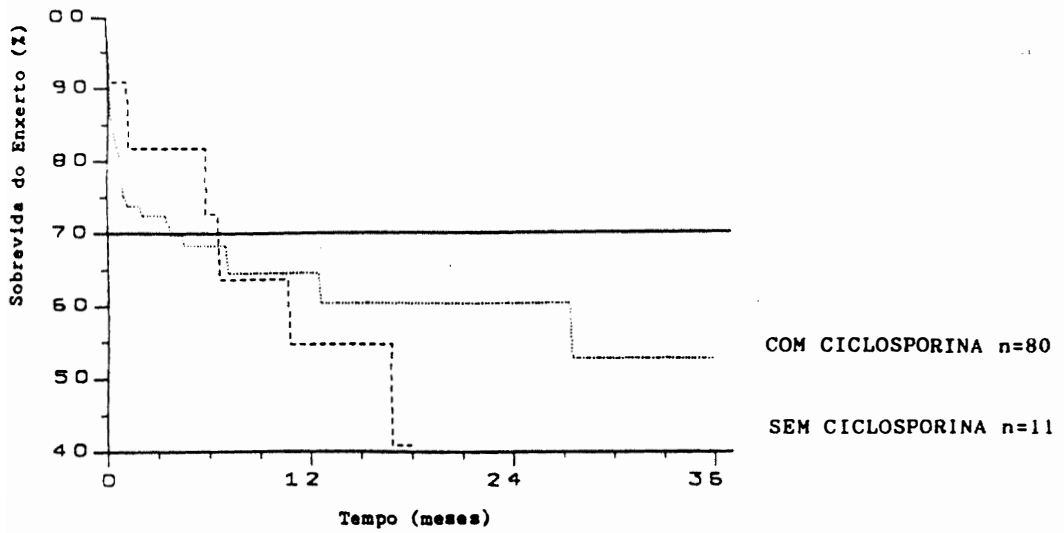
Fig. 3.4. Transplante renal sem Ciclosporina A.



4.3.4. TRANSPLANTE COM DOADOR CADÁVER COM E SEM CICLOSPORINA

As frequências de sobrevida dos enxertos foram de 64.5% e 54.5% no primeiro ano, sendo de 60% e 42% em 15 meses . Não houve diferença significativa entre as curvas.

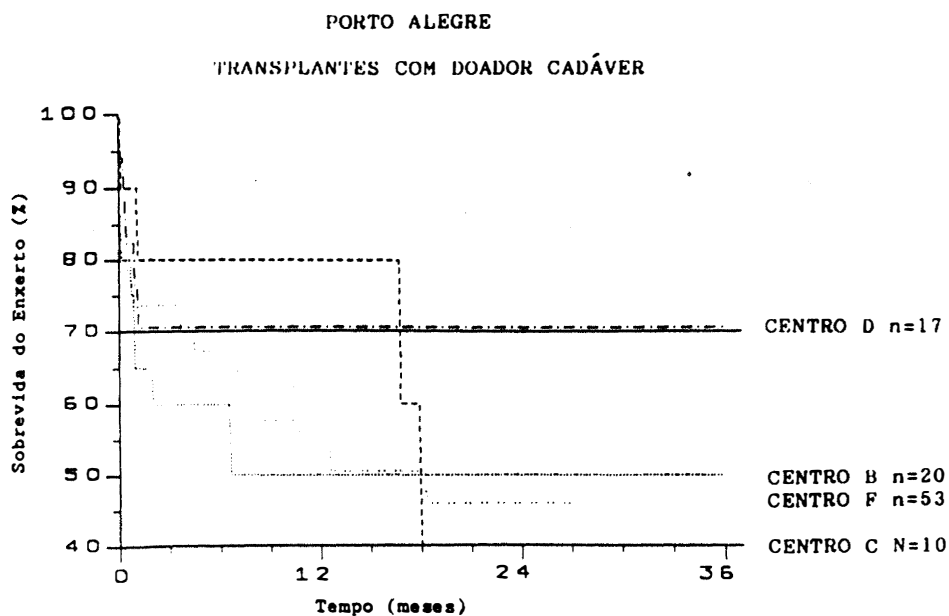
Fig. 4.4. Transplante renal com doador cadáver, com e sem Ciclosporina..



4.3.5. EFEITO DO CENTRO NOS TRANSPLANTES COM DOADOR CADÁVER.

O estudo compara os resultados entre os 4 centros que transplantam em Porto Alegre. O centro B manteve a mesma sobrevida de 50% no 2º e 3º ano. O centro C apresentou poucos transplantes e a melhor sobrevida no 1º ano (80%), mas piorou no 3º ano (40%). O centro F foi o que mais transplantou, com resultados de 55.1% no 1º ano e 39.4% no 3º. O centro D apresentou resultados de 70.6% no 1º e 3º anos. Os resultados para o 2º ano são similares para as equipes B, F e C, não alcançando 50% de sobrevida, enquanto a sobrevida é superior para os centros D e C no primeiro ano (Fig. 5.4).

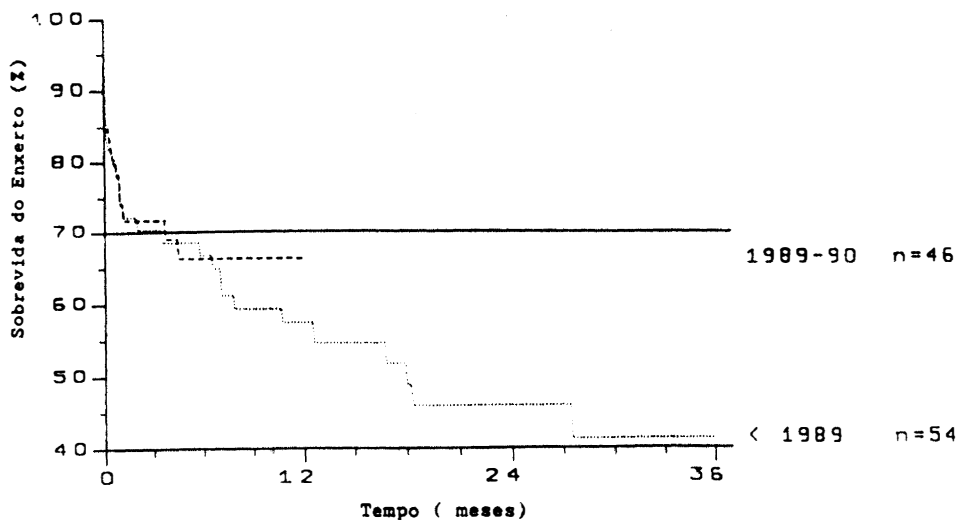
Fig. 5.4. O efeito do centro nos transplantes com doador cadáver.



4.3.6. TRANSPLANTE COM DOADOR CADÁVER ANTES E APÓS A COORDENADORIA DE TRANSPLANTES.

A procura de órgãos em Porto Alegre foi realizada, durante muitos anos, de maneira descentralizada. Cada equipe procurava os seus doadores e preservava os órgãos à sua maneira. A coordenadoria de transplantes proporcionou uma uniformidade de procedimentos que provavelmente trouxe benefícios para os pacientes. Com a intenção de avaliar os primeiros resultados dessa mudança, procurou-se observar diferenças entre os transplantes anteriores a 1989 e após 1989, embora a sobrevida dos últimos não alcance 2 anos (Fig. 6.4.). Os 54 transplantes da fase anterior a 1989 apresentaram uma sobrevida do enxerto de 57.4% e 41.3% no final do 1º e 3º anos. Os realizados após 1989 finalizaram o 1º ano com 66.2%. Não houve diferença estatística, mas a tendência é de provável significância no final do 3º ano.

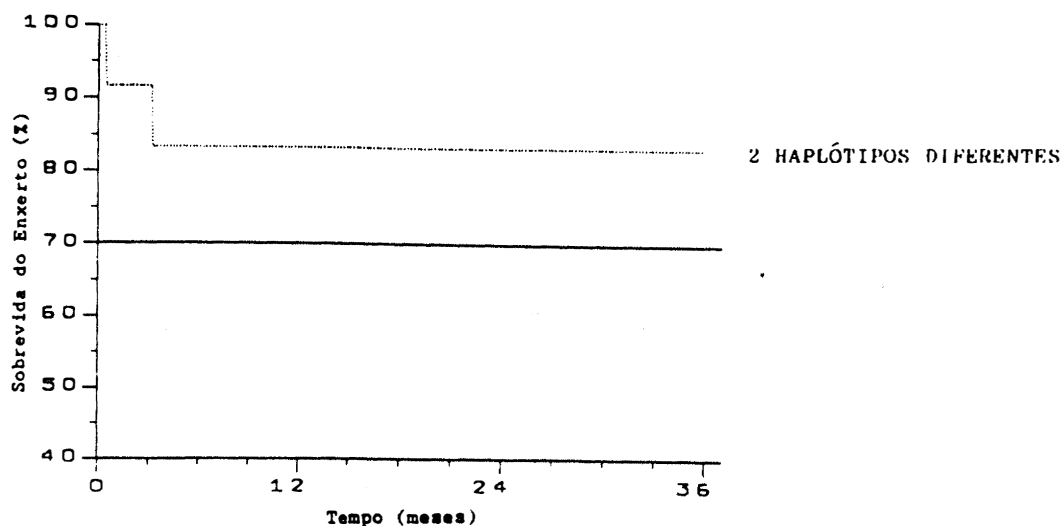
Fig. 6.4. Transplante com doador cadáver antes e após a coordenadoria de transplantes.



4.3.7. TRANSPLANTES COM DOADOR RELACIONADO COM DOIS HAPLÓTIPOS HLA DIFERENTES.

O transplante com doador relacionado (irmãos), mas com nenhuma compatibilidade HLA, deveria apresentar sobrevida do enxerto semelhante à observada nos transplantes com doador cadáver. Os resultados de Porto Alegre não demonstram esta relação, pois os 17 casos apresentaram uma sobrevida de 83.3% durante os primeiros 3 anos, significativamente superior aos resultados com doador cadáver em 3 dos 4 centros transplantadores (Fig. 7.4.).

Fig. 7.4. Transplante com doador relacionado sem compatibilidade HLA.

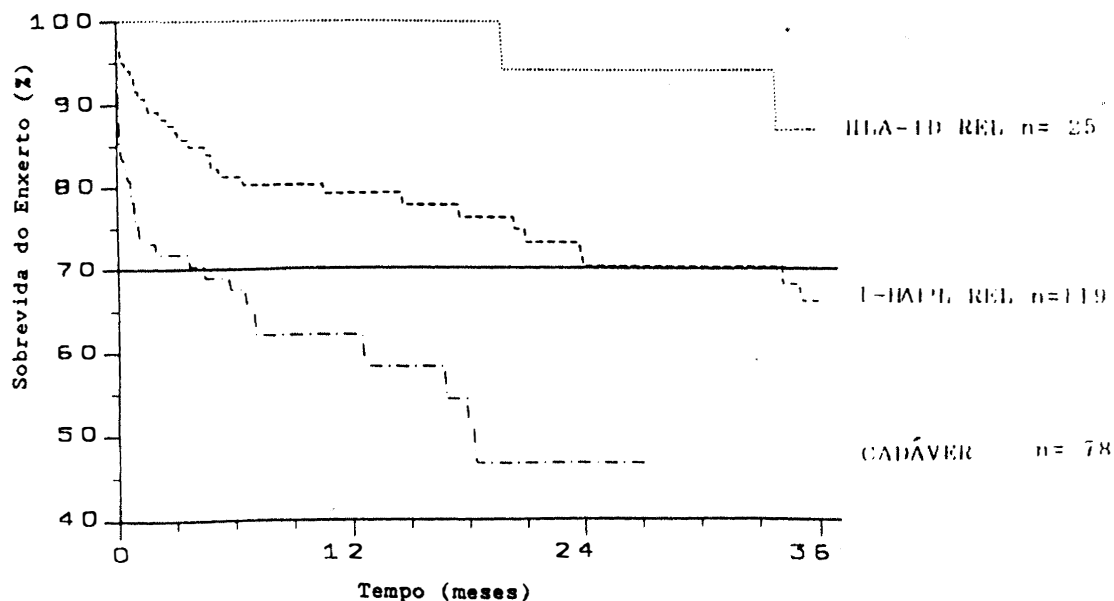


4.3.8. TRANSPLANTES COM RECEPTOR CAUCASÓIDE.

Os transplantes renais em pacientes de raça branca parecem ter melhor sobrevida que na raça negra (capítulo 1.4.5.8.). Para observarmos essa relação foi necessário o cálculo da sobrevida para caucasóides e não caucasóides (Fig. 8.4. e 9.4.). Os transplantes com identidade HLA foram melhores nos caucasóide do que nos de outras raças, tanto no 1º como no 2º ano. O mesmo aconteceu naqueles com 1 haplótipo em comum (relacionados), somente no 3º ano apresentaram resultados semelhantes. Os transplantes com órgãos de cadáver apresentaram melhor sobrevida após o 2º ano da cirurgia em relação aos caucasóides.

As frequências de sobrevida foram de 100%, 79.2% e 62.1% para o 1º ano e de 86.9%, 66.1% para o 3º ano. A sobrevida de 2 anos para órgão de cadáver foi de 45%. A significância aconteceu para a comparação entre a 1ª e 2ª curvas ($p < 0.019$), entre a 1ª e 3ª ($p > 0.00019$) e entre a 2ª e 3ª ($p > 0.0019$).

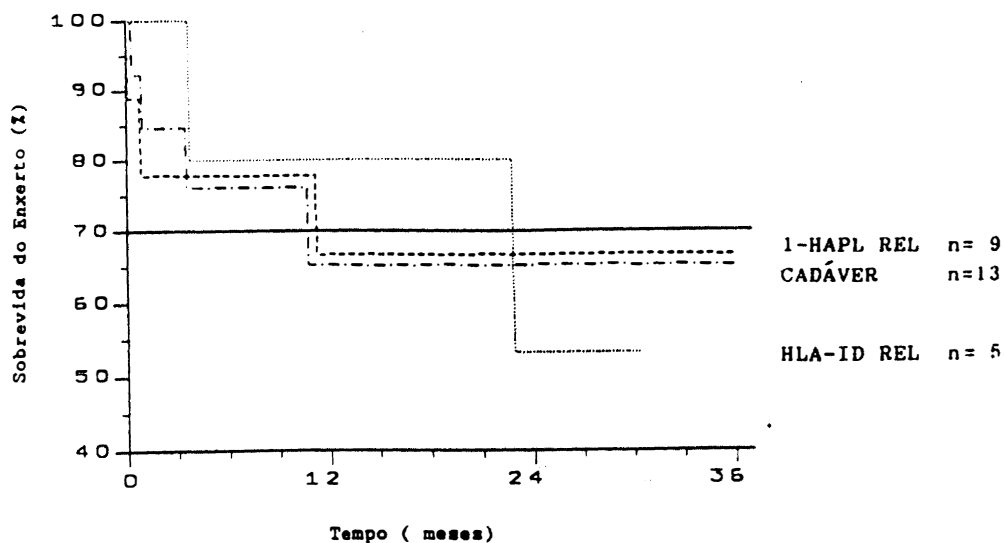
Fig. 8.4. Transplantes com receptor caucasóide.



4.3.9. TRANSPLANTES COM RECEPTOR NÃO CAUCASÓIDE.

As frequências observadas no 1º ano foram de 80%, 66.7% e 65.3%. No 2º ano os HLA idênticos alcançaram 53%, não completando ainda o 3º ano. No 3º ano observou-se 66.7% para os com 1 haplótipo de identidade e 65.3% para os com doador cadáver. (Fig.9.4).

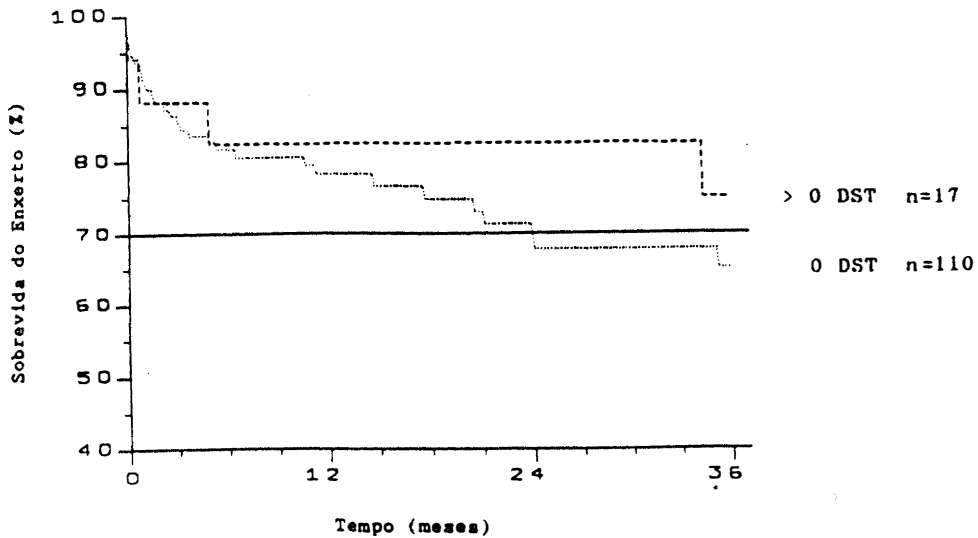
Fig. 9.4. Transplantes com receptor não caucasóide.



4.3.10. TRANSFUSÃO ESPECÍFICA DO DOADOR, 1 HAPLÓTIPO EM COMUM

Este tipo de terapêutica já foi mais popular, sendo que somente 17 receptores realizaram DST. As freqüências de sobrevida no 1º ano foram de 82.4% para os com e 78.3% para os sem DST. No 3º ano observou-se 74.9%, contra 65.1%. Não foi encontrada significância estatística (Fig. 10.4.).

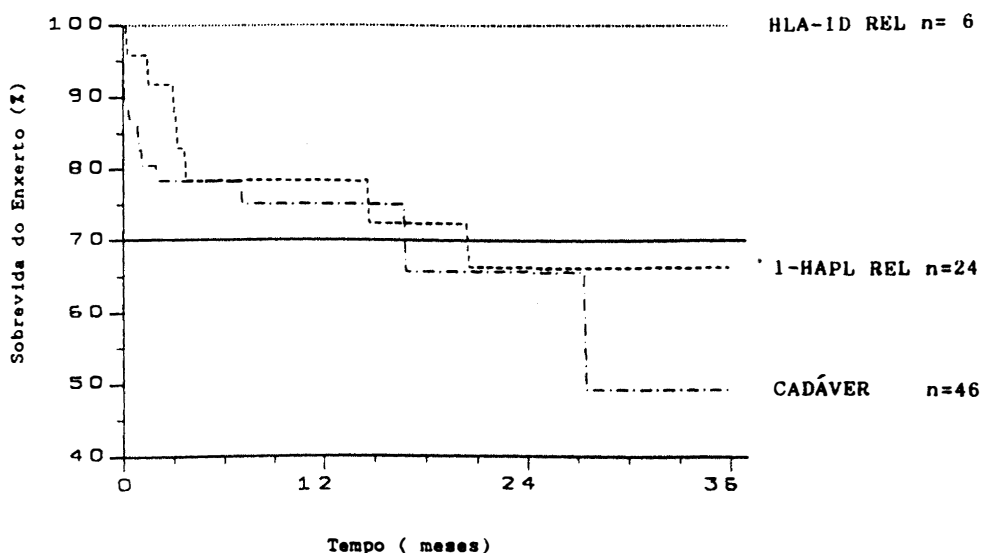
Fig. 10.4. Transplantes após transfusão específica do doador.



4.3.11. IDADE DO RECEPTOR: MAIOR DO QUE 40 ANOS

Os receptores com idade superior a 40 anos tiveram a mesma sobrevida dos mais jovens entre 16 e 40 anos. A única diferença pode ser vista na sobrevida de receptores de rim de cadáver no 1º ano (Fig. 11.4.), quando os receptores mais velhos têm melhor resultado (75% contra 55.4%). Os transplantes nos receptores maiores de 40 anos apresentaram freqüências de sobrevida no primeiro ano de 100%, 78.3% e 75%, enquanto no 3º ano de 100%, 66.2% e 49.2%. As curvas não mostraram significância estatística.

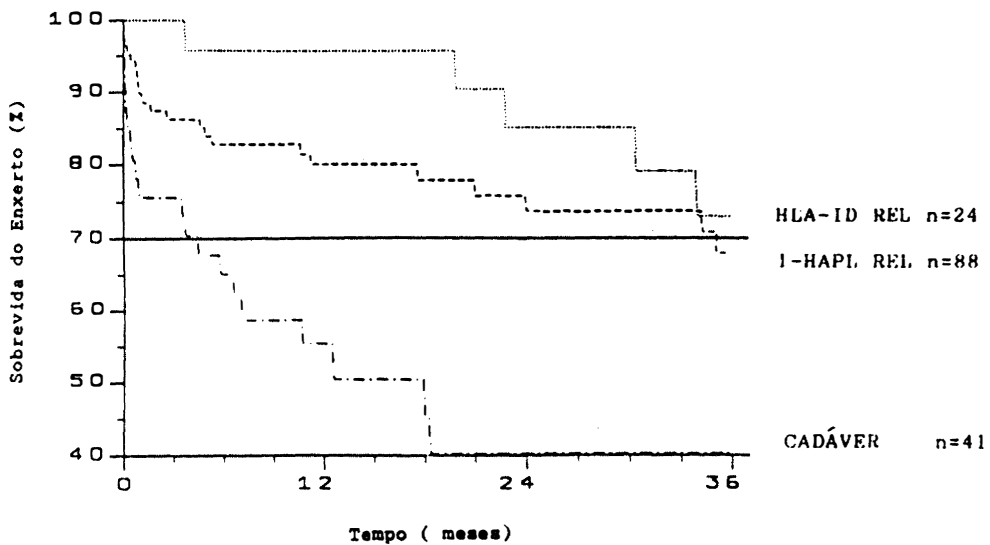
Fig.11.4. Transplantes com receptores maiores de 40 anos.



4.3.12. IDADE DO RECEPTOR ENTRE 16 E 40 ANOS

As frequências de sobrevida foram no 1º ano de 95.8%, 80% e 55.4%, sendo que no 3º ano 73%, 68% e 40.3% (Fig. 12.4.). A significância estatística aconteceu entre a 1ª e 3ª curva ($p>0.0019$) e entre a 2ª e 3ª ($p>0.0019$).

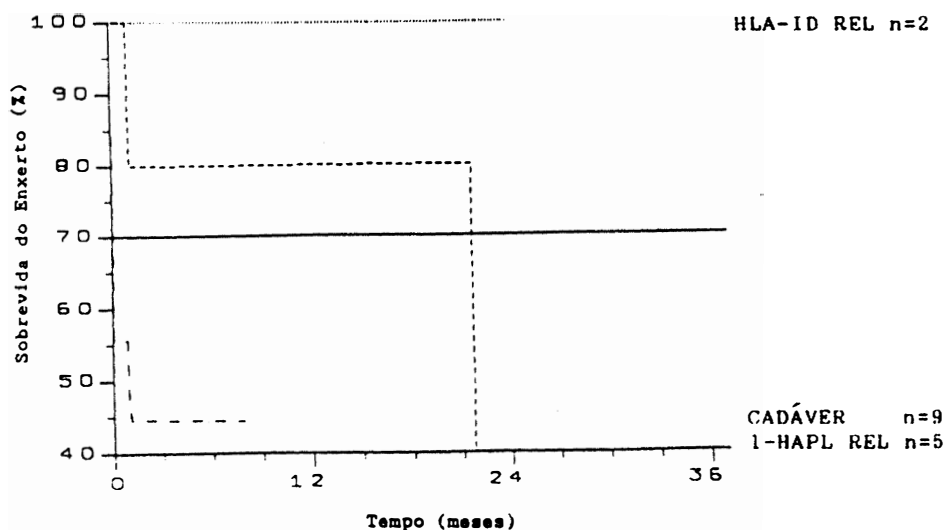
Fig.12.4. Transplantes com receptores entre 16 e 40 anos.



4.3.13. RETRANSPLANTES

Os retransplantes apresentaram no 1º ano freqüências de 100% e 80% para HLA idênticos e 1 haplótipo de identidade. Os com doador cadáver não completaram o 1º ano, mas já mostram sobrevida inferior (Fig 13.4.).

Fig.13.4. Retransplantes



4.3.14. PRIMEIRO TRANSPLANTE, OS PAIS COMO DOADORES.

O efeito do NIMA e PIMA foram discutidos no capítulo 1.4.5.4.. Esse efeito está relacionado a uma possível tolerância por parte dos doadores a antígenos HLA presentes no haplótipo não herdado da mãe. Este fato está relacionado à tolerância "in útero", sendo que na vida adulta não responderíamos adequadamente contra antígenos que tivéssemos contato na vida fetal. Os transplantes com órgãos maternos talvez reproduzisse este efeito descrito por Van Rood (1990). Os resultados obtidos quando os pais foram doadores (tanto mãe como pai) foram de 77.4% e 69.8% no final do 1º e 3º anos respectivamente (Fig.14.4.). Os resultados quando a mãe foi doadora, não são superiores àqueles em que o pai foi o doador, como teoricamente seria de esperar. No primeiro ano a sobrevida é de 75.4% e no 3º de 68.5% (Fig. 15.4.). Quando o pai é o doador as freqüências são de 84.4% e 73.9%, respectivamente. Estatisticamente não existem diferenças entre as curvas de sobrevida.

Fig.14.4. Resultados dos transplantes quando os pais são doadores.

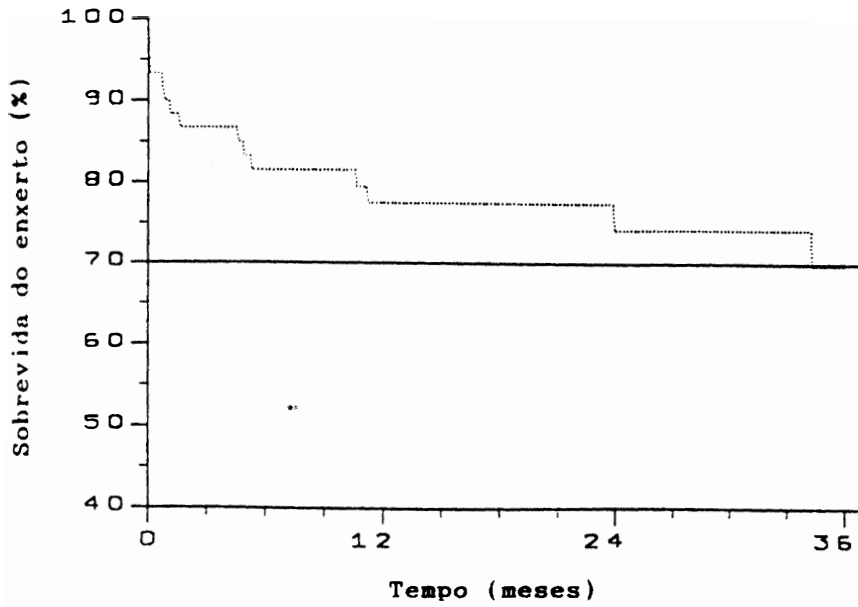
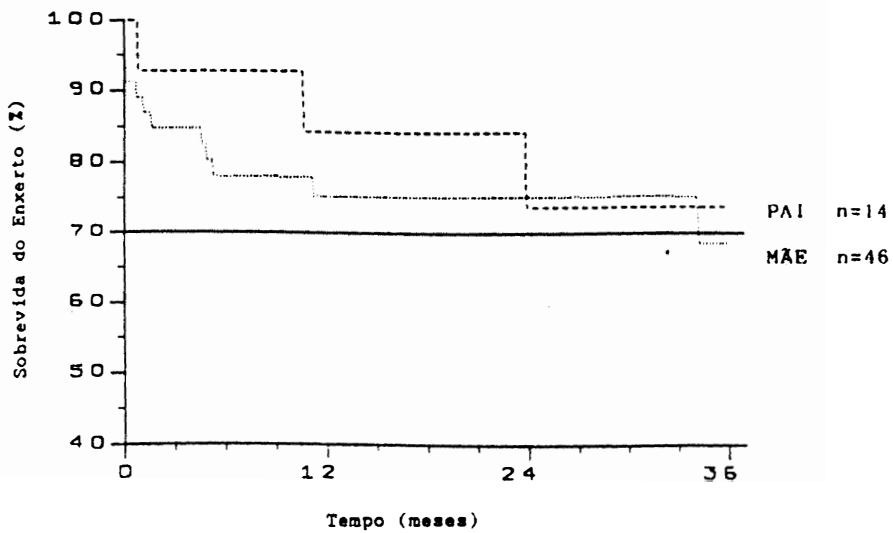


Fig 15.4. Resultados dos transplantes quando a mãe é doadora.



4.4. AVALIAÇÃO DO SISTEMA HLA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.

O risco de um indivíduo vir a contrair uma determinada patologia, associada ao sistema HLA, pode ser calculado estatisticamente. Os resultados do risco relativo indicam quantas vezes a doença é mais, ou menos, freqüente nos indivíduos portadores do gene marcador, do que nos negativos para o mesmo. Os resultados podem indicar susceptibilidade, neutralidade ou proteção. O nível de neutralidade está em torno do número 1, enquanto acima denota susceptibilidade e abaixo proteção.

Os resultados das freqüências de fenótipo e genótipos de pacientes e controles são observados nas tabelas 7.4., 8.4., 9.4., 10.4., 11.4. e 12.4.. Não foram detectadas diferenças significantes positivamente associadas com a LLC, ou seja, não existem alelos HLA mais freqüentes nos pacientes do que nos controles que permitam dizer que existe uma susceptibilidade genética à doença. Por outro lado, encontrou-se uma relação negativa, sugerindo proteção ao desenvolvimento da mesma.

Os alelos HLA-A23, A24 e CW4 estão em freqüência diminuída em relação aos controles normais. Os dois primeiros antígenos são "splits" do HLA-A9, sendo este um dos mais freqüentes e fáceis alelos detectáveis na maioria das raças. O risco relativo do A9 é conseguido somando-se as freqüências de A23 e A24. Sendo assim, observou-se A9 (RR= 0.12, 95% LC= 0.14-0.55, $X^2 = 13.50$ p= 0.001). O valor de "p" foi multiplicado pelo número de alelos estudados

(50 para HLA-A, B) com a intenção de eliminar a casualidade. O antígeno HLA-A24 apresentou um risco relativo negativo, com um X^2 elevado, mas não significativo, quando multiplicado pelo número de alelos (RR= 0.13, 95% LC= 0.16-0.71, X^2 = 8.94, p= ns.), sendo que o mesmo aconteceu com o HLA-A23 (RR 0.24, 95% LC= 0.05-1.09, X^2 = 3.42, p= ns). O alelo CW4 foi significativamente negativo, com a frequência inferior ao grupo controle (RR= 0.40, 95% LC= 0.20-0.78, p= 0.048).

Durante as tipagens HLA para a constituição do painel de linfócitos B, provenientes de indivíduos com LLC, foram selecionados alguns pacientes que não apresentaram HLA-DQ na sua membrana celular, embora exaustivamente testados com diversos anticorpos. Este fato indicava a existência de indivíduos homozigotos para a deficiência deste produto e ocasionou a procura de outros que seriam heterozigotos. Os últimos seriam indivíduos que apresentassem um antígeno HLA-DQ positivo e ausência do outro, embora a tipagem HLA-DR sinalizasse a necessidade de determinado DQ, devido ao desequilíbrio de ligação existente entre os dois locos. Não foram considerados os casos em que a falta do HLA-DQ estivesse relacionada com possível homozigose para o antígeno, podendo ser observado este fato pela tipagem HLA-DR.

A tipagem HLA-DRB1 e DQB1 foi realizada por RFLP. A ausência das moléculas HLA na membrana de linfócitos não foi acompanhada por deleção dos genes HLA-DQ ao nível do DNA. Os estudos com o RFLP demonstraram que todos os pacientes selecionados para a possível deficiência, apresentavam HLA-DQ no

seu DNA (Figuras 16.4. e 17.4.). Foram encontrados dois pacientes homozigotos e 3 heterozigotos para a deficiência de HLA-DQ. Seis pacientes com possível homozigose para a deficiência foram considerados normais, após novamente estudados sorologicamente (Tab. 13.4.).

Tab. 7.4. Antígenos HLA-A e HLA-B em Pacientes com Leucemia Linfática Crônica.

ANTÍGENOS	NUMERO	TOTAL	FENÓTIPO	GENÓTIPO
A1	38	114	33.33	18.35
A2	59	114	51.75	30.54
A3	28	114	24.56	13.14
A11	10	114	8.77	4.49
A23	1	114	0.88	0.44
A24	8	114	7.02	5.57
A25	5	114	4.39	2.22
A26	2	114	1.75	0.88
A28	7	114	6.14	3.12
A29	10	114	8.77	4.49
A30	5	114	4.39	2.22
A31	8	114	7.02	3.57
A32	12	114	10.53	5.41
A33	4	114	3.51	1.77
B7	31	114	27.19	14.67
B8	33	114	28.95	15.71
B13	9	114	7.89	4.03
B14	8	114	7.02	3.57
B15	4	114	3.51	1.77
B16	1	114	0.88	0.44
B17	8	114	7.02	3.57
B18	11	114	9.65	4.95
B22	2	114	1.75	0.88
B27	5	114	4.39	2.22
B35	10	114	8.77	4.49
B37	4	114	3.51	1.77
B38	0	114	0.00	0.00
B39	4	114	3.51	1.77
B40	10	114	8.77	4.49
B41	1	114	0.88	0.44
B42	0	114	0.00	0.00
B44	29	114	25.44	13.65
B45	0	114	0.00	0.00
B49	2	114	1.75	0.88
B50	2	114	1.75	0.88
B51	6	114	5.26	2.67
B52	2	114	1.75	0.88
B53	0	114	0.00	0.00
B55	3	114	2.63	1.32
B56	0	114	0.00	0.00
B57	8	114	7.02	3.57
B58	0	114	0.00	0.00
B59	0	114	0.00	0.00
B60	6	114	5.25	2.67
B61	0	114	0.00	0.00
B62	11	114	9.65	4.95

Fenótipos e genótipos em porcentagem.

Tab. 8.4. Tipagem HLA-C em Pacientes com Leucemia Linfática Crônica

ANTÍGENOS	NUMERO	TOTAL	FENÓTIPO	GENÓTIPO
CW1	1	113	0.88	0.44
CW2	7	113	6.19	3.15
CW3	26	113	23.01	12.26
CW4	10	113	8.85	4.53
CW5	21	113	18.58	9.77
CW6	25	113	22.12	11.75
CW7	33	113	29.20	15.86
CW8	4	113	3.54	1.79

Tab. 9.4. Tipagem DR/DQ em Pacientes com Leucemia Linfática Crônica

ANTÍGENOS	NUMERO	TOTAL	FENÓTIPO	GENÓTIPO
DR1	13	114	11.40	5.87
DR2	24	114	21.05	11.15
DR3	29	114	25.44	13.65
DR4	47	114	41.23	23.34
DR5	2	114	1.75	0.88
DRW6	3	114	2.63	1.32
DR7	28	114	24.56	13.14
DRW8	7	114	6.14	3.12
DR9	1	114	0.88	0.44
DRW10	4	114	3.51	1.77
DRW11	11	114	9.65	4.95
DRW12	5	114	4.39	2.22
DRW13	18	114	15.79	8.23
DRW14	4	114	3.51	1.77
DRW52	61	98	62.24	38.55
DRW53	57	98	58.16	35.32
DQW1	49	98	50.00	30.54
DQW2	37	98	37.76	21.10
DQW3	60	98	61.22	37.87

Fenótipos e genótipos em percentagem.

Tab. 10.4. Tipagem HLA-A, B em Controles Normais

ANTÍGENOS	NUMERO	TOTAL	FENÓTIPO	GENÓTIPO
A1	120	367	32.70	17.96
A2	174	367	47.41	27.48
A3	102	367	27.79	15.03
A11	45	367	12.26	6.33
A23	18	367	4.90	2.48
A24	69	367	18.80	9.89
A25	9	367	2.42	1.23
A26	8	367	2.18	1.10
A28	21	367	5.71	2.90
A29	25	367	6.81	3.47
A30	8	367	2.18	1.10
A31	19	367	5.18	2.62
A32	27	367	7.36	3.75
A33	12	367	3.27	1.65
A34	1	367	0.27	0.14
B7	103	367	28.07	15.19
B8	85	367	23.16	12.34
B13	12	367	3.27	1.65
B14	24	367	6.54	3.33
B15	11	367	3.00	1.51
B16	2	367	0.54	0.27
B17	13	367	3.54	1.79
B18	29	367	7.90	4.03
B21	0	367	0.00	0.00
B22	5	367	1.36	0.68
B27	33	367	8.99	4.60
B35	57	367	15.53	8.09
B37	10	367	2.72	1.37
B38	5	367	1.38	0.37
B39	12	367	3.27	1.65
B40	27	367	7.36	3.75
B41	3	367	0.82	0.41
B42	0	367	0.00	0.00
B44	84	367	22.89	12.19
B45	8	367	2.18	1.10
B49	9	367	2.45	1.23
B50	5	367	1.36	0.68
B51	35	367	9.54	4.89
B52	1	367	2.27	0.14
B53	4	367	1.09	0.55
B54	0	367	0.00	0.00
B55	14	367	3.81	1.93
B56	1	367	0.27	0.14
B57	17	367	4.63	2.34
B58	3	367	0.82	0.41
B59	0	367	0.00	0.00
B60	19	367	5.18	2.62
B61	1	367	0.27	0.14
B62	42	367	11.44	5.90

Tab. 11.4. Tipagem HLA-C em Controles Normais

ANTÍGENOS	NUMERO	TOTAL	FENÓTIPO	GENÓTIPO
CW1	17	366	4.64	2.35
CW2	24	366	6.56	3.33
CW3	100	366	27.32	14.75
CW4	73	366	19.95	10.53
CW5	68	366	18.58	9.77
CW6	47	366	12.84	6.64
CW7	132	366	36.07	20.04
CW8	11	366	3.01	1.51

Tab. 12.4. Tipagem HLA-DR/DQ em Controles Normais

ANTÍGENOS	NUMERO	TOTAL	FENÓTIPO	GENÓTIPO
DR1	68	342	19.88	10.49
DR2	107	342	31.29	17.11
DR3	85	342	24.85	13.31
DR4	115	342	33.63	18.53
DR5	12	342	3.51	1.77
DRW6	44	342	12.87	6.65
DR7	73	342	21.35	11.31
DRW8	12	342	3.51	1.77
DR9	5	342	1.46	0.73
DRW10	1	342	0.29	0.15
DRW11	44	342	12.87	6.65
DRW12	8	342	2.34	1.18
DRW13	28	342	8.19	4.18
DRW14	11	342	3.22	1.62
DRW52	130	202	64.36	40.30
DRW53	106	202	52.48	31.06
DQW1	119	197	60.41	37.08
DQW2	77	197	39.09	21.95
DQW3	110	197	55.80	32.89

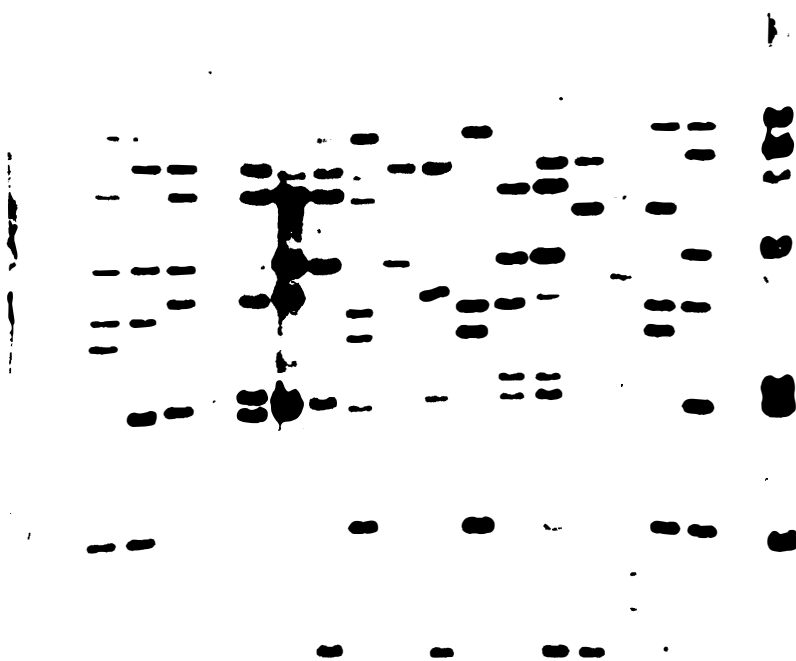
Fenótipos e genótipos em porcentagem.

Tab. 13.4. TIPAGEM HLA DE PACIENTES COM POSSÍVEL DEFICIÊNCIA DQ

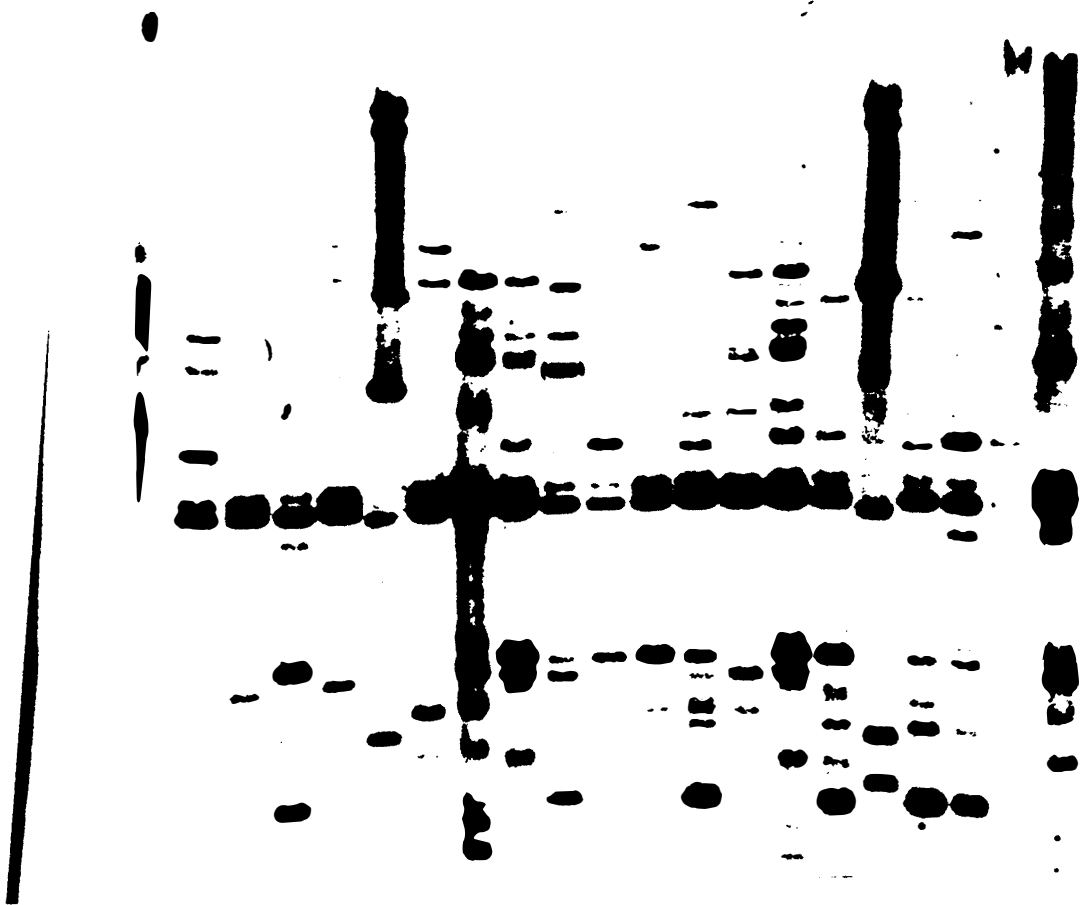
CLL	SOROLOGIA		RFLP		DEFICIÊNCIA
	DR	DQ	DR	DQ	
DAN	2,3	?	15,17	6,2	HOMOZIGOTO
PLA	1	?	1	5	HOMOZIGOTO
HEA	9,13	-,1	9,13	9,6	HETEROZIGOTO
GEL	2,3	1,-	15,17	6,2	HETEROZIGOTO
BRO	7,14	-,5	7,14	9,5	HETEROZIGOTO
DOD	3,4	-,7	17,4	2,7	HETEROZIGOTO
ENE	3,11	2,7	17,11	2,7	NORMAL
FIS	3,13	2,7	17,13	2,7	NORMAL
JEF	4,7	8,(2)	4,7	8,2	NORMAL
PIC	2,13/11	6,7	15,11	6,7	NORMAL
REA	4,?	7,8	4,4	7,8	NORMAL
JON	2,8	6,4	15,8	6,4	NORMAL

Obs. Nesta tabela pode-se observar os indivíduos homozigotos, onde a sorologia não demonstrou reações com anticorpos anti-DQ. Os heterozigotos apresentam somente um HLA-DQ pela sorologia, enquanto os "normais" apresentam dois. Pode-se observar que o teste de RFLP possibilita a identificação dos "splits" de HLA-DR.

FIG. 16.4. SINAIS DE HIBRIDIZAÇÃO COM SONDA cDNA pRTV1 (DRB1)



Obs. As tipagens correspondem aos indivíduos deficientes na expressão de HLA-DQ, assim como alguns indivíduos controles com difícil tipagem sorológica. De acordo com a ordem: RAN (DR4,DRW10); DOD (DRW17,DR4); HEA (DR9,DRW13); ENE (DRW17,DRW11); marcador λ ; SCA (DRW12,DRW13); FIS (DRW17,DRW13); GEL (DR15,DR17); JEF (DR4,DR7); PEN (DR15,DR14); PIC (DRW15,DRW11); REA (DR4,DR4); SHA (DRW17,DRW13); DAN (DRW15,DRW17); JON (DRW15,DRW8); marcador λ ; CHI (DR4,DRW8); BRO (DR7,DRW14); PLA (DR1)fraco, melhor observado no filme de RX; MAS (DR7,DRW12).

FIG. 17.4. SINAIS DE HIBRIDIZAÇÃO COM SONDA cDNA p11- β -1 (DQB1)

Obs. As tipagens correspondem aos mesmos indivíduos da figura anterior. Os sinais com esta sonda são mais difíceis de caracterizar, aparecendo melhor no filme original. RAN (DQW7,DQW5); DOD (DQW7,DQW2); HEA (DQW9,DQW6); ENE (DQW2,DQW7); marcador λ ; SCA (DQW7,DQW6); FIS (DQW2,DQW7); GEL (DQW6,DQW2); JEF (DQW8,DQW2); PEN (DQW5,DQW6); PIC (DQW6,DQW7); REA (DQW7,DQW8); SHA (DQW2,DQW6); DAN (DQW6,DQW2); JON (DQW6,DQW4); MARCADOR λ ; CHI (DQW8,DQW4); BRO (DQW9,DQW5); PLA (DQW6,DQW2); MAS (DQW2,DQW7).

4.5. ESTUDO DO POLIMORFISMO HLA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE: AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO NORTE-AMERICANA DE ORIGEM HISPÂNICA E ANGLO-SAXÔNICA DO ESTADO DO COLORADO.

A análise sorológica demonstrou resultados de interesse no entendimento da DMID na população hispânica do Colorado (Tab. 14.4., 15.4., 16.4., 17.4, 18.4 e 19.4). O HLA-DR3 foi significativamente associado com a doença, tanto nos hispânicos (RR=22.61, limites de confiança 95% (LC)=4.9-102.5, $X^2=22.26$, $p=0.00005$) como nos anglos (RR=3.8, 95% CL= 1.7-8.0, $X^2=12.37$, $p=0.022$). O antígeno HLA-DR4 não foi associado positivamente com a DMID tanto nos anglos, quanto nos Hispânicos. O antígeno HLA-B8 está positivamente associado com a doença em hispânicos (RR=11.10, 95% LC= 3.22-37.71, $p= 0.04$), reforçando a possibilidade da população controle não possuir o haplótipo caucasóide HLA-A1/B8/DR3. Este fato foi confirmado pelo resultado de significante presença deste haplótipo nos pacientes, comparados aos controles (RR= 26.97, 95% LC=13.2-54.8, $p=0.01$). Comparando-se as populações controles, observou-se diferenças nas freqüências dos seguintes alelos: HLA-A24 na população hispânica (31.25%) e Anglo-saxônica (6.06%) ($X^2= 12.70$, $p= 0.0003$); B35 (33.33%) em hispânicos e (13.63%) em Anglos ($X^2= 6.29$, $P= 0.01$); B16(38) (8.33%) em Hispânicos e ausente nos Anglos ($X^2= 5.61$, $P= 0.017$); A3 (12.50%) em Hispânicos e (37.87%) em Anglos ($X^2= 9.04$, $P= 0.002$); B8 (2.08%) em Hispânicos e 27.27% em Anglos ($X^2= 12.70$, $P= 0.0003$); DR3 (2.08%) em Hispânicos e (19.40%) em Anglos

($X^2 = 7.84$, $P=0.005$); DQW6 (8.33%) em Hispânicos e (29.85%) em Anglos ($X^2=7.84$, $P= 0.005$) (Tab. 22.4, 23.4, 24.4., 25.4 e 26.4).

A tipagem com oligonucleotídios (Tab. 20.4. e 21.4.) demonstrou uma associação positiva com DQW8 (RR=6.63, 95% LC=2.8-15.3, $p=0.0005$) e A3 (RR=6.83, 95% LC=2.8-16.1, $p=0.0005$) nos pacientes hispânicos e com somente A3 (RR=3.61, 95% LC=1.7-7.3, $p=0.016$) nos anglos. Resultados marginais (não significantes) foram obtidos com DQW2 na primeira e com DQW2 e DQW8 na segunda população. O haplótipo DR3/DQW2/A4 foi significativamente associado à DMID nos hispânicos (RR= 13.30, 95% LC= 2.8-60.3, $p=0.004$) e a importante combinação de DR3-A3 foi associada com a doença, tanto nos hispânicos (RR= 9.96, 95%, CL= 3.4-28.7, $P= 0.001$), quanto nos anglos (RR= 5.52, 95% CL= 7.6-44.6, $P= 0.001$).

Os alelos HLA com associação significativamente negativa com a doença nos hispânicos foram DR5 e DQW7, enquanto DQW6 aconteceu nos anglos. Resultados marginais (não significantes) foram DR2 e A1 nos primeiros e DR2, DR5 e DQW7 nos segundos.

Todos os pacientes hispânicos e 96% dos anglos apresentaram um ou ambos alelos com aminoácido não Asp na posição 57 de DQB, enquanto que nos controles observou-se 80% e 84%, respectivamente (RR= 24.62, 95% LC=2.45-244.69, $p=0.002$; RR= 3.55, 95% LC= 0.64-19.2, $p= 0.14$). Nos hispânicos diabéticos, 90% dos haplótipos não apresentaram Asp na posição 57, assim como 85% dos anglos. Nos controles esta frequência foi de 66% .

Tab. 14.4.. Freqüência dos antígenos HLA-A nos pacientes Hispânicos portadores de DMID e controles normais.

HLA-A	Pacientes (51)	Controles (48)	RR	95% LC	P
1	23.52	18.75	1.31	-	NS
2	50.98	47.91	1.12	-	NS
3	11.76	12.50	0.93	-	NS
11	7.84	8.33	0.93	-	NS
23 (9)	3.92	4.16	0.93	-	NS
24 (9)	31.37	31.25	1.00	-	NS
25 (10)	3.92	4.16	0.93	-	NS
26 (10)	7.84	6.25	1.23	-	NS
28	11.76	12.50	0.93	-	NS
29 (19)	3.92	10.41	0.40	-	NS
30 (19)	5.88	2.08	2.28	-	NS
31 (19)	15.68	12.50	1.27	-	NS
32 (19)	1.96	4.16	0.55	-	NS
33 (19)	5.88	2.08	2.28	-	NS

NS= não significante, RR= risco relativo
95% LC= 95% limites de confiança

Tab. 15.4. Freqüências dos antígenos HLA-A nos pacientes Anglos portadores de DMID e controles.

HLA-A	Pacientes (64)	Controles (66)	RR	95% LC	P
1	34.37	28.78	1.28		NS
2	60.93	54.54	1.29		NS
3	21.87	37.87	0.46		NS
11	6.25	12.12	0.59		NS
23 (9)	3.12	4.54	0.72		NS
24 (9)	9.37	6.06	1.54		NS
25 (10)	7.81	6.06	1.28		NS
26 (10)	4.68	3.03	1.46		NS
28	7.81	6.06	1.28		NS
29 (19)	4.68	9.09	0.52		NS
30 (19)	3.12	3.03	1.03		NS
31 (19)	9.37	9.09	1.03		NS
32 (19)	1.56	1.51	1.03		NS
33 (19)	0	0	-		-

NS= não significante, RR= risco relativo
95% LC= 95% limites de confiança

Tab. 16.4. Frequências dos antígenos HLA-B nos pacientes Hispânicos portadores de DMID e controles normais.

HLA-B	Pacientes (51)	Controles (48)	RR	95% LC	P
7	13.72	12.50	1.10	-	NS
8	25.49	2.08	11.10	3.22-37.71	0.04
13	3.92	6.25	0.65	-	NS
14	7.84	8.33	0.93	-	NS
18	7.84	8.33	0.93	-	NS
22	0	0	-	-	-
27	9.80	6.25	1.53	-	NS
35	11.76	33.33	0.28	-	NS
37	1.96	2.08	0.93	-	NS
38 (16)	5.88	8.33	0.71	-	NS
39 (16)	7.84	4.16	1.76	-	NS
41	3.92	2.08	1.59	-	NS
42	0	0	-	-	-
44 (12)	15.68	25.00	0.57	-	NS
45 (12)	1.96	4.16	0.55	-	NS
46	0	0	-	-	-
47	1.96	2.08	0.93	-	NS
48	3.92	4.16	0.93	-	NS
49 (21)	1.96	2.08	0.93	-	NS
50 (21)	17.64	0	22.20	-	NS
51 (5)	9.80	4.16	2.20	-	NS
52 (5)	3.92	2.08	1.59	-	NS
53	0	2.08	0.30	-	NS
57 (17)	0	4.16	0.17	-	NS
58 (17)	5.88	2.08	2.28	-	NS
60 (40)	5.88	2.08	2.28	-	NS
61 (40)	3.92	0	4.89	-	NS
62 (15)	1.96	6.25	0.38	-	NS
75 (15)	1.96	2.08	0.94	-	NS

NS= não significante, RR= risco relativo

95% LC= 95% limites de confiança

Tab. 17.4. Frequências dos antígenos HLA-B nos pacientes Anglos portadores de DMID e controles normais.

HLA-B	Pacientes (64)	Controles (66)	RR	95% LC	P
7	14.06	27.27	0.44		NS
8	40.62	27.27	1.80		NS
13	3.12	4.54	0.72		NS
14	6.25	6.06	1.03		NS
18	9.37	10.60	0.88		NS
22	0	0	-		-
27	3.12	6.06	0.55		NS
35	12.50	13.63	0.91		NS
37	1.56	1.51	1.03		NS
38 (16)	0	0	-		-
39 (16)	4.68	0	7.56		NS
41	1.56	1.51	1.03		NS
42	0	0	-		-
44 (12)	18.75	27.27	0.62		NS
45 (12)	0	0	-		-
46	0	0	-		-
47	3.12	1.51	1.74		NS
48	3.12	0	5.32		NS
49 (21)	1.56	4.54	0.42		NS
50 (21)	6.25	1.51	3.24		NS
51 (5)	1.56	6.06	0.32		NS
52 (5)	1.56	4.54	0.42		NS
53	1.56	0	3.14		NS
57 (17)	0	4.54	0.14		NS
58 (17)	6.25	0	3.04		NS
59	0	1.51	0.33		NS
60 (40)	7.81	10.60	0.73		NS
61 (40)	3.12	3.03	1.03		NS
62 (15)	23.43	10.60	2.48		NS
75 (15)	3.12	1.51	1.74		NS

NS= não significante, RR= risco relativo

95% LC= 95% limites de confiança

Tab. 18.4. Frequências dos antígenos HLA-DR nos pacientes Hispânicos portadores de DMID e controles normais.

HLA-DR	Pacientes (53)	Controles (48)	RR	95% LC	P
1	15.00	12.50	1.22		NS
2	3.77	16.66	0.23		NS
3	41.50	2.08	22.61	4.9-102.5	0.00005
4	60.37	31.25	3.26		NS
5	5.66	33.39	0.13	0.03-0.42	0.019
6 (13)	0	6.25	0.12		NS
6 (14)	3.77	6.25	0.63		NS
7	11.32	22.91	0.44		NS
8	0	2.08	0.29		NS
9	1.88	0	2.77		NS
10	0	2.08	0.29		NS

NS= não significante, RR= risco relativo

95% LC= 95% limites de confiança

Tab. 19.4. Frequências dos antígenos HLA-DR nos pacientes Anglos portadores de DMID e controles normais.

HLA-DR	Pacientes (64)	Controles (67)	RR	95% LC	P
1	7.81	7.46	1.05		NS
2	3.12	17.91	0.16		NS
3	48.43	19.40	3.80	1.7-8.0	0.022
4	60.93	34.32	2.93		NS
5	6.25	17.91	0.70		NS
6 (13)	1.56	7.46	0.26		NS
6 (14)	3.12	4.47	0.73		NS
7	23.43	19.40	1.26		NS
8	4.68	5.97	0.80		NS
9	1.56	1.49	1.04		NS
10	0	0	-		NS

NS= não significante, RR= risco relativo

95% LC= 95% limites de confiança

Capítulo 4.

Tab. 20.4. Frequências dos alelos HLA-DQA1 e DQB1 nos pacientes Hispânicos portadores de DMID e controles normais.

HLA	Pacientes (53)	Controles (48)	RR	95% LC	P
DQA1					
A1	20.75	39.58	0.40		NS
A2	11.32	22.91	0.44		NS
A3	81.13	37.50	6.83	2.8-16.1	0.000
A4	54.71	54.16	1.02		NS
DQB1					
DQW2	58.49	31.25	3.02		NS
DQW4	3.77	4.16	1.00		NS
DQW5	13.20	22.91	0.52		NS
DQW6	1.88	8.33	0.28		NS
DQW7	16.98	47.91	0.23	0.09-0.55	0.04
DQW8	69.81	25.00	6.63	2.8-15.3	0.000
DQW9	7.54	0	8.81		NS

NS= não significativa, RR= risco relativo
95% LC= 95% limites de confiança

Tab. 21.4. Frequências dos alelos HLA-DQA1 e DQB1 nos pacientes Anglos e controles.

HLA	Pacientes (64)	Controles (67)	RR	95% LC	P
DQA1					
A1	31.25	56.71	0.35		N
A2	18.75	23.88	0.74		NS
A3	68.75	37.31	3.61	1.7-7.3	0.01
A4	59.37	44.77	1.78		NS
DQB1					
DQW2	62.50	43.28	2.15		NS
DQW4	6.25	4.47	1.37		NS
DQW5	25.00	19.40	1.37		NS
DQW6	1.56	29.85	0.05	0.01-0.22	0.000
DQW7	15.62	34.32	0.36		NS
DQW8	46.87	23.88	2.75		NS
DQW9	0	1.49	0.34		NS

NS= não significativa, RR= risco relativo
95% LC= 95% limites de confiança

Tab. 22.4. Freqüências dos antígenos HLA-A na população de controles Hispânicos e Anglos.

HLA-A	Hispânicos (48)	Anglos (66)	X ²	P
1	18.75	28.78	1.51	NS
2	47.91	54.54	0.48	NS
3	12.50	37.87	9.04	0.002
11	8.33	12.12	0.42	NS
23 (9)	4.16	4.54	0.95	NS
24 (9)	31.25	6.06	12.70	0.0003
25 (10)	4.16	6.06	0.19	NS
26 (10)	6.25	3.03	0.68	NS
28	12.50	6.06	1.44	NS
29 (19)	10.41	9.09	0.56	NS
30 (19)	2.08	3.03	0.97	NS
31 (19)	12.50	9.09	0.34	NS
32 (19)	4.16	1.51	1.38	NS
33 (19)	2.08	0	1.38	NS

NS= não significante

Tab. 23.4. Frequências dos antígenos HLA-B na população de controles Hispânicos e Anglos.

HLA-B	Hispânicos (48)	Anglos (66)	X ²	P
7	12.5	27.27	3.64	NS
8	2.08	27.27	12.70	0.0003
13	6.25	4.54	0.16	NS
14	8.33	6.06	0.22	NS
18	8.33	10.60	0.16	NS
27	6.25	6.06	0.96	NS
35	33.33	13.63	6.29	0.01
37	2.08	1.51	0.52	NS
38 (16)	8.33	0	5.61	0.017
39 (16)	4.16	0	2.79	NS
41	2.08	1.51	0.52	NS
44 (12)	25.00	27.27	0.74	NS
45 (12)	4.16	0	2.79	NS
47	2.08	1.51	0.52	NS
48	4.16	0	2.79	NS
49 (21)	2.08	4.54	0.49	NS
50 (21)	0	1.51	0.73	NS
51 (5)	4.16	6.06	0.19	NS
52 (5)	2.08	4.54	0.49	NS
53	2.08	0	1.38	NS
57 (17)	4.16	4.54	0.95	NS
58 (17)	2.08	0	1.38	NS
59	0	1.51	0.73	NS
60 (40)	2.08	10.60	3.09	NS
61 (40)	0	3.03	1.48	NS
62 (15)	6.25	10.60	0.65	NS
63 (15)	2.08	0	1.38	NS
75 (15)	2.08	1.51	0.52	NS

NS= não significante.

Tab. 24.4. Freqüências dos antígenos HLA-DR na população de controles Hispânicos e Anglos.

HLA-DR	Hispânicos (48)	Anglos (67)	X ²	P
1	12.50	7.46	0.82	NS
2	16.66	17.91	0.30	NS
3	2.08	19.40	7.84	0.005
4	31.25	34.32	0.11	NS
5	33.39	17.91	3.60	NS
6 (13)	6.25	7.46	0.63	NS
6 (14)	6.25	4.47	0.17	NS
7	22.9	19.40	0.20	NS
8	2.08	5.87	1.01	NS
9	0	1.49	0.72	NS
10	2.08	0	1.40	NS

Tab. 25.4. Frequências dos antígenos HLA-DQB1 na população de controles Hispânicos e Anglos.

HLA-DQB1	Hispânicos (48)	Anglos (67)	X ²	P
DQW2	31.25	43.28	1.71	NS
DQW4	4.16	4.47	0.65	NS
DQW5	22.91	19.40	0.20	NS
DQW6	8.33	29.85	7.84	0.005
DQW7	47.91	34.32	2.15	NS
DQW8	25.00	23.88	0.19	NS
DQW9	0	1.49	0.72	NS

NS= não significante

Tab. 26.4. Frequências dos antígenos HLA-DQA1 na população de controles Hispânicos e Anglos.

HLA-DQA1	Hispânicos (48)	Anglos (67)	X ²	P
A1	39.58	56.70	3.28	NS
A2	22.91	23.88	0.14	NS
A3	37.50	37.31	0.41	NS
A4	54.16	44.77	0.98	NS

NS= não significante

DISCUSSÃO

5.1. IDENTIFICAÇÃO E CÁRACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA EXTRAÍDOS DE PLACENTAS HUMANAS.

O valor deste trabalho com placentas está relacionado ao aspecto prático da identificação dos anticorpos anti-HLA. Os 82 anticorpos anti-HLA identificados proporcionaram a organização de um banco de reagentes, possibilitando o intercâmbio internacional com outros laboratórios e, assim, cobrir as especificidades não conseguidas durante esta pesquisa. Devemos ressaltar que esta atividade deve ser contínua nos laboratórios que desejam participar nos estudos de transplantes e nos de relação do HLA com doenças. A utilização das placentas como fonte de anticorpos foi adequada, pois proporcionou volumes apreciáveis de reagentes, sendo que muitas vezes foi possível diluir alguns desses soros. Essa foi a única maneira encontrada de manter o intercâmbio, pois no passado utilizávamos coleta de sangue (20 ml) no pré-parto e, na maioria das vezes, ficávamos somente com esta amostra. O volume obtido com o soro extraído de placenta corresponde a pelo menos seis vezes o correspondente a coleta

anterior.

Nossos resultados contrariam parcialmente a publicação que coloca o antígeno HLA-A10 como o "mais" e o A3 com o "menos" imunogênico (Tovey, 1973), pois não identificamos nenhum anticorpo contra o primeiro, assim como caracterizamos dois excelentes anti-HLA-A3. Foi possível, entretanto encontrar a freqüência elevada do A2 e B35, confirmando os trabalhos anteriores (Ahrons, 1971, Bertrans, 1971 e Kissmeyer Nielsen, 1970). A freqüência elevada nas mulheres com maior número de gestações era de se esperar, entretanto as primíparas também produzem anticorpos e com maior chance de serem monoespecíficos.

5.2. INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE NO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS DA UTILIZAÇÃO DA IMUNOGENÉTICA HLA.

A análise de 866 casos de investigação de paternidade (Davey, 1984) é a melhor coletânea de informações sobre os resultados desta metodologia aplicada à Medicina Legal. Alguns pontos dos resultados do RS são comparáveis a este estudo. A freqüência da exclusão de paternidade é a mesma, embora em populações diferentes: 22% e 21%. Esse fato tem interesse, pois os juízes ficam alertados para o número de falsas acusações que acontecem em nosso meio. Nossos resultados são superiores aos de Davey, em relação à freqüência com que o HLA possibilitou índices superiores a 95% de probabilidade relativa de paternidade (64% contra 42%). Outro fato que chamou a atenção, é que combinando o HLA com grupos sanguíneos tivemos 98% dos casos acima de 95%

de probabilidade cumulativa de paternidade, contra 69% de Davey. A explicação para essas diferenças talvez seja a de que todos os nossos investigados eram caucasóides, enquanto na outra amostra existiam 40% de indivíduos de raça negra (sabidamente de mais difícil tipagem HLA). Estes dados também podem ficar mais próximos com o aumento de nossa amostra.

Um fato interessante é o tipo de comportamento encontrado quanto ao nome do filho. Em 30% dos casos de "inclusão" da paternidade, as mães deram nomes que, se não o mesmo, sugeriam o nome do pai, sendo que o mesmo não foi observado nos casos de exclusão, embora em número reduzido.

A idade média das mães foi de 29 anos (15-42) e a dos pais de 36 anos (16-70). No grupo de exclusão a idade média das mães foi a mesma, sendo a dos acusados de 44 anos (diferença não significativa).

Não foi possível alcançar o resultado "acima de 95%" (forte probabilidade), em somente um caso, dentre as 66 avaliações, pois a probabilidade cumulativa de paternidade foi de 92%, sendo utilizado como "provável paternidade".

O sistema HLA demonstrou ser de imenso valor na investigação de paternidade no RS, sendo que a utilização de métodos moleculares pode ser necessária numa minoria de casos e, para tanto, os métodos de RFLP ou de tipagem com oligonucleotídios sintéticos utilizados nos próximos capítulos, serão futuramente associados aos métodos atuais.

5.3. RESULTADOS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NO RIO GRANDE DO SUL

Os transplantes com doador relacionado HLA idêntico (30) apresentaram sobrevida do enxerto de 96.7% para o 1º ano e 75.4% para o 3º. O número maior de perdas aconteceu após o 2º ano da cirurgia. A maioria desses pacientes não fizeram uso de Ciclosporina. Quatro outros pacientes utilizaram esta droga, observando-se sobrevida de 75% no 1º e 2º ano. A sobrevida dos primeiros 30 é satisfatória para o primeiro ano, sendo que poderia ter alcançado valores melhores para o 3º ano. A comparação é com o registro da UCLA, onde os mesmos pacientes obtêm 78% no 5º ano de transplante. No registro brasileiro este tipo de paciente alcança 97% no 1º ano e 90% no 2º (Sesso, 1990)

Os transplantes com doador relacionado com 1 haplótipo HLA de diferença (128) tiveram sobrevida do enxerto de 78.2% no 1º ano e 65.9% no 3º ano. Os resultados são referentes aos transplantes com e sem Ciclosporina, sendo, portanto, difíceis de comentar. Esse grupo de pacientes, no registro brasileiro, apresenta resultados de 82% e 75% para o 1º e 2º ano.

Os resultados da sobrevida do enxerto nos transplantes com doador cadáver (91) foram de 62.5% para o 1º ano e 43.9% para o 3º. Este grupo de pacientes também utilizou diferentes tipos de imunossupressão e seus resultados não são dos melhores. Os resultados do registro brasileiro são de 74% e 65% para o 1º e 2º ano.

A comparação dos transplantes com e sem ciclosporina (Tab. 4.3.2. e 4.3.3.) demonstra resultados únicos em relação aos que

receberam rins de doadores relacionados com um haplótipo de diferença (parcialmente idênticos). Esses pacientes tiveram uma sobrevida do órgão de 76% no 1º ano e 56% no 2º (grupo com Ciclosporina), sendo de 79% e 70.7% (grupo sem ciclosporina). A sobrevida no 2º ano é inferior no grupo que usa a Ciclosporina ($p=0.06$), justamente o contrário do esperado. Os resultados dos pacientes sem ciclosporina são estatisticamente semelhantes aos dos registros brasileiros.

Os receptores de rins de cadáver que usaram a Ciclosporina (Tab. 4.3.4.) tiveram sobrevidas de 64.5% e 52.7% no 1º e 3º ano de transplante, enquanto os que não usaram este medicamento, 54.5% e 42% em 12 meses e 15 meses após o transplante ($p=NS$). Os resultados para as sobrevidas com ciclosporina do John Radcliffe Hospital da Universidade de Oxford, são de 61% para o 1º e 2º anos de transplante com doador cadáver sem compatibilidade HLA e de 95% quando com compatibilidade HLA (Ting, 1986). Resultados superiores são encontrados em diversos outros trabalhos, como o do Montefiori Medical Center em Nova York (Matas, 1988) onde a sobrevida dos enxertos de indivíduos transplantados sem compatibilidade HLA foi de 85% e 75% para o 1º e 3º anos pós-transplante. Neste mesmo centro de Nova York observa-se sobrevida menor, quando não é utilizada a Ciclosporina, 48% e 37% para o 1º e 3º ano, respectivamente. Os resultados com uso de Ciclosporina do Collaborative Transplant Study (CTS) são de 85% de sobrevida no 1º ano para os enxertos com identidade HLA-A,B,DR e 73% para os com nenhuma identidade (Opelz, 1988).

Uma grande polêmica existe entre alguns centros como o do

Montefiori e o CTS em relação à necessidade de compatibilidade para os transplantes com doador cadáver na era da Ciclosporina. Os primeiros dizem que seus resultados, sem compatibilidade, são semelhantes àqueles com compatibilidade dos estudos que envolvem múltiplos centros. Reforçam seus resultados, as ponderações a respeito de que os antígenos HLA não são bem definidos nos negros e outras minorias, e que o número de doações é pequeno nesses grupos. O fato é que 35% dos pacientes na primeira instituição são negros e somente 8% destes são transplantados com rins de doadores da mesma raça.

Recentemente, discute-se a hipótese de que a imunossupressão é melhor realizada nos centros mais experientes que realizam grande número de transplantes e onde o efeito HLA não é observado. Insuficiente indução de imunossupressão, pode fazer com que as diferenças aloantigênicas fiquem mais evidentes, o que pode ser o caso dos estudos de múltiplos centros (Burdick, 1991).

A opinião internacional predominante, embora a existência de fortes argumentos como os apresentados, é a de que a compatibilidade HLA-DR proporciona um acréscimo em 10% na sobrevida de transplantes com ou sem Ciclosporina (Opelz, 1988).

Os transplantes entre irmãos totalmente diferentes no sistema HLA (Tab. 4.3.7.) apresentaram uma sobrevida de 83.3% no 1º ano, mantendo esta frequência até o final do 3º. Este resultado contrasta com o dos irmãos com identidade parcial, comentado acima, entretanto o número de pacientes é muito pequeno neste último caso. Estes resultados sugerem que a indução da imunossupressão pode ter sido mais efetiva neste grupo de

pacientes, devido a serem relacionados, sem compatibilidade HLA.

O efeito do centro transplantador pode ser sugerido existir entre as 4 equipes de Porto Alegre (Tab. 4.3.5.), em relação aos transplantes com órgãos de cadáver, visto que uma alcança a sobrevida de 70.6% no 1º e 3º ano, enquanto as demais equipes não alcançam 50% no 2º ano. Um fato interessante é que a equipe com os melhores resultados teve seus insucessos nos primeiros 4 meses dos transplantes, sendo que a partir desse momento não apresentou nenhuma diminuição na sobrevida.

A tentativa de observar os primeiros resultados positivos da procura de órgãos por intermédio da coordenação de transplante (Tab. 4.3.6.) demonstrou que, antes de 1989, a sobrevida foi de 57.4% e 41.3% para o 1º e 3º ano, enquanto que após 1989, chegou a 66.2% no 1º ano. Esse resultado, sem validade estatística, denota uma tendência de melhora da sobrevida nos transplantes com órgãos de cadáver.

Os receptores HLA idênticos de raça branca têm melhores resultados do que os de raça negra, embora os últimos sejam em número pequeno (5). Outra diferença aconteceu em favor dos receptores de raça negra (13), apresentando uma sobrevida do enxerto de cadáver de 65.3% após o 2º ano, contra a de 45% para o 2º ano de receptores caucásicos (78)(p=NS).

O efeito da transfusão específica do doador não foi observado com significância estatística, favorável aos que receberam este tipo de transfusão deliberada. Os 17 pacientes que realizaram DST apresentaram uma sobrevida após 3 anos de 78.3% contra 65.1% dos 110 pacientes sem DST.

Os pacientes com idade superior a 40 anos apresentaram melhor sobrevida com órgãos HLA idênticos, mas este fato pode ser explicado pelo número pequeno de indivíduos (6), contra os de idade entre 16 e 40 anos (24). Os transplantes com doador cadáver tiveram maior sucesso entre o grupo mais velho (46), sendo 75% no 1º ano e 49.2% no 3º, enquanto os mais jovens (41) apresentaram 55.4% e 40.3% ($p=NS$).

Os retransplantes foram muito poucos (16), não possibilitando maiores comparações, entretanto os 2 pacientes HLA idênticos tiveram uma sobrevida de 100% para o 1º e 2º ano (Tab. 4.3.13.). Os realizados com órgãos de cadáver ainda não alcançaram o 1º ano, mas já mostram sobrevida do órgão menor de 50%.

Os transplantes que tiveram os pais como doadores foram razoavelmente bem sucedidos, com sobrevida de 77.4% e 69.8% para o 1º ano e 3º ano. Os resultados tendo a mãe como doadora não foram superiores áqueles em que o pai foi o doador. Este fato teoricamente é desfavorável à teoria dos "NIMA" ("non inherited maternal HLA antigens"), pela qual talvez esperássemos melhores resultados entre os indivíduos que receberam um rim materno. Os resultados favoráveis ao PIMA só foram observados entre indivíduos hipersensibilizados e que reagem com a maioria das células dos painéis (van Rood, 1990), talvez não sendo observados entre transplantes com doadores vivos não sensibilizados.

A comparação dos resultados de Porto Alegre com os de outros grupos coloca os primeiros em desvantagem aos melhores resultados, especialmente no grupo de transplantes entre

relacionados haploidênticos. A questão dos piores resultados com o uso de ciclosporina, talvez esteja relacionada à toxicidade da mesma, associada ao fato de que só recentemente existe disponibilidade de sua dosagem no sangue dos pacientes de Porto Alegre, ou, por outro lado, a indução insuficiente da imunossupressão. O número de equipes transplantadoras também é um fator de desequilíbrio, pois enquanto algumas fazem um regular número de transplantes, outras transplantam menos, adquirindo menor experiência. A tipagem HLA para os transplantes com doador cadáver talvez melhore os resultados para esse grupo.

5.4. AVALIAÇÃO DO SISTEMA HLA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÁTICA CRÔNICA.

A LLC não se apresenta associada positivamente ao sistema HLA. Esses achados são também encontrados na literatura, embora alguns estudos mostrem alguma associação.

A associação negativa de uma patologia com o sistema HLA, tem crescente interesse imunogenético, devido ao fato de que a maioria dos estudos se relacionam com susceptibilidade e não com resistência à determinada doença. O fato de que 9 indivíduos com LLC apresentassem o alelo HLA-A9, comparados com 87 no grupo controle, possibilita a sugestão deste alelo estar relacionado com proteção ao desenvolvimento da doença. O mesmo acontecendo com o alelo HLA-CW4 que foi positivo em 10 pacientes e 73 controles. A identificação do loco HLA-C foi realizada com os

melhores anticorpos possíveis, inclusive com os recentes monoclonais. O painel HLA-DQ não foi o mesmo utilizado para a tipagem dos pacientes com diabetes no capítulo seguinte.

O método de RFLP possibilitou a identificação do genótipo das células deficientes em HLA-DQ pela sorologia. Nas tipagens sorológicas de "possíveis" deficiências, o RFLP demonstrou sua superioridade em detectar os "splits" de DR2 (DR15 em DAN e GEL), DR3 (DRw17 em DAN, GEL e DOD) (Tabela 28.4.).

Os antígenos HLA-DR sorológicos não permitiam supor (para todos os antígenos), com precisão, qual o HLA-DQ associado pelo forte desequilíbrio de ligação existente entre esses dois locos. Com os resultados DR-RFLP foi possível identificar os "splits" DR, esclarecendo a necessidade de DQW6 para o DRW15 e o DQW2 para o DR17 (DAN e GEL); o DQW2 para DRW17 (DOD).

Esse achado de presença dos genes HLA, mas falta de expressão na superfície celular pode ter importância futura. Não foram observadas alterações clínicas associadas com essa deficiência, embora se possa supor, teoricamente, que talvez esses indivíduos estivessem mais sujeitos às infecções do que os demais, devido à falta de uma molécula que seria importante na apresentação de antígenos aos linfócitos T.

Outros estudos serão importantes na caracterização dos antígenos HLA que possam conferir resistência à LLC, para esclarecer a dúvida sobre a generalização desses achados para demais populações. O mesmo se aplica para a deficiência de expressão do HLA-DQ, necessitando estudos de frequência da falta destas moléculas, assim como estudos clínicos mais profundos.

5.5. ESTUDO DO SISTEMA HLA NA DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ANTÍGENOS E DOS GENES NA POPULAÇÃO NORTE-AMERICANA DE ORIGEM HISPÂNICA E ANGLO-SAXÔNICA.

A DMID é uma patologia com maior incidência em europeus do norte, praticamente não existente em índios e marcadamente reduzida nos povos orientais (japoneses, coreanos). Na América Latina, a incidência de DMID parece ser também reduzida. Os dados mais importantes são os de pacientes de origem hispânica, moradores do Estado do Colorado.

O haplótipo HLA-A1, B8, DR3 é reconhecidamente um haplótipo caucasóide, estando em desequilíbrio de ligação, tanto nos caucasóides europeus como nos encontrados na América. Este haplótipo não é encontrado em povos orientais e indígenas, em que observa-se forte desequilíbrio de ligação com HLA-A24, B5(52), DR2 e com HLA-A24, B7, DR1. O antígeno HLA-A24 é o alelo mais comum nestes povos, alcançando frequências de até 85% (Jobim, 1981).

O alelo DR3 foi encontrado em 42% dos hispânicos diabéticos e em somente 2% dos controles de mesma raça. O mesmo alelo apresentou a frequência de 48% nos pacientes anglos e 19% nos controles. Este fato demonstra que este alelo está fortemente associado com a doença e que os indivíduos hispânicos que apresentarem este marcador genético terão um risco 22.61 vezes superior de manifestarem a doença, do que os que não possuírem o DR3. Os controles hispânicos, representantes da massa da população hispânica do Colorado, estarão protegidos da DMID, pelo

menos parcialmente.

A observação de que os pacientes hispânicos apresentam o alelo HLA-B8, significativamente mais freqüente que seus controles (13 indivíduos entre os pacientes e somente 1 entre os controles), demonstra que a falta de DR3 nos controles está relacionada com a inexistência do haplótipo HLA-A1, B8, DR3. O fato foi confirmado na análise do referido haplótipo, observando-se 11 pacientes hispânicos com este conjunto e nenhum no grupo controle.

A presença do alelo HLA-A24 em 31.25% dos controles hispânicos e em 6.06% dos anglos ($p=0.003$) demonstra mais um fato sugestivo da presença de genes indígenas nesta população. Os alelos HLA-B35 e HLA-B16 (38) que são significativamente mais freqüentes nos controles Hispânicos, também são de alta freqüência nos índios norte-americanos (Schanfield, 1980).

Os alelos HLA-A3, HLA-B8, HLA-DR3 e DQW6 apresentam-se significativamente diminuídos na população de controles normais Hispânicos, comparada com os controles Anglos. Estes alelos são praticamente ausentes em índios e outros orientais (Jobim, 1981; Dausset, 1985; Todd, 1990).

Os resultados mostram 13 pacientes hispânicos com o alelo HLA-B8 e 11 com o haplótipo HLA-A1, B8, DR3. Nos anglos observa-se 25 alelos B8 e 18 haplótipos HLA-A1, B8, DR3. Desta maneira, o alelo B8 está associado intimamente ao haplótipo caucasóide nos hispânicos e de forma menos intensa nos anglos.

Entre os hispânicos diabéticos encontra-se 22 indivíduos com o alelo DR3 e 11 com o haplótipo HLA-A1, B8, DR3. Resultado

semelhante observa-se nos anglos com DMID, 31 DR3 e 18 haplótipos A1, B8, DR3. O excesso de DR3 em relação ao B8, confirma a suspeita de que o alelo DR3 é o real responsável pela susceptibilidade e B8 apresenta associação somente devido ao desequilíbrio de ligação com DR3.

O alelo DQW8 encontra-se associado com a diabetes nos hispânicos e de forma quase significativa nos anglos. Este achado confirma diversos outros trabalhos que demonstram esta associação (capítulo 1.3.3.5.). O alelo A3, pertencente ao haplótipo DR4 DQW8 A3, apresenta-se positivamente associado com a DMID em ambas as populações, sugerindo ser o principal responsável por esta relação, sendo o DQW8 participante indireto pelo sua forte associação com DR4.

O alelo A3 apresenta-se com frequência semelhante nos controles hispânicos e anglos (36% e 37%, respectivamente), assim como entre os pacientes (81% e 70%). Desta maneira, pode-se sugerir que a proteção devida a falta do alelo DR3 na população hispânica do Colorado não é suficiente para afastar totalmente a DMID de seu meio, pois existe o risco de desenvolver a doença por intermédio da associação com A3 que permanece.

Estes achados são referentes à população do Estado do Colorado, havendo necessidade de estudo de outras populações hispânicas para observar a possibilidade de generalização dos resultados.

As associações negativas são praticamente as mesmas entre as duas populações, embora o grau de significância possa variar discretamente. Os alelos que supostamente protegem da doença

seriam DR5, DQW7, DR2 e A1 nos hispânicos e DQW6, DR5, DQW7, DR2 e A1 nos anglos, entretanto a significância só foi alcançada nos dois primeiros alelos dos hispânicos e só no primeiro dos anglos.

A observação dos alelos com associação negativa demonstra que todos eles estão relacionados com haplótipos onde o aminoácido da posição 57 da molécula de DQ β é o ácido aspártico. A importância da posição 57 pode ser observada pelo lado das associações positivas, sendo que 100% dos pacientes hispânicos e 96% dos anglos apresentaram alelos que não possuem o ácido aspártico nesta localização. Estes achados confirmam a literatura e sugerem que o entendimento da susceptibilidade à diabete não está relacionada simplesmente com os genes HLA, mas com a presença de seus produtos na membrana celular.

Os pacientes hispânicos e anglos não apresentam, entre si, diferenças genéticas importantes em relação ao sistema HLA, mas demonstram um polimorfismo característico em relação aos controles normais. A presença de HLA-DR3 e do alelo A3 de DQA1 está associada com a doença (90% nos hispânicos e 87% nos anglos), assim como as moléculas de DQ β não apresentam o ácido aspártico na posição 57.

Estes achados sugerem que os determinantes de risco possam ser os próprias moléculas HLA referidas e que apresentariam um antígeno autólogo ou mesmo viral aos linfócitos T. Estas células iniciariam um processo auto-imune, culminando com a destruição das células beta do pâncreas. As moléculas HLA seriam, desta maneira, os próprios receptores para o possível antígeno, sendo o palco desta apresentação a membrana das células apresentadoras

de antígenos. Quando estas moléculas apresentassem um ácido aspártico na posição 57, não seria possível o acoplamento do possível antígeno no "ninho" desta molécula e o indivíduo não estaria susceptível à doença.

CONCLUSÕES

Este conjunto de trabalhos caracteriza o desenvolvimento dos estudos de histocompatibilidade na Unidade de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, assim como demonstra resultados de pesquisas realizadas no exterior com metodologia molecular a ser incorporada na referida Unidade.

A identificação de 24 anticorpos anti-HLA para o loco HLA-A, 32 para o loco HLA-B e 26 para HLA-DR e DQ no soro extraído de 2600 placentas humanas possibilitou a organização de um pequeno "banco de reativos" HLA, que realiza intercâmbio internacional com demais laboratórios de histocompatibilidade, sendo responsável pela maioria dos reagentes utilizados nas tipagens de nosso laboratório. A dependência externa sempre existirá, devido a dificuldade de identificação de alguns antígenos raros. Como consequência, nosso laboratório nunca necessitou adquirir anticorpos anti-HLA no comércio internacional, o que trouxe considerável economia à instituição.

A análise dos nossos primeiros 66 casos de investigação de paternidade por intermédio da imunogenética HLA, possibilitou o conhecimento de que é possível alcançar índices de probabilidade relativa de paternidade acima de 95% em 64% dos casos, sendo que

os demais 15% são resolvidos pela combinação dos resultados HLA com os dos grupos sanguíneos ABO, Rh (CcDEe) e MNSs. A observação de 21% de casos de acusações falsas é semelhante aos resultados obtidos no exterior.

Os resultados da investigação de paternidade indicam que a sorologia HLA e de grupos sanguíneos possibilitam resultados confiáveis na quase totalidade dos casos. Para os casos mais difíceis, especialmente quando o acusado é falecido, é possível adicionar o teste de RFLP com sondas de loco único e que se tornou colocado em prática, após o aprendizado adquirido no estudos por RFLP em Leucemia Linfática Crônica.

Os resultados de 250 transplantes renais no Rio Grande do Sul foram apurados até 1990. Os enxertos entre indivíduos relacionados HLA idênticos demonstraram sobrevida de 97% no 1º ano e 75% no final do 3º. A maioria destes pacientes não usou a Ciclosporina A como imunossupressor.

Os enxertos entre indivíduos relacionados com 1 haplótipo HLA de diferença, tiveram sobrevida de 78% e 65% no 1º e 3º ano respectivamente. Quando separamos os que usavam e não usavam Ciclosporina, observamos que os primeiros apresentaram sobrevida de 76% e 54% no 1º e 2º ano, sendo que os segundos tinham 79% e 70%. Esse fato merece registro especial, pois seria esperado o contrário. Deve ser especulado o fato de doses insuficientes de Ciclosporina terem sido usadas, por medo de intoxicação medicamentosa, devido a falta de dosagem do medicamento no sangue da maioria dos doentes.

Os enxertos com rins de doadores cadáver apresentaram sobrevidas de 64% e 53% para o 1º e 3º ano nos pacientes que utilizaram a Ciclosporina. Nos que não utilizaram esse medicamento, observamos 54% e 42% no final de 1 ano e 15 meses respectivamente.

Os resultados entre irmãos HLA incompatíveis (2 haplótipos diferentes) demonstraram sobrevidas do enxerto de 83% no 1º e 3º ano. Teoricamente, esses resultados deveriam ser semelhantes aos com doador cadáver, "especulando-se que a indução da imunossupressão tenha sido mais efetiva neste grupo de pacientes especialmente por ser transplante com doador vivo. compatibilidade HLA.

O "efeito do centro" parece ter existido entre as equipes gaúchas. Uma delas apresenta resultados de 77% no 1º e 3º ano, sendo que as demais não ultrapassaram os 50% no final do 2º ano. Existe uma tendência a alcançarem melhores resultados nos transplantes com doador cadáver, após a inauguração da coordenadoria de transplantes em Porto Alegre, embora ainda estatisticamente não significativa.

Não foi observado o efeito da "transfusão específica do doador" na sobrevida dos enxertos. Os retransplantes foram número do 17, não possibilitando realizar estatística, entretanto os 2 realizados com doador relacionado HLA idêntico tiveram sobrevida de 100% no primeiro ano.

Os transplantes em que tiveram os pais como doadores apresentaram sobrevidas do enxerto de 77% e 70% para o 1º e 3º

ano. Não se observaram diferenças, quando a mãe ou o pai foram os doadores.

O estudo da relação HLA com Leucemia Linfática Crônica possibilitou demonstrar não existir susceptibilidade genética HLA, ou seja, não existem marcadores HLA mais frequentes nos doentes do que nos controles. Este fato contrasta com alguns dos estudos realizados anteriormente, nos quais, ora encontravam um determinado alelo em desequilíbrio de ligação com a doença, ora descreviam outro. Nossos resultados demonstram existir uma proteção para os indivíduos portadores dos alelos HLA-A9 (RR=0.14, P=0.001) e HLA-CW4 (RR=0.40, P= 0.04), pois esses marcadores encontram-se estatisticamente diminuídos nos pacientes em relação aos controles.

Foi possível demonstrar casos de ausência dos antígenos HLA-DQ na membrana dos linfócitos de alguns pacientes com LLC. O estudo com o método molecular (RFLP) proporcionou o conhecimento de que os genes HLA-DQ estão presentes no DNA, não sendo caracterizado um caso de deleção ao nível molecular. A falta de expressão do HLA-DQ na membrana celular deverá ser ainda melhor estudada, procurando-se evidências de comorbididades clínicas, não detectados nos raros casos estudados. A deficiência demonstrada aconteceu com caracter homozigoto em dois pacientes e heterozigoto em quatro.

O estudo do sistema HLA na Diabetes Mellitus Insulino-Dependente confirmou os achados anteriores da predisposição existente na população caucasóide e do risco diminuído em populações de origem oriental. A análise de uma população

geneticamente mestiça, fruto da mistura de brancos e índios americanos, possibilitou demonstrar que a associação dos genes HLA com a doença é mais forte nos brancos, entretanto, quando os hispânicos herdaram determinados genes caucasóides, apresentam risco de desenvolver a doença. Não existiu diferenças imunogenéticas entre as duas populações de diabéticos estudadas.

Os alelos estatisticamente associados à diabetes foram HLA-DR3, DQW8, A3 (DQA1), correspondentes aos haplótipos: HLA-A1, B8, DR3, DQW2, A4 (DQA1) e DR4, DQW8, A3 (DQA1). Os alelos que estatisticamente apresentaram-se em associação negativa foram DR5, DQW7, DR2, e A1 nos hispânicos e DQW6, DR5, DQW7, DR2 e A1 nos anglos.

A falta do haplótipo HLA-A1, B8, DR3, A4 na população de controles hispânicos, não afasta totalmente o risco da diabetes pois os genes diabetogênicos ligados ao haplótipo DR4, DQW8, A3 (DQA1) estão presentes igualmente em ambas populações controles. Este último foi evidenciado especialmente pela associação positiva com DQW8 e A3 (DQA1).

As características indígenas da população hispânica foram detectadas pelas frequências elevadas dos alelos HLA-A24, HLA-B35 e HLA-B16, assim como pela significativa diminuição de HLA-A3, HLA-B8, HLA-DR3 e DQW6. Estes achados são encontrados especialmente em populações indígenas.

A característica molecular da ausência de ácido aspártico na posição 57 da molécula de DQB1 nos pacientes com diabetes juvenil foi novamente demonstrada, encontrando-se 100% dos

pacientes hispânicos e 96% dos anglos com alelos que não apresentam esse aminoácido nesta posição.

A razão para a diferença entre a incidência da diabetes entre os habitantes do Estado do Colorado foi esclarecida imunogeneticamente. Estes resultados podem, provavelmente, explicar a pouca incidência da doença no México, assim como a chance 60 vezes maior de uma criança da Finlândia ter diabetes em comparação com uma da Coréia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRONS, S. (1971). Influence of the human foetus. *Tissue Antigens*, 1: 121-128.
- AMOS, D.B.; BACH, F.H. (1968). Phenotypic expression of the major histocompatibility locus in man (HL-A): Leucocyte antigens and mixed leucocyte culture reactivity. *J. Exp. Med.*, 128: 623-627.
- ANDERSON, C.B. (1984). Pretreatment of renal allograft recipients with immunosuppression and donor-specific blood transfusion. *Transplantation*, 38: 664-668.
- ARNAIZ-VILLENA, A.; RAMON-REGUERIO, J.; ROBLES, C.; NIETO-QUARTERO, J.; ORDONEZ, A.; SERRANO-RIOS, M. (1984). HLA and complement (C4 and Bf) allotypes in type I and type II Spanish diabetics. In: BABA, S.; GOULD, M.K.; ZIMMETT, P. (ed). *Diabetes Mellitus: Recent Knowledge on Etiology, Complications and Treatment*. Sydney, Australia, Academic. p. 39-48.
- AUFRFRAY, C.; NOVOTNY, J. (1986). Speculations on sequence homologies between the fibronectin cell attachment site, major histocompatibility antigens, and a putative AIDS virus polypeptide. *Human Immunology*, 15: 381.
- BACH, F.; HIRSHORN, K. (1964). Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility test in vitro. *Science*, 143: 813-817.
- BACH, F.H.; VOYNOW, N.K. (1966). One way stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science*, 153: 545-547.
- BACH, F.H.; AMOS, D.B. (1967). HU-I: Major histocompatibility locus in man. *Science*, 156: 1506-1508.
- BACH, F.H.; ALBERTINI, R.; AMOS, D.B.; CEPPELLINI, R.; MATTIUS, P.; MIGGLIANO, A. (1969). Mixed leucocyte culture studies in families with know HL-A genotypes. *Transpl. Proc.*, 1: 339-341.
- BACH, F.H.; ALBERTINI, R.; JOO, C.; ANDERSON, J.; BORTIN, M.M. (1968). Bone marrow transplantation in a patient with Wiscott-Aldrich Syndrome. *The Lancet*, ii: 1364-1366.
- BAIN, B.; VAS, M.; LOWENSTEIN, L. (1964). The development of large immature monuclear cells in mixed leucocyte cultures. *Blood*, 23: 108-113.

- BARICORDI, O. ; BELVEDERE, M.; FAGIOLO, U.; NERI, T.M.; TRABACE, S. (1977). Screening for sera with B cell antibodies in Region Italy I. *Tissue Antigens*, 10: 130-133.
- BELL, J.; DENNEY, D.; McMURRAY, A.; FOSTER, L.; WATLING, D.; McDEVITT, H. (1987). Molecular mapping of class II polymorphisms in the human major histocompatibility complex. *J.Immunol.*, 139: 562-573.
- BELL, J.; DENNEY, D.; FOSTER, L. BELT, T.; TODD, J.; McDEVITT, H. (1987 B). Allelic polymorphism in the HLA-DR subregion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 6234-6238.
- BELL, J.; TODD, J.; MACDEVITT, H. (1989). The molecular basis of HLA- disease association. In: HARRIS, H.; HIRSCHHORN, K. (ed.). *Advances in Human Genetics*. p. 1-41.
- BELVEDERE, M.; CURTONI, E.; DAUSSET, J.; LAMM, L.; MAYR, U.; ROOD, J.J.; SVEJGARD, S.; PIAZZA, A. (1975). On the heterogeneity of linkage estimations between LA and Four loci of the HLA system. *Tissue Antigens*, 5;99-102.
- BENACERRAF, B.; KATZ, D. (1975). The histocompatibility-linked immune response genes. *Adv. Cancer Res.*, 21: 121- 173.
- BENACERRAF, B.; GERMAIN, R. (1976). The immune response gene and the major histocompatibility complex. *Immunl. Rev.*, 38: 70-119.
- BENDER, K. (1984). The HLA system. *Biotest Bulletin*, 2: 64-116.
- BENTLEY, F.R.; SUTHERLAND, D.; FRYD, D. (1984). Similar renal allograft functional graft survival rates for kidney from sibling donor matched for zero-versus-one haplotype with the recipient. *Transplantation*, 38: 674-679.
- BIDWELL, J.; BIDWELL, E.; SAVAGE, D.; MIDDLETON, D.; KLOUDA, P.; BRADLEY, B. (1988-a). A DNA-RFLP typing system that positively identifies serologically well-defined and ill-defined HLA-DR and DQ alleles, including DRw10. *Transplantation*, 45: 640-646.
- BIDWELL, J. (1988-b). DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and HLA-DQ antigens. *Immunology Today*, 9: 18-23.
- BIRD, M.; UESHIMA, Y.; VARDIMAM, J. (1989). Chromosomal abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia and their clinical correlations. *Leukemia*, 3(3): 182-191.
- BJORKMAN, P.; SAPER, P.; SAMRAOUI, B.; BENETT, W.; STROMINGER, J.; WILEY, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329: 506-512.
- BLANN, A.D.; CRICHTON, W.B. (1988). Genetics of HLA system. *Med. Lab. Sciences*, 45: 370-380.

- BODMER, W. (1973). Population genetics of the HLA system: retrospect and prospect. *Histocompatibility Testing 1972*, p. 611-617.
- BODMER, W.; THOMPSON, G. (1977). Population genetics and evolution of the HLA system. In: DAUSSET J.; SVEJGAARD A. (ed.) *HLA and Disease*. Munksgaard, Copenhagen, p. 280-295.
- BODMER, J.; MARSH, S.; ALBERT, E. (1990). Nomenclature for factors of HLA system, 1989. *Immunology Today*, 11: 3-10.
- BOREL, J.F. (1986). Cyclosporin. *Prog. Allergy*, 38: 1-50.
- BOYLSTON, A.W. (1987). The T-cell antigen receptor gamma chain and its accomplices. *Immunology Today*, 8: 144-148
- BOYUM, A. (1974). Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*, 4: 269-274.
- BRAUN, W.E. (1983). Histocompatibility testing in clinical renal transplantation. *Urologic Clinics of North America*, 10: 231-240.
- BRAUN, W.E.; CUNNINGHAM R.J. (1985). Humoral and cellular responses to donor-specific transfusion. *Transpl. Proc.* 17: 1062-1065.
- BREWERTON, D.; CAFFREY, M.; HART, F.; JAMES, D.; NICHOLLS, A.; STURROK, R. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A27. *Lancet*, i: 904-907.
- BROWN, J.; JARDESTZKY, T.; SAPER, M.; SAMRAOUI, B.; BJORKMAN, P.; WILEY, D. (1988). A hypothetical model of foreign antigen binding site of class II histocompatibility antigens. *Nature*, 332: 845-850.
- BUGAWAN, T.; HORN, G.; LONG, C.; MICKELSON, E.; HAANSEN, J. FERRARA, G.B.; ANGELINI, G.; ERLICH, H. (1988). Analysis of HLA-DP allelic sequence polymorphism using the in vitro enzymatic DNA amplification of DP- α and DP- β loci. *J. Immunol.*, 141: 4024-4030.
- BURDICK, J.F.; DIETHELM, A.; THOMPSON, J.; BUREM, C.; WILLIAMS, G. (1991). Organ sharing-present realities and future possibilities. *Transplantation*, 51: 287-292.
- BURLINGHAM, W.I.; SODINGER, H.W. (1987). Improved allograft survival following donor-specific transfusion. *Transplantation*, 43: 41-45.
- BUSH, G.J.; TILNEY, N.L. (1979). Variants forms of arteritis in human renal allografts. *Transpl. Proc.* 10: 100-105.
- BUSHELL, A.; HIGGINS, R.; WOOD, K.J.; MORRIS, P. (1989). HLA-DQ mismatches between donor and recipient in the presence of HLA-DR compatibility do not influence the function or outcome of renal transplants. *Human Immunology*, 26: 179-189.

- CALIN, A.; FRIES, J. (1976). Ankylosing spondylitis and epidemic Reiter's syndrome: Genetics and environment. *Ann. Rheum. Dis.*, 35: 287-296.
- CARPENTER, C.B.; MORRIS, P.J. (1978). The detection and measurement of pretransplant sensitization. *Transplant. Proc.* 10: 509-513.
- CECKA, M. (1989). The effect of HLA matching in transfused and nontransfused patients. In: TERASAKI, P. (ed.). *Visuals of the Clinical Histocompatibility Workshop*. One Lambda, Inc. p. 113.
- CERILLI, J.; BRASILE, L.; GALOUZIS, T. (1985). The vascular endothelial cell-specific antigen system: three years experience in monocyte cross-matching. *Transp. Proc.* 17: 567-570.
- COHEN, D.; LeGALL, I.; MARCADET, A.; FONT, P.; LALOUEL, J.; DAUSSET, J. (1984). Clusters of HLA class II β restriction fragments describe allelic series. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 7870-7874.
- CHRITIANSEN, F.; DAWKINS, R. (1984). Rheumatoid arthritis, In: ALBERT E. & MAYR (ed) *Histocompatibility testing 1984*. Springer-Verlag, p. 378-383.
- DALLMAN, M.; MORRIS, P. (1988). The immunology of rejection. In: MORRIS, P. (ed.). *Kidney Transplantation*, 3rd ed. p. 15-36.
- DAUSSET, J. (1954). Leuco-agglutinins. *Vox Sang.*, 4: 156-166.
- DAUSSET, J. (1958). Iso-leuco anticorps. *Acta Haematol.*, 20: 156-158.
- DAUSSET, J.; PLA, MARIKA. (1985). *HLA, Complexe Majeur d'Histocompatibilité de l'Homme*. Flammarion Medecine-Sciences.
- DAVEY, F. ; HENRY, J. (1984). Analysis of paternity. The use of HLA and red cell antigens. *Transfusion*, 24(4): 340-342.
- DE MOUSSOM, A.; TONGIO, M.; JEANNET, M.; BETUEL, H.; DE BOISSEZON, J. (1977). Ia like serology in leukemia. *Tissue Antigens*, 10:211-215.
- DECARY, F.; VAN HELDEN-HENNINGHEIM, L.; VAN GRIETUYSEN, D.; HELMERHOSRS, F.; VAN DER WERF, A.J.; ENGELFRIET, C.P. (1978). Detection of B-cell specific alloantibodies in pregnancy sera in the lymphocytotoxicity and indirect immunofluorescence techniques. *Tissue Antigens*, 14: 1-9.
- DILELLA, G.; HUANG, W.; WOO, S. (1988). Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with polimerase chain reaction. *Lancet*, 1: 497-499.
- DOLL, R. (1980). The epidemiology of cancer. *Cancer*, 45: 2475-2484.

- DUQUESNOY, R.; MARRARI, M.; ZEEVI, A. (1984). Serological and celular definition of new HLA-DR associated determinant, MC1, and its association with rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* 10:165-176.
- DUQUESNOY, R.; MARRARI, M.; ANNEN, K. (1979). Identification of a HLA-DR associated system of B-cell alloantigens. *Transpl. Proc.*, 11: 1757-1760.
- EBRINGER, A.; AVAKIAN, H.; COWLING, P.; WELSH, J.; WOOLEY, P.; PANAYI, G. (1980). Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and Klebsiela: Cross reactivity studies with rabbit anti-lymphocytes sera and human tissue typing sera. *Ann.Rheum.Dis.*, 39: 194-199.
- EISIRIK, D.L.; MONTEIRO, C.M.C.; VOLTARELLY, J.C.; FOSS, M.C. (1987). Frequency of HLA antigens in a Brazilian type I diabetic population. *Brazilian J.Med.Biol.Res.*, 20: 533-537.
- ERLICH, H.; GELFAND, D.H.; SAIKI, R.K. (1988). Specific DNA amplification. *Nature*, 331: 461-462.
- ERLICH, H.; BUGAWAN, T. (1989). HLA class II gene polymorphism: DNA typing, evolution and relationship with disease susceptibility. In: ERLICH, H. (ED.). *PCR Technology*. Stokton Press, p. 193-209.
- FARID, N.; SAMPSON, L.; HILMAN, D. (1979). HLA-D related antigens in juvenil diabetes melittus. *Diabetes*, 28 : 552-557.
- FERRARA, G.B.; PISTILO, M.P.; MAZZOLENI, O; LONGO, A.; ANGELINI, G. (1989). Detection of HLA specificities by using human monoclonal antibodies. In TERASAKI, P. (ed.). *Visuals of the Clinical Histocompatibility Workshop*. One Lamda, 140-141.
- FINGOLD, N. (1971). Critical analysis of relationship between HLA system and susceptibility to disease. *Transplant.Proc.*, 3: 1317-1320.
- FINKELSTEIN, S.; ZELLER, E.; WALFORD, R. (1972). No relation between HL-A and juvenile diabetes. *Tissue Antigens*. 2 : 74-77.
- FLECHNER, S.M.; KAHAN, B.D. (1984). Successful transplantation of cyclosporine-treated haploidentical living-related renal recipients without blood transfusion. *Transplantation*, 37: 73-76.
- FRANCO, L.; VIVOLO, M. (1988). Incidence study of insulin dependent diabetes mellitus in the state of São Paulo, Brazil. Presented at 13th Diabetes Fed. Cong., Satellite Congr. on *Epidemiol. of Diabetes*, Hobart, Tasmania.
- FU, S.; KUNKEL, H.; BRUSMAN, H.; ALEN F.; FOHINO, M. (1974). Evidence for linkage between HL-A histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the complement system. *J. Exp. Med.*, 140: 1108-1111.

- FUNG, J.J.; TODO, A.; STARZL, T.E, (1991). Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK 506 based immunosuppression. *Transp. Proc.*, 23(1): 11-13.
- GAY, E.; HAMMAN, R.; CAROSONE-LINK, P.; LEZOTTE, D.; COOK, M.; STROHEKER, R.; KLINGENSMITH, G.; CHASE, H.P. (1989). Colorado IDDM Registry: Lower incidence of IDDM in Hispanics. Comparison of disease characteristics and care patterns in biethnic population. *Diabetes Care*, 12: 701-708.
- GLASS, N.R.; BELZER, F.O. (1985). A four year experience with donor blood transfusion protocols for living-donor renal transplantation. *Transplantation*, 39: 615-621.
- GORER, P.A. (1937). The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. *J. Pathol.* 44: 691-694.
- GORONZY, J.; WEYAND, C.; FATHMAN, C. (1986). Shared T cell recognition sites on HLA class II MHC molecules of patients with seropositive rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 77: 1042-1049.
- GREGERSEN, P.; SHEN, M.; SONG, Q.; MERRYMAN, P.; DEGAR, S.; SEKI, T.; MACCARI, J.; GOLDBERG, D.; MURPHY, H.; NEPOM, G.; SILVER, J. (1986). Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 2642-2646.
- GUSSOW, D.; REIN, R.; GINJAAR, I. (1987). The human Beta-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J. Immunol.*, 139: 3132-3138.
- HAMMAN, R.; BAXTER, J.; GRAY, E. (1985). NIDDM and IDDM in Hispanic Americans: evolution of epidemiologic approaches. In: SERRANO-RIOS, M.; LEFEBVRE, P.J. (ed.). *Diabetes 1985*. Elsevier, p. 386-389.
- HAMMAN, R.; GAY, E.; CRUICKSHANKS, K.; COOK, M.; LEZOTTE, D.; KLINGENSMITH, G.; CHASE, H. (1990). Colorado IDDM Registry. Incidence and validation of IDDM in children aged 0-17 years. *Diabetes Care*, 13(5): 499-505.
- HASKINS, K.; HANNUM, C.; WHITE, J.; RHOELM, N.; KUBO, R.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. (1984). The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 160: 452-458.
- HEISE, E.; McMAHAN. (1983). A critical analysis of paternity determination using HLA and five red cell antigens. *Am. J. Forens. Med. Pat.* 4(1): 15-23.
- HELENIUS, A.; MOREIN, B.; FRIES, F.; SIMON, K.; ROBINSON, P.; SCHIRRMACHER, V. (1978). Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 3846-3850.

- HISCHHORN, K.; BACH, F.; KOLODNY, R.L.; FIRSCHEN, I.L. (1963). Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science*. 142, 1185-1188.
- HONDA, Y.; ASAKA, A.; TANIMURA, M.; FURUSSHO, T. (1983). A genetic study of narcolepsy and excessive daytime sleepiness in 308 families with a narcolepsy of hipersomnia proband. In: GUILLEMINAULT, C.; LUGARESI, E. (ed.). *Sleep/Wake Disorders*, Raven Press, New York., p.198-210.
- HORN, G.; BUGAWAN, T.; LONG, C.; ERLICH, H. (1988). Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85: 6012-6016.
- HUI, K.; FESTENSTEIN, H.; GROSVELD, G.; GROSVELD, F. (1985). HLA-DR genotyping by RFLP analysis. *Immunogenetics*, 22: 231-239.
- JEANNET, M.; RUSSELL, P. (1970). Humoral antibodies and renal allotransplantation in man. *N.Engl.J.Med.*, 282: 111-115.
- JEANNET, M.; MAGNIN, C. (1976). HLA antigens in haematological malignant diseases. *Eur.J.Clin.Inv.* 2: 39-42.
- JOBIM, L.F.; KOTHLAR, T.; LONGONI, E. (1975). Sub populações de linfócitos. *J.Ass.Med.Bras.* 21(6): 3-10.
- JOBIM, L.F.; MENDES, N.F.; WALFORD, R.; WULFF, A.; MOURA, N.C.; PERSSOLI, L.B. (1981). HLA antigens in Tukunas Indians. *American Journal of Phisical Anthropology*, 56: 285-290.
- JOHNSTON, C.; CUDWORTH, A.G.; WOLF, E. (1983). HLA-DR typing in identical twins with insulin-dependent diabetes mellitus: a difference between concordant and discordant pairs. *Br. Med. J.* 286: 253-255
- JULIUSSON, G.; FRIBERG, K.; GAHRTON, G. (1988). Chromosomal aberrations in progressive and indolent chronic B lymphocytic leukaemia. *Acta Onc.* 27(5): 473-477.
- KEYS, A. (1970). Coronary heart disease in 7 countries. *New York Am. Heart Assoc. Monogr.* nº 29.
- KERMAN, R. (1989). Influence of race, transfusion and tissue typing. In: TERASAKI, P.(ed.), *Visuals of the Clinical Histocompatibility Workshop*. One Lamda, Inc. p.111.
- KHAN, M.A.; KUSHNER, Y.; BRAUN, W. (1980). Association of HLA-A2 with uveites in HLA-B27 positive patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 27: 703-719.
- KIM, S.; NEPON, G. (1985). Identification of a polymorphic variant associated with HLA-DQW3 and characterized by specific restriction sites within the DQB-chain genes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 82: 8139-8143.

- KISSMEYER-NIELSEN, F.; OLSEN, S.; PETERSEN, V.; FJELDBORG, O. (1966). Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 2: 662-665.
- KISSMEYER-NIELSEN, F. & THORSBY, E. (1970). Human transplantation antigens. Current methods in histocompatibility testing. *Transplantation Rev.*, 4: 1-176.
- KISSMEYER-NIELSEN, F.; OLSEN, S.; PETERSEN, V.; FJELDBORG, O. (1966). Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*, 2: 662-665.
- KNOWLER, W.C.; BENNETT, P.H.; BOTTAZZO, G.F.; DONIACH, D. (1979). Islet cell antibodies and diabetes mellitus in Pima Indians. *Diabetologia*, 17: 161-164.
- KOOGAN, S.; DOHERTY, M.; GITSCHIER, J. (1987). An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences: application to hemophilia A. *N. Eng. J. Med.* 317: 985-990.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256, 495-497.
- KRAWCZAK, M.; REEIS, J.; SCHMIDTKE, J.; ROSLER, U. (1989). Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. *Nucleic Acids Res.*, 17: 2197-2201.
- KWOK, S.; HIGUSHI, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339: 237-238.
- LA PORTE, R.E.; TAJIMA, N.; AKERBLUM, H.; BERLIN, N.; BROSSEAU, J.; CHRISTY, M.; DRASH, A.L.; FISHBEIN, H.; GREEN, A.; HAMMAN, R.; HARRIS, M.; KING, H.; LARON, Z.; NEIL, A. (1985). Geographic differences in the risk of insulin dependent diabetes mellitus: the importance of registries. *Diabetes Care* 8, suplem.1: 101-107.
- LAZDA, V.; JONASSON, O. (1990). Evidence that HLA class II disparity is required for the induction of renal allograft enhancement by donor specific blood transfusion. *Transplantation*, 49: 1084-1087.
- LEGRAND, L. ; DAUSSET, J. ; RAPAPORT, F.T. (1971). Serological and genetics studies of the HL-A system. Results of host immunization within haplo-identical donor recipient combinations. *Transfusion*, 11: 233-250.
- LINET, M.S.; BIAS, W.; HUMPREY, R. (1988). HLA antigens in chronic lymphocytic leukemia. *Tissue Antigens*, 31: 71-78.

- LOHGEM, J.J.v.; SAUER, A.J.; HART, M.; BRINKERING, P. (1956). Zeldzame immunologische afwijkingen als oorsak van bloedtransfusieracties bij een lijder aan verworvrn haemolytische anaemia. *Ned Tidschr. Geneeskd.*, 90: 304-308.
- LOO, Y-M.; MEHAL, W.; FLEMING, K. (1988). False positive results and polimerase chain reaction. *Lancet*, 2: 679.
- LORENZI, M.; CAGLIERO, E.; SCHMIDT, N.J. (1985). Racial differences in incidence of juvenile onset type I diabetes mellitus. *Diabetologia*, 28: 734-738.
- MATAS, A.J.; TELLIS, V.A.; QUINN, T.; PRINCIPE, A.; SOBERMAN, R.; MALLIS, M.; GLICKLICH, D.; WEITH, F. (1989). Short- and long-term graft survival with 0 antigen-matched first cadaver renal transplants: A single instituiton study. *Clin. Transplantation*, 3: 22-26.
- MATSUKI, K.; HONDA; Y.; JUJI, T. (1989). HLA antigens in 206 Japanese patients with Narcolepsy and 46 patients with essencial hipersomnia. In: DUPONT, B. (ed), *Immunobiology of HLA*, Springer Verlag, N.Y. p. 438- 440.
- MAYR, W.R.; PACHER, M.; MICKERTS, D. (1971). Kreuzreagierrende antikorper im bereich des HL-A systems der transplantation antigene. *Schweis. Med. Wschr.* 101: 361-363.
- McDEVITT, H.; TYAN, M. (1968). Genetic control of the antibody response in inbred mice: Transfer of response by spleen cells and linkage to the major histocompatibility (H-2) locus. *J. Exp. Med.*, 128: 1-11.
- MEMPEL, W.; GROSSE-WILDE, H.; ALBERT, E.; THIEFELDER, S. (1973). Atypical MLC reactions in HL-A typed related and unrelated pairs. *Transp. Proc.*, 5: 401-408.
- MEO, T.; ATKINSON, J.; BERNOCO, M.; BERNOCO, D.; CEPPELLINI, R. (1976). Mapping of the HLA locus contolling C2 structural variants and linkage disequilibrium between alleles C2 and Bw. *Eur. J. Immunl.*, 6: 916-919.
- MILLAN-GUASH, M.M.; ANGLADA, J.; ARROYO, J.; RODRIGUEZ, M.; TUBAU, M.; GARAU, X. (1988). Epidemiology of type I insulin dependent diabetes in Terrassa (160,106 inhabitants), Barcelona: its correlation with ongoing viral infections in the community (abstract). *Diabetologia*, 31: 552A.
- MILLER, S.; DYKES, D.; POLESKY, H.; (1988). A simple salting out procedure for extration DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids. Res.*, 16: 1215-1220.
- MONTOLIU, J.; STENZ, K.H. (1979). Delayed hiperacute rejection in recipients of kidney transplants from HLA identical siblings donors. *American Journal of Medicine.*, 67: 590-596.

- MOREL, P.A.; DORMAN, J.S.; TODD, J.A.; McDEVITT, H.; TRUCCO, M. (1987). Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQB chain protects against type I diabetes: A family study. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 85: 8111-8115.
- MORRIS, P.J.; WILLIAMS, G.M.; HUME, D.; MICKEY, M.; TERASAKI, P. (1968). Occurrence of cytotoxic antibodies following kidney transplantation in man. *Transplantation*, 6: 292-299.
- MORRIS, P.J. (1988). Results of renal transplantation. In: MORRIS, P.(ed.) *Kidney Transplantation*, 3^o ed. p. 737-757.
- MOY, C.L. (1989). Evaluation of epidemiology and immunogenetics of IDDM in Spanish and Portuguese - heritage registries. A key to understanding the etiology of IDDM ? *Diabetes Care*, 12(7): 487-493.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- NAHIR, M.; SCHARF, Y.; BRICK, R.; SHARFY, Y.; GIDASI, O.; BARZILAI, A. (1979). The influence of HLA-B27 on the clinical picture of ankylosing spondylitis. *Rheum. Rehab.*, 18: 10-12.
- NAJARIAN, J.S.; VAN HOOK, E.J.; SIMMONS, R. (1978). Kidney transplants from distant relatives. *Amer.J.Surg.* 135: 362-366.
- NEPOM, G.; SEYFRIED, C.; HOLBECK, S.; BYERS, P.; NEPOM, B. (1989). HLA-DR4 associated disease: oligonucleotide probes identify specific class II susceptibility genes in type I diabetes and rheumatoid arthritis. In: *Immunobiology of the HLA*. Springer-Verlag, p.404-406.
- NYMAND, G.; HERON, I.; JENSEN, K.G.; LUNDSGAARD, A. (1971). Occurrence of cytotoxic antibodies during pregnancy. *Vox Sang.*, 21: 21-29.
- OCHMAN, H.; AJIOKA, J.W.; GARZA, D.; HARTL, D. (1989). Inverse chain reaction. In: ERLICH, H. (ed.). *PCR Technology*. Stokton Press, p. 105-113.
- OPELZ, G. (1987). Improved kidney graft survival in non transfused recipients. *Transp.Proc.*, 19: 149-152.
- OPELZ, G. (1990). Newsletter 6: 1-5.
- PAABO, S.; WILSON, A. (1988). Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts. *Nature*, 334: 387-388.
- PATEL, R.; TERASAKI, P. (1969). Significance of positive crossmatch test in kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 7: 246-258.
- PAYNE, R.; ROLFS, M.R. (1958). Fetomaternal leucocyte incompatibility. *J. Clin. Inv.*, 37: 1756-1762.

- PAYNE, R.; TRIPP, M.; WEIGLE, J.; BODMER, W.; BODMER, J. (1964). A new leucocyte isoantigenic system in man. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 29: 285-286.
- PAYNE, R. (1990). Early history of HLA. In: TERASAKI, P. (ed.). *History of HLA: Ten recollectios*. UCLA Tysue Typing Laboratory, p. 23-32.
- PARHAM, P.; BODMER, W. (1978). Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen HLA-A2. *Nature*, 276: 397-398.
- PEARSON, T. C.; MADSEN, J.; WOOD, K,J. (1990). Effect of anti-CD4 monoclonal antibody dosage when combined with donor cells antigen for the induction of transplantation tolerance. *Transpl. Proc.* 23(1): 565-566.
- POLLACK, M.S.; DUBOIS, D. (1977). HLA antibodies in common typing sera on HLA antigen frequency data in leukemia. *Cancer*, 39: 2348-2354.
- REINHERZ, E.L.; MEUER, S.C.; SCHLOSSMAN, S.F. (1983). The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunology Today*, 4: 5-9
- REWERS, M.; LA PORTE, R.E.; KING, H.; TUOMILEHTO, J. (1988). Trends in the prevalence and incidence of diabetes: insulin-dependent diabetes mellitus in childhood. *Whorld Health Stat.*, 41: 179-189.
- RICHTER, K.; RUCKWARTH, G. (1973). HLA antigen und disposition fur hamatologische maligne erkrankungen. *Haematologia*, 7: 203-209.
- ROBLES, V.C.; CORNEJO, B.; DORANTES, A.L.; GUTIERRES, G.; MAGOS, L.; PEREZ, P.E. (1987). Incidencia de la diabetes mellitus tipo I, 1984-1986, en el área metropolitana (A.M.). *Proc. Soc. Mex. Nutr. Endocrinol., Mérida, 1987*.
- RODRIGUES, L.; GORODEZKY, C.; ROBLES, C.; CASTRO, L.; SALAZAR, D.; TERAN, L; CAMELA, U. (1987). HLA, Bf, T- cell subsets and some autoantibodies in Mexicans with type I diabetes. Presented at *Histocompatibility and Immunogenetics Conference, New York*.
- ROGERS, M.; OU, C-Y; RAYFIELD, M. (1989). Use of the polimerase chain reaction for early detection of the proviral sequences of human immunodeficiency virus in infant born to seropositive mothers. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1649-1654.
- RONNINGEN, K.; THORSBY, E. (1989). The amino acid at position 57 of the HLA-DQB chain and susceptibility to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Human Immunology*, 26: 215-225.
- ROOD, J.J. van ; EERNISSE, J.; LEEUWEN, A. (1958). Leucocyte antibodies in sera of pregnant women. *Nature*, 181: 1735-1737.

- ROOD, J.J. van. (1962-a). Leucocyte antigen and transplantation immunity. *Proc. of the Eight Congress of the Eur. Soc. of Haematology, Viena*. p, 161-162.
- ROOD, J.J. van. (1962-b). Leucocytes grouping. A method and its application. *Thesis, State University Leiden*.
- ROOD, J.J. van; LEEUWEN, A. (1963). Leucocyte grouping. A method and its application. *J. Clin. Invest.*, 42: 1382-1387.
- ROOD, J.J. van; LEEUWEN, A.; SCHIPPERS, A.; VOOYS, W.; FREDERIKS, E.; BALNER, H.; EENISSE, J. (1965). Leucocytes groups. The normal lymphocyte transfer test and homograft sensitivity. In: *Histocompatibility Testing 1965*, Munksgaard, p. 37.
- ROOD, J.J. van; LEEUWEN, A.; SCHIPPERS, R.; CEPPELLINI, R.; MATTIUS, P.L.; CURTONI, E. (1966). Leucocytes groups and their relation to homotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 129: 467-452.
- ROOD, J.J. van; LEEUWEN, A. van; KEUNING, J.J. ; BLUSSE, A. (1975). The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxic technique. *Tissue Antigens*, 5: 73-79
- ROOD, J.J. van; LEEUWEN, A.; KEUNING, J.; ABLAS, A. (1975). The serological recognition of human MLC determinants using a modified cytotoxicity technique. *Tissue Antigens*, 5: 73-77.
- ROOD, J.J. van; LEEUWEN, A. (1990-a). The history of HLA as seen from Leiden. In: TERASAKI, P. (ed.). *History of HLA: ten recollections*. UCLA Tissue Typing Laboratory, p. 33-59.
- ROOD, J.J. van; CLAAS F. (1990-b). The influence of allogeneic cells on the human T and B cell repertoire. *Science*, 248: 1388-1393.
- ROSSINI, A.; MORDES, J.; LIKE A.; (1985). Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. *Annu. Rev. Immunol.* 3 : 289-320.
- RUBINSTEIN, P.; WALKER, M.; SUCIU-FOCA, N.; GINSBERG-FELLNER, F. (1990). No excess of DR3/DR4 haplotypes in Askenasi Jewish or Hispanic IDDM patients. *Diabetes*, 39: 1138-1143.
- RUDERMAN, R.; WARD, F. (1977). HLA-B27 in black patients with ankylosing spondylitis. *Lancet*, i: 610-614.
- SACHS, J.A. (1977). HLA antigens in multiple sclerosis. *Proc. R. Soc. Med.*, 70: 869-871.
- SACHS, J.A.; CUDWORTH, A.G.; JARAQUEMADA, D.; FESTENSTEIN, H. (1980). Type 1 diabetes and the HLA-D locus. *Diabetologia*, 18: 41-43.

- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. (1985). Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- SAIKI, R.K.; BUGAWAN, T.L.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H. (1986). Analysis of amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele specific oligonucleotides probes. *Nature*, 324: 163-166.
- SAIKI, R.K.; GE.FAND, D.H.;STOFEL, S. (1988). Primer - direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- SAIKI, R.; CHANG, C.; LEVENSON, C. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes. *N. Engl. J. Med.*, 319: 537-541.
- SALVATIERRA, O.; TERASAKI, P. (1983). Four year experience with donor specific blood transfusion. *Transp. Proc.*, 15: 924-929.
- SALVATIERRA, O; MELZER, J; POTTER, D. (1985). A seven year experience with donor specific blood transfusion: results and considerations for maximum efficacy. *Transplantation*, 40: 654-670.
- SASAZUKI, T.; NISHIMURA, Y.; MUTO, M.; OHTA, N. (1983). HLA linked genes controlling immune response and disease susceptibility. *Immun. Rev.*, 70: 51-58.
- SCHARF, S.; HORN, G.; ERLICH, H. (1986). Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 233: 1076-1078.
- SCHARF, S.; FRIEDMAN, A.; BRAUTBAR, C. (1988). HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris. *Proc. Natl. Acad. Scienc. USA.*, 85: 3504-3508.
- SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P.; BLUESTONE, R.; PEARSON, G. (1973). High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N. Eng. J. Med.*, 288: 704-706.
- SCHROEDER, J. & DE LA CHAPELLE, A. (1972). Fetal lymphocytes in the maternal blood. *Blood*, 39, 153-162.
- SCHROEDER, J. (1974). Passage of leucocytes from mother to fetus. *Scand. J. Immunology*, 3: 369-373.
- SEAGER, K.; BASHIR, H.; GECZY, A.; EDMONDS, J.; DE VERE-TYNDALL, A. (1979). Evidence for a specific B27 cell surface marker on lymphocytes of patients with ankylosing spondylitis. *Nature*, 277: 68-70.

- SEMANA, G.; FAUCHET, R. (1989). DR4 associated DQW3 subdivision in insulin-dependent diabetes with polyendocrinopathies: serology and RFLP. In: DUPONT, B. (ed.), *Immunobiology of HLA*, Springer-Verlag, p. 414-415.
- SERJEANTSON, S. (1983). HLA and susceptibility to leprosy. *Immunol. Rev.* 70: 89-112.
- SESSO, R.; ANÇÃO, M.S.; DRAIBE, S.A.; SIGULEM, D.; RAMOS, O.L.; BRASILIAN TRANSPLANTATION CENTERS. (1990) Survival analysis of renal transplantation in Brazil: report of the Brazilian Registry of Renal Transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 5: 956-961.
- SHEEHY, M.; BACH, F.H. (1976). Primed LD typing (PLT)- technical considerations. *Tissue Antigens*, 8: 157-171.
- SHREFFLER, R.F.; DAVID, C. (1975). The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: Genetic variation, function and organization. *Adv. Immunol.*, 20: 125-195
- SIEBERS, J.W.; KNAUF, J.; HILLEMANS, H.G.; VOGEL, W. (1975) Antenatal sex determination in blood from pregnant women. *Humangenetik*, 28: 271-280.
- SIEMIATYCKI, J.; COLLE, E.; CAMPBELL, S.; DEWARD, R.; AUBERT, D.; BELMONTE, M.M.; (1988). Incidence of IDDM in Montreal by ethnic group and by social class and comparisons with ethnic groups living elsewhere. *Diabetes*, 37: 1096-1102.
- SILVER, H.; SCHOPPMANN, A. (1987). Limitations of paternity testing calculations. *Transfusion*, 27(3): 288-290.
- SILVER, H. (1989). Paternity testing. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 27(5): 391-408.
- SINHA, A.; BRAUTBAR, C.; SZAFER, F. (1988). A newly characterized HLA-DQB allele association with pemphigus vulgaris. *Science*, 239: 1026-1029
- SINGAL, D.; MICKEY, M.; TERASAKI, P. (1969). Serotyping for homotransplantation. Analysis of kidney transplants from parental versus siblings donors. *Transplantation*, 7: 264-258.
- SO, A.; TROWSDALE, J.; BODMER, J.; BODMER, W. (1984). DNA polymorphism of HLA-DR β and HLA-DP β genes. In: ALBERT E. (ed.). *Histocompatibility Testing 1984*. Springer-Verlag, p. 565-568.
- SOLOW, H.; HIDALGO, R.; SINGAL, D. (1979). Juvenil-onset diabetes: HLA-A, B, C and DR alloantigens. *Diabetes*. 28: 1-4.
- SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journ. Mol. Biol.*, 98: 503-517.

- SPEES, E. K.; MILAN, R. (1985). The current experience with cyclosporine in the United States: cadaver kidney transplantation. *Transp. Proc.*, 17: 2660-2664.
- STARZL, T.; LERNER, R.; DIXON, F.; TERASAKI, P. (1968). Shwartzman reaction after human renal homotransplantation. *New Engl. J. Med.* 278: 642-645.
- STASTNY, P.; BALL, E.; DRY, P.J.; NUNEZ, G. (1983). The human immune response region (HLA-D) and disease susceptibility. *Immunol. Rev.*, 70: 111-154.
- STASTNY, P.; OLSEN, O.; PINKUS, T.; KHAN, M.; BALL, E. (1989). DR4 and DR1 define different subsets of patients with rheumatoid arthritis. In: DUPONT, B. (ed), *Immunobiology of the HLA*. Springer-Verlag, p. 418-419.
- STASTNY, P. (1978). Association of B-cell alloantigen DRW4 and rheumatoid arthritis. *New Engl. J. Med.* 298: 869-871.
- STERN, P. & RITTNER, C. (1981). HLA-DR screening programm. *Arztl. Lab.*, 27: 209-214.
- SVEJGAARD, N.; KISSMEYER-NIELSEN, F. (1968). Cross-reactive human HL-A isoantibodies. *Nature*. 219, 868-869.
- SVEJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYER, L. (1980). Insulin dependent diabetes mellitus. In: TERASAKI, P.(ed.), *Histocompatibility Testing 1980*, UCLA Tissue Typing Laboratory, p. 638-642.
- TANANOV, A.; ISAEV, V. (1981). HLA antigens in patients with blood pathologies. *Prob.Gematol.Pereliv.Krovi.*, 26: 8-12.
- TAYLOR, C.J.; CHAPMAN, J.R.; FUGGLE, S.; MORRIS, P.J. (1987). A positive B cell crossmatch due to IgG anti-HLA-DQ antibody present at a time of transplantation in a successful renal allograft. *Tissue Antigens*, 3, 439-453.
- TERASAKI, P.; McCLELLAND, J. (1964). Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204: 998-1000.
- TERASAKI, P.; BOND, J. (1978) Twins with two different fathers identified by HLA. *N.Engl.J.Med.*, 299: 590-593.
- TERASAKI, P.; TAKEMOTO, S.; PARK, M.S.; CECKA, J.; MICKEY, M. (1990). Molecular HLA matching. *Transplantation Proceedings* 23(1): 365-367.
- TERASAKI, P.; TOYOTOME, A.; MICKEY, M.R. (1985). Patient, graft and functional survival rates. In: TERASAKI, P. (ed.). *Clinical Transplants 1985*. UCLA Tyssue Typing Laboratory, p.1-3.
- TERASAKI, P.; HIMAYA, N.; CECKA, M. (1986). Overview. In: TERASAKI, P.(ed.). *Clinical Transplants 1986*. UCLA Tyssue Typing Laboratory, p. 367-391.

- THOMPSON, A.W. (1989). Cyclosporin. Mode of action and clinical application. In: THOMPSON, A. W. (ed). *Cyclosporin*. Kluwer Academic Publishers. London.
- THORSBY, E. ; KISSMEYER-NIELSEN, F. (1970). HL-A antigens and genes. Production of HL-A typing antisera of desired specificity. *Vox Sang.*, 17: 417-427.
- TING, A.; MORRIS, P.J. (1978). Reactivity of autolymphocytotoxic antibodies from dialysis patients with lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Transplantation*, 25: 31-33.
- TING, A.; MORRIS, P.J. (1983). Successful transplantation with a positive T and B crossmatch due to autoreactive antibodies. *Tissue Antigens*, 21: 219-226.
- TING, A. (1988). HLA matching and cross-matching. In: MORRIS, P.(ed.). *Kidney Transplantation Principles and Practice*. 3^o ed. p.185-213.
- TING, A. (1989a). What crossmatches are required in organ transplantation? *Transp. Proc.* 21(1): 613-614.
- TING, A. (1989b). Renal Transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 1: 1191-1194.
- TIWARI, J.; TERASAKI, P. (1985). Endocrinology. In: TIWARI J. ; TERASAKI, P. (ed). *HLA and Disease Association*. Springer-Verlag, p. 185-210.
- TIWARI, J.; TERASAKI, P. (1985). HLA and Neurology, In: TIWARI, J.; TERASAKI, P.(ed.). *HLA and Diseases Association*, Springer Verlag, N.Y. p.153-167.
- TODD, J.A.; BELL, J.; McDEVITT, H. (1987). HLA-DQB gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 329: 599-604.
- TODD, J.; BELL, J.; MACDEVITT. (1988). A molecular basis for genetic susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Gent.*, 4 :129-134.
- TODD, J. (1990). Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunology Today*. 11:122-128.
- TODD, J.; FUKUI, Y.; KITAGAWA, T.; SASAZUKI, T. (1990). The A3 allele of the HLA-DQA1 locus is associated with susceptibility to type 1 diabetes in Japanese. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 1094-1098.
- TOVEY, G.H. ; NELSON, S.D.; MOORE, B. (1973). Response in pregnancy to LA and FOUR antigens. *Symp. Immunol. Stand.*, 1: 53-56.

- TWEEL, J.G.van; ABLAS, A.; KEUNNING, J.; GOULMY, E.; BACH, M.; ROOD, J.J.van. (1973). Typing for MLC. Lymphocytes from cousin marriage offspring as typings cells. *Transpl. proc.*, 5: 1335-1339.
- VASSALLI, P.; JEANNET, M.; MOERLOSE, P.; CHARDONNENS, X. (1979). A screening program for anti-DR typing reagents. *Tissue Antigens*, 13: 77-80.
- WAKE, C.; LONG, E.; MACH, B. (1982). Allelic polymorphism and complexity of the genes for HLA-DR β -chains: direct analysis by DNA-DNA Hybridisation. *Nature*, 300: 372-374.
- WALKER, J.; COOK, J.; HARRINSON, P.; STASTNY, P. (1982). HLA and the response of lymphocytes to viral antigens in patients with multiple sclerosis. *Hum. Immunol.*, 4: 71-78.
- WELSH, J.; AVAKIAN, H.; COWLING, P.; EBRINGER, A.; WOOLEY, P.; PANAYI, G. (1980). Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and klebsiella: Cross reactivity studies with rabbit antiserum. *Br. J. Exp. Pathol.*, 61: 85-91
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. (1989). The polymerase chain reaction. *Trends in Genet.*, 5: 185-189.
- WIENER, A.S. (1968). Chances of proving nonpaternity with a system determined by tripe allelic codominant genes. *Am. J. Hum. Genet.*, 20: 279-284.
- WILLIAMS, G. (1986). Transplant rejection: an overview from the clinical perspective. In: MERYMAN, H. (ed.). *Transplantation Approaches to Graft Rejection*, Alan R. Liss Inc., p. 1-9.
- WILLIAMS, A.F. (1987). A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunology Today*, 8: 298-304.
- WINCHESTER, R.; KUNKEL, H. (1979). The human Ia system. *Adv. Immunol.* 28: 221-292.
- ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. (1977). Major transplantation antigens, viruses, and specificity of surveillance T cells. *Contemporary Topics in Immunobiology*, 7: 179-186.
- ZEIDLER, A.; LONN, J.; FRASIER, S.D.; KUMAR, D.; PENNY, R.; TERASAKI, P. (1980). HLA-DRW antigens in Mexican-American and Black-American diabetic patients. *Diabetes*, 29: 247-250.