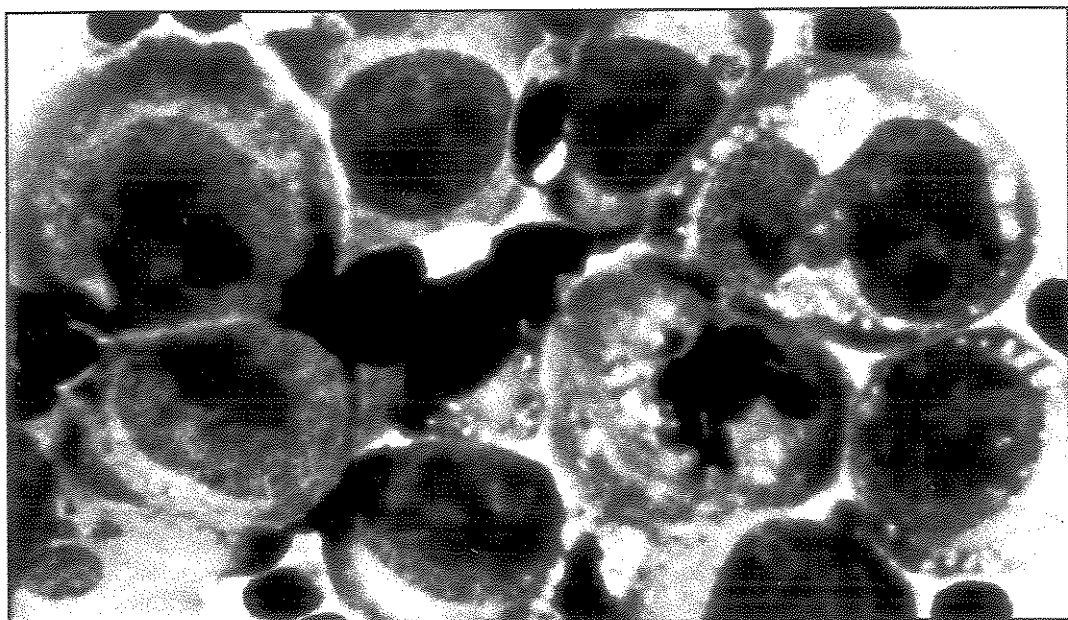


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS ANTÍGENOS DE
HISTOCOMPATIBILIDADE DE CLASSE II:
ANÁLISE COM FAMÍLIAS INFORMATIVAS PARA
TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**



MARGARETH BATISTELLA ARAUJO

Campinas
1997

Ar15c

30908/BC

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS ANTÍGENOS DE
HISTOCOMPATIBILIDADE DE CLASSE II:
ANÁLISE COM FAMÍLIAS INFORMATIVAS PARA
TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Margarita Batistella</i> <i>Carvalho</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

25/04/97

Caraci Helena S. Kraemer

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer

Campinas
1997



9707782

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	77 UNICAMP
	Ar15c
V.	E.
TOMBO B3	30908
PROC.	28/197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 12,00
DATA	28/06/97
N.º EPD	

CM-00098914-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Ar15c

Araújo, Margareth Batistella

Contribuição ao estudo dos antígenos de histocompatibilidade de classe II: Análise com famílias informativas para transplante de medula óssea / Margareth Batistella Araújo – Campinas, SP:[s.n.], 1997.
86f: illus.

Orientadora: Maria Helena Stangler Kraemer
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Medula óssea - Transplante. 2. Linfócitos. 3. Antígenos de histocompatibilidade. I. Kraemer, Maria Helena Stangler. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

Local e Data : Campinas, 25 de abril de 1997

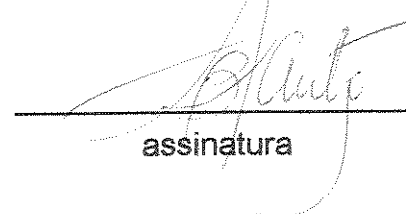
BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer


assinatura

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos


assinatura

Profa. Dra. Dagmar F. Machado


assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada

assinatura

APROVADA

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Orlando e Clarisse, e aos meus irmãos,
pelo que eles são e pelo que me ajudaram a ser.*

*Ao meu marido e companheiro, José Carlos, pela sua
compreensão, apoio e incentivo, pelas horas e horas de
convivência das quais abdicou, com amor.*

Às minhas filhas Rafaela e Fernanda, por elas existirem.

“Se você está percorrendo o caminho de seus sonhos, comprometa-se com ele. Não deixe a porta de saída aberta, através da desculpa: “Ainda não é bem isto que eu queria.” Esta frase guarda dentro dela a semente da derrota.

Assuma o seu caminho. Mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba que pode fazer melhor o que está fazendo. Se você aceitar suas possibilidades no presente, com toda certeza vai melhorar no futuro.

Mas, se negar suas limitações, jamais se verá livre delas.

Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros. E, sobretudo, não se deixe paralisar por sua própria crítica.”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer, minha orientadora, pelo apoio e incentivo.

Aos pacientes e respectivas famílias, pela inestimável colaboração que permitiu a viabilização deste trabalho.

Ao Centro Infantil de Investigação Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini, particularmente a Dra. Sílvia Regina Brandalise, do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que permitiu o acesso total junto aos pacientes; e as Dras. Vera Aranega e Maria Emília Pita, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna, do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela ajuda no estudo estatístico desta pesquisa.

Ao Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que possibilitou o desenvolvimento da presente tese de mestrado.

Ao Laboratório de Imunogenética da Escola de Saúde Pública, da Universidade Católica de Louvain, Bruxelas - Bélgica, e de seu responsável, Dr. Marc De Bruyère, pela valiosa colaboração no fornecimento dos anti-soros HLA.

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo grande apoio e colaboração em seu laboratório.

Ao Hemocentro da UNICAMP, pelas importantes contribuições, quanto ao fornecimento contínuo de soro humano para este trabalho.

Aos companheiros Bete, Vilma e José Renato, do Serviço de Radioterapia da UNICAMP, pela irradiação das células para cultura, que foi de grande valia.

Aos colegas Gilberto e Márcia, do Laboratório de Imunologia Celular do CIPOI da UNICAMP, que de um jeito ou de outro, me ajudaram nesta trajetória.

Aos amigos Arthur, Ana Cristina, Vera, Eliana, Vilma e Paulo, do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, que me acompanharam de perto durante os trabalhos, pela valiosa ajuda e pelo estímulo de seguir adiante.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelos ensinamentos, atenção e amizade.

Às Profas. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Dra. Dagmar F. Machado e Dra. Júlia Keiko Sakurada, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas valiosas sugestões na análise deste trabalho.

Aos funcionários da Sessão de Apoio Didático da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela atenção e disposição, além da excelente qualidade de seus serviços profissionais.

A todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, cujos nomes estão ausentes neste texto, mas presentes na minha memória e no meu coração.

E a Deus, cuja presença forte em minha vida, tem tirado todas as pedras do caminho, fazendo mais suave a caminhada...!

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO.....	1
I-1.	O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	2
I-1.1.	Considerações gerais.....	2
I-1.2.	Moléculas e genes HLA.....	4
I-1.3.	Expressão das moléculas HLA.....	7
I-1.4.	Desequilíbrio de ligação.....	8
I-1.5.	Métodos de detecção das moléculas HLA.....	9
I-2.	TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	10
I-2.1.	Considerações gerais.....	10
I-2.2.	Cultura mista de linfócitos.....	13
I-2.3.	Famílias informativas.....	15
II.	OBJETIVOS.....	18
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
III.1.	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	21
III-1.1.	Pacientes.....	21
III-1.2.	Controles.....	21
III-2.	TIPAGEM SOROLÓGICA DOS ANTÍGENOS	
	HLA DE CLASSE II.....	22
III-2.1.	Obtenção de células mononucleares.....	22
III-2.2.	Obtenção de linfócitos B	22

III-2.3.	Reação de microlinfocitotoxicidade.....	23
III-2.3.1.	Anti-soros.....	23
III-2.3.2.	Complemento	23
III-2.3.3.	Controles positivo e negativo.....	24
III-2.3.4.	Tipagem HLA-DR e DQ.....	24
III-3.	CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS	25
III-3.1.	Preparação da suspensão de linfócitos.....	25
III-3. 2.	Manutenção de linfócitos em nitrogênio líquido.....	25
III-3.3.	Descongelamento de linfócitos.....	26
III-3.4.	Cultura de linfócitos estimulados pelo mitógeno PHA.....	26
III-3.5.	Ensaio em cultura mista de linfócitos.....	27
III-3.5.1.	Células respondedoras e estimuladoras.....	27
III-3.5.2.	Controles.....	27
III-3.5.3.	Reação de cultura mista de linfócitos.....	28
III-4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
IV.	RESULTADOS.....	31
IV-1.	CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE PACIENTES	32
IV-2.	CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO CONTROLE.....	34
IV-3.	COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS HLA DE CLASSE II E CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS.....	37
IV-4.	ASSOCIAÇÃO DE ANTÍGENOS HLA DE CLASSE II E CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS.....	39

IV-5	FREQUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE ANTÍGENOS HLA-DR, DQ, ENCONTRADA EM COMUM NOS CASAIS.....	45
V.	DISCUSSÃO.....	49
VI.	CONCLUSÕES.....	57
VII.	RESUMO.....	60
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	62
X.	APÊNDICE.....	75

I. INTRODUÇÃO

I-1. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

I-1.1. Considerações gerais

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) no homem representa a região cromossômica mais intensamente estudada. Nessa região se localizam uma série de genes que codificam para aloantígenos, isto é, antígenos que diferem entre indivíduos da mesma espécie.

O primeiro antígeno leucocitário humano (HLA) foi descoberto por Dausset em 1958, através da constatação de anticorpos leucoaglutinantes detectados pela primeira vez, tanto no soro de pacientes com múltiplas transfusões sanguíneas, como em mulheres gestantes e múltiparas. Este antígeno foi denominado na época, antígeno MAC, e que corresponde a atual especificidade HLA-A2. Este sistema foi denominado e reconhecido como Complexo Principal de Histocompatibilidade, responsável pela indução rápida de transplantes incompatíveis, bem como de anticorpos humorais. O conhecimento progressivo sobre as associações levaram à interpretação de que tratava-se de um sistema imunogenético complexo e análogo ao sistema de histocompatibilidade H-2 do camundongo (IVANNY & DAUSSET, 1966).

A primeira função biológica atribuída a estes antígenos, foi a indução de reação de rejeição a aloenxertos, daí terem sido denominados antígenos de histocompatibilidade. Sua importância, inicialmente reconhecida no campo dos transplantes, foi muito ampliada com a descoberta de importantes funções biológicas destes antígenos.

Um primeiro papel atribuído aos genes do CPH, foi relacionado ao controle do reconhecimento de célula a célula, durante os processos de diferenciação celular (BENACERRAF & DEVITT, 1972).

A descoberta de que a suscetibilidade para a indução de tumores estava ligada ao CPH, veio mostrar que havia um controle genético dos genes

deste sistema na resposta a infecções por vírus oncogênicos (LILLY & PINNEUS, 1973).

O papel do CPH, na imunidade mediada pelas células T, foi amplamente pesquisado no sistema H-2 do camundongo, mostrando que a atividade citotóxica das células T específicas para o vírus, estava restrita ao H-2 (DOHERTY & ZINKERNAGEL, 1975a).

Modelos animais foram utilizados para melhor definir, os detalhes moleculares do reconhecimento do antígeno para a célula T, partindo do princípio que a função comum das glicoproteínas é a de apresentar fragmentos antigênicos para as células T (MARYANSKI et alli., 1988).

Para as moléculas de classe I, foi demonstrado que peptídeos antigênicos têm a capacidade de interagir direta e especificamente com moléculas do CPH. Tais complexos podem estimular a produção de interleucina (CESANO et alli., 1993). Em ensaios de estimulação "in vitro", foi observada correlação direta entre a habilidade do peptídeo para competir com o antígeno, tanto na ligação direta com as moléculas CPH de classe II, quanto na habilidade de inibir a apresentação do antígeno (LAMÓNT & ADORINI, 1996). Além disto, vários antígenos HLA têm sido relatados como genes de suscetibilidade ou marcadores destes genes, em grande número de doenças (NEPOM & NEPOM, 1995).

Atualmente, reconhecem-se as moléculas CPH como elementos capitais no desenvolvimento de resposta imune, a qualquer antígeno estranho ao organismo e o exuberante polimorfismo dessas moléculas no decorrer de um longo período evolucionário, vem sendo extensivamente pesquisado (KLEIN & SHEREFFLER, 1971; KWOK et alli., 1993).

O estudo do polimorfismo das moléculas e genes CPH, muito contribuiu para a compreensão da organização da região gênica deste complexo. Os trabalhos iniciais de Bodmer (1972), contribuíram para descrever conceitualmente o polimorfismo genético, que consiste na existência em uma população de dois ou mais alelos em um determinado *locus*, cada um dos

quais numa frequência de mais de 1%. A grandeza deste polimorfismo é calculada pela frequência total dos heterozigotos em relação a frequência total dos homozigotos. Neste contexto o CPH possui um polimorfismo de grande variabilidade, se comparado com outros polimorfismos conhecidos.

Desde então, o polimorfismo das moléculas CPH tem sido consideravelmente aumentado, tanto para as moléculas de classe I (PARHAM et alli., 1993), como para região HLA-D (KRONENBERG et alli., 1994). Este polimorfismo genético pode ser o responsável por uma intensa resposta imunológica, quando tecidos ou órgãos são transplantados entre indivíduos incompatíveis (PARHAM & OHTA, 1996).

Os estudos moleculares tem mostrado que as regiões de maior polimorfismo estão localizadas no sulco de ligação ao peptídeo, por outro lado, os métodos moleculares, especialmente aqueles empregando DNA amplificado pela reação de polimerização em cadeia e/ou sequenciamento de bases nitrogenadas, tem definido ainda mais o polimorfismo (BODMER et alli., 1995).

A nomenclatura oficial das especificidades HLA definidas por métodos sorológicos e moleculares, segue as orientações da "Nomenclatura dos fatores HLA da Organização Mundial de Saúde". De acordo com a última nomenclatura (BODMER et alli., 1995), mais de 450 alelos de classe I e II já haviam sido relatados. Por meio da cultura mista de linfócitos usando células homozigotas tem-se definido pelo menos 29 especificidades HLA-D e 6 especificidades HLA-DP (BODMER et alli., 1995).

I-1.2. Moléculas e genes HLA

Os genes que compõem o CPH humano têm sido agrupados em regiões designadas de classe I, II e III, estendendo-se por cerca de 3500 Kilobases no braço curto do cromossomo 6 (HANSEN et alli., 1993), onde mais de 40 *loci* no CPH codificam diversas moléculas, muitas delas, diretamente envolvidas na resposta imune. As moléculas de classe I e II são glicoproteínas

de superfície celular e diferem na estrutura, distribuição tecidual e função (KOVATS et alli., 1990).

A região de classe I engloba os *loci* HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L expressos na maioria das células nucleadas (BODMER et alli., 1995). Na região de classe I com um segmento de 2000 Kilobases-Kb são identificados os genes HLA-A, B e C que codificam moléculas clássicas de histocompatibilidade. Estas moléculas estão envolvidas na rejeição de um transplante, sendo também fundamentais na imunocompetência e estão relacionadas no reconhecimento de antígenos, na interação de linfócitos e no desenvolvimento da autotolerância (THOMPSON, 1993). Os genes HLA-E e HLA-F codificam moléculas encontradas nos tecidos fetais, enquanto que os genes HLA-G são responsáveis pela síntese de moléculas presentes apenas em tecido placentário (CAROSELLA et alli., 1996). Os *loci* HLA-K, J e L são pseudogenes, isto é, não codificam nenhuma proteína.

As moléculas de classe I são heterodímeras, constituídas de duas subunidades de polipetídeos. A cadeia pesada ou alfa (α) é uma glicoproteína polimórfica de peso molecular 44000 daltons codificada dentro do CPH e está associada não covalentemente a cadeia leve de peso molecular de 12000 daltons, a β_2 microglobulina (β_2 -m), codificada por um gene situado no cromossomo 15. A cadeia pesada α liga a molécula a membrana celular, possui 338 aminoácidos e contém 3 regiões: uma região hidrofílica extracelular, uma região hidrofóbica transmembrana e uma região hidrofílica intracelular. A região extracelular é subdividida em domínios α_1 , α_2 , α_3 . O grande polimorfismo das moléculas de classe I é encontrado nos domínios α_1 e α_2 (BJORKMAN et alli., 1987; BJORKMAN & PAHAM, 1990; HANSEN et alli., 1992), enquanto que o domínio α_3 basicamente não polimórfico apresenta grande homologia estrutural com as cadeias pesadas das imunoglobulinas. Considerando que os genes para as moléculas HLA-A, B e C são codominantes, pelo menos seis dessas moléculas podem ser encontradas nas superfícies celulares (NEPOM & NEPOM, 1994; NEPOM & NEPOM, 1995).

Outras moléculas codificadas pelos genes HLA-E, F e G somente são expressas nas células em condições especiais, como a molécula HLA-G em trofoblasto (KOVATS et alli., 1990).

As moléculas de classe II são heterodiméricas codificadas pelos genes do CPH, compostas de uma cadeia α_1 de peso molecular 34000 daltons e uma cadeia β de peso molecular 29000 daltons, unidas não covalentemente e formadas pelos domínios α_1 e α_2 ou β_1 e β_2 . O polimorfismo dessas moléculas encontra-se nos domínios α_1 e β_1 . Os domínios α_2 e β_2 também apresentam homologia estrutural com a cadeia pesada das imunoglobulinas (JOHNSON et alli., 1991; HANSEN et alli., 1992). As moléculas HLA de classe II são codificadas por diversos genes nas regiões DR, DQ e DP. Na região HLA-DR, o gene HLA-DRA codifica apenas uma cadeia α , não polimórfica. Dentre os genes que codificam as cadeias β (DRB1-9), apenas os genes HLA-DRB1, 3, 4 e 5 são responsáveis pela síntese dessas moléculas, sendo todas polimórficas. Na região HLA-DQ os genes DQA1 e DQB1 codificam, respectivamente, as cadeias α_1 e β_1 polimórficas ao passo que os genes HLA-DQA2, DQB2 e DQB3 são pseudogenes (GOLDMAN et alli., 1994).

Dependendo da complementaridade dos genes DQA1/B1 e DPA1/B1 nos mesmos *cis* ou em haplótipos diferentes *trans*, até oito moléculas HLA-DR e DQ distintas podem ser expressas nas superfícies celulares (BRODSKY et alli., 1996).

Uma das principais funções das moléculas de classe II é a apresentação de peptídeos exógenos para as células CD4 positivas (BENACERRAF, 1981). As moléculas de classe I, tem uma importante função na apresentação de peptídeos endógenos/virais às células T CD8 positivas. Os domínios α_3 da molécula de classe I e β_2 da classe II fazem a ligação entre as moléculas CD8 e CD4 respectivamente durante o processo de apresentação do antígeno (NEPOM & NEPOM, 1995; BODMER et alli., 1995; BRODSKY et alli., 1996).

Existem outros genes na região HLA, que codificam moléculas relacionadas ao transporte de peptídeos para o retículo endoplasmático, ou seja, genes TAP1 e TAP2 ("transporter of antigens peptides" - transportador de peptídeos antigênicos) e ainda genes relacionados a proteossomas LMP2 e LMP7 ("Large multifunctional protease" - Protease multifuncional grande) (BODMER et alli., 1995).

Os genes de classe III incluem o segundo e o quarto componentes (C2 e C4) da via clássica do sistema complemento e o fator B, da via alternativa, e ainda contém genes para as enzimas 21-hidroxilase (21A, 21B) a proteína do choque térmico (Hsp 70) e os fatores de necrose tumoral $TNF\alpha$ e β (NEPOM & NEPOM, 1994).

I-1.3. Expressão das moléculas HLA

Os genes dos *loci* HLA-A, B, C e os antígenos que eles controlam, estão presentes em virtualmente todas as células nucleadas do organismo, contudo o nível de expressão dos antígenos pode variar consideravelmente de uma célula a outra, aumentando muito após a exposição a determinadas linfocinas (WALLACH et alli., 1982). A região HLA-D ou produtos de classe II (HLA-DR, DQ, DP) expressam-se em linfócitos B e células T ativadas, e foram encontrados originariamente em células linforeticulares derivadas da medula óssea. Algumas células epiteliais podem apresentar antígenos de classe II durante os processos inflamatórios (DAAR et alli., 1984).

Em 1987, SANT et alli. mostraram que a associação das cadeias alfa e beta em forma de heterodímero estável na superfície da membrana celular é necessária para a expressão das moléculas HLA, principalmente as de classe II.

Paralelamente, LOISEAU et alli. (1986) demonstraram que nas células blásticas de pacientes com leucemias linfóides e mielóides ocorre, uma

grande variação na expressão destes antígenos. Da mesma forma, TONGIO et alli. (1986) e DEXLER et alli. (1988) comprovaram, através de pesquisas com clones de células leucêmicas, uma deficiência na expressão celular para os antígenos de classes II (HLA-DR, DQ e DP).

A maior parte das células leucêmicas expressam as moléculas HLA-DR, no entanto a expressão das moléculas HLA- DQ é mais fraca, principalmente em algumas leucemias agudas. Nas células leucêmicas foi observado uma heterogeneidade para a expressão dessas moléculas, apresentando um grau de positividade durante o desenvolvimento de células B, onde primeiramente aparece o HLA-DR, após o HLA-DQ e a seguir o HLA-DP, indicando diferenças nos estágios de parada na maturação e uma regulação diferencial desses marcadores, podendo as células B malignas não apresentarem a expressão de uma ou mais dos três tipos de moléculas HLA de classe II. ELKINS et alli. (1984), também mostraram que as moléculas de classe I (HLA-A, B e C) em células leucêmicas eventualmente apresentam uma expressão fraca quando comparadas com as células normais, sendo que esta diminuição quantitativa, todavia não se estende para a maioria dos casos. GARRIDO et alli. (1993) e MACDOUGALL et alli., (1990) observaram que a expressão das moléculas HLA é frequentemente alterada em tumores comparado ao tecido de origem. Dado a função central dos produtos do CPH na restrição do reconhecimento de células T, a regulação da expressão HLA nos tumores pode ser uma estratégia para evasão da imunovigilância pelas células malignas que frequentemente expressam antígenos de superfície (neoantígenos), os quais são reconhecidos como estranho e eliminado pelo hospedeiro.

I-1.4. Desequilíbrio de ligação

Além da diversidade dos genes e do polimorfismo dos alelos, outra importante característica do complexo CPH é a existência de

alelos de diferentes *loci*, codificando um desequilíbrio genético para determinados alelos, e muitas vezes para o haplótipo inteiro. Assim, alelos de dois ou mais *loci* se transmitem juntos no mesmo haplótipo em uma frequência maior que a esperada para uma associação ao acaso (BODMER, 1987).

Os eventos que levam ao desequilíbrio de ligação e ao concomitante aparecimento de tais haplótipos incluem processos mutacionais e endocruzamento. As vantagens seletivas, são invocadas para justificar a continuidade de tais associações preferenciais (BODMER, 1987). Essas associações, portanto, devem ter um grande significado biológico, uma vez que as associações com os haplótipos em desequilíbrio de ligação, mostram induzir uma resposta imune particular, a qual pode significar vantagem ou desvantagem seletiva (TROWSDALE, 1987a).

O estudo das frequências dos alelos HLA e dos desvios relacionados, a taxa de recombinação no estudo de famílias com doadores para transplante é interessante, uma vez que, é possível calcular a probabilidade dos genes nos indivíduos. A probabilidade de dois genes (gene A e gene B) estarem presentes simultaneamente em um indivíduo é igual ao produto de suas respectivas frequências gênicas. Se o valor observado da frequência for significativamente diferente do valor esperado, dizemos que os genes estão em desequilíbrio de ligação.

I-1.5. Métodos de detecção das moléculas HLA

O polimorfismo das especificidades HLA pode ser detectado ao nível celular ou molecular. Ao nível celular os procedimentos iniciais utilizaram a aglutinação para detecção dos antígenos leucocitários. No entanto em 1964, TERASAKI & McCLLELAND descreveram um micrométodo de linfocitotoxicidade mediada por anticorpo e dependente de complemento, sendo o mais adequado para a detecção desses antígenos leucocitários, método este até hoje empregado. Os métodos sorológicos indispensáveis para a detecção de especificidades HLA de classe II (DR e DQ), dependem de uma

separação adequada de linfócitos B, de células viáveis, de expressão adequada de moléculas de histocompatibilidade na superfície celular e de disponibilidade do painel de anti-soros específicos (DARKE & DYER, 1993). Outro método celular bastante utilizado, particularmente para as especificidades HLA de classe II, para definir o *locus* B não detectado por sorologia, é a cultura mista de linfócitos. No final dos anos 80 e 90 houve grandes avanços nos procedimentos de tipagem dos alelos HLA, particularmente os de classe II utilizando o DNA genômico (REISMOEN, 1993).

Estudos correlacionando as especificidades HLA-DR, DQ e HLA-D, não mostraram até o momento a existência de uma relação direta entre o *locus* HLA-D e os antígenos HLA-DR e DQ (REED et alli., 1992). Existem poucos estudos das associações das moléculas HLA para definir compatibilidades realizadas em trabalhos amplos, incluindo um grande número de famílias e doenças associadas (STRONCE et alli, 1993) e nenhum estudo na população brasileira, motivo pelo qual nos levou a estudar e a comparar os dois métodos sorológicos e cultura mista de linfócitos.

I-2. TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

I-2.1. Considerações gerais

O transplante de medula óssea é caracterizado pela transferência das células precursoras hematopoiéticas, de um doador geneticamente idêntico, com a finalidade de restabelecer a função da medula e regenerar os elementos celulares do sangue e do sistema imune (ARMITAGE, 1994; HANSEN et alli., 1992).

As investigações na área de hematologia têm relacionado o transplante de medula óssea como a única terapia de cura e de eficácia no estágio final de determinadas patologias sanguíneas, envolvendo principalmente três doenças intimamente associadas: a leucemia linfóide

aguda (LLA), a leucemia mielóide aguda (LMA) e a anemia aplástica (AA) (MARSH & GEARY, 1991; GOLDMAN et alli., 1994; SCHWARTZ, 1995). Nessas três doenças acima citadas, as manifestações malignas envolvendo as células sanguíneas são consequências de um erro ou omissão, caracterizada nos processos iniciais de reconhecimento, diferenciação e proliferação da célula precursora da medula óssea. No entanto para a LLA, LMA e AA, existem marcadores de identificação que possibilitam a imunofenotipagem laboratorial no diagnóstico diferencial específico de cada doença (PICKER, 1994).

A leucemia linfóide aguda é uma doença maligna, que se origina nas células germinativas das linhagens linfocíticas, caracterizada por desarranjo na diferenciação e proliferação dessas células resultando em linfoblasto, seguida por uma expansão e proliferação clonal associada a blastos malignos e funcionalmente imaturos com características de células T e B. A disseminação das células leucêmicas é evidenciada principalmente, nos sítios extramedulares (MAUER, 1990).

A leucemia mielóide aguda é uma doença maligna, que igualmente se origina nas células germinativas das linhagens linfocíticas, caracterizada por um desarranjo na diferenciação e proliferação clonal dessas células em mieloblastos, os quais possuem a capacidade de modificar-se de uma forma desordenada em célula sanguínea não determinada ou em granulócitos, mantendo características tanto de células maduras como imaturas. Os blástos malignos encontram-se disseminados particularmente na própria medula óssea (LICHTMAN & HENDERSON, 1990).

A aplasia de medula ou anemia aplástica é uma síndrome onde o comprometimento para o erro ou omissão nos mecanismos de reconhecimento e proliferação de células precursoras, está associado a um desarranjo nos mecanismos de controle das células hemopoiéticas, resultando em uma redução da produção de células vermelhas, linfócitos e plaquetas, com depleção celular profunda da medula óssea com marcante hipoplasia de todos os elementos do sangue (DESSYPRIS, 1994). Os fatores genéticos

associados a determinadas especificidades dos antígenos leucocitários humanos (HLA) confere um grau de risco estatisticamente significativo em indivíduos suscetíveis (NIMER et alli., 1994; BORTIN et alli., 1987; SELL et alli., 1996) e podem ser citados entre as causas para a predisposição nas doenças descritas. Foi observado também uma perda na expressão de moléculas de classe II nos estágios finais de diferenciação de células B , tanto malignas como benignas (CARBTREE, 1989; CROUAU et alli, 1993) .

A origem tanto da LLA, LMA ou AA, é desconhecida porém similar nas leucemias linfóides e mielóides agudas (MARSH & GEARY, 1991). Possivelmente a somatória de vários fatores tais como: a suscetibilidade genética dos hospedeiro, a injúria nos cromossomos devido a agentes químicos e físicos, a incorporação de antígenos virais nas células primordiais indiferenciadas e suscetíveis (LICHTMAN & HENDERSON, 1990). Os Agentes mielotóxicos, tais como o benzeno, as irradiações, o cloranfenicol, os agentes alquilantes, os campos magnéticos e elétricos (MARSH & GEARY, 1991), os quais além de serem tóxicos para a medula, aparentemente impedem a síntese de DNA nas células precursoras diferenciadas e inibem a proliferação de células progenitoras (ADAMSON & ERSLEV, 1990).

O polimorfismo genético das moléculas CPH se acha intimamente associado às reações imunológicas envolvidas nos transplantes, na aceitação ou rejeição de um transplante alogênico e na regulação da resposta imune aos antígenos estranhos (WEYAND & GORONZY, 1994). Devido ao fenômeno da restrição do CPH reflete o fato de que, para proteger efetivamente o indivíduo de agentes nocivos como vírus, bactérias e fungos, o sistema imune precisa discriminar entre o próprio "self" e estranho "non-self" por meio das moléculas do CPH.

Dessa forma, porém, com diferenças nas moléculas HLA quando o doador e o receptor pertencem a mesma espécie genética, podem ocorrer reações de aloenxertos e as estruturas moleculares que iniciam essas reações são definidas como aloantígenos. Uma resposta imune a aloantígenos ocorre

quando as células do sistema imune são submetidas a antígenos estranhos. A estimulação de aloantígenos resulta em respostas imunes efectoras, tanto humorais como celulares, incluindo a produção de anticorpos específicos e citocinas e a indução de células T helper e T citotóxica (WEYAND & GORONZY, 1994).

O transplante de medula óssea pode provocar reações imunológicas no receptor, levando a rejeição do enxerto. Quando este fato ocorre, observa-se uma complicação conhecida como a doença do enxerto contra o hospedeiro, usualmente definida pela sigla em inglês GVHD, iniciada pela ativação dos linfócitos T do doador ao reconhecerem antígenos de histocompatibilidade estranhos no receptor (KRENSKY, 1990; LAFFERTY, 1995). Como essa reação é potencialmente letal, justificam-se os critérios e a necessidade de doadores idênticos ou compatíveis para o CPH, possibilitando uma reconstituição do sistema imune bem como uma tolerância imunológica entre o doador e o receptor (ANESETTI et alli., 1989).

Um grande número de trabalhos vem mostrando que as desigualdades para os antígenos HLA ou para os antígenos menores de histocompatibilidade, aumentam os riscos da "GHVD", a falta de pega ou insucesso do enxerto (KAMINSKY, 1989). Com base nesse princípio os doadores de medula óssea são selecionados em termos de igualdades para os antígenos HLA-A, B, C e HLA-DR, DQ. Para definir compatibilidades HLA para os antígenos de classe II, o teste de cultura mista de linfócitos tem sido aceito como ensaio padrão para definir compatibilidades dos determinantes da região HLA-D (MICKELSON et alli., 1993).

I-2.2. Cultura mista de linfócitos

A identificação das compatibilidades para os antígenos HLA de classe II por tipagem sorológica, apresenta dificuldades, devidas principalmente a limitação dos anti-soros HLA para definir as especificidades

próprias da população brasileira caucasóide miscigenada. O desenvolvimento de técnicas complementares como a cultura mista de linfócitos (CML), que avalia a resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de indivíduos geneticamente diferentes, vem sendo considerada como uma ferramenta eficaz para prever a resposta do hospedeiro em transplante de medula óssea.

A primeira idéia a respeito de um controle genético da reação alogênica em cultura linfocitária mista é atribuída a BAIN, WAS & LOWENSTEIN (1964) e BACH & HIRSCHLORN (1964), sendo ela relacionada a proliferação celular dos linfócitos do sangue periférico, de dois indivíduos não aparentados, logo, geneticamente diferentes. Células de ambos quando colocadas em cultura "in vitro" sofrem uma reação alogênica, se dividem, se multiplicam e se transformam em células blásticas. Nessa mesma época, BACH & VOYNO (1966) observaram que a inativação de uma das duas populações de linfócitos por um inibidor da síntese do DNA (mitomicina C ou radiação), de maneira a preservar as propriedades antigênicas dessas células, sem contudo perder a capacidade de resposta a um estímulo antigênico, conduzia à uma resposta unilateral, possibilitando a avaliação da resposta de uma das populações linfocitárias ao estímulo, ponto vital para saber se o doador tem antígenos que irão estimular a reação no receptor.

A técnica introduzida por HARTZAMN (1971) constitui um marco inicial bastante eficiente para a avaliação das reações de proliferação e cultura mista de linfócitos para detecção de aloantígenos de classe II, porém sugerindo modificações dos mesmos que trouxeram nítida melhoria. Assim o emprego da cultura mista de linfócitos para identificar alelos de classe II, constitui-se em avaliação eficiente capaz de prognosticar compatibilidades para definir o doador de um paciente para transplante de medula óssea (REINHERZ & SCHASMAM, 1981).

Utilizando anticorpos monoclonais em populações de linfócitos T, derivados do timo e populações depletadas de linfócitos T, REINHERZ &

SCHLOSMAN (1981) concluíram que os linfócitos T proliferam em resposta à um estímulo alogênico (células respondedoras), enquanto a estimulação devida a antígenos de classe II é atribuída aos linfócitos B, monócitos e linfócitos T ativados, os quais representam as células estimuladoras em cultura mista de linfócitos. Utilizando-se células respondedoras e estimuladoras é possível constatar diferenças entre antígenos HLA-D do provável doador e receptor (CHOPEK et alli., 1993).

O padrão para a cultura mista de linfócitos como encaramos hoje, representa o reconhecimento do não próprio e simula "in vitro" uma reação de aloenxerto. Este foi introduzido com o objetivo de ser um teste potencial para histocompatibilidade celular, para determinantes de estimulação alogênica que não podem ser definidos por sorologia.

A cultura mista de linfócitos consiste na capacidade das moléculas de classe II reconhecer e responder a uma variedade grande de agentes de estimulação antigênica, induzindo divisões celulares. "In vitro", esta resposta celular é medida por análise do nível de replicação de DNA, usando timidina radioativa incorporada dentro das células em divisão (DUBEY et alli., 1986). A maioria das células que expressam os antígenos de classe II, podem estimular a CML, mas o verdadeiro reconhecimento requer o receptor de célula T, levando a conclusão de que a participação dos macrófagos é essencial para a continuidade da estimulação das células (LAFFERTY, 1995).

Estudos indicam que a combinação do antígeno de histocompatibilidade HLA-D é a mais importante na prevenção da rejeição de aloenxertos. Evidências indicam que o locus HLA-D está mais perto do gene da resposta imunológica do que os outros *loci* HLA (ROESEL, 1981).

I-2.3. Famílias Informativas

A família informativa é o núcleo básico e imprescindível na determinação precisa das compatibilidades HLA entre indivíduos

geneticamente relacionados, com indicação terapêutica para um transplante de medula óssea. Nessa constituição familiar deverá sempre estar presente a doença em um ou mais dos seus membros.

Usualmente os estudos em famílias, na qual pelo menos um de seus membros constituintes apresenta a doença, parecem ser os mais convenientes e, muitas vezes, o único caminho para identificar associações. Nesses casos o critério para avaliação das diferentes combinações alélicas possíveis dentro do quadro familiar está fundamentado na herança para o resultado final do haplótipo, o qual representa a especificidade HLA em um cromossomo (DAVIDSON et alli., 1988).

Os antígenos de histocompatibilidade individuais são determinados por um haplótipo recebido da mãe e um do pai. As letras **a** e **b** são frequentemente empregadas para representar os haplótipos paternos e **c** e **d**, os haplótipos maternos. Consequentemente, uma criança e cada um dos seus pais tem um haplótipo idêntico e um haplótipo desigual (ROESEL, 1981). As combinações possíveis de haplótipos entre irmãos seguem as leis da genética mendeliana. Há uma em quatro chances (25%), de que dois irmãos tenham dois haplótipos idênticos e sejam perfeitamente compatíveis no *loci* HLA. Há uma em quatro chances de que eles tenham haplótipo totalmente desiguais (25%) e, uma em duas chances de que eles tenham um haplótipo idêntico e um haplótipo desigual (50%-semi-idêntico). Entretanto, eventos genéticos, como crossing-over, homozigose, alteram tais combinações, resultando em haplótipos observados muitas vezes diferentes daqueles esperados. Talvez esses eventos sejam a causa ou vice-versa do surgimento da doença na família, são perguntas feitas e ainda não respondidas na área da imunogenética humana. Porém, do ponto de vista prático, somente pelo estudo exaustivo de cada tipagem HLA e posterior associação entre os diferentes elementos da família será possível definir com grande margem de fidedignidade e exatidão, as compatibilidades entre o receptor e potenciais doadores. Como muitos pacientes possuem mais de um irmão e por outro lado certas especificidades HLA são mais comuns entre famílias com predisposição

às leucemias, aproximadamente 35% dos pacientes com as diferentes formas de leucemia, tem um irmão idêntico (DUPONT et alli., 1979).

Os trabalhos iniciais na literatura, documentando as associações dos alelos de histocompatibilidade (HLA) em famílias, resultaram da análise da ascendência: onde a partir do cruzamento dos pais formadores da primeira geração, são avaliadas as gerações posteriores, comparado a árvore genealógica familiar (OTT, 1974; AMOS, 1975). Estudos recentes e especificamente com famílias informativas, mostraram a associação dos antígenos HLA no grupo das doenças hematológicas: aplasia de medula, leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda. (SELL et alli., 1996).

Os métodos sorológicos para determinar a distribuição normal dos alelos e haplótipos HLA, bem como os desvios resultantes dos desequilíbrios de ligação, são usados para definir as diferenças entre as associações esperadas e observadas (FISHMAN et alli., 1978).

Portanto, é indispensável para o transplante o estudo familiar incluindo, além do paciente, o pai, a mãe e todos os irmãos, a fim de determinar a herança dos haplótipos HLA, ou seja, a distribuição dos antígenos HLA formadores do haplótipo individual.

II. OBJETIVOS

O polimorfismo do Complexo Principal de Histocompatibilidade é muito maior do que o determinado por tipagem sorológica, particularmente na população brasileira. Considerando que em nosso meio não existem estudos na avaliação de compatibilidades, com análise para os antígenos HLA de classe II, nos pacientes portadores de doenças hematológicas indicados para transplantes de medula óssea, os objetivos deste estudo foram:

1. Caracterizar os antígenos e haplótipos HLA de classe II, nos pacientes e indivíduos da família, por tipagem sorológica HLA-DR e DQ e cultura mista de linfócitos.
2. Comparar as tipagens sorológicas para os antígenos de classe II, HLA-DR, DQ e os resultados obtidos em cultura mista de linfócitos nos pacientes com LLA, LMA, AA e membros da família.
3. Analisar os resultados obtidos em tipagem sorológica e cultura mista de linfócitos nos pacientes e indivíduos da família, a fim de definir as associações haplotípicas dos antígenos de histocompatibilidade de classe II, e caracterizar compatibilidades entre doador e receptor, para transplante de medula óssea.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III-1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

III-1.1. Pacientes

Foi estudado um grupo de 60 pacientes infantis, provenientes do Centro Infantil para Investigações Hematológicas, Dr. Domingos A. Boldrini, com idade variando entre 0 e 18 anos, portadores de doenças hematológicas indicadas para o transplante de medula óssea e 202 indivíduos das famílias constituintes: pai, mãe e irmãos.. Dos pacientes, 23 eram portadores de leucemia linfóide aguda LLA, 20 de leucemia de mielóide aguda LMA e 17 de anemia aplástica AA.

As características individuais dos pacientes quanto a idade e ao estágio da doença, estão apresentadas nas figuras 1 e 2. na seção IV- Resultados.

III-1.2. Controles

Foram avaliados basicamente dois grupos controle, sendo um grupo constituído de 25 indivíduos sadios não relacionados geneticamente, utilizados em cada teste de cultura mista de linfócitos, com idade variando de 15 a 39 anos. Um grupo constituído de 247 indivíduos sadios com idade variando de 18 a 60 anos, utilizados como populações controles para a comparação das frequências de antígenos HLA-DR e DQ. Estes indivíduos foram tipados em nosso laboratório com a finalidade de compor painéis de referência para a população caucasóide miscigenada da cidade de Campinas. Os controles sadios eram constituídos por indivíduos de cor branca não aparentados entre si, provenientes da mesma área geográfica e com etnias presumivelmente semelhante as dos pacientes e indivíduos testados.

III-2. TIPAGEM SOROLÓGICA DOS ANTÍGENOS HLA DE CLASSE II

III-2.1. Obtenção de células mononucleares

Os linfócitos foram separados por gradiente de densidade segundo a técnica descrita por BOYUM (1968). Foram coletados 20 ml de sangue periférico em tubos de vidro de 10 ml (Vacuum II - LABNEW, USA), contendo heparina sódica na concentração de 143 UI/ml. Para cada 10ml era adicionado 0,6g de ferro reduzido em pó (Riedel de Haen - Germany) e incubados por 30 minutos em estufa 37°C, agitados manualmente a cada 5 minutos. Após o período de incubação o sangue era centrifugado a 1200 rpm em temperatura ambiente 22°C por 10 minutos e eram coletados os leucócitos. O sangue diluído (1:2) em solução tampão fosfato salina - PBS (pH=7,2), homogeneizado e submetido a um gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis-MO, USA), com densidade 1.076. Centrifugada a 1800 rpm em temperatura ambiente por 20 minutos. As células mononucleares retidas na interface entre Ficoll-Hypaque-Plasma, eram coletadas e lavadas uma vez com PBS e duas vezes em Hank's, pH 7,2 (Sigma Chemical Co., St. Louis-MO, USA), sendo as duas primeiras a 1200 rpm (22°C) e a terceira a 500 rpm, para eliminação de plaquetas. As células obtidas eram ressuspensas em 1ml de Hank's enriquecido com 10% de soro bovino fetal SBF - (WL Imunoquímica - Rio de Janeiro - Brasil). A concentração final era ajustada para $1-2 \times 10^7$ células/ ml).

III-2.2. Obtenção de linfócitos B

A suspensão de células mononucleares foi utilizada para a obtenção dos linfócitos B pelo método de aderência utilizando-se cotonetes de lã de nylon descritos por (WERNER et alli., 1977; DANILOVS et alli., 1980). Os cotonetes eram previamente preparados contendo 0,15g de lã de nylon (Leuko-Pack-Fenwal Laboratories, USA) em tubos de polipropileno de 15ml. A lã era inicialmente lavada com 10ml de Hank's com 5% de SBF, e os tubos

incubados em banho-maria a 37°C por 20 minutos. No final do período de incubação com auxílio de um palito de madeira de 15 cm a lã era enrolada através de movimentos circulares, formando um cotonete. A seguir, acrescentados gota a gota sobre o cotonete 1ml de suspensão celular ($1-2 \times 10^7$ células/ml). Após um período de incubação a 37°C por 20 minutos, o cotonete era retirado do tubo e depositado sobre a lã de nylon, gota a gota, 30ml de solução de Hank's com 5% de SBF, para retirar as outras células com exceção dos linfócitos B. Para a obtenção dos linfócitos B, o cotonete foi lavado com 10ml de Hank's contendo 10% de SBF centrifugado a 1200 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. A concentração final de linfócitos B era ajustada para 2×10^6 células/ml.

III-2.3. Reação de microlinfocitotoxicidade

III-2.3.1. Anti-soros

Os Anti-soros anti-HLA de classe II utilizados eram provenientes de Pel-Freez - Clinical Systems (Brown Deer, WI, USA); C-Six Diagnostics, Inc. (Granville Rd Mequon, WI, USA) e Université Catholique de Louvain (Clos Chapelle-aux-Champs, Bruxelles-Belgique).

As especificidades testadas estão abaixo relacionadas:

HLA-DR

DR1, DR2, DR3, DR4 DR5, DR6, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR17, DR51, DR52, DR53

HLA-DQ

DQ1, DQ2, DQ3, DQ4, DQ5, DQ7, DQ8

III-2.3.2. Complemento

O soro de coelho, utilizado como fonte de complemento, era obtido de uma mistura "pool" de 108 coelhos da raça New Zeland, com idade aproximada de quatro meses, não vacinados e não infectados. (MONTAGNA - Indústria e Comércio de Produtos Laboratoriais Ltda. - São Paulo - SP)

III-2.3.3. Controles positivo e negativo

Como controles positivos foram utilizados soros de mulheres multíparas preparados pelo Laboratório de Imunogenética de Transplantes FCM-Unicamp. Foram utilizados os soros com 100% de reatividade contra painel e um anti-soro monoclonal adquirido da Pel-Freez (HDS/2705 - MONOCLONAL PF).

Os controles negativos foram preparados pelo Laboratório de Imunogenética de Transplantes FCM-Unicamp, constituídos de misturas de soros "pool" de indivíduos do sexo masculino, não transfundidos do tipo sanguíneo AB ou meio de Hank's.

III-2.3.4. Tipagem HLA-DR e DQ

A tipagem foi realizada segundo o método descrito por TERASAKI & McCLELLAND (1964), TERASAKI et al., (1974) e adaptado segundo HOPKINS (1990). A tipagem sorológica de antígenos HLA de classe II, DR e DQ, foram efetuados em placas de microlinfocitotoxicidade com 60 poços (Robbins Scientific, USA). Em cada poço foi adicionado 1µl de diferentes anti-soro anti-HLA, controles positivo e negativo, juntamente com 5µl de óleo mineral, conforme mostrado no apêndice 1. Eram acrescentadas 1µl da suspensão celular de linfócitos B (2×10^6 células/ml) e a placa incubada por 60 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação eram adicionados 5µl de complemento de coelho, diluído 1:4, incubados 120 minutos a temperatura ambiente. A seguir, era adicionado 1µl de eosina y a 5%, (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) incubadas por 5 minutos e acrescentados 5µl de formaldeído 30% (MERCK S.A. - Indústrias Químicas - Rio Janeiro - RJ). As placas eram acondicionadas em geladeira a 4°C. Após 12 horas, era colocada na placa uma lâmina de vidro e iniciada a leitura das reações, sendo atribuídos graus de positividade conforme o percentual de lise celular. Era considerado positivo o poço que apresentasse 50% ou mais de lise celular e negativo aquele com menos de 25% de lise celular.

III-3. CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS

III-3.1. Preparação da suspensão de linfócitos

Foram coletados cerca de 20 ml de sangue periférico em tubos de vidro de 10 ml contendo heparina sódica 143 UI/ml. Cada amostra de sangue era diluída, volume a volume, com RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) adicionado 4% hepes 1M pH 7.3 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1% antibiótico Penicilina G. Potássica 2.000.000 U (Prodotti - Lab. farmacêutico Ltda.) e 1g de Sulfato de Streptomicina (Sigma Chemical Co.- St. Louis, MO, USA), sem soro AB. Células mononucleares do sangue periférico eram obtidas através de gradiente de Ficoll-Hypaque densidade 1076, na proporção de 3 volumes do primeiro para um volume do segundo. Após a centrifugação a 1800 rpm (22°C) por 20 minutos, o anel leucocitário era retirado e lavado três vezes em meio RPMI-1640, sendo duas vezes a 1200 rpm durante 10 minutos e uma vez a 500 rpm durante 10 minutos. As células eram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI-1640 contendo 4% hepes, 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina e 20% soro humano normal tipo AB (sexo masculino), inativado por 30 minutos a 56°C e ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/ml. O volume final era dividido em dois tubos, um contendo células a serem irradiadas a 1500 rads, contendo as células estimuladoras e outro não irradiado contendo as células respondedoras.

III-3.2. Manutenção de linfócitos em nitrogênio líquido

Linfócitos de indivíduos sadios, foram mantidos em nitrogênio líquido para a preparação da mistura "pool", para serem utilizados como controle na cultura mista de linfócitos. O método utilizado para o congelamento de células foi o de STRONG (1982) com modificações para o nosso uso. A suspensão celular na concentração inicial de 5×10^6 células/ml era ressuspensa em meio RPMI-1640, contendo 4% hepes, 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina. e 50% de soro AB humano. Previamente era preparada em banho de gelo, uma solução contendo 40% do meio RPMI-1640,

50% de soro AB humano e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido - Merck) colocado gota a gota. A seguir em um tubo de vidro, utilizando-se pipeta Pasteur, era colocado volume a volume a suspensão celular e a solução contendo DMSO. Essa preparação era introduzida em tubos de polipropileno na quantidade de 1ml. Os tubos eram colocados em caixa de isopor com orifícios (para se obter queda gradual de temperatura) em freezer a -70°C , por no mínimo 18 horas. A seguir eram mergulhados em nitrogênio líquido e guardados por tempo indeterminado.

III-3.3. Descongelamento dos linfócitos

As células eram descongeladas no momento da realização da cultura em banho-maria a 37°C e colocadas em tubo cônico contendo 2ml de RPMI 1640 e 50% de soro AB humano e homogeneizadas lentamente com pipeta Pasteur. As células eram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 20% de soro AB humano. A viabilidade celular foi determinada com azul tripan (Merck) diluído na proporção de 1:2 e a concentração final ajustada para 1×10^6 células/ml.

III-3.4. Cultura de linfócitos estimulados pelo mitógeno - PHA

Foram coletados 20 ml de sangue periférico assepticamente em tubos de vidro de 10 ml contendo heparina sódica na concentração de 143 UI/ml. Células mononucleares do sangue periférico eram obtidas esterilmente por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque, densidade 1076, na proporção de 1:3, com centrifugação a 1800 rpm por 20 minutos. A seguir as células eram lavadas em RPMI-1640 duas vezes a 1200 rpm por 10 minutos e a última a 500 rpm por 10 minutos. As células assim obtidas eram ressuspensas em 1ml e ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/ml em meio RPMI-1640 contendo 4%, 1% de antibiótico penicilina e 20% soro humano normal tipo AB. Em cada orifício da placa de microcultura (Costar, Cambridge, USA) eram adicionados 200 μl da suspensão celular e 10 μl de solução de PHA-P 10 $\mu\text{g/ml}$ (Difco Laboratories, Michigan, USA). Simultaneamente eram também

cultivadas células de cada amostra sem PHA. As culturas eram realizadas sempre em triplicatas. As placas eram mantidas 48 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células eram marcadas com timidina tritiada 1µCi/escavação (atividade específica 6.7 Ci/mM - Du Pont - New products, Boston, Ma, USA) e incubadas por mais 24 horas. No final, as culturas eram coletadas em filtro de fibra de vidro (Cambridge Technology Inc., USA) por meio de coletor de células, através de aspiração e lavagem automática com água bidestilada e deionizada em um aparelho "Cell Harvester"(PHD-Skatron Instruments Inc., USA). Os discos eram destacados e transferidos para frascos contendo 3 ml de líquido de cintilação (PPO-4.0g, POPOP - 0.1g MERCK e Toluol - qsp - Ecibra). A medida da incorporação da timidina tritiada se faz automaticamente em um contador de cintilação (Beckman - modelo LS-5000) durante 1 minuto. Os resultados foram expressos pela média aritmética das triplicatas de cada amostra em contagem por minuto.

III-3.5. Ensaios em cultura mista de linfócitos

III-3.5.1. Células respondedoras e estimuladoras

Foi estabelecido previamente como pode ser observado no apêndice 2, um modelo para cada teste, assim as combinações eram sempre realizadas em triplicatas. Cada combinação continha células respondedoras (R) e células estimuladoras (E) e as combinações eram distribuídas na placa de modo a incluir as células de paciente junto as células dos indivíduos da família e relacionados geneticamente.

III-3.5.2. Controles

Foram utilizados como controles positivos para cada cultura realizada, uma combinação contendo células respondedoras do paciente e células estimuladoras de indivíduos não relacionadas; como controle negativo ou autólogo, uma combinação contendo células estimuladoras e respondedoras do mesmo indivíduo e como controle para verificar a eficácia

da irradiação, uma combinação com as células estimuladoras de dois indivíduos não relacionados geneticamente. No momento da realização da CML eram ainda utilizados além do controle positivo, uma mistura "pool" de células congeladas de 2, 3 ou mais indivíduos não relacionados geneticamente com o paciente.

III-3.5.3. Reação de cultura mista de linfócitos

Na cultura mista de linfócitos, foi utilizado o método de microtécnica em placas com adaptações para as nossas necessidades descritas em vários trabalhos da literatura: HARTZMAN, R. J. (1971), OSOBA, D. (1974), OPELZ, G. (1975), SEGALL, M. (1976), DUPONT, B. (1976), DUPONT (1980), DUBEY, D. P. (1986), MICKELSON, E. M. (1990) e MICKELSON, E. M. (1993). Durante a padronização os testes eram controlados através da avaliação da resposta celular de doadores sadios, através da cultura de linfócitos estimulados com o mitógeno PHA e realizados paralelamente a CML. Todas as etapas eram realizadas de maneira absolutamente estéril, dentro do fluxo laminar, para garantir o perfeito processamento do material biológico manipulado. Foram utilizadas placas de microcultura, fundo em U, com 96 escavações. As placas eram preparadas colocando-se as células estimuladoras, após as respondedoras. Em cada escavação era colocada 100 µl das diferentes suspensões celulares a 1×10^6 células/ml. As placas eram incubadas em estufa a 37°C atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 120 horas (5 dias). No final deste período, era acrescentado 1 µCi de timidina em cada escavação. As placas eram incubadas durante 18 horas a 37°C com 5% de tensão de CO₂ na atmosfera. Após a incubação, as culturas eram coletadas em filtro de fibra de vidro por meio de coletor de células através de aspiração e lavagem automática com água bidestilada e deionizada em um aparelho "Cell Harvester". As células eram recuperadas e cada disco era removido rapidamente, colocado em frascos contendo 3ml de líquido de cintilação. Os frascos eram colocados para contagem em contador de cintilação Beta durante um minuto, sendo a atividade de cada cultura

expressa através da incorporação de timidina tritiada em contagem por minuto (cpm).

Os resultados foram expressos pelas diferenças obtidas entre as médias das contagens por minuto (cpm) das triplicatas estimuladas e as médias das contagens por minuto das triplicatas controles, calculando-se o índice de resposta relativa, expressa em porcentagem, através das fórmulas, abaixo discriminadas, que ilustram o cálculo para a resposta relativa.

$$RR \text{ PR } \times DE = \frac{PR \times DE - CAP}{PR \times CE - CAP} \times 100$$

$$RR \text{ DR } \times PE = \frac{DR \times PE - CAD}{DR \times CE - CAD} \times 100$$

RR - Resposta Relativa

PR x DE - Paciente Respondendo e Doador Estimulando

DR x PE - Doador Respondendo e Paciente Estimulando

CAP - Controle Autólogo do Paciente

CAD - Controle Autólogo do Doador

A resposta relativa (RR) de 0 a 12 significa uma CML negativa e o RR maior que 12 significa uma CML positiva. A RR do paciente era calculado de acordo com a fórmula acima descrita e de forma tal que, a resposta relativa das células do paciente aos leucócitos do doador não relacionado, representa a resposta máxima desse paciente. Os valores normais para a RR foram determinados por combinações em CML realizados por meio de pares de irmãos idênticos normais.

III-4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A resposta relativa da cultura mista de linfócitos, dos pacientes e indivíduos da família, previamente classificados sorologicamente quanto a sua compatibilidade, foi comparada por meio do teste t de "student", para amostras independentes. O resultado deste teste permitiu verificar, a associação entre a compatibilidade definida sorologicamente e por cultura mista de linfócitos. Além disso, a fim de verificar a resposta relativa de acordo com as doenças, avaliada entre pacientes e indivíduos da família incompatíveis e indefinidos, foi utilizada a análise de variância, para a comparação das médias.

As frequências das especificidades HLA encontradas, em comum entre os casais, e as do grupo controle, foram comparadas utilizando-se o teste do χ^2 .

IV. RESULTADOS

IV-1. CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE PACIENTES

A figura 1, apresenta a distribuição do número de pacientes agrupados na combinação das três doenças estudadas, Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Anemia Aplástica (AA), segundo a faixa etária. Na LLA, o número observado de pacientes infantis foi maior de 7 a 11 anos, na LMA abaixo de 6 anos e acima de 12 anos e na AA, eram bastante semelhantes em relação a média das idades.

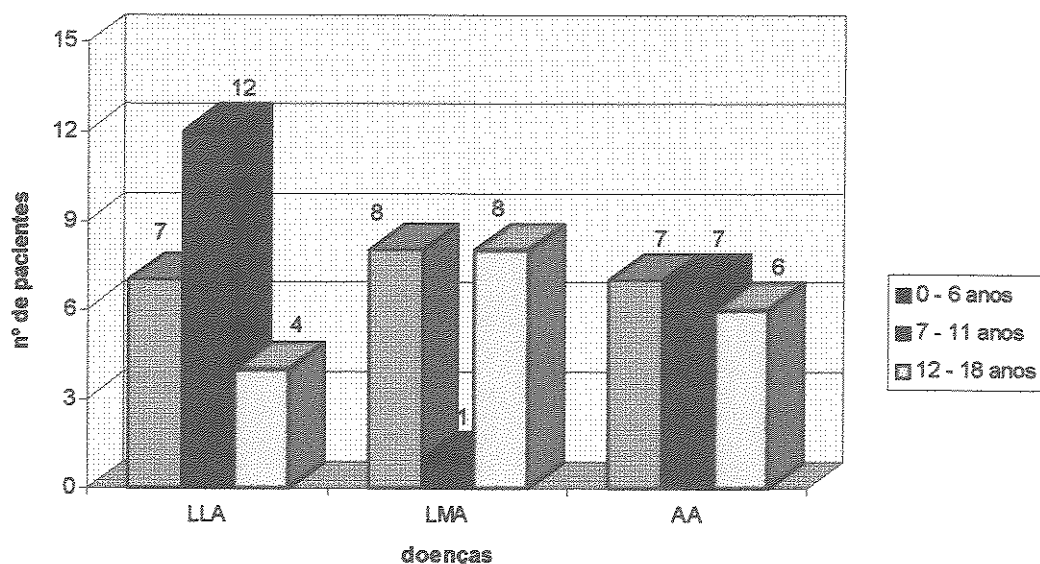


FIGURA 1: Distribuição dos pacientes portadores de LLA, LMA e AA, segundo a faixa etária.

Na figura 2, encontra-se a distribuição do número de pacientes, nas três doenças (LLA, LMA e AA), segundo os diferentes estágios da doença. O número de pacientes infantis foi maior no estágio de recaída e menor nos estágios de remissão e sem tratamento.

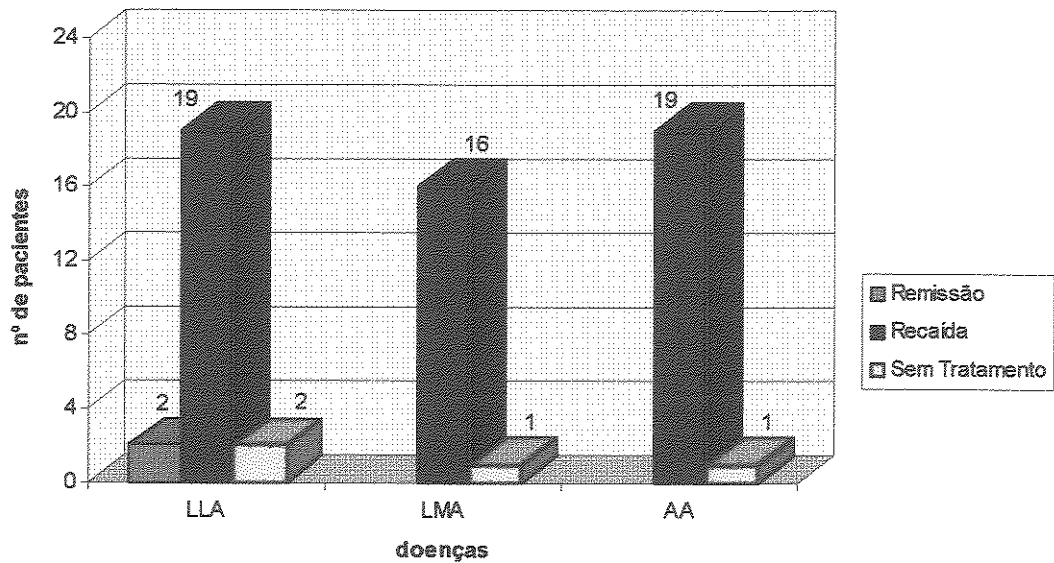


FIGURA 2: Distribuição dos pacientes de LLA, LMA e AA, segundo o estágio da doença.

IV-2. CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO CONTROLE

Na figura 3, encontram-se os resultados da transformação blástica de linfócitos em resposta ao mitógeno fitohemaglutinina de 25 indivíduos sadios, não relacionados geneticamente, utilizados como controle para a cultura mista de linfócitos. Os valores obtidos representam a incorporação da timidina pelo DNA genômico e foram expressos em contagem por minuto (cpm), onde apresentaram índice de estimulação acima de 20.000 cpm, sendo que a maioria das respostas ficaram entre 25.000 e 50.000 cpm.

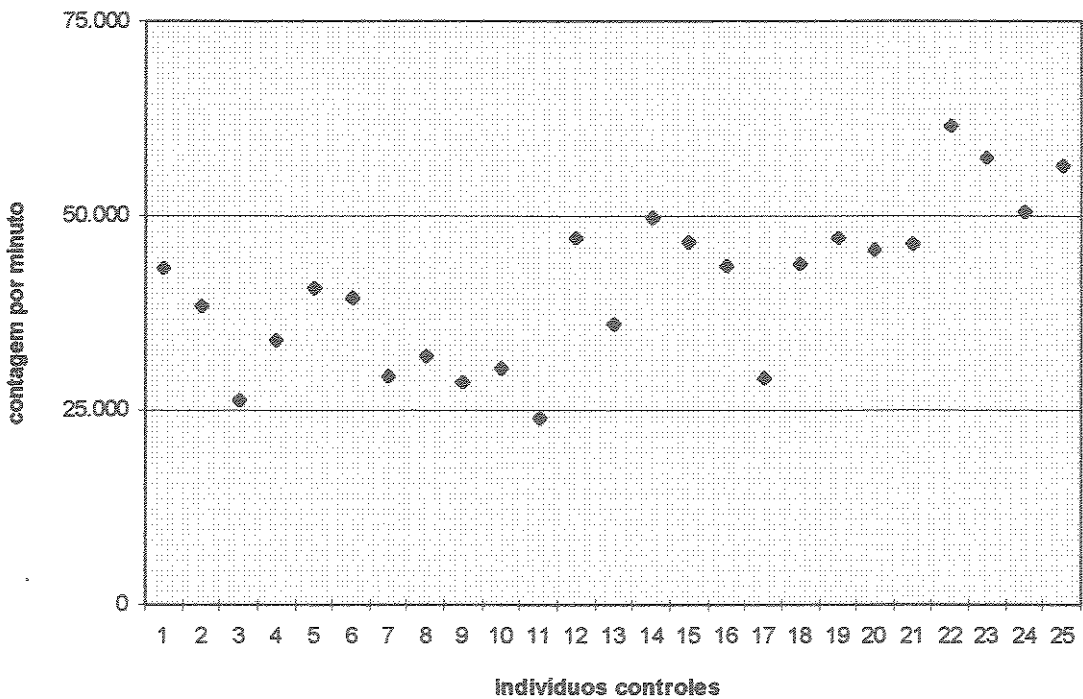


FIGURA 3: Transformação blástica de linfócitos do sangue periférico nos indivíduos controle, após 72 horas em cultura, estimulados com fitohemaglutinina.

Na figura 4, observam-se linfócitos humanos de indivíduos saudáveis que representam um experimento em cultura por 72 horas, sem estimulação mitogênica e expressam linfócitos com características de células normais.

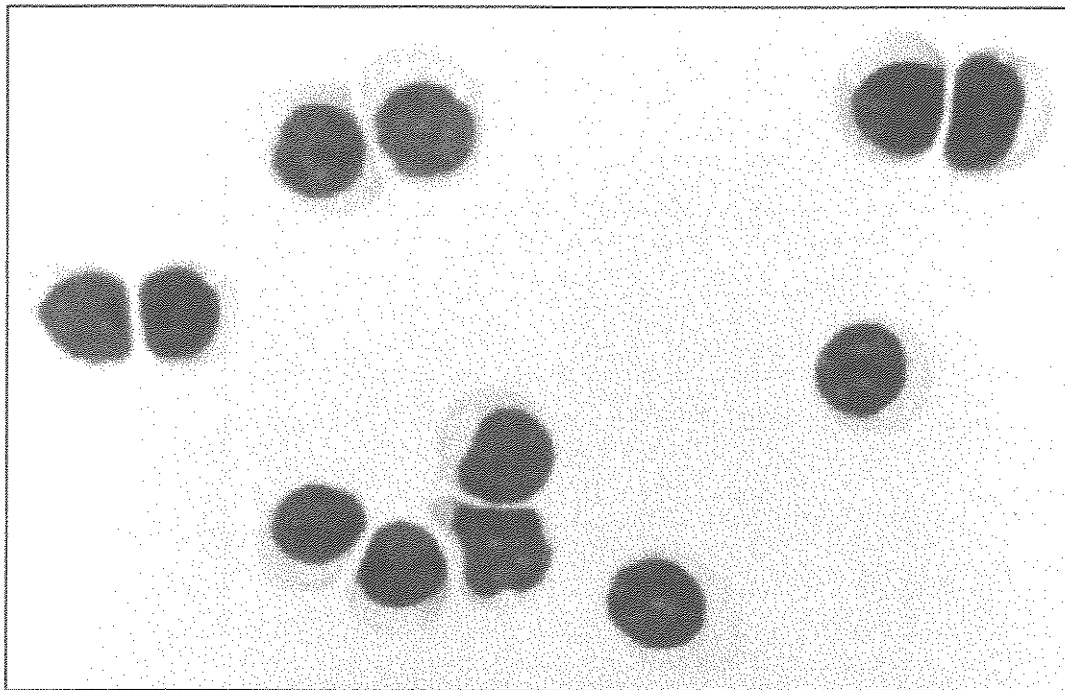


FIGURA 4: Linfócitos humanos de indivíduos saudáveis, sem estimulação mitogênica.

A figura 5, mostra uma transformação blástica de linfócitos humanos de indivíduos saudáveis, que representam um experimento em cultura por 72 horas, com estimulação mitogênica por fitohemaglutinina, e expressam linfócitos com características de células blásticas.

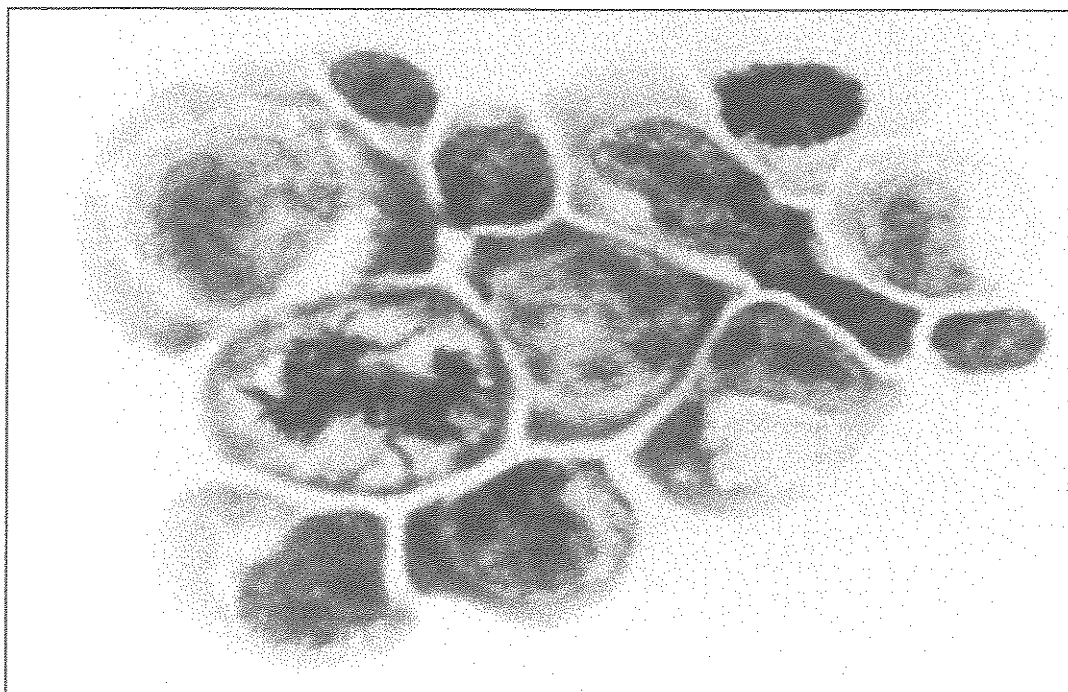


FIGURA 5: Linfócitos humanos de indivíduos saudáveis, com estimulação mitogênica por fitohemaglutinina.

IV-3. COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS HLA DE CLASSE II E CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS

As tipagens dos antígenos HLA-DR, DQ de classe II e os valores da resposta relativa (RR) da cultura mista de linfócitos (CML), foram realizadas em todos os pacientes e membros da família com leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide aguda e anemia aplástica, conforme mostram os apêndices III, IV e V.

A comparação das reações dos antígenos de classe II por tipagens sorológicas e reações em cultura mista de linfócitos, revelaram que entre o paciente e os irmãos compatíveis, as tipagens sorológicas identificaram 7 pares compatíveis, enquanto que a cultura mista de linfócitos identificou 6 pares compatíveis e 1 incompatível; entre os irmãos incompatíveis ocorreu correlação entre a sorologia e a cultura mista de linfócitos, e nos 28 pares indefinidos por tipagem sorológica, 16 estavam entre os compatíveis e 12 entre os incompatíveis por CML. Quando comparado o paciente com os pais compatíveis, as tipagens sorológicas identificaram 2 pares compatíveis e a cultura mista de linfócitos identificou 1 par compatível e 1 par incompatível. Na comparação com os pais incompatíveis, ocorreu concordância entre a tipagem sorológica e a cultura mista de linfócitos; entre os pais indefinidos as tipagens sorológicas identificaram 30 pares indefinidos e a cultura mista de linfócitos definiu 1 par compatível e 29 pares incompatíveis (tabela 1).

TABELA 1: Comparação das reações de tipagem sorológica de classe II, HLA-DR e DQ e cultura mista de linfócitos em pacientes com LLA, LMA e AA e indivíduos da família

Combinações nas famílias	Número de Combinações							RR / LB
	CML			tipagem sorológica			n.º total de pares	
	++	+-	--	++	+-	--		
P x I ++	6	<u>1</u>	0	7	0	0	7	C / NC / C
P x I +-	0	30	0	0	30	0	30	NC / NC
P x I --	16	12	0	0	0	28	28	C / NC / ND
P x P* ++	1	<u>1</u>	0	2	0	0	2	C / NC / C
P x P* +-	0	50	0	0	50	0	50	NC / NC
P x P* --	<u>1</u>	29	0	0	0	30	30	C / NC / ND

P	= paciente	C	= compatível
P*	= pais	NC	= não compatível
I	= irmãos	ND	= não definido
++	= compatível	RR	= resposta relativa
+-	= incompatível	LB	= linfócitos B
--	= indefinido		

IV-4. ASSOCIAÇÃO DE ANTÍGENOS HLA DE CLASSE II E CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS

Quando comparada a resposta relativa dos pacientes e indivíduos da família para as tipagens HLA de classe II-DR, DQ incompatíveis e indefinidas na leucemia linfóide aguda, encontrou-se uma associação significativa ($p < 0,05$) entre CML e tipagem HLA-DR e DQ (tabela 2). Na leucemia mielóide aguda não houve associação significativa para a correlação entre CML e HLA-DR e DQ (tabela 3). Na anemia aplástica ocorreu uma associação significativa ($p < 0,02$) entre CML e tipagem HLA-DR e DQ (tabela 4). Na leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide aguda e aplasia de medula com pacientes e indivíduos da família incompatíveis, tiveram uma concordância e associação significativa entre resposta relativa e leucemia linfóide aguda, resposta relativa e leucemia mielóide aguda ($p < 0,01$), com aumento de resposta relativa nas duas doenças. Na anemia aplástica, não ocorreu associação significativa entre resposta relativa e a doença, com diminuição da resposta relativa (tabela 5). Para as doenças leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide aguda e anemia aplástica, a associação da resposta relativa com paciente e indivíduos da família indefinidos, não ocorreu correlação significativa entre a resposta relativa e os indefinidos (tabela 6).

TABELA 2: Associação entre a resposta relativa e tipagem sorológica com linfócitos B para pacientes e indivíduos das famílias incompatíveis e indefinidos na LLA.

Doença	Resposta Relativa Média	Desvio Padrão dP	HLA-DR, DQ
LLA	80,23	25,38	incompatíveis
LLA	53,40	41,78	indefinidos

p<0,05

(t- test)

TABELA 3: Associação entre a resposta relativa e tipagem sorológica com linfócitos B para pacientes e indivíduos das famílias incompatíveis e indefinidos na LMA.

Doença	Resposta Relativa Média	Desvio Padrão dP	HLA-DR, DQ
LMA	75,74	23,34	incompatíveis
LMA	53,39	39,73	indefinidos

0,05 < p <0,10

(t- test)

TABELA 4: Associação entre a resposta relativa e tipagem sorológica com linfócitos B para pacientes e indivíduos das famílias incompatíveis e indefinidos na AA.

Doença	Resposta Relativa Média	Desvio Padrão dP	HLA-DR, DQ
AA	54,11	25,82	incompatíveis
AA	25,51	35,62	indefinidos

p<0,02

(t- test)

TABELA 5: Comparação da resposta relativa entre os pacientes e indivíduos de família incompatíveis em HLA-DR e DQ na LLA, LMA e AA.

Doenças	Resposta Relativa Média	Desvio Padrão dP	HLA-DR, DQ
LLA	80,23	25,38	Incompatíveis
LMA	75,54	23,34	Incompatíveis
AA	54,11	25,82	Incompatíveis

F= 6,859; GL= 2,58; p < 0,01 (LLA e LMA)

TABELA 6: Comparação da resposta relativa entre os pacientes e indivíduos de família indefinidos em HLA-DR e DQ na LLA,LMA e AA.

Doenças	Resposta Relativa Média	Desvio Padrão dP	HLA-DR, DQ
LLA	53,40	41,78	Indefinidos
LMA	53,39	39,73	Indefinidos
AA	25,51	35,62	Indefinidos

F= 1,428; GL= 2,42; p= 0,25

IV-5. FREQUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE ANTÍGENOS HLA-DR, DQ, ENCONTRADA EM COMUM NOS CASAIS

Com relação a frequência de combinações de antígenos HLA-DR e DQ encontradas em comum nos casais com tipagem completa para os antígenos HLA de classe II, quando comparados com as frequências desses mesmos antígenos, nos 247 indivíduos controles, observou-se que, dos 60 casais estudados, 31 casais apresentavam excesso de antígenos HLA presentes, tanto no pai como na mãe. Houve, na LLA, um aumento estatisticamente significativo da especificidade HLA-DR6 ($p < 0,01$) e uma diminuição significativa da especificidade DR52 ($p < 0,01$), conforme mostra a figura 6. Na figura 7, pode-se observar que na LMA, o antígeno DR15 apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) e o antígeno DR52 uma diminuição significativa ($p < 0,01$). Na AA, ocorreu uma diminuição significativa para os antígenos DR52 ($p < 0,01$), DR53 ($p < 0,01$) e DQ1 ($p < 0,01$), de acordo com a figura 8.

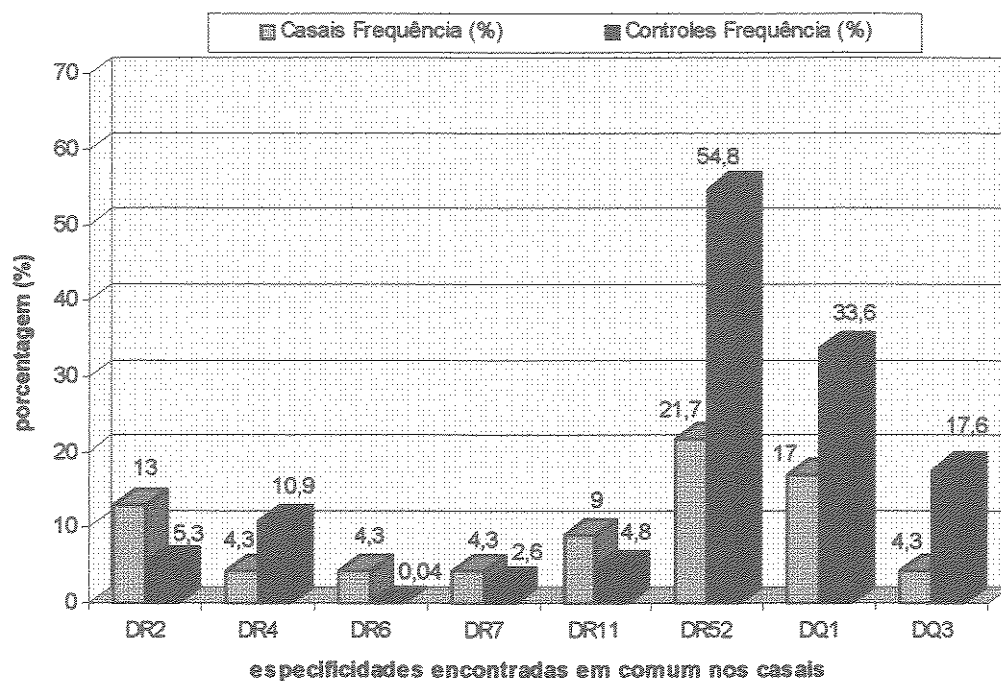


FIGURA 6 : Frequência (%) das especificidades para os antígenos HLA-DR e DQ, encontradas em comum nos casais e nos indivíduos controle, na LLA.

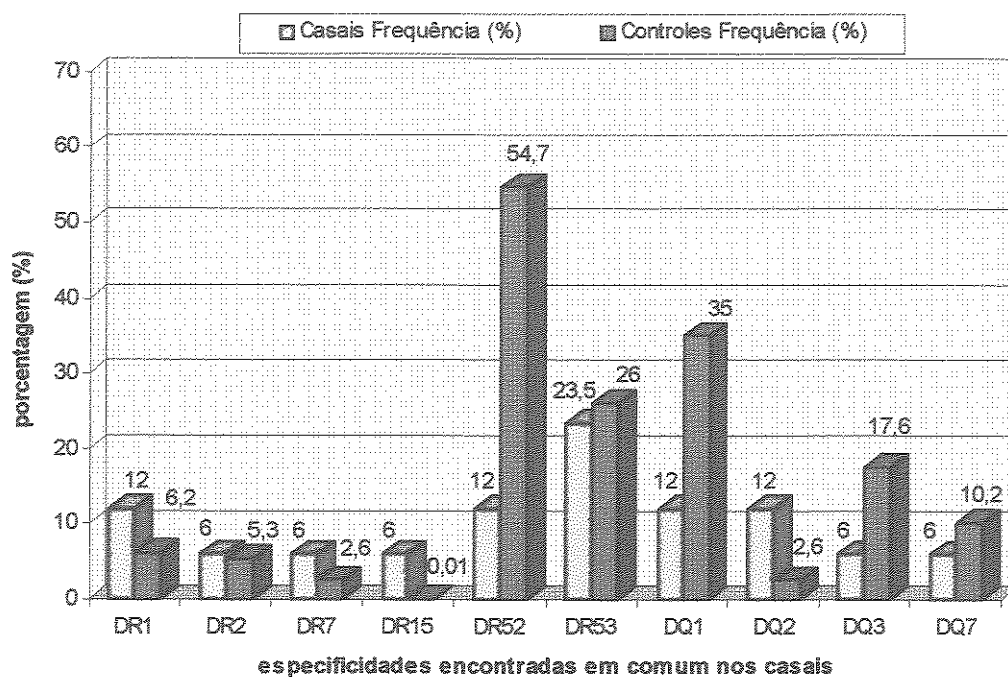


FIGURA 7 : Frequência (%) das especificidades para os antígenos HLA-DR e DQ, encontradas em comum nos casais e nos indivíduos controle, na LMA.

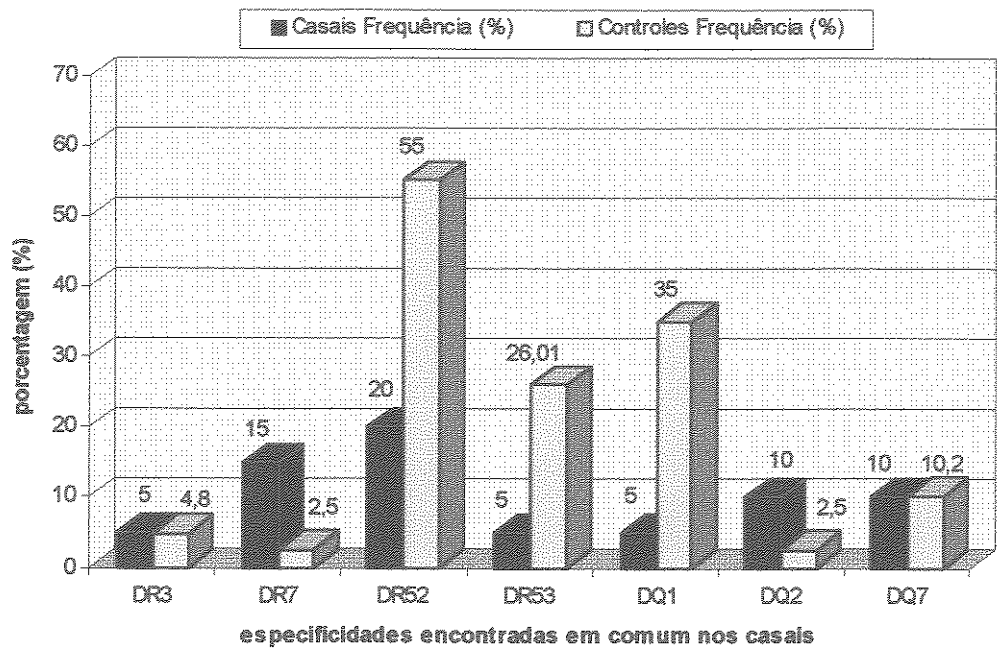


FIGURA 8 : Frequência (%) das especificidades para os antígenos HLA-DR e DQ, encontradas em comum nos casais e nos indivíduos controle, na AA.

V. DISCUSSÃO

A organização gênica para a região de classe II, do complexo principal de histocompatibilidade no homem, é caracterizada pela similaridade estrutural existente entre os genes, nela contidos (SCHIPPER et alli, 1996). O polimorfismo funcional desses alelos de classe II representa um traço marcante na regulação da resposta imune como também na imunobiologia dos transplantes (TIERCY et alli, 1991). As igualdades para os genes HLA são relevantes particularmente no transplante de medula óssea (KRONENBERG et alli, 1994).

Com a finalidade de comparar as reatividades por tipagem sorológica com as reatividades celulares em cultura mista de linfócitos (CML), foi então selecionado um grupo de pacientes portadores de doenças sanguíneas. Considerando o comprometimento dos blastos leucêmicos, como fator limitante, para as tipagens sorológicas (DREXLER et alli, 1988). Nas leucemias agudas, tanto a linfóide (LLA) como a mielóide (LMA), os tratamentos usuais conferem para uma grande parte de pacientes a remissão total e cura da doença. No entanto, a exceção desses, 20 a 30% dos demais pacientes tem como única terapia possível para a remissão da doença, o transplante de medula óssea. Por outro lado, na aplasia de medula ou anemia aplástica, o transplante de medula óssea representa a única terapia para a cura total da doença (MARCH & GEARY, 1991).

Entretanto, a contribuição do sistema imune nos transplantes é relatada como prejudicial (PARHAM, 1993). Uma das complicações limitantes na sobrevida dos pacientes após o transplante, diz respeito a rejeição do enxerto de medula óssea, conhecida como a doença do enxerto contra o hospedeiro, usualmente definida pela sigla em inglês "GVHD" (LAFFERTY, 1995). Entre os fatores de risco correlacionados as prováveis causas para a "GVHD", inclui-se as incompatibilidades para os antígenos de histocompatibilidade e uma resposta relativa positiva em cultura mista de linfócitos entre o paciente e o receptor (NIEDERWIESER et alli., 1988). A barreira imunológica pode ser significativamente reduzida se o receptor e o

doador forem irmãos que tenham herdado em comum os mesmos haplótipos do cromossomo 6 dos pais.

Uma vez que para o êxito dos transplantes de medula óssea os fatores genéticos associados as compatibilidades HLA conferem uma sobrevida maior aos pacientes transplantados (SCHIPPER et alli, 1996), é importante avaliar o resultado das tipagens dos alelos HLA de classe II para definir compatibilidades e incompatibilidades, juntamente com os valores expressos pelas respostas relativas em CML para determinar compatibilidades em CML, nos pacientes e indivíduos da família.

Os pacientes infantis com LLA, LMA e AA incluídos nesta investigação, foram selecionados aleatoriamente da totalidade dos pacientes indicados para transplante de medula óssea e acompanhados no Centro Infantil para Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini, com a finalidade de realizar uma análise criteriosa na determinação das compatibilidades para os antígenos HLA de classe II DR e DQ e em CML. Foi selecionado o grupo de estudo, envolvendo sempre o paciente, a doença, a família: pai, mãe e irmãos.

O primeiro passo foi selecionar dentre as doenças sanguíneas, aquelas que apresentavam uma similaridade (MARSH & GEARY, 1991). Selecionamos os pacientes com LLA, LMA e AA; um subgrupo constituído pelos membros da família, representado pelos irmãos e um representado pelos pais. Por outro lado, foram selecionados 25 indivíduos saudáveis, utilizados como controle em cultura mista de linfócitos, de acordo com a capacidade das células induzirem a proliferação celular, pois algumas possuem poder de estimulação maior que as outras. As células destes indivíduos eram coletadas no dia da realização da cultura mista de linfócitos e congeladas para a preparação da mistura "pool". Trabalhos descritos por OSOBA et alli., (1974); SEGALL et alli., (1976), enfatizaram a importância da utilização de "pool" de células estimuladoras para a determinação de uma resposta máxima em cultura.

A investigação das tipagens dos antígenos HLA de classe II, mostrou um aumento estatisticamente significativo para as especificidades, indefinidas, representadas por *traços* (apêndices III, IV e V) tanto nos pacientes como nos indivíduos da família. Diversos relatos utilizando tipagens sorológicas de antígenos HLA de classe II, também mostraram resultados semelhantes aos nossos. Em 1996, MORAES & MORAES, estudando a distribuição de alelos HLA na população brasileira, relataram aumento significativo das especificidades *brancos ou indefinidos*. Esse fato talvez seja devido a intensa miscigenação racial entre brancos, negros e mulatos, observadas na população brasileira e interferindo em muito na análise dos marcadores HLA detectados por sorologia. Outros estudos efetuados em famílias recombinantes, definiram mais de 100 recombinações para 1040 famílias analisadas, demonstrando que estes eventos dificultam ou impossibilitam a identificação dos alelos. Estudos realizados com gêmeos monozigotos conferiram uma tipagem sorológica diferente para cada um dos gêmeos (ROSE et alli, 1988). Posteriormente outros relatos também evidenciaram falta de expressão significativa de antígenos HLA de classe II em células leucêmicas (TONGIO et alli, 1986; DEXLER et alli, 1986). Com relação a outras alterações associadas a detecção de antígenos de classe II por métodos sorológicos e especificamente nas patologias sanguíneas, podemos evidenciar a fragilidade das células leucêmicas à presença de blastos e a incapacidade para as reações de microlinfocitotoxicidade na viabilização dos testes sorológicos. Considerando a lise das células não uma reação positiva para a presença do antígeno e muito mais como uma manifestação da fragilidade das células frente as incubações, predominando as reações de falso positivo.

As falhas nas tipagens sorológicas para definir os alelos HLA ou tipagens indefinidas, podem ser devidas a uma reação cruzada ou falta de reação. Representam uma alteração a nível de estudo populacional e familiar, interferindo no significado das compatibilidades. Se por um lado os indivíduos da família contribuem para a análise de herança genética dos haplótipos, por

outro lado os pacientes possuem a chance de adquirir essas mesmas tipagens. Assim são necessários outros estudos para discriminar especificidades envolvidas nas compatibilidades HLA. A contribuição da diversidade alélica dos genes de classe II foi então analisada por cultura mista de linfócitos. A primeira comparação realizada entre as tipagens sorológicas e a cultura mista de linfócitos mostrou que dois irmãos HLA idênticos para classe I e II quando colocados juntos em CML, estimulavam um ao outro (YUNIS & AMOS, 1971). Desse modo, foi demonstrada a existência de um *locus* ou região, separado dentro do sistema HLA, denominado de região HLA-D (JORGENSEN et alli., 1977).

Os métodos celulares utilizando a cultura mista de linfócitos discriminam o grau de compatibilidade entre o receptor e o doador para a região HLA-D. As combinações celulares envolvem duas variáveis, células respondedoras e células estimuladoras. As especificidades alogênicas são definidas como compatíveis pela ausência de estímulo ou como incompatíveis pela presença de estímulo.

No caso dos 147 pares analisados para a comparação da resposta relativa em CML com tipagem sorológica para os antígenos de classe II, na definição das compatibilidades entre o paciente e irmãos, foi concordante para 6 pares definidos como compatíveis para ambos os métodos e 1 par não concordante por CML. Além das compatibilidades foram detectados 30 pares incompatíveis e concordantes nos dois métodos. Em adição, não houve correlação nos 28 pares tipados como indefinidos por sorologia. Constatamos por CML, que dos 28 pares indefinidos, a compatibilidade para 16 pares e a incompatibilidade para 12 pares. Por outro lado, as combinações envolvendo o paciente e o pai e paciente e a mãe, a CML definiu 1 par incompatível para o mesmo par definido como compatível por sorologia e 1 par compatível para o mesmo par indefinido por sorologia. Foram detectados ainda, 50 pares de incompatíveis e concordantes nos dois métodos. Entretanto para os 30 pares indefinidos por sorologia a CML foi capaz de definir 29 pares como incompatíveis e 1 par compatível.

É possível que as especificidades não definidas por sorologia estejam envolvidas em eventos como a homozigose. Em doentes com LLA, tem sido descrito associações significativas de antígenos HLA de classe II com a especificidade HLA-DR3 em homozigose (DORAK et al., 1995). Por intermédio desses resultados observamos diferenças entre a sorologia e CML. A tipagem sorológica não foi capaz de determinar a segregação haplotípica nas famílias. A CML realizada posteriormente nos mesmos indivíduos, apresentou um grau maior de sensibilidade. Entretanto, devido a população estudada composta de pacientes portadores de células malignas, muitas vezes constatou-se um número de falhas ou antígenos não definidos (apêndices III, IV e V), ocasionando em falta de interpretação dos resultados. No estudo realizado por Yasunaga et alli (1996), além da contribuição da CML para as tipagens sorológicas, foi estudada a tipagem por DNA utilizando o método de PCR/SSOP para a definição dos antígenos DR1 para os alelos DRB1.

Concomitantemente, foram encontrados na LLA, LMA e AA, um grande número de casais que apresentaram antígenos HLA-DR, DQ em comum, resultando em aumento ou diminuição de algumas especificidades. Na LLA a especificidade DR6 ($p<0,01$) encontrava-se aumentada, enquanto a especificidade DR52 ($p<0,01$) se achava diminuída. Na LMA a especificidade DR15 ($p<0,01$) encontrava-se aumentada, enquanto a especificidade DR52 ($p<0,01$), se achava diminuída. Na AA, as especificidades DR52 ($p<0,02$), DR53 ($p<0,04$) e DQ1 ($p<0,01$), encontravam-se significativamente diminuídas. Na literatura não são referidos resultados similares a esses. Parece portanto, que este excesso de antígenos HLA em comum nos pais das crianças com leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide aguda e anemia aplástica, representa um fenômeno geral nestas doenças, no entanto, essa anomalia pode desencadear a doença, para qual ainda não existe explicação.

Salazar et alli., (1992) relataram que determinados alelos são capazes de induzir reatividade alogênica. Em nossa pesquisa não observamos as respostas dos pacientes em concordância com diminuição ou aumento para níveis normais de resposta em cultura mista de linfócitos.

Outros estudos foram realizados em populações e famílias de diversas etnias e puderam estimar o grau de recombinação na definição dos haplótipos, detectado um número significativo de frequências de recombinações ($p \geq 0,008 \pm 0,004$) para DRB1, DQA1 e DQB1 (BEGOVICH et alli, 1992). Assim, a análise para determinados alelos implica em uma distribuição, mesmo em famílias, maior ou menor que a esperada. Esse fato compromete os resultados obtidos na análise para as tipagens sorológicas (PARHAM, 1993).

Retornando a comparação dos dois métodos para a definição das compatibilidades, observou-se que no total de pacientes e indivíduos de família incompatíveis e indefinidos com LLA ($p < 0,05$) e AA ($p < 0,02$), a CML e a tipagem sorológica mostraram uma associação significativa, portanto, as células leucêmicas de pacientes com LLA e AA não devem estar associadas a uma diminuição significativa na expressão desses antígenos HLA de classe II. No entanto, na LMA é possível que estes marcadores estejam significativamente diminuídos. ELKINS et alli., (1984), não encontraram deficiências significativas na expressão dos antígenos de classe II e sim nos antígenos de classe I. É possível que na LMA a proporção de células que expressa os antígenos HLA-DR e DQ, apresentam variações decorrentes do estado do paciente. Outros autores (GUY et alli, 1986) mostraram uma grande população de pacientes nos quais 80% de células mostravam diminuição na expressão desses antígenos. Desse modo a não concordância entre a sorologia e a CML na população de pacientes estudada apresenta um dado significativo.

Quando comparadas as três doenças, LLA, LMA e AA, quanto a resposta relativa e incompatibilidades, foi observada uma associação entre o aumento da resposta relativa para os pacientes incompatíveis na LMA e LLA. Entretanto, na AA não houve associação significativa, devido a diminuição da resposta relativa. Já no grupo de pacientes indefinidos não houve associação de aumento ou diminuição da resposta relativa. No estudo da resposta relativa

e os pacientes indefinidos é possível que muitas especificidades indefinidas indiquem compatibilidades.

Concluindo, observamos neste estudo, que a cultura mista de linfócitos não esteve associada com as tipagens sorológicas no grupo de pacientes e irmãos compatíveis (6 concordantes para 1 não concordante) e esteve associada com as tipagens sorológicas no grupo de irmãos incompatíveis (30 concordantes para 30 concordantes). Comparadas com pacientes e pais, observamos uma falta de correlação significativa, associada a CML incompatível e sorologia compatível e CML compatível e sorologia indefinida. Nesse grupo a CML esteve associada a sorologia para as incompatibilidades. A falta de correlação entre CML e sorologia no grupo de indefinidos, tanto entre pares irmãos como pais é possivelmente atribuível aos eventos genéticos associados a recombinação, homozigose e crossing-over nas famílias. Como já explicitado, observamos a associação dos dois métodos em determinadas circunstâncias pela comparação dos pares investigados. Assim, propusemos nas três doenças, tanto em relação aos incompatíveis como indefinidos, a associação entre CML e sorologia.

Finalmente avaliamos também, possíveis associações entre aumento e diminuição da resposta relativa dos pacientes e indivíduos de família incompatíveis. Assim observamos que na LLA e LMA houve uma correlação das incompatibilidades e aumento da resposta relativa e na AA, não houve essa correlação. Nas comparações da resposta relativa para pacientes e indivíduos da família indefinidos, não houve correlação.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem chegar as seguintes conclusões:

1 - O melhor e mais acurado método para a determinação das compatibilidades para as especificidades HLA de classe II, é a cultura mista de linfócitos.

2 - As reações de reatividade obtidas nas tipagens sorológicas para os antígenos HLA de classe II e na cultura mista de linfócitos entre os pares constituídos pelo paciente e irmãos e paciente e pais, permitiram classificar as tipagens sorológicas como insuficientes na definição de compatibilidades.

3 - A correlação entre a cultura mista de linfócitos e a tipagem sorológica mostrou uma associação significativa entre os pacientes e indivíduos das famílias, incompatíveis e indefinidos, na LLA e AA, enquanto na LMA não ocorreu associação entre os dois métodos.

4 - A comparação dos valores obtidos para a resposta relativa em cultura mista de linfócitos e a tipagem sorológica nos pacientes e indivíduos das famílias, incompatíveis, mostrou uma associação significativa na LLA e LMA, e na AA não houve associação.

5 - A comparação dos valores obtidos para a resposta relativa em cultura mista de linfócitos e a tipagem sorológica nos pacientes e indivíduos das famílias, indefinidos, na LLA, LMA e AA não mostrou associação entre os dois métodos.

6.- A frequência das combinações dos antígenos HLA encontrada em comum entre casais, mostrou-se aumentada para os antígenos HLA-DR6 na LLA e HLA-DR15 na LMA, e diminuída para os antígenos HLA-DR52 nas três doenças e HLA-DR53 e DQ1 na AA.

7 - As tipagens para os antígenos HLA são essenciais para determinar os eventos da recombinação, homozigose e herança familiar.

8.- As famílias informativas permitiram um estudo ainda não existente na população brasileira para a identificação de doadores para transplante de medula óssea.

VII. RESUMO

Diversos estudos tem relatado a associação entre as especificidades HLA-DR, DQ e doenças. Entretanto poucos tem correlacionado as associações dos antígenos HLA de classe II com estudos em família. Relatamos juntamente com as tipagens HLA de classe II as reações em cultura mista de linfócitos (CML) em 60 pacientes portadores de leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide aguda (LMA) e anemia aplástica (AA) incluindo 202 indivíduos das famílias. As tipagens HLA de classe II foram realizadas pelo método de microlinfocitotoxicidade (TERASAKI et alli 1964). Os anti-soros utilizados, DR1 a DR18 e DQ1 a DQ8 eram provenientes de Pel-Freez, C-Six, Université Catholique de Louvain - Bruxelles - Belgique. Os testes de cultura mista de linfócitos foram realizados pelo micrométodo descrito por HARTZMAN et alli. (1971). As células utilizadas, respondedoras e estimuladoras, eram provenientes dos pacientes, dos irmãos, do pai e da mãe. O teste t, a análise da variância, e o X^2 para a comparação das frequências, foram utilizados para análise estatística. Comparando as tipagens sorológicas com os valores em cultura mista de linfócitos na LLA e AA, os dois métodos estavam significativamente associados entre os pacientes e indivíduos das famílias incompatíveis e indefinidos, enquanto que, na LMA não ocorreu associação. Entre os pacientes e indivíduos das famílias incompatíveis, ocorreu associação entre a tipagem sorológica e a cultura mista de linfócitos na LLA e LMA, e na AA não ocorreu associação. Para a resposta relativa nas três doenças, entre os pacientes e indivíduos das famílias, indefinidos, não ocorreu associação entre a tipagem sorológica e CML. Estes resultados sugerem que a cultura mista de linfócitos é capaz de discriminar especificidades entre os indivíduos incompatíveis e indefinidos na LMA, LLA e AA e que na anemia aplástica a cultura mista é indispensável para a identificação das especificidades HLA em todos os grupos testados.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ADANSON, J. W. & ERSLEV, A. J. - Aplastic Anemia . "In" WILLIAMS, W. J.; BEAUTLER, E.; ERSLEV, A. J. & LITCHMAN, M. A. *Haematology*. 4th Edition. United States of America, McGraw-Hill. 1990. 158-169.
- ANASETTI, C.; AMOS, P. ; BEATTY, P. G.; APPELBAUM, F. R.; BENSINGER, W.; BUCKNER, C. D.; CLIFT, R.; DONEY, K.; MARTIN, P. J.; MICKELSON, E.; NISPEROS, B.; O'QUIGLEY, J.; RAMBERG, R.; SANDERS, J. E.; STEWART, P.; STORB, R.; SULLIVAN, K. M.; WITHERSPOON, R. P.; THOMAS, E. D. & HANSEN, J. A. Effect of HLA compatibility and engraftment of bone marrow transplantation in patients with leukemia or lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **320**:197-204, 1989.
- AMOS, D. B.; RUDERMAN, R.; MENDELL, N. R. & JOHNSON, A. H. Linkage between HLA and spinal development . *Transplant Proc.* **7**: 93-95, 1975.
- ARMITAGE, J. O. Bone marrow Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **330**: 827-838, 1994.
- BACH, F. H. & VOYNO, N. K. One-Way Stimulation in mixed leucocyte cultures. *Science* **153**: 545-547, 1966.
- BAIN, B.; WAS, M. R. & LOWENSTEIN, L. The development of large inactive mononuclear cells in mixed leukocyte cultures. *Blood*, **23**: 108, 1964.
- BEGOVIĆ, A. B.; McCLURE, G. R.; SURAJ, V. C.; HELMUTH, R. C.; FILDES, N.; BUGAWAN, T. L.; ERLICH, H. A. & KLITZ, W. Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *The Journal of Immunol.* **148**:249-258, 1992.
- BENACERRAF, B. & Mc DEVITT, H. O. Histocompatibility - linked immune response genes. *Science* **175**:272-279, 1972.
- BENACERRAF, B. Role of MHC gene products in Immune regulation. *Science* **212**: 1229-1238, 1981.

- BJORKMAN, P. J.; SAPER, M. A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W. S.; STROMINGER, J. L. & WILEY, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**: 512-518, 1987.
- BJORKMAN, P. J. & PARHAM, P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:253-288, 1990.
- BODMER, W. F. Evolutionary significance of the HLA system. *Nature* **237**:139-145, 1972.
- BODMER, J. G.; KENNEDY, L. J.; LINDSAY, J.; WASIK, A. M. Application of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. *Br. Med. Bull.* **43**: 94-121, 1987.
- BODMER, J. G.; MARSH, S. G. E.; ALBERT, E. D., BODMER, W. F.; BONTROP, R. E.; CHARRON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A.; MACH, B.; MAYN, W. R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SHREUDER, G. M. T.; STROMINGER, J. L.; SVEJEGAARD, A. & TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* **46**: 1-18, 1995.
- BORTIN, M. M.; D'AMARO, J.; BACH, F. H.; RIMM, A. A.; VAN-ROOD, J. J. HLA Association with leukemia. *Blood* **70**:227-232, 1987.
- BOYUM, A. J. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Lab. Inv.* **21** ; suppl. 97: 77-88, 1968.
- BRODSKY, F. M.; LEM, L. & BRESNAHAN, P. A. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* **47**: 464-71, 1996.
- CAROSELLA, E. D.; DAUSSET, J. & KIRSZENBAUM, M. HLA-G revisited. *Immunol. today* **17**: 407-409, 1996.

- CESANO, A.; VISOMNEAU, S.; CLARK, S. C. & SANTOLI, D. Celular and molecular mechanisms of activation of MHC non restricted cytotoxic cells by IL-12. *J. Immunol.* **151**:2943-2957, 1993.
- CHOPEK, M.; ALOSCO, S.; SALAZAR, M. & YUNIS, E. J. Unrelated donor matching for bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.* **25**: 1255-1258, 1993.
- CRABTREE, G. R. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* **243**: 355-361, 1989.
- CROUAE, R. B.; BOUISSOU, E. S.; SOMMER, E.; PONTAROTTI, P. & THOMSEN, M. Analysis of HLA-A, B recombinant families with new polymorphic markers. *Human Immunology* **38**: 132-136, 1993.
- DAAR, A. S.; FUGGLE, S. V.; FABRE, J. W.; TING, A. & MORRIS, P. J. The detailed distribution of MHC class II antigens in human organs. *Transplantation* **38**:293-298, 1984.
- DANILOVS, J. A.; AYOUB, G. & TERASAKI, P. I. Join report: B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. "In": TERASAKI, P. I. *Histocompatibility testing 1980*. Los Angeles: UCLA Press, 1980. 282-288.
- DARKE, C.; DYER, P. Clinical HLA typing cytotoxicity. "In": DYER, P.; MIDDLETON, D. *Histocompatibility testing: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, 1993. 51-80.
- DAVIDSON, J. A.; KIPPAX, R. L. & DYER, P. A. A study of HLA-A, B, DR and bearing haplotypes derived from 304 families resident in the north west of England. *J. Immunogenet.* **15**: 227-237, 1988.
- DESSYPRIS, E. N. Aplastic anemia and pure red cell aplasia. *Current Opinion in Hematology* **1**:157-161, 1994.

- DOHERTY, P. C. & ZINKERNAGEL, R. M. H-2 Compatibility Requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic chorio meningitis virus. Different cytotoxic T-cell specities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. *J. Exp. Med.* **141**:502-507, 1975 A.
- DORAK, M. T.; MACHULLA, H. K.; HENTSCHEL, M.; MILLS, K. I.; LANGNER, J. & BURNETT, A. K. Influence of the major histocompatibility complex on age at onset of chronic lymphoid leukaemia. *Int. J. Cancer.* **65**: 134-139, 1996.
- DREXLER, H. G.; GIGNAC, S. M.; BRENNER, M. K.; SMITH, E. C.; JANOSSY, G. & HOFFBRAND, A. V. Differential expression of MHC class II antigens in chronic B-cell disorders. *Clin. Exp. Immunol.* **71**: 217-223, 1988.
- DUBEY, D. P.; YUNIS, I. & YUNIS, E. J. Cellular Typing: mixed lymphocyte response and cell-mediated lympholysis. *Man. Clin. Lab. Immunol.* 847-858, 1986.
- DUPONT, B.; HANSEN, J. & YUNIS, E. J. Human mixed lymphocyte culture reaction: genetics, specificity and biological implications. *Adv. Immunol.* **23**: 107-202, 1976.
- DUPONT, B.; BRAUN, D.; YUNIS, E. J. & CARPERNTER, C. B. HLA-D by cellular typing. In: TERASAKI, P.I. *Histocompatibility Testing*, 1980, 229-267.
- DUPONT, B.; O'REILLY, R. J.; POLLACK, M. S. & GOOD, R. A. Use of HLA genotypically different donors in bone marrow transplantation. *Transplantation Proceedings* **11**:219-224, 1979.
- ELKINS, W. L.; PICKARD, A. & PIERSON, G. Defficient expression of class I HLA in some cases of acute leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.* **18**:91-100, 1984.

- FISHMAN, P. M.; SUAREZ, B.; HODGE, S. E. & REICH, T. A robust method for the detection of linkage in familiar disease. *Am. J. Hum. Genet.* **30**: 308-321, 1978.
- GARRIDO, F.; CABRERA, T.; CONCHA, A.; GLEW, S.; CABELLO, F. R. & STERN, P. L. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunology Today* **14**:491-498, 1993.
- GOLDMAN, J. M.; CLEAVER, S.;WARNEN, P. Word marron donor association:a progress report. *Bone Marrow Transplant* **13**: 689-691,1994.
- GUY, K.; KRAFEWAKI, A. S.; DEWAR, A. E. Expression of MHC clone 55 antigens in human B-cell leukaemia and non-Hodgkin's limphoma *Br J. Cancer* **53**: 161-173, 1986.
- HANSEN, J. A. Effect of HLA compatibility and engrajment of bone marrow transplantation in patients with leukemia or lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **320**: 197-204, 1989.
- HANSEN, J. A.; MICKELSON, E. M.; CHOO, S. Y.; PETERSDORF, E. W.; ANASETTI, C.; MARTIN, P. J. & THOMAS, E. D. Clinical bone marrow transplantation: donor selection and recepient monitoring. "In": ROSE, N. R. ; De MACARIO, E. C.; FAHEY, J. L.; FRIEDMAN, H. & PENN, G.M. *Man. Clin. Lab. Immunol.* 4th edition. 1992, 850-866.
- HANSEN, T. H.; CARRENO, B. M.; SACHS, D. H. The major histocompatibility complex. "In": Paul, W. E. *Fundamental Immunology*. 3th edition. Raven Press Ltd, New York, 1993. 577-628.
- HARTZMAN, R. J.; SEGALL, M. L. & BACH, F. H. Histocompatibility matching . VI miniaturization of the mixed leukocyte culture test. A preliminary report. *Transplantation* **11**: 268-273, 1971.

- HOPKINS, K. A. Basic microlymphocytotoxicity test . "In": ZACHARY, A. A. & TERESI, G. A. *ASHI Laboratory Manual*. Am. Soc. Histocompatibility Immunogenetic. 1990, 195-201.
- IVANNY, P. & DAUSSET, J. Alloantigens and antigenic factors of human leucocytes. *Vox Sang*. 11:326-331, 1966.
- JOHNSON, A. H.; HURLEY, C. K.; HARTZMAN, R. J.; ALPER, C. A. & YUNIS, E. J. HLA: The major histocompatibility Complex of man. "In": HENRY, J. B. *Clinical Diagnosis e management by laboratory methods* . 18th edition. W. B. Sanders Company. 1991, 761-794.
- JORGENSEN, F. ; KRISTENSEN, T.; LAMM, L. U. & KISSMEYER-NIELSEN, F. MLC (HLA-D) typing: A family study . *Tissue Antigens* 10:379-393, 1977.
- KLEIN, J. & SHEREFFLER, D. C. The H-2 model for the major histocompatibility systems. *Transplante Review* 6:3-29, 1971.
- KOVATS, S.; MAIN, E. K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S. J. & DEMARS, R. A Class I Antigens, HLA-G, Expressed in Human Trophoblasts. *Science* 248:220-223, 1990.
- KRENGER, G. & FERRARA, J. L. M. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Res.* 15: 50-73, 1996.
- KRENSKY, A. M.; WEISS, A.; GABTREE, G.; DAVIS, M. M. & PAHAM, P. T-Lymphocyte - antigen interactions in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 322: 510-517, 1990.
- KRONENBERG, M.; BRINES, R. & KAUFMANS, J. MHC evolution: a long term investment in defense. *Immunol. Today* 15: 4-6, 1994.
- KWOK, W. W.; KOVATS, S.; THURTMAN, P. & NEPOM, G. T. HLA-DQ allelic polymorphisms constrain patterns of class II heterodimer formation. *J. Immunol.* 50:1-10, 1993.

- LAFFERTY, K. J. Role of second signals in the induction of T cells and graft rejection. *The Immunologist* **3**: 256-258, 1995.
- LAMÓNT, A. G. & ADORINI, L. IL-12: Key cytokine in immune regulation *Immunol. Today* **17**:214-217, 1996.
- LOISEAU, P. Expression of class II HLA molecules DR, DQ and DP at the surface of blast cells in non-T acute lymphoblastic Leukemia. *Immunology* **173**: 2-10, 1986.
- LICHTMAN, M. A. & HENDERSON, E. S. Acute myelogeneous leukemia. "In": WILLIAMS, W. J.; BEAUTLER, E.; ERSLEV, A. J. & LICHTMAN, M. A. *Hematology*. 4th edition. United States of America, Mc Graw-Hill, Inc. "ed", 1990. 251-252.
- LILLY, F. & PINNEUS T. Genetic control of murins viral leucomogenesis. *Adv. Cancer Reser.* **17**:231-277, 1973.
- MARSH, J. C.; GEARY, C. G. Is aplastic anemia a pre-leukaemic disorder? *British Journal Haematology* **77**: 447-452, 1991.
- MARYANSKI, J.; PALA, P.; CEROTTINI, J. C. & CORRADIN, G. Synthetic peptides as antigens and competitors in recognition by H-2 - Restricted cytolytic T cells specific for HLA. *J. Exp. Med.* **167**:1391-1405, 1988.
- MAUER, A. M. Acute lymphocytic leukemia. "In": WILLIAMS, W. J.; BEAUTLER, E.; ERSLEV, A. J. & LICHTMAN, M. A. *Hematology* 4th edition. United States of America, Mc Graw-Hill, Inc. , 1990. 994-1003.
- McDOUGALL, C. J.; NGOI, S. S.; GOLDMAN, I. S. ; GODWIN, T.; FELIX, J.; DECOSSE, J. J. & RIGAS, B. Reduced expression of HLA class I and II antigens in colon cancer. *Cancer Research* **50**: 8023-8027, 1990.

- MICKELSON, E. M. & HANSEN, J. A. The mixed lymphocyte culture (MLC) test. "In" ZACHARY, A. A. & TERESI, G. A. *ASHI Laboratory manual. Am. Soc. Histocompatibility Immunogenetics*. 339-356, 1990.
- MICKELSON, E. M.; BARTSCH, G. E. ; HANSEN, J. A. & DUPONT, B. The MLC assay as a test for HLA-D region compatibility between patients and unrelated donors : Results of a national marrow donor program involving multiple centers. *Tissue Antigens* **42**: 465-472, 1993.
- MITCHINSON, A. A Immunoregulation in T-cell clusters. *The Immunologist*, **3**: 258-259, 1995.
- MORAES, J. R. F. & MORAES, M. E. Distribuição dos alelos HLA na população brasileira. *Hematol Hemater* **1996**, 1:18-23.
- NEPOM, B. S. & NEPOM, G. T. Polyglot and polymorfism . An HLA update. *Arthritis Rheum.* **38**: 1715-1721, 1995.
- NEPOM, G. T. & NEPOM, B. The major histocompatibility complex. "In" KLIPPEL , J. H. & DIPPE, P. A. (editors) *Reumatology* . Mosby, St. Louis, 1994. 1-12.
- NIEDERWIESER, D.; PEPE, M. & STORB, R. Improvement in rejection, engraftment rate e survival without increase in graft-versus-host- disease by high marrow cell dose in patients transplanted for aplastic anemia. *Br. J. Haematol.* **69**: 23-28, 1988.
- NIMER, S. D.; IRELAND, P.; MESKINPOUR, A.; FRANC, M. An increased HLA-DR2 frequency in seen in aplastic anemia patients. *Blood* **84**: 923-927, 1994.
- OPELZ, G.; KIRUCHI, M. & MITSUOTAKASUGI Reactivity of Lymphocyte Subpopulations in Human Mixed Lymphocyte Culture. *Journal of Immunogenetics* **2**: 1-7, 1975.

- OSOBA, D. & FALK, J. The mixed leukocyte reaction in man: effect of pool of stimulating cells selected on the basis of crossreacting HLA specificities. *Cell. Immunology* **10**: 117-135, 1974.
- OTT, J. Estimation of the recombination fraction in human pedigree. Efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am. J. Human Genet.* **26**: 588-597, 1974.
- PARHAM, P. HLA, antropology and transplantation. *Transpl. Proc.* **25**: 159-161, 1993.
- PARHAM, P. & OHTA, T. Population Biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* **272**: 67-74, 1996.
- PICKER, L. J. Control of lymphocyte homing *Current Biology* **6**: 394-406, 1994.
- REED, ELUPU F.; McMANUS, P.; SEIGLE, R. & SUCIU-F, N. Population and family sterolies of HLA-DR4 by use of oligonucleotide typing. *Tissue Antigens* **39**: 266-271, 1992.
- REINHERZ, E. L. & SCHLASSMAN, S. F. The characterization and function in human immunoregulatory T lymphocyte subsets. *Immunol. Today* **2**: 69-71, 1981.
- REISMOEN, W. L. Cellular methods. "In" DYER, P, MIDDLETON, D. Histocompatibility testing: a pratical approach. Oxford University Press, Oxford 143-157, 1993.
- ROESEL, C. E. Reações Imunológicas que afetam Transplantes de Tecidos. "In": Roesel, C. E. *Imunologia: Um Método Auto-Instrutivo*. 2ª edição. São Paulo, SP, McGraw-Hill "ed", 1981. 203-215.
- ROSE, M.; MENZEL, G. R.; GESERIK, G.; DOXICDES, G.; GRASSE-WILDE, H.; MUKORIDA, M. & RACKWITZ, A. Recombination within the class II . *Tissue Antigens* **3**:183-190, 1988.

- SALAZAR, M. ; YUNIS, I.; ALASCO, S. M.; CHOPEC, M. & YUNIS, E. J. HLA-A, B, C, DR (generic) DQA1 identical unrelated individuals with unreactive MLC. *Tissue Antigens* **39**:203-208, 1992.
- SANT, A. J.; BRAUNSTEIN, N. S. & GERMAIN, R. N. Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex $\alpha\beta$ dimer expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 8065-8069, 1987.
- SCHWARTZ, R. S. The early years of immunosuppressive drug therapy - a personal history *The Immunologist* **3**: 5-6, 1995.
- SCHIPPER, R. F., OUDSHOORN, M; D'AMARO Validation of large data sets, an essential prerequisite for data analysis: an analytical survey of the Bone Marrow Donors World Wide. *Tissue Antigens* **47**:169-178, 1996.
- SEGALL, M. & BACH, F. H. Pooled stimulating cells as a "Standard Stimulation" in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* **22**: 79-85, 1976.
- SELL, A. M.; DONADI, E. A.; VOLTARELLI, J. C.; OLIVEIRA, V. C; THOMAZ, E. M.; BRANDALISE, S. R.; MAGNA, L. A.; TEIXEIRA, M. P.; ARANEGA, V. L. & KRAEMER, M. H. S. Population and family study of histocompatibility antigens in acute leukemias and aplastic anemia. Genetic diversity of HLA: Functional and medical implications. Paris, EDK-International Publisher Medicine & Science, 1996. In press.
- STRONCE, K. D.; BARTSCH, G.; PERKINS, H. A.; RANDAL, B. L.; HANSEN, J. A.; McCULLONGH, J. *The National Marrow Donor Program Transfusion* **33**:567-577, 1993.
- STRONG, D. M.; ORTALDO, D. M. J. R.; PANDOLFI, F.; MALUISH, A. & HERBERMAN, R. B. Cryopreservation of human mononuclear cells for quality control in clinical immunology. I. Correlations in recovery of K and

- NK-cell functions , surface markers and morphology. *J. Clin. Immunol.* **2**: 216-221, 1982.
- TERASAKI, P. I. & McCLEND, J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* **204**: 998-1000, 1964.
- TERASAKI, P. I. ; McCLEND, J.; PARK, M. S. & McCURLY, B. Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. "In": RAY, J. G.; HARE, D. B.; PEDERSEN, P. D. & KAYOE, D. E. ed. Manual of tissue typing techniques. NIH. Bethesda, 1974. 66-72.
- THOMPSON, M. W.; MACINNES, R. R. & WILLARD, H. F. *Thompson & Thompson: Genética Médica* . 5ª edição . Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. 1993, 222-239.
- TIERCY, J.-M.; MOREL, C.; FRIEDEL, A. C.; ZWAHLEN, F.; GEBUHRER, L.; BÉTUEL, H.; JEANNET, M. & MACH, B. Selection of unrelated donors for bone marrow transplantation is improved by HLA class II genotyping with oligonucleotide hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:7121-7125, 1991.
- TONGIO, M. M.; FALKENRODT, A.; URLACHER, A.; MITSUISHI, Y.; BERGERAT, J. P.; BOILLETOT, A.; LUTZ, P.; GRIVEAU, A. M.; TROUSSARD, X. & MAYER, Expression des marqueurs de classe I et II sur des populations de cellules leucémiques. *Path. Biol.* **34**:753-757, 1986.
- TROWSDALE, J. Genetics and polymorphism: class II antigens. *Br. Med. Bull.* **43**: 15-36, 1987a
- WALLACH, D.; FELLOUS, M. & REVEL, M. Preferential effect of interferon on the synthesis of HLA antigens and their RNAs in human cells. *Nature*. 299:833-836, 1982.
- WEISS, A.; IMBODEN, J. B. Cell surface molecules and early events in human T lymphocyte activation . *Adv Immunol* **41**:1-38, 1987.

- WERNER, C.; KLOUDA, P. T.; CORREA, M. C.; VASSALLI, P. & JEANNET, M.
Isolation of B and T lymphocytes by nylon fiber columns. *Tissue Antigens* **9**:
227-229, 1977.
- WEYAND, C. M. & GORONZY, J. J. Functional Domains on HLA-DR
Molecules: Implications for the Linkage of HLA-DR Genes to Different
Autoimmune Diseases. *Clinical Immunology and Immunopathology* **70**:91-
98, 1994.
- YASUNAGA, S.; KIMURA, A.; HAMAGUCHI, K.; RONNINGEN, K. S.;
SASAZUKI, T. Different contribution of HLA-DR and DQ genes in
susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)
Tissue Antigens **47**:37-48, 1996.
- YUNIS, E. J. & AMOS, D. B. Three closely linked genetic systems relevant to
transplantation. *Proc Nat Ac Sci (Wasb)* **68** :3030-3035, 1991.

X. APÉNDICE

APÊNDICE 1 - Anti-soros anti-HLA de classe II nas placas de tipagem

	A	B	C	D	E	F
1	CN	CN	CN	DR1	DR1	DR2
2	DR3	DR3	DR15	DR15	DR1,2,10	DR2(6)
3	DR3	DR17	DR4	DR4	DR4	DR5
4	DR12	DR12	DR11	DR11	DR11	DR5
5	DR6	DR13(12)	DR14,8,11	DR7	DR7	DR7
6	DR7	DR8	DR9	DR9	DR10	DR10
7	DQ1	DQ1	DR53	DR53	DR52	DR51
8	DQ1	DQ5	DQ2	DQ2	DQ2	DQ3
9		DQ7,8	DQ8	DQ7	DQ4	DQ3
10				CP HDS/2705	CP	CP

CP - Controle Positivo de classe II
CN - Controle Negativo
HDS/2705 - Anticorpo monoclonal anti-DR
nulo - Ausência de Anti-soros

APÊNDICE 2 - Combinações entre as células mononucleares na placa de cultura mista de linfócitos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R ₁ E ₂	-	-	R ₂ E ₁	-	-	R ₁ E ₃	-	-	R ₃ E ₁	-	-
B	R ₁ E ₄	-	-	R ₄ E ₁	-	-	R ₁ E ₅	-	-	R ₅ E ₁	-	-
C	R ₂ E ₅	-	-	R ₅ E ₂	-	-	R ₃ E ₅	-	-	R ₅ E ₃	-	-
D	R ₄ E ₅	-	-	R ₅ E ₆	-	-	R ₁ E ₆	-	-	R ₂ E ₆	-	-
E	R ₃ E ₆	-	-	R ₄ E ₆	-	-	CA ₁	-	-	CA ₂	-	-
F	CA ₃	-	-	CA ₄	-	-	CA ₅	-	-	E ₂ E ₅	-	-
G												
H												

R - células respondedoras

E - células estimuladoras

R₁ e E₁ - paciente

R₂ e E₂ - doador

R₃ e E₃ - mãe

R₄ e E₄ - pai

R₅ e E₅ - controle não relacionado

E₆ - "pool"

CA - controle autólogo

APÊNDICE 3 - Tipagem dos antígenos HLA de classe II e resposta relativa nos pacientes portadores de LLA e indivíduos da família

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
01	DR7	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ3	
I1	DR7	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ3	ND
I2	DR7	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ3	ND
M	DR7	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ3	ND
P	DR -	DR11	DR52		DQ3	DQ3	ND
02	DR7	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ3	
I1	DR7	DR11	DR53		DQ1	DQ1	ND
I2	DR7	DR -	DR53		DQ1	DQ1	ND
M	DR -	DR7	DR53		DQ2	DQ2	ND
P	DR -	DR11	DR52		DQ3	DQ3	ND
03	DR -	DR15	DR51		DQ1	DQ1	
I1	DR -	DR15	DR51		DQ1	DQ1	ND
M	DR2	DR -	DR51		DQ1	DQ1	ND
P	DR1	DR15	DR51		DQ1	DQ1	ND
04	DR -	DR2	DR51		DQ1	DQ1	
I1	DR1	DR2	DR51		DQ1	DQ1	ND
I2	DR -	DR2	DR51		DQ1	DQ1	ND
M	DR1	DR2	DR51		DQ1	DQ1	ND
P	DR2	DR -	DR51		DQ -	DQ -	ND
05	DR2	DR6	DR51	DR52	DQ1	DQ1	
I1	DR6	DR -	DR52		DQ1	DQ1	ND
I2	DR6	DR -	DR52		DQ1	DQ1	ND
M	DR6	DR -	DR52		DQ1	DQ1	ND
P	DR2	DR6	DR51	DR52	DQ1	DQ1	ND
06	DR3	DR -	DR51	DR52	DQ -	DQ -	
I1	DR1	DR -	DR52		DQ -	DQ -	ND
M	DR4	DR -	DR52	DR53	DQ -	DQ -	ND
P	DR1	DR3	DR52		DQ1	DQ1	ND
07	DR -	DR11	DR52		DQ1	DQ1	
I1	DR -	DR11	DR52		DQ1	DQ1	1,85
M	DR -	DR3	DR52		DQ1	DQ1	64,80
P	DR -	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ3	74,00

01... 07 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 3 - (continuação)

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
08	DR -	DR7	DR52	DR53	DQ1	DQ2	
I1	DR -	DR7	DR52	DR53	DQ1	DQ2	0,97
I2	DR -	DR7	DR52	DR53	DQ1	DQ2	0,54
I3	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ3	70,00
M	DR -	DR4	DR52	DR53	DQ1	DQ3	68,00
P	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ3	55,00
09	DR -	DR11	DR52	DR53	DQ1	DQ7	
I1	DR1	DR4	DR53		DQ1	DQ8	46,00
M	DR1	DR11	DR52		DQ1	DQ7	96,00
P	DR4	DR -	DR53		DQ1	DQ8	81,00
10	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ2	
I1	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ2	6,30
I2	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ2	5,00
M	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ2	72,00
P	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ -	85,00
11	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ3	
I1	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ8	164,00
M	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ3	65,50
P	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ8	147,70
12	DR11	DR -	DR52		DQ1	DQ -	
I1	DR11	DR -	DR52		DQ1	DQ -	0,92
I2	DR11	DR -	DR52		DQ1	DQ -	84,80
M	DR11	DR -	DR52		DQ1	DQ -	78,00
P	DR4	DR11	DR52	DR53	DQ1	DQ3	90,00
13	DR1	DR7	DR53		DQ1	DQ -	
I1	DR1	DR7	DR53		DQ1	DQ -	1,76
M	DR3	DR7	DR52	DR53	DQ -	DQ -	79,00
P	DR1	DR2	DR51		DQ1	DQ -	93,00
14	DR3	DR5	DR52		DQ2	DQ7	
I1	DR3	DR5	DR52		DQ2	DQ7	0,40
M	DR3	DR4	DR52	DR53	DQ2	DQ7	128,00
15	DR -	DR -			DQ -	DQ -	
I1	DR3	DR -	DR52		DQ3	DQ -	0,32
M	DR6	DR3	DR52		DQ1	DQ3	78,00
P	DR1	DR -	DR52		DQ1	DQ3	87,00

08... 15 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 3 - (continuação)

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
16	DR -	DR -			DQ -	DQ -	
I1	DR3	DR -	DR52		DQ5	DQ -	91,20
I2	DR3	DR -	DR52		DQ2	DQ -	39,50
I3	DR3	DR -	DR52		DQ2	DQ -	44,70
M	DR3	DR7	DR52	DR53	DQ2	DQ -	91,00
P	DR3	DR -	DR52		DQ5	DQ5	88,00
17	DR4	DR -	DR53		DQ -	DQ -	
I1	DR4	DR -	DR52	DR53	DQ -	DQ -	1,90
I2	DR2	DR -	DR51		DQ1	DQ1	78,00
M	DR -	DR -	DR52		DQ3	DQ1	95,00
P	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ3	76,00
18	DR11	DR4	DR52	DR53	DQ1	DQ7	
I1	DR11	DR4	DR52	DR53	DQ7	DQ8	1,30
M	DR -	DR4	DR52	DR53	DQ -	DQ3	87,00
19	DR2	DR11	DR51	DR52	DQ1	DQ3	
I1	DR2	DR11	DR51	DR52	DQ1	DQ3	0,80
M	DR -	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ -	54,00
P	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ -	81,00
20	DR7	DR6	DR52	DR53	DQ1	DQ3	
I1	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ3	ND
I2	DR7	DR6	DR52	DR53	DQ1	DQ3	ND
M	DR6	DR -	DR52		DQ1	DQ -	ND
P	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ3	ND
21	DR7	DR -	DR52	DR53	DQ -	DQ -	
I1	DR7	DR2	DR51	DR53	DQ1	DQ2	59,50
M	DR2	DR -	DR51	DR52	DQ1	DQ -	78,00
22	DR -	DR -			DQ -	DQ -	
I1	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ8	75,00
M	DR2	DR6	DR51	DR52	DQ1	DQ -	82,50
P	DR4	DR -	DR53		DQ8	DQ -	63,00
23	DR -	DR -			DQ -	DQ -	
I1	DR1	DR4	DR53		DQ1	DQ3	43,00
M	DR1	DR7	DR53		DQ1	DQ2	79,00
P	DR4	DR6	DR52	DR53	DQ3	DQ1	58,00

16... 23 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 4 - Tipagem dos antígenos HLA de classe II e resposta relativa nos pacientes portadores de LMA e indivíduos da família

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
01	DR	DR -			DQ -	DQ -	
I1	DR1	DR2	DR51		DQ5	DQ1	ND
I2	DR3	DR4	DR52	DR53	DQ2	DQ3	ND
M	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ3	ND
P	DR1	DR3	DR52		DQ5	DQ2	ND
02	DR -	DR7	DR53		DQ2	DQ -	
I1	DR -	DR7	DR53		DQ2	DQ -	ND
I2	DR -	DR7	DR53		DQ2	DQ -	ND
M	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ -	ND
P	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ3	ND
03	DR -	DR4	DR53		DQ3	DQ -	
I1	DR7	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ -	58,34
M	DR -	DR11	DR52	DR53	DQ -	DQ3	73,00
P	DR7	DR4	DR53		DQ -	DQ3	90,00
04	DR1	DR1			DQ1	DQ1	
I1	DR4	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ -	62,00
I2	DR4	DR11	DR52	DR53	DQ3	DQ3	91,00
M	DR1	DR4	DR53		DQ1	DQ3	87,00
P	DR1	DR11	DR52		DQ1	DQ3	78,00
05	DR2	DR -	DR51	DR53	DQ -	DQ -	
I1	DR2	DR2	DR51		DQ1	DQ -	ND
M	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ8	ND
P	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ3	ND
06	DR -	DR3	DR52		DQ -	DQ2	
I1	DR -	DR3	DR52		DQ -	DQ2	ND
M	DR -	DR3	DR52		DQ1	DQ2	ND
P	DR -	DR7	DR52	DR53	DQ -	DQ2	ND
07	DR4	DR -	DR52	DR53	DQ3	DQ -	
I1	DR4	DR7	DR53		DQ2	DQ3	64,00
M	DR2	DR4	DR53		DQ1	DQ3	79,00
P	DR -	DR7	DR		DQ2	DQ3	83,50

01... 07 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 4 - (continuação)

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
08	DR4	DR -	DR52	DR53	DQ1	DQ3	
I1	DR -	DR -	DR52		DQ -	DQ -	ND
M	DR -	DR -	DR52	DR53	DQ1	DQ -	ND
P	DR4	DR -	DR52	DR53	DQ1	DQ3	ND
09	DR -	DR -			DQ -	DQ -	
I1	DR4	DR8	DR53		DQ3	DQ -	ND
I2	DR4	DR8	DR53		DQ3	DQ -	ND
M	DR -	DR4	DR52	DR53	DQ1	DQ3	ND
P	DR8	DR9	DR53		DQ1	DQ -	75,00
10	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ3	
I1	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ3	7,50
I2	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ3	8,50
I3	DR7	DR -	DR53		DQ2	DQ3	5,80
I4	DR4	DR8	DR53		DQ3	DQ -	42,80
M	DR7	DR8	DR53		DQ2	DQ -	90,00
P	DR4	DR -	DR53		DQ2	DQ3	55,00
11	DR -	DR -			DQ -	DQ -	
I1	DR1	DR -			DQ5	DQ1	91,00
M	DR1	DR11	DR52		DQ5	DQ7	111,00
P	DR3	DR -	DR52		DQ1	DQ2	131,00
12	DR15	DR -	DR51	DR51	DQ1	DQ -	
I1	DR15	DR -	DR51		DQ1	DQ -	13,00
M	DR15	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ3	70,00
P	DR15	DR -	DR51	DR52	DQ1	DQ -	15,00
13	DR8	DR11	DR52		DQ7	DQ -	
I1	DR4	DR8	DR53		DQ8	DQ -	137,00
I2	DR4	DR8	DR53		DQ8	DQ -	94,00
M	DR4	DR11	DR52	DR53	DQ8	DQ7	70,00
P	DR8	DR12	DR52		DQ7	DQ -	36,00
14							
I1	DR5	DR7	DR52	DR53	DQ7	DQ2	80,30
M	DR5	DR -	DR52		DQ8	DQ -	72,50
P	DR7	DR -	DR53		DQ1	DQ2	69,00

08... 14 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 4 - (continuação)

PAC. / FAM.		HLA-DR				HLA-DQ		RR (%)
15								
M	DR1	DR11	DR52		DQ1	DQ7	37,20	
P	DR6	DR -	DR52		DQ1	DQ -	61,10	
16								
	DR -	DR11	DR52	DR53	DQ-	DQ -		
I1	DR -	DR11	DR52		DQ3	DQ -	ND	
I2	DR -	DR11	DR52		DQ -	DQ3	ND	
M	DR7	DR11	DR52	DR53	DQ1	DQ3	ND	
P	DR -	DR -	DR		DQ -	DQ -	ND	
17								
	DR11	DR7	DR52	DR53	DQ7	DQ2		
I1	DR 11	DR -	DR53		DQ7	DQ1	60,50	
M	DR7	DR -	DR52	DR53	DQ2	DQ1	85,80	
P	DR3	DR11	DR52		DQ2	DQ7	81,80	

15... 17 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 5 - Tipagem dos antígenos HLA de classe II e resposta relativa nos pacientes portadores de AA e indivíduos da família

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
01	DR2	DR3	DR51	DR52	DQ -	DQ -	
M	DR11	DR3	DR52		DQ -	DQ2	ND
P	DR2	DR3	DR51	DR52	DQ1	DQ2	ND
02	DR2	DR9	DR51	DR52	DQ1	DQ9	
I1	DR2	DR9	DR51	DR53	DQ1	DQ9	ND
I2	DR9	DR -	DR53		DQ1	DQ9	ND
M	DR9	DR -	DR53		DQ -	DQ9	ND
P	DR2	DR -	DR51	DR51	DQ -	DQ1	ND
03	DR -	DR7	DR53		DQ -	DQ -	
I1	DR -	DR7	DR53		DQ -	DQ2	ND
M	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ2	ND
P	DR -	DR7	DR52	DR53	DQ -	DQ2	ND
04	DR -	DR -	DR52	DR53	DQ -	DQ -	
I1	DR1	DR4	DR53		DQ5	DQ7	ND
M	DR4	DR6	DR52	DR53	DQ3	DQ1	ND
P	DR1	DR7	DR53		DQ1	DQ2	ND
05	DR1	DR3	DR52		DQ1	DQ2	
I1	DR1	DR4	DR53		DQ1	DQ2	ND
M	DR1	DR7	DR53		DQ1	DQ2	ND
P	DR3	DR4	DR52	DR53	DQ2	DQ8	ND
06	DR11	DR -	DR52		DQ7	DQ1	
I1	DR3	DR5	DR52		DQ2	DQ7	21,00
M	DR5	DR -	DR52		DQ7	DQ1	2,70
P	DR3	DR11	DR52		DQ2	DQ7	46,50
07	DR8	DR -	DR52		DQ1	DQ -	
M	DR4	DR8	DR53		DQ3	DQ -	37,50
P	DR7	DR -	DR52	DR53	DQ3	DQ -	31,00

01... 07 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 5 - (continuação)

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
08	DR6	DR -	DR52		DQ2	DQ2	
I1	DR1	DR -			DQ1	DQ1	52,00
I2	DR1	DR6	DR52		DQ -	DQ -	83,00
I3	DR1	DR -	DR52		DQ7	DQ7	52,00
I4	DR1	DR -	DR52		DQ7	DQ7	54,00
I5	DR6	DR -	DR52		DQ1	DQ1	63,00
I6	DR7	DR6	DR52	DR53	DQ2	DQ2	78,00
M	DR6	DR -	DR52		DQ1	DQ1	80,00
P	DR1	DR -	DR52		DQ1	DQ1	60,00
09	DR2	DR11	DR51	DR51	DQ1	DQ7	
M	DR2	DR -	DR51	DR51	DQ1	DQ7	20,70
P	DR3	DR11	DR52	DR52	DQ -	DQ7	96,30
10	DR1	DR4	DR53	DR53	DQ1	DQ8	
I1	DR1	DR3	DR52	DR52	DQ1	DQ2	84,00
I2	DR1	DR4	DR53	DR53	DQ1	DQ8	19,80
M	DR3	DR4	DR52	DR52	DQ2	DQ8	60,00
P	DR1	DR5	DR52	DR52	DQ1	DQ7	72,00
11	DR1	DR8			DQ5	DQ4	
I1	DR7	DR8	DR53	DR53	DQ2	DQ4	39,50
M	DR1	DR7	DR53	DR53	DQ5	DQ2	20,20
P	DR7	DR8	DR53	DR53	DQ3	DQ4	24,30
12	DR1	DR2			DQ1	DQ5	
M	DR1	DR7	DR53	DR53	DQ2	DQ5	98,00
P	DR2	DR7	DR51	DR51	DQ1	DQ3	106,00
13	DR2	DR15	DR51	DR51	DQ1	DQ1	
M	DR2	DR7	DR51	DR51	DQ1	DQ2	85,00
P	DR7	DR8	DR53	DR53	DQ1	DQ4	19,50
14	DR7	DR7	DR53		DQ2	DQ8	
I1	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ8	31,00
I2	DR3	DR7	DR52	DR53	DQ2	DQ -	32,00
I3	DR3	DR7	DR52	DR53	DQ2	DQ -	16,00
M	DR2	DR7	DR51	DR2	DQ1	DQ2	55,00
P	DR -	DR7	DR53		DQ -	DQ -	61,00

08... 14 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido

APÊNDICE 5 - (continuação)

PAC. / FAM.		HLA-DR			HLA-DQ		RR (%)
15	DR2	DR5	DR51	DR52	DQ1	DQ3	
I1	DR2	DR5	DR51	DR52	DQ1	DQ3	0,64
I2	DR2	DR7	DR51	DR53	DQ1	DQ2	79,00
I3	DR3	DR	DR52	DR53	DQ2	DQ3	20,70
M	DR2	DR3	DR51	DR52	DQ1	DQ2	42,00
P	DR5	DR7	DR52	DR53	DQ3	DQ2	55,00
16	DR2	DR -	DR51		DQ1	DQ2	
I1	DR2	DR -	DR51		DQ1	DQ2	0,04
M	DR2	DR4	DR51	DR53	DQ1	DQ8	64,00
17	DR -	DR -	DR52		DQ1	DQ3	
I1	DR3	DR -	DR52		DQ1	DQ3	1,93
I2	DR3	DR -	DR52		DQ1	DQ3	0,20
M	DR3	DR -	DR52		DQ1	DQ3	73,00
18	DR1	DR5	DR52		DQ -	DQ -	
I1	DR -	DR2	DR51		DQ -	DQ -	37,40
M	DR1	DR2	DR51		DQ -	DQ -	89,00
19	DR2	DR3	DR51	DR52	DQ7	DQ3	
I1	DR3	DR11	DR52		DQ2	DQ7	36,00
M	DR2	DR11	DR51	DR52	DQ1	DQ7	49,50
P	DR3	DR6	DR52		DQ2	DQ1	61,00
20	DR6	DR4	DR52	DR53	DQ1	DQ3	
I1	DR7	DR -	DR53		DQ3	DQ -	38,50
I2	DR4	DR7	DR53		DQ3	DQ2	52,60
M	DR4	DR -	DR53		DQ3	DQ -	64,00
P	DR6	DR7	DR52	DR53	DQ1	DQ2	73,00

15... 20 - Pacientes

I - Irmão

M - Mãe

P - Pai

RR até 12 - Cultura não estimulatória

RR acima de 12 - Cultura estimulatória

- : Homozigose ou antígeno não determinado

ND - Não Definido