

4. SISTEMA LEUCOCITÁRIO

SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDADE (H.L.A.)

Prof. Dr. Ayush Morad Amar

4.1. INTRODUÇÃO

Os antígenos HLA (antígeno leucocitário humano ou de histocompatibilidade), também conhecidos como antígenos de transplante ou teciduais, estão situados na superfície da membrana de glicoproteína das células nucleadas e dos trombócitos. Após o contato parenteral, por exemplo, mediante transplantes, transfusões de sangue e gravidez, os antígenos HLA induzem à formação de iso-anticorpos nos organismos alogênicos humanos. Essa sensibilização, que pode acompanhar aquela da defesa imunológica celular, é a mais indesejável, particularmente na terapêutica mediante transplante de órgãos e transfusões de sangue ou de células sanguíneas.

Já em 1946, concluíam-se com certeza, por meio de experiência em animais, que os processos imunológicos são responsáveis pela rejeição de transplantes. Em 1952, Dausset descobriu anticorpos aglutinantes no soro de pacientes politransfundidos que reagiam apenas com leucócitos e não com eritrócitos. Em 1958, o primeiro antígeno leucocitário, "Mac", foi descrito. Tanto Payne quanto van Rood, independentemente, ao mesmo tempo, descobriram anticorpos leucocitários no soro de mulheres grávidas.

As tentativas posteriores, objetivando demonstração e identificação de outros antígenos leucocitários, obtiveram êxito. Torna-se, cada vez mais claro que proporção considerável de antígenos leucocitários pode ser encontrada em todas as células nucleadas do corpo. Por essa razão, os leucócitos fornecem, facilmente, material de pesquisa, sendo utilizados na seleção de doadores para transplante de forma sistemática. Sucessivamente, outras investigações clínicas ganharam corpo e, recentemente, a perícia médico-legal de investigação de vínculo genético viu-se enriquecida, sobretudo, com o advento do referido sistema.

4.2. GENÉTICA

Os inúmeros antígenos do sistema HLA são geneticamente determinados. Os gens responsáveis foram relacionados, pelo menos, a quatro

posições genéticas diferentes (loci) de um complexo principal de histocompatibilidade.

Mediante estudos genealógicos e análises genéticas com híbridos de células somáticas, o complexo de histocompatibilidade humano foi especificado ao cromossomo autossomal 6. Os quatro loci foram designados pelas letras A, B, C e D, sendo A (inicialmente chamado "primeiro" ou locus LA) e B (inicialmente chamado locus "segundo", "quatro" ou "sete") relativamente bem definidos. O conhecimento do locus C ("terceiro" ou locus AJ) e D (MLC) é incompleto, sendo, atualmente, objeto de pesquisa intensiva.

Cada um dos loci é associado a uma série de alelos (gens reciprocamente exclusivos). Isto significa que a informação genética total que caracteriza os antígenos HLA de cada indivíduo, está localizada em um par de autossomas com cada quatro loci. Desse modo, em um indivíduo (diplóide) há um total de oito alelos (dos 50 possíveis). Dependendo da zigoticidade do indivíduo, há, pelo menos, quatro a oito diferentes antígenos HLA detectáveis no fenótipo.

A hereditariedade é codominante; em razão da grande proximidade dos loci, os gens são herdados juntos. Admite-se mesmo que sua separação por meio do "crossing-over" ocorre com frequência de 0% a 1%. No processo normal, a informação veiculada por um cromossomo (chamado haplótipo ou cromossomo HLA) é sempre originária do pai e do cromossomo homólogo da mãe. Portanto, apenas quatro diferentes combinações genéticas são possíveis na criança (ver Fig. 1).

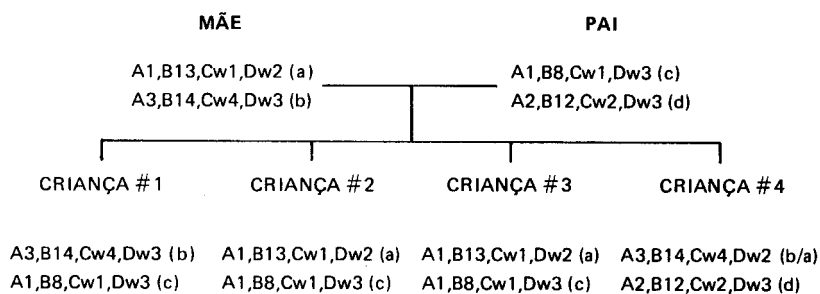
Embora os loci controladores dos grupos sanguíneos Chido e Rogers pudessem também ser relacionados ao HLA, observou-se que outros sistemas imunológicos eritrocitários (ABO, Rh, MNSs, K, Jk, FY, secretor), plaquetínicos (Ko) e séricos (Gm, Gc, Lp, Ag, Hp) são independentes do complexo de histocompatibilidade em apreço.

Em diversos estudos, demonstrou-se que as populações em geral, apresentam evidente diferença quanto à frequência de gens e haplótipos. Na população branca, certos gens (HLA-A2, A3, B7, B12) ou combinações de gens (A1-B8, A3-B7, A2-B12, A2-B7) são muito comuns, enquanto outros, extremamente raros. Na maioria dos haplótipos comuns, os antígenos mais frequentes estão envolvidos. Deve-se notar, entretanto, que as frequências constatadas mostram considerável discrepância em relação à frequência genética prospectada. Tal variação, chamada desequilíbrio de "linkage", é também encontrada nos sistemas MNSs e Rh. A presença do aludido desequilíbrio no sistema HLA apresenta implicações

práticas, como, por exemplo, nas investigações de paternidade e maternidade, porque permite o cálculo do mais provável genótipo para um dado fenótipo.

Ao se pesquisar antígenos HLA, pode-se detectar somente a presença ou a ausência de antígenos individuais; a caracterização de haplótipos, entretanto, é feita apenas pela análise de segregação de antígenos HLA em dada família. Na Fig. 1, por exemplo, a observação de que a criança #1 herdou A1 e B8 mas não A2 e B12, leva-nos a concluir que os haplótipos do pai devem ter sido A1/B8 e A2/B12 ao invés de A1/B12 e A2/B8.

HERANÇA DE HAPLÓTIPOS



a, b = haplótipos maternos

c, d = haplótipos paternos

Em determinadas situações, principalmente quando há "brancos" ou "vazios" (possíveis antígenos não-detectados), a indicação de haplótipos pode ser ambígua. Por exemplo, talvez não seja possível saber se um indivíduo que possui os antígenos A2, B8 e B12 apresenta haplótipos A2/B8 e A2/B12 ou A2/B8 e -/B12 ou, finalmente, -/B8 e A2/B12.

Como já se viu, diversas formas alélicas dos antígenos HLA ocorrem com diferentes freqüências em diversos grupos raciais. Alguns desses antígenos parecem ser exclusivos de certas populações enquanto outros ocorrem segundo distribuições diferentes. Tal fato está ilustrado na Tabela 1, fundado no mais recente relatório do Laboratório de Pesquisas sobre o HLA relativamente às Américas.

**FREQUÊNCIAS DE ANTÍGENOS (%) EM
POPULAÇÕES AMERICANAS**

Grupo racial	Caucasiano	Negro	Chinês	Japonês
Número de testes	1942	563	68	31
HLA-A1	26.9	12.8	2.9	0.0
A2	43.4	30.0	43.3	41.9
A3	22.6	16.3	2.9	0.0
A9	19.8	27.4	25.0	64.5
Aw23	4.3	17.7	0.0	3.3
Aw24	15.0	6.8	24.2	63.3
HLA-A10	15.7	13.9	8.8	16.1
Aw25	4.8	0.4	1.5	3.3
Aw26	9.4	7.8	6.1	13.3
A11	12.9	3.6	51.5	22.6
A28	9.8	16.7	4.4	0.0
A29	7.0	6.2	2.9	3.2
Aw30	6.5	21.8	7.7	3.2
Aw31	4.9	5.5	4.7	16.1
Aw32	8.3	6.6	0.0	0.0
Aw33	4.9	10.3	16.9	8.0
Aw36	1.8	7.4	6.7	0.0
Aw43	0.0	0.7	0.0	0.0
HLA-B5	11.5	10.3	5.9	45.2
B7	20.1	21.5	2.9	9.7
B8	19.0	7.1	1.5	0.0
B12	22.9	21.3	2.9	9.7
B13	5.9	1.1	25.0	3.2
B14	9.4	7.1	0.0	0.0
B18	9.7	7.1	4.4	0.0
B27	9.5	3.6	2.9	0.0
Bw15	11.5	6.6	26.5	22.6
Bw16	7.5	2.5	7.8	13.3
Bw38	4.0	0.9	3.6	0.0
Bw39	5.1	1.3	7.1	8.3
B17	8.9	18.8	22.1	3.2
Bw21	6.0	8.6	0.0	0.0
21.1	3.2	7.1	0.0	0.0
21.2	1.7	1.2	0.0	0.0
Bw22	6.4	8.4	7.4	22.6
Bw35	16.9	31.4	10.3	16.1
Bw37	3.9	2.3	0.0	0.0
Bw40	14.3	5.2	36.8	29.0
Bw41	1.2	1.1	0.0	0.0
Bw42	0.0	6.3	0.0	0.0
HLA-Cw1	5.5	1.9	19.3	28.0
Cw2	9.5	14.2	0.0	0.0
Cw3	24.6	17.2	69.5	40.7
Cw4	21.4	34.6	8.5	11.1
Cw5	4.9	1.4	2.9	0.0

4.3. NOMENCLATURA

Os métodos de identificação de antígenos leucocitários foram desenvolvidos independentemente, em diversos laboratórios, de tal sorte que cada grupo de trabalho adotou terminologia técnica própria para os antígenos que descobriam. A primeira simplificação ocorreu ao se concluir que alguns dos anti-soros preparados possuíam antígenos idênticos. Em 1968, a Organização Mundial da Saúde sugeriu nomenclatura padrão para os antígenos leucocitários que pudessem ser identificados com certeza (HLA-A1, 2, 3, 5, 7, 8, 9), o que se repetiu em 1970, 1972 e 1975. Desde a última revisão, em 1975, todo o complexo de histocompatibilidade é chamado "HLA".

Os loci genéticos pertencentes ao sistema são identificados por uma ou mais letras em seguida ao "HLA". Os alelos individuais de cada locus e as correspondentes especificidades foram designados por números em seguida ao símbolo do locus. Provisoriamente, as especificidades identificadas foram caracterizadas pela letra W. Este símbolo, que indica uma especificidade provisória, será suprimido ao ser a especificidade efetivamente caracterizada.

Atualmente, os antígenos que são controlados por gens do locus A, B e C podem ser determinados por métodos sorológicos comuns à classificação de tecidos, isto é, principalmente mediante testes de linfocitotoxicidade. Os determinantes do locus D podem ser reconhecidos através da cultura de leucócitos.

4.4. ANTI-SOROS

Para a identificação dos antígenos leucocitários são necessários anti-soros mono-específicos que podem ser obtidos pelos seguintes meios:

a) mulheres grávidas, tanto primíparas quanto multíparas. Nelas formam-se, normalmente, anticorpos contra antígenos estranhos provenientes de suas crianças (isto é, herdados do pai).

b) pessoas que sofreram transfusões de sangue, principalmente após vários episódios. Nesse caso, porém, como estão envolvidos diversos doadores de sangue, os anticorpos formados, por via de regra, não são mono-específicos.

c) voluntários imunizados mediante enxertos de pele ou injeções intracutâneas de leucócitos (imunização planejada). Dependendo do grau de incompatibilidade entre doador e receptor, os anticorpos serão mais ou menos específicos.

d) antropóides imunizados (chimpanzés).

Para a produção de anti-soros HLA em grande quantidade, usam-se, normalmente, soros de mulheres imunizadas por meio do processo gravídico. Durante o parto ou após as primeiras semanas, encontram-se anticorpos linfocitóticos de 15 a 20% de soro. Cerca de 10% desses soros, entretanto, são específicos contra antígenos HLA ou não se relacionam com especificidades do HLA.

Os anticorpos HLA não são geralmente monoespecíficos. Quando um anti-soro possui diversos anticorpos para diferentes antígenos, pode-se, então, sob certas condições, produzir um anti-soro monoespecífico através de condições especiais. Há também, entretanto, anticorpos que reagem, simultaneamente, com várias especificidades (anticorpos "cross-reacting"). Nesse caso, o anticorpo todo é removido por absorção mediante especificidade parcial.

A especificidade de um anticorpo é determinada por análise comparativa (reação do soro com um grande número de células já conhecidas do doador), por estudos de absorção (quando as reações cruzadas "cross-reactions" devem ser levadas em consideração) e por investigações genológicas.

A padronização dos anti-soros HLA é sempre um problema, pois diferentes métodos são usados pelos mais variados laboratórios, decorrendo, destarte, variação considerável quanto à sensibilidade.

4.5. MÉTODOS

Embora os antígenos HLA sejam encontrados em todas as células nucleadas do corpo, prefere-se utilizar células sangüíneas (granulócitos, linfócitos e trombócitos) por serem de mais fácil acesso. Outras células, como, por exemplo, de nódulos linfáticos e do baço, ou culturas de fibroblastos, medula óssea e outros órgãos, são cogitados somente em casos especiais.

Para a classificação de tecidos pode-se utilizar quatro métodos diferentes. Três deles são métodos sorológicos usados para demonstração de antígenos HLA bem definidos e pertencentes ao locus A, B e C (teste de toxicidade linfocitária, teste de fixação de complemento trombocitário CFT, teste de aglutinação leucocitária). O quarto método, o da cultura de leucócitos, é usado para reconhecer os determinantes do locus D.

Atualmente, o teste de toxicidade linfocitária é o mais difundido e usado devido à reprodutibilidade, sensibilidade e melhor eficácia dos anti-soros. O teste de aglutinação leucocitária tem a desvantagem de ser mais suscetível às perturbações externas e, por essa razão, possibilita menor reprodutibilidade. Apenas, recentemente, o método do CFT obteve uma aplicação regular. A dificuldade reside na disponibilidade de anti-soros adequados, apesar de haver, por outro lado, facilidade para isolar e conservar os trombócitos.

4.6. APLICAÇÃO MÉDICO-LEGAL: INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE

O extremo polimorfismo e a validade das leis de Mendel, fazem do sistema HLA meio extremamente adequado aos propósitos da investigação de paternidade e da genética populacional. Desde 1972, tem-se demonstrado que, para a exclusão de paternidade ou maternidade, o sistema HLA representa o melhor sistema disponível, considerando-se que o emprego dos antígenos HLA disponíveis confere a este sistema uma probabilidade de exclusão "a priori" da ordem de 76%. Usando-se todos os antígenos HLA descritos e em via de definição, o índice teórico de exclusão "a priori" para o sistema HLA é calculado em cerca de 90%.

Conseqüentemente, o emprego do sistema HLA aumenta a eficácia de toda a escala de investigação genética, tornando possível excluir-se a paternidade de forma mais decisiva e segura.

Em razão do grande número de possíveis alelos, o sistema HLA é ideal para ser usado em investigações de paternidade e maternidade. Alguns dos supostos pais podem ser excluídos com absoluta confiança e o verdadeiro pai poderá ser indicado com alto grau de confiabilidade, uma vez que sejam conhecidos a distribuição dos antígenos e a frequência dos haplótipos na população correspondente.

OCORRÊNCIA DE HAPLÓTIPOS HLA ENTRE OS BRANCOS AMERICANOS E/OU POPULAÇÃO AMERICANA NEGRA, SEGUNDO ALBERT E COLS

Haplótipos	Frequência de Haplótipos		Frequência de Haplótipos Esperada	
	branco	negro	branco	negro
A1/B8	6.7% *	1.6% *	1.4%	0.2%
A3/B7	4.3% *	2.1% *	1.5%	0.7%
A2/B12	6.1% *	2.5%	4.5%	1.8%
A2/B7	3.9%	2.0%	3.8%	1.6%
A2/B27	2.4% *	0.2%	1.6%	0.4%
A2/Bw40	2.6%	1.5% *	1.9%	0.7%
A2/Bw15	2.6% *	0.3%	1.6%	0.3%
A2/Bw35	1.4%	2.9% *	2.1%	3.2%
A9/B7	1.0%	2.1%	1.3%	1.3%
A9/Bw35	1.2%	1.8%	0.7%	2.5%
A28/Bw17	0.2%	2.7% *	0.2%	1.3%
A2/B8	1.9% **	0.8%	3.1%	0.7%

(*) Frequência de haplótipos maiores que o esperado — evidência de desequilíbrio genético.

(**) Exemplo de frequência de haplótipos menor que o esperado.

Os haplótipos dos pais podem ser identificados pela análise da segregação de antígenos nas respectivas crianças, segundo o que foi descrito anteriormente. Está claro, no exemplo seguinte, que o homem, não pode ser o pai da criança 3.

PAI	MÃE
HLA: A1,B8 / A3,B7	HLA: A2,B12 / A10,B7
CRIANÇAS	
1. HLA: A1,B8 / A2,B12	
2. HLA: A3,B7 / A2,B12	
3. HLA: A9,B5 / A10,B7	

Tivemos a oportunidade de proceder à perícia hematológica, para excluir, ou não, a paternidade de um indivíduo em relação a uma criança, possível fruto do congresso sexual daquele com a mãe do último.

Conquanto não se possa afirmar a paternidade (ou maternidade) na perícia hematológica de filiação, a ocorrência de fatores raros, no filho e no suposto pai, sugerindo indício de filiação, pode indicar à Justiça solução que se compadecesse com outros elementos comprobatórios do processo.

O resultado parcial da perícia foi o abaixo:

	Sistema MN	Sistema Rh	Sistema H.L.A.
Suposto pai	Mg M	Cc D E	A28/Bw17 / A2/B12
Mãe	M N	Cc D ee	A1/B8 / A2/B12
Filho	Mg M	Cc D E	A2/B12 / A28/Bw27

O encontro dos caracteres raros no filho, além de permitir a possibilidade de vínculo, traduz também um indício do mesmo. Em algumas legislações o encontro de fatores raros é considerado de elevada importância, como indicio de relação genética. No caso em apreço, no sistema MN detectou-se no suposto pai e no filho o antígeno Mg; no sistema HLA, suposto pai e filho apresentavam o haplótipo A28/Bw17. Antígeno Mg, fator E e haplótipo A28/Bw17 ocorrem todos com baixíssima frequência nas populações, em geral, vale dizer, constituindo indícios de paternidade quando detectadas no suposto pai e filho.

A classificação dos antígenos HLA não substitui outros estudos de investigação de vínculo genético. Qual complemento, entretanto, das provas hemáticas e séricas, a pesquisa dos antígenos do sistema HLA é aceita nos tribunais, justificando, de forma ampla, sua requisição ao lado dos sistemas tradicionais.