

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDRÉA SILVEIRA BORTOLOTTO

**FREQÜÊNCIAS DE ALELOS E HAPLÓTIPOS *HLA -A, -B e -DRB1*  
EM UMA AMOSTRA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA  
ÓSSEA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Porto Alegre  
Maio, 2011

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Freqüências de alelos e haplótipos *HLA –A, -B e –DRB1* em uma amostra de doadores voluntários de medula óssea do estado do Rio Grande do Sul**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular  
como requisito para obtenção  
do grau de Mestre.

Autora  
Andréa Silveira Bortolotto

Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Beatriz C Bonorino

Porto Alegre, RS  
Maio, 2011

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e minha irmã pelo amor e incentivo.

Ao Dr<sup>o</sup> Jorge Neumann, pelas correções e sugestões e principalmente por todo incentivo, apoio e compreensão.

À Professora Cristina Bonorino, minha orientadora, por quem tenho grande admiração. Agradeço pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por confiar na minha capacidade.

À Professora Clarice Sampaio Alho, pelas idéias e sugestões no projeto de pesquisa e na dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia de Transplantes, em especial à Heloísa e à Sandra, pelo carinho, amizade e companheirismo.

À Márcia Petry, Ana Rosa Raya e Janaína Gomes pela contribuição com a realização e análise das tipagens.

Ao Léo, meu amor, por ser meu maior incentivador. Obrigada pelas críticas e principalmente pelo apoio e paciência.

A todos os doadores voluntários de medula óssea por oferecerem esperança a quem precisa de um transplante.

À CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

As moléculas HLA (*Human Leucocyte Antigens*) são proteínas codificadas por genes altamente polimórficos localizados na região do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) no braço curto do cromossomo 6 humano. Elas estão envolvidas em processos de resposta imunológica, sendo responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T. O sistema HLA é altamente informativo em estudos de genética de populações, devido ao seu elevado polimorfismo e ao forte desequilíbrio de ligação entre *loci* próximos. Entre diferentes populações podemos observar variação tanto na frequência, como na presença de alelos e haplótipos em determinados grupos. Portanto, o conhecimento de alelos HLA é uma ferramenta importante para os estudos da origem das populações. Além disso, sua determinação contribui para a compreensão de mecanismos associados à suscetibilidade ou resistência a determinadas doenças e em processos de alocação de órgãos para transplante. A investigação da compatibilidade HLA entre doador e receptor é determinante no sucesso do transplante. No Brasil a elevada taxa de miscigenação dificulta a busca por um doador compatível. Informações sobre a diversidade desses alelos na nossa população nos permitem estimar a chance de um paciente em lista encontrar um doador com uma melhor compatibilidade imunológica. No Brasil, existem estudos prévios de frequência HLA, porém, no Rio Grande do Sul, essa informação é muito escassa. Nesse trabalho a distribuição das frequências alélicas, fenotípicas e haplotípicas de *HLA A, B e DRB1* foi determinada utilizando uma amostra de 5000 doadores voluntários de medula óssea cadastrados no REDOME (*Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea*). Os indivíduos estudados residem no estado do Rio Grande do Sul e foram classificados com base no grupo étnico (4428 caucasianos, 324 *mestiços* e 248 negros). A tipagem HLA foi realizada pelo método de PCR-SSO aliado à tecnologia Luminex. Na amostra total foram identificados 21 grupos alélicos *HLA-A*, 33 *HLA-B* and 13 *HLA-DRB1*. Os grupos alélicos mais frequentes para cada *locus* foram: A\*02, B\*35 e DRB1\*13. Os haplótipos mais frequentes foram: A\*01 B\*08 DRB1\*03 nos caucasianos e *mestiços*, e A\*02 B\*15 DRB1\*04 nos negros. As frequências alélicas foram comparadas com amostras de diferentes regiões brasileiras. Na maioria das comparações não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Foram observadas maiores diferenças na comparação entre os grupos da nossa amostra, mostrando a contribuição HLA dos diferentes grupos étnicos. Esses dados oferecem informações para o conhecimento da diversidade *HLA* na população do Rio Grande do Sul e na busca por um doador mais compatível para transplante.

Palavras-chave: alelos HLA; população brasileira; PCR-SSO

## ABSTRACT

The HLA (*Human Leukocyte Antigen*) molecules are proteins encoded by genes highly polymorphic located in the MHC (*Major Histocompatibility Complex*) region on the short arm of Human chromosome 6. They are involved in immune response processes, being responsible for presenting antigens to T lymphocytes. The HLA system is highly informative in studies of population genetics because of its high polymorphism and strong linkage disequilibrium between *loci*. Among different populations we can observe differences in both frequency and in the presence of alleles and haplotypes in certain groups. Therefore, knowledge of *HLA* is an important tool for studies of the origin of populations. Moreover, its determination is important for understanding mechanisms associated with susceptibility or resistance to certain diseases and in processes of allocation of organs for transplantation. The investigation of the HLA compatibility between donor and recipient is crucial for the success of transplantation. In Brazil, the high rate of miscegenation of the population complicates the search for a compatible donor. Information about the diversity of these alleles in our population offer us the ability to estimate the chance of a patient in list to find a donor with a better immunological compatibility. In Brazil, there are previous studies of HLA frequency, however, in Rio Grande do Sul, this information is very scarce. In this study the HLA A, B and DRB1 allelic, phenotypic and haplotypic distribution was determined using a sample of 5000 volunteer bone marrow donors registered in REDOME (*Brazilian Registry of Bone Marrow Donors Volunteers*). The study subjects reside in the state of Rio Grande do Sul and were classified according to ethnic group (4428 caucasians, 324 *mestizos* and 248 blacks). The *HLA* typing was performed by PCR-SSO and Luminex technology. In the total sample, we identified 21 allelic groups HLA-A, 33 HLA-B and 13 HLA-DRB1. The most frequent allelic groups for each locus were A\*02, B\*35 and DRB1\*13. The most frequent haplotypes were A\*01 B\*08 DRB1\*03 in caucasians and mestizos, and A\*02 B\*15 DRB1\*04 in blacks. Allele frequencies were compared with samples from different regions. Most of the comparisons were not statistically different. The most significant differences were observed in the comparison of the groups of our sample, showing the HLA contribution from different ethnic groups. These data provide information on the knowledge of HLA diversity in the population of Rio Grande do Sul and in the search for a better match for transplantation.

**Key words:** HLA alleles; brazilian population; PCR-SSO

## SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1 .....	7
1.1	INTRODUÇÃO .....	8
1.1.1.	O Complexo Principal de Histocompatibilidade .....	8
1.1.2.	Relevância do <i>HLA</i> na rejeição de transplantes .....	15
1.1.3.	Associação entre <i>HLA</i> e doenças .....	19
1.1.4.	Distribuição de <i>HLA</i> na população brasileira .....	20
1.2.	OBJETIVOS.....	25
2.	CAPÍTULO 2 .....	26
2.1.	ARTIGO .....	27
3.	CAPÍTULO 3.....	46
3.1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
	ANEXO A - Comprovante de submissão do artigo.....	54

## 1. CAPÍTULO 1

## 1.1. INTRODUÇÃO

### 1.1.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade

O MHC (*Major Histocompatibility Complex*) é uma região formada por genes altamente polimórficos que codificam proteínas envolvidas na apresentação de antígenos e no reconhecimento por receptores de linfócitos T em processos de resposta imunológica. Ele foi descoberto como um *locus* genético cujos produtos eram responsáveis pela rejeição de tecidos enxertados entre diferentes linhagens de camundongos. Nos anos 40, George Snell e Peter Gorer caracterizaram antígenos determinados geneticamente que foram responsáveis por rejeição de tumores e tecidos normais alogênicos em camundongos. O *locus* particular responsável pela rejeição foi relacionado a um gene do cromossomo 17 que codifica um antígeno de grupo sanguíneo polimórfico, que foi chamado de histocompatibilidade-2 (H-2), o qual se tornou conhecido como MHC (Rodey, 2000). Com o desenvolvimento de técnicas de transfusão sanguínea, foi possível a descoberta do MHC em humanos. Em 1958, Jean Dausset descreveu o primeiro antígeno HLA (MAC) que ele identificou através da técnica de leucoaglutinação no soro de pacientes politransfundidos (Dausset, 1958).

A partir da década de 60, vários grupos de pesquisa se interessaram pela investigação do MHC. A relação entre os diferentes antígenos de leucócitos e o seu polimorfismo e genética ainda eram difíceis de entender. Para que fossem discutidos os resultados obtidos nos ensaios e para padronizar os testes e a nomenclatura do sistema *HLA*, foi idealizado o *Workshop Internacional de Histocompatibilidade* (IWHS). A partir de 1964 foi possível a contínua atualização de descobertas nas



áreas de imunogenética e histocompatibilidade através desses encontros. Nesses debates a nomenclatura para esses antígenos passou a ser *HLA* (*Human Leucocyte Antigens*) e a primeira especificidade identificada, então descrita por Dausset e também mais tarde por outros pesquisadores, foi definida como *HL-A2*. Em 1968, foi estabelecido o Comitê de Nomenclatura para os fatores do sistema *HLA* da WHO (*World Health Organization*), responsável pela definição dos nomes oficiais das especificidades e *loci HLA*. Esses esforços levaram à identificação de vários *loci* gênicos localizados muito próximos uns dos outros, numa única região do braço curto do cromossomo 6 humano.

Com o passar dos anos, o avanço nas técnicas de detecção de antígenos *HLA* permitiu a identificação de inúmeras moléculas. Na década de 70, quando a técnica de microlinfocitotoxicidade ainda era padrão na identificação de alelos *HLA*, o Comitê da WHO estabeleceu que os *loci HLA* seriam designados por uma letra, precedida pela sigla *HLA* (por exemplo *HLA-A*) e as especificidades antigênicas determinadas por sorologia seriam indicadas por números (por exemplo: *HLA-A1*) (Nomenclature, 1978). Com o advento das técnicas moleculares, tornou-se possível identificar os alelos do sistema *HLA*, e a nomenclatura foi restabelecida. Quando a seqüência é conhecida, deve-se assinalar a letra correspondente ao *locus HLA* com um asterisco (por exemplo *HLA-A\**). No *Workshop* de 1987 foi determinado que os alelos *HLA* receberiam quatro dígitos para diferenciar as proteínas que eles codificavam. Os primeiros dois números descrevem o correspondente sorológico para um grupo alélico específico (por exemplo: *HLA-A\*02*). O terceiro e quarto dígitos se referem a substituições de um ou mais nucleotídeos que mudam a seqüência de aminoácidos da proteína codificada, ou seja, a variante alélica (por exemplo: *HLA-A\*0201*) (Albert, 1988). Desde então, esta nomenclatura tem sido

aperfeiçoada e um alelo pode possuir até 8 dígitos. Para facilitar a identificação dos alelos, foi estabelecida a introdução de dois pontos (:) na nomenclatura (por exemplo: A\*02:01) (Marsh *et al.*, 2010).

O MHC humano está localizado no braço curto do cromossomo 6 (a localização específica é no segmento 6p21.3). As primeiras proteínas identificadas por testes sorológicos foram denominadas *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*. Através da utilização de MLR (*Mixed Lymphocyte Reaction*) para identificar a resposta de células do receptor a antígenos presentes nas células do doador, foram mapeados genes de uma região adjacente ao *locus HLA* definido sorologicamente. Essa região foi denominada de gene HLA-D, e seus produtos de HLA-D relacionado (HLA-DR). Outros *loci* identificados próximos ao HLA-DR e que codificavam proteínas estruturalmente similares foram denominados HLA-DQ e HLA-DP (Abbas; Lichtmann, 2003).

Em 1999, foi publicada a seqüência completa e o mapa genético deste complexo, compreendendo uma região de 3,6 Mb. O produto gênico de 40% dos genes identificados parece estar envolvido em funções diretamente relacionadas com o sistema imunológico (THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999).

Os dois tipos de genes polimórficos do MHC foram definidos como MHC de classe I (*HLA A, B e C*) e classe II (*HLA DR, DQ e DP*). Entre os grupos de genes de classe I e II situa-se um terceiro grupo denominados de classe III, que codificam proteínas do sistema complemento, entre outras. Do centrômero para o telômero as regiões se distribuem da seguinte forma no cromossomo: classe II, III e I (Figura 1). A região do MHC de classe I possui genes que codificam para proteínas das cadeias

pesadas das moléculas clássicas de histocompatibilidade (*HLA-A, B e C*) e para as não clássicas (*HLA-E, F, G, MICA e MICB*).

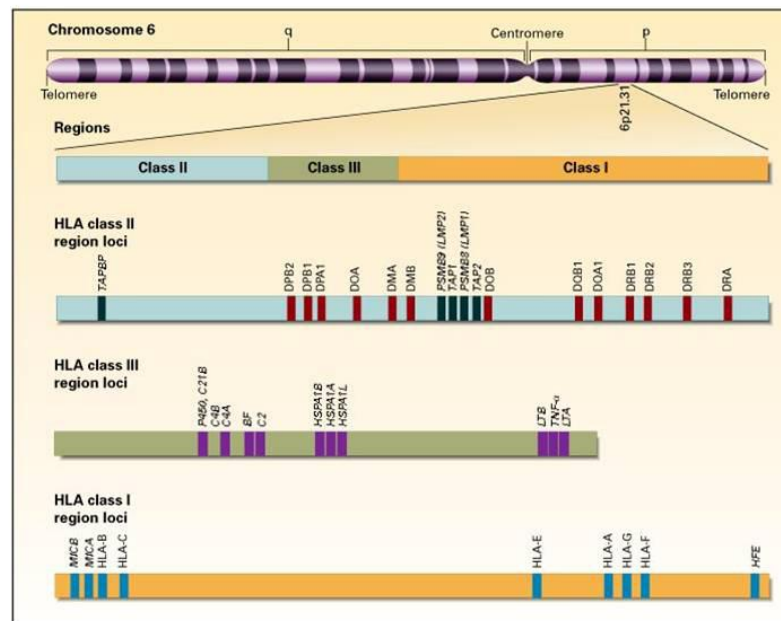


Figura 1 – Estrutura gênica do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (Klein; Sato, 2000)

As moléculas não clássicas possuem polimorfismo limitado e expressão restrita em determinados tipos celulares. A região de classe I também é formada por pseudogenes e genes com funções ainda não conhecidas. A molécula expressa é composta por uma cadeia  $\alpha$  pesada, associada não covalentemente a uma cadeia leve ( $\beta$ 2-microglobulina de 12kD), sendo a última codificada por um gene localizado no cromossomo 15. A cadeia  $\alpha$  possui de 44 a 47 kD e é formada por 3 domínios ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3). A região N-terminal formada por  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2, compõe a fenda de ligação de peptídeos de 8 a 10 aminoácidos. Nessa porção também está localizada a maioria dos resíduos polimórficos da molécula. As moléculas de classe I clássicas são expressas em quase todas as células nucleadas. Essa expressão se refere ao fato dessas moléculas se ligarem ao receptor de células TCD8+. Como os vírus podem infectar qualquer célula nucleada, a presença dessa molécula permite que a

proteína viral seja processada e apresentada, desencadeando a resposta imunológica por ativação de linfócitos T citotóxicos.

Os genes de classe II codificam proteínas das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de cinco tipos de moléculas expressas: HLA-DR, -DQ, -DP, -DM e -DO. Dessa maneira, uma molécula DR, por exemplo, é formada por proteínas codificadas pelo gene de cadeia  $\alpha$  (DRA) e por proteínas codificadas pelo gene de cadeia  $\beta$  (DRB). O DRB pode usar alelos codificados por DRB1 (especificidades DR clássicas), DRB3 (DR52), DRB4 (DR53) ou DRB5 (DR51). A Figura 2 demonstra a estrutura de cada grupo de genes DRB. Os genes DRB1 que codificam as especificidades DRB1\*15 ou DRB1\*16, por exemplo, também irão expressar a especificidades DRB5 (DR51).

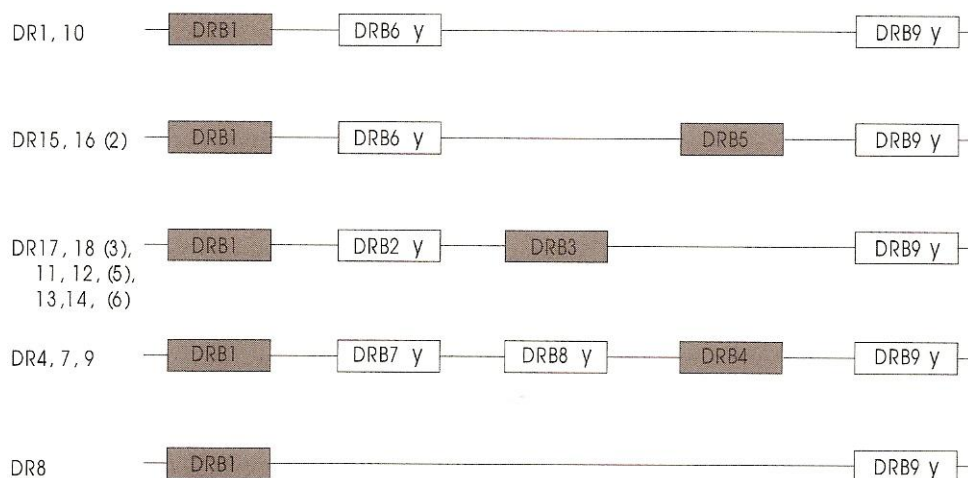


Figura 2 – Estrutura dos diferentes grupos de genes HLA-DR. Fonte: Rodey, 2000.

Essa região de classe II também possui genes que codificam para proteínas responsáveis pelo processamento e transporte de peptídeos (Rodey, 2000). Elas são compostas por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia  $\alpha$  de 32 a 34 kD e uma

cadeia  $\beta$  de 29 a 32kD. A fenda de ligação do peptídeo é formada em  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  e acomoda peptídeos de até 30 aminoácidos. A maioria dos resíduos polimórficos se encontra na cadeia  $\beta$ . As moléculas MHC de classe II são expressas em linfócitos B, linfócitos T ativados, macrófagos e células dendríticas. Elas se ligam aos receptores de células TCD4+ e, permitem assim, a ativação dessas células por apresentarem peptídeos derivados de organismos e proteínas extracelulares. Portanto, as moléculas do MHC desempenham um papel crucial no reconhecimento de antígenos (Abbas; Lichtmann, 2003). A estrutura das moléculas HLA de classe I e II estão representadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

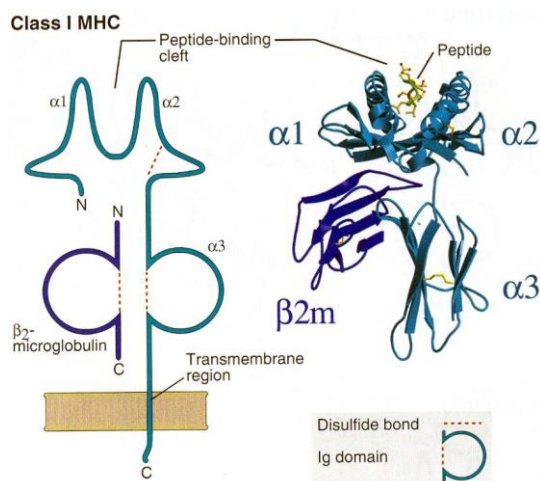


Figura 3 – Estrutura da molécula HLA de Classe I

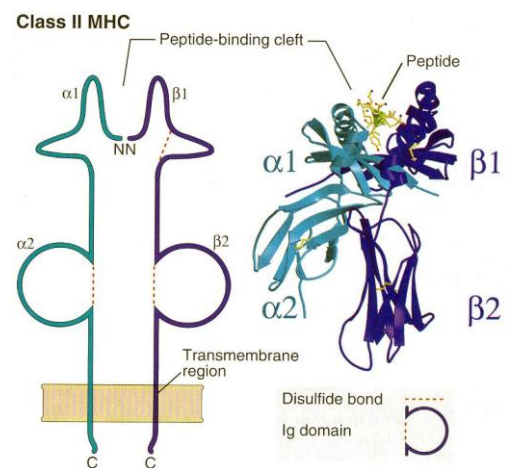


Figura 4 – Estrutura da molécula HLA de Classe II

Fonte: (Abbas; Lichtmann, 2003)

Os alelos da região do MHC são expressos codominantemente. Assim, cada indivíduo apresenta dois antígenos HLA para cada *locus*, um de origem materna e outro de origem paterna. A combinação desses genes derivados do cromossomo da

mãe ou do pai é denominada haplótipo. Isso quer dizer que, entre pais e filhos, geralmente existe 50% de compatibilidade de alelos HLA, e entre irmãos, há 25% de probabilidade de serem idênticos. Os *loci* HLA estão tão ligados que raramente ocorre *crossing over*.

A recombinação ocorre normalmente entre *loci* mais distantes dentro do complexo HLA. O sistema HLA também apresenta a ocorrência de desequilíbrio de ligação. Nesse fenômeno certas combinações de alelos ocorrem em haplótipos em frequência maior do que o esperado, obtida de cálculos com ocorrência de genes numa determinada população. Um exemplo é o haplótipo A1 B8 em populações caucasianas. Na região de classe II, o desequilíbrio de ligação é bem caracterizado pela ocorrência de DRB3, DRB4, DRB5 com determinados alelos DRB1. Essas combinações de alelos HLA podem caracterizar vantagens seletivas. Elas variam, assim como os alelos, entre as diferentes populações, de acordo com o grupo étnico. O desequilíbrio de ligação tem uma importante aplicação clínica, especialmente na seleção de doador para transplante. Pacientes com haplótipos em desequilíbrio de ligação têm maiores chances de encontrar um doador, pois a frequência desse genótipo é mais comum em certas populações (Rodey, 2000).

A determinação da distribuição dos alelos HLA contribui nos estudos de genética de populações. Além disso, as implicações dessa diversidade na aceitação/rejeição de órgãos enxertados, na defesa do organismo contra patógenos e na associação com diversas doenças autoimunes torna esse tipo de estudo extremamente importante e necessário.

### 1.1.2. Relevância do *HLA* na rejeição de transplantes

O transplante é uma alternativa terapêutica para determinadas doenças que causam falência em órgãos. Quando um órgão alogênico é transplantado num receptor, ele é reconhecido como estranho pelo sistema imune. Em transplante de órgãos sólidos, como rim, coração, pulmão e fígado ocorre troca de células e moléculas solúveis entre enxerto e receptor.

O reconhecimento dessas células transplantadas como próprias ou estranhas, é determinado principalmente pelas moléculas *HLA*. Esse processo pode ocorrer por apresentação direta ou indireta das moléculas *HLA* alogênicas. A apresentação direta envolve o reconhecimento do *HLA* presente na membrana de APCs (células apresentadoras de antígenos) do enxerto por células T do receptor. Por outro lado, a apresentação indireta envolve o processamento das moléculas *HLA* do doador por APCs do receptor. Os peptídeos derivados são apresentados pelo *HLA* do receptor desencadeando a ativação de linfócitos T e a rejeição do enxerto. A caracterização de rejeição de órgãos em hiperaguda, aguda e crônica, é baseada nos padrões histopatológicos do transplante renal. A rejeição hiperaguda é caracterizada por oclusão trombótica dos vasos do enxerto e começa dentro de minutos ou horas depois que os vasos do receptor são anastomosados com os do enxerto. É normalmente causada por anticorpos pré-existentes na circulação do receptor que se ligam ao endotélio do órgão transplantado. A rejeição aguda é um processo de dano parenquimal e vascular mediado por células T e anticorpos, normalmente depois da primeira semana de transplante. O processo de rejeição crônica é caracterizado por fibrose e anormalidades vasculares com perda da função do enxerto que ocorre durante um período prolongado (Abbas; Lichtmann, 2003).

O papel dos anticorpos na rejeição hiperaguda do enxerto já é conhecido desde a década de 60 (Kissmeyer-Nielsen *et al.*; 1966). Sabe-se que pacientes com episódios de sensibilização, como gestação, transfusão e transplante prévios têm maiores chances de desenvolver anticorpos contra antígenos HLA. Portanto, a detecção desses anticorpos no pré-transplante é uma ferramenta extremamente necessária para evitar um episódio de rejeição hiperaguda. A sorologia formou a base dos testes clínicos de HLA quando foi descrita em 1954 por Dausset. Alguns anos mais tarde, a relevância desses anticorpos no transplante foi descoberta, e os testes de histocompatibilidade melhoraram significativamente quando o ensaio de aglutinação foi substituído pelo teste de CDC (microlinfocitotoxicidade dependente de complemento) (Terasaki; McClelland, 1964). O CDC é o método de prova cruzada (*crossmatch*) utilizado até hoje na investigação pré-transplante. Através desse teste é possível detectar se um paciente possui anticorpos anti-HLA contra um potencial doador. Para isso, realiza-se a incubação do soro do receptor com células mononucleares do doador. Se houver anticorpos presentes, eles se ligarão na proteína HLA alvo e, através da adição de complemento (soro de coelho), ocorrerá o rompimento da membrana da célula. Com a utilização de um corante é possível a visualização em microscópio das células lisadas. Portanto, uma prova cruzada positiva (ou seja, com presença de células lisadas) geralmente impede o transplante entre receptor e doador testados. Hoje é possível realizar prova cruzada com sensibilidade muito maior à observada no teste padrão CDC, utilizando a citometria de fluxo.

Os testes de tipagem HLA do doador e receptor também são importantes nessa investigação, pois o número de *mismatches* (ou seja, número de antígenos no doador diferentes do receptor) está fortemente associado à menor sobrevida do



enxerto. Além disso, a detecção de anticorpos pré-formados pelo teste de reatividade contra painel e a informação do HLA do doador permitem prever o resultado da prova cruzada. O teste de reatividade contra painel define o padrão de reação contra antígenos HLA. Realiza-se o mesmo teste de CDC do crossmatch, porém utilizam-se várias células (e não somente do doador) que são representativas da distribuição de antígenos HLA na população. Um número percentual define a reatividade existente a esse painel de células. Esses testes evoluíram e passou-se a utilizar ensaios de fase sólida. Atualmente os testes que utilizam citometria de fluxo para a detecção desses anticorpos são mais sensíveis. Porém ainda existem discussões sobre a padronização dos resultados e a relevância desses anticorpos na sobrevida do enxerto (Gupta; Sinnott, 2009). Nesse contexto, o conhecimento das freqüências fenotípicas dos alelos HLA na nossa população é fundamental. Essa informação permite que a reatividade seja de fato verdadeira. A cada anticorpo detectado por esse teste atribui-se um valor percentual que correspondente à freqüência do antígeno correspondente na população. O valor percentual final define o painel virtual.

O transplante de medula óssea é uma alternativa de terapia para algumas doenças e desordens hematológicas e apresenta características que o distinguem do transplante de órgãos sólidos. Nesse tipo de transplante, tanto as células imunocompetentes do receptor como do sangue/medula óssea recebidos tem o potencial de rejeitar um ao outro, resultando em rejeição do enxerto por um lado e DECH (*Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro*) por outro (Buckley, 2003). Quando não há um doador aparentado, a solução é procurar doadores compatíveis num banco de registros de doadores voluntários de medula. No Brasil, esse registro é feito pelo REDOME (*Registro Brasileiro de Doadores de Medula Óssea*) que reúne e

monitora as informações de pessoas que se dispõem a doar medula para transplante. Esse cadastro consta de informações de dados gerais, grupo étnico e tipagem genética *HLA -A, -B e -DRB1* do doador. Pacientes com indicação de transplante de medula cadastrados no REREME (Registro Brasileiro de Receptores de Medula Óssea) têm a possibilidade de transplante assim que um doador compatível for localizado no REDOME. A estimativa de chance de encontrar um doador compatível varia de acordo com o HLA do receptor. Pacientes com alelos HLA mais comuns na população têm mais chances de encontrar um doador compatível. Dados da ABTO (*Associação Brasileira de Transplante de Órgãos*) indicam que no ano de 2009 foram realizados 590 transplantes alogênicos de medula óssea e 5998 transplantes de órgãos sólidos no Brasil (ABTO, 2009). Até o final de novembro de 2010, o REDOME contava com um cadastro de mais de um milhão e meio de doadores (INCA, 2010).

Por essas razões, se faz necessário o conhecimento da diversidade desses alelos na população brasileira. Dessa maneira, podemos apontar alternativas de busca de doadores de medula em regiões brasileiras ainda escassas dessa informação. O conhecimento das frequências fenotípicas desses alelos também permite estimar as chances de um paciente hipersensibilizado em lista de espera para transplante renal encontrar um doador com uma melhor compatibilidade imunológica.

### **1.1.3. Associação entre *HLA* e doenças**

O sistema HLA é fortemente associado a diversas doenças, incluindo na maioria, as autoimunes. Nos estudos existentes na área, um ou mais antígenos HLA

são associados a uma determinada patologia se as suas freqüências estiverem aumentadas ou reduzidas significativamente nos doentes quando comparadas com um grupo controle adequado. Dessa maneira, é possível calcular o risco relativo de um paciente desenvolver a doença.

A associação mais conhecida é a existente entre o HLA-B\*27 e a espondilite anquilosante (EA). Nessa associação, 90-95% dos pacientes com EA são positivos para HLA-B\*27 (mais especificamente HLA-B\*27:02, B\*27:04 e B\*27:05) comparados com menos de 10% de indivíduos saudáveis, e o risco absoluto de desenvolver a doença é de cerca 5% em indivíduos que possuem o antígeno (Caillat-Zucman, 2008).

Um estudo recente sobre a associação de doença celíaca com antígenos HLA demonstrou uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de intolerância ao glúten em pacientes com presença de HLA-DQ\*02 numa amostra de indivíduos da população italiana (Megiorni *et al.*, 2009). A suscetibilidade imunogenética para o diabetes melito tipo 1 em brasileiros está associada com os grupos alélicos *HLA-DRB1\*03*, *-DRB1\*04*, e o alelos *HLA-DQB1\*02:01*, *-DQB1\*03:02* e a proteção com os alelos *-DQB1\*06:02* e *-DQB1\*03:01* e os antígenos *-DR2* e *-DR7* (Alves *et al.*, 2006). Pênfigo e lúpus são outras doenças autoimunes associadas ao HLA (Cortes *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007).

Além das doenças autoimunes, alguns estudos apontam a associação do HLA com doenças infecciosas. Um trabalho realizado em uma amostra de indivíduos de Campinas com infecção crônica por HCV sugere a associação de *DRB1\*07* com a doença (Corghi *et al.*, 2008). Estudos com pacientes HIV positivos caracterizados como LTNPS (*Long Term Non Progressors*), que passam em média 17 anos sem

desenvolver os sintomas, demonstram que a presença do alelo HLA B\*57:01 pode ser um fator de proteção para o desenvolvimento de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Migueles *et al.*, 2000).

#### **1.1.4. Distribuição de *HLA* na população brasileira**

A população brasileira é muito diversa geneticamente. Essa diversidade é resultado da contribuição de três grandes grupos: europeus, africanos e nativos americanos. O início da colonização do Brasil foi marcado principalmente por misturas entre homens portugueses e mulheres ameríndias e africanas (Bortolini *et al.*, 1999; Carvalho-Silva *et al.*, 2001). No final do século 19 e início do século 20 ocorreu uma grande migração caracterizada principalmente por europeus de Portugal, Espanha, Itália e Alemanha. A distribuição desses imigrantes foi diferente de acordo com as regiões brasileiras. Os alemães migraram principalmente para o estado do Paraná e Rio Grande do Sul, enquanto a maioria dos italianos povoou São Paulo e Rio Grande do Sul (Marrero *et al.*, 2005)

A população brasileira é, portanto, formada pela mistura dessas etnias, gerando uma população “mestiça”, onde a mistura de caucasianos com índios gera um subtipo denominado caboclo, a de caucasianos com africanos forma o subtipo dos mulatos e a mistura de africanos com índios forma o subtipo dos cafuzos. Devido ao grande tamanho territorial do Brasil e as diversidades da sua colonização, diferentes regiões do país apresentam predominância maior ou menor de cada um dos subtipos populacionais descritos.

O estado do Rio Grande do Sul é o mais meridional do Brasil, formado por uma área de aproximadamente 282.000 Km<sup>2</sup> com uma população estimada em mais de 10 milhões e 600 mil habitantes e Porto Alegre, sua capital, possui 1.409.939

habitantes. Essa região brasileira é caracterizada pela forte influência da colonização européia. O último censo demográfico demonstra que a distribuição racial no Rio Grande do Sul é caracterizada por 81,4% de brancos, 5,0% de negros, 13,3% de pardos e 0,3% de amarelos ou indígenas (IBGE, 2010).

Algumas pesquisas realizadas na população brasileira revelam informações de populações nativas de índios americanos (Erlich *et al.*, 1997; Lázaro *et al.*, 1999; Tsuneto *et al.*, 2003). Esses estudos demonstram uma menor diversidade alélica quando comparados com populações com maior taxa de miscigenação.

Outros estudos oferecem informações sobre a diversidade HLA na população geral brasileira. Um estudo publicado em 2004 demonstra a contribuição da informação da diversidade HLA numa população de Teresina/Piauí. A frequência das especificidades observadas na amostra foi intermediária entre os caucasianos e negros com pouca participação de genes indígenas (Monte *et al.*, 2004). No mesmo ano, uma publicação com dados de uma amostra de doadores voluntários de medula óssea do estado de Pernambuco também apontou os mesmos resultados, demonstrando que a contribuição dos genes europeus na formação da população do nordeste brasileiro é muito mais relevante que a do ameríndio (Nigam *et al.*, 2004). Esses dados indicam que a população do nordeste brasileiro, apesar de variar entre os estados, é na maioria formada por mestiços originados da mistura de caucasianos e negros. Alguns trabalhos também informam a distribuição de HLA na população dos estados de São Paulo (Donadi *et al.*, 2000; Louzada-Junior *et al.*, 2001; Morgun *et al.*, 2004; Temin *et al.*, 2004), Rio de Janeiro (Moraes *et al.*, 1993), Minas Gerais (Williams *et al.*, 2004) e Paraná (Braun-Prado *et al.*, 2000; Probst *et al.*, 2000; Bicalho *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2005). A tabela 1 apresenta os dados das publicações mais recentes de distribuição HLA em diferentes regiões brasileiras.

Estudos realizados com amostras de indivíduos dos cinco continentes revelam as diferenças existentes de acordo com a distribuição e frequência de alelos HLA e seu conseqüente aumento em populações com alta miscigenação (Middleton *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001). No Rio Grande do Sul, os trabalhos publicados sobre essa determinação são extremamente escassos. Em 1988, Trachtenberg descreveu a distribuição dos antígenos HLA A e B detectados por métodos sorológicos numa amostra de indivíduos gaúchos. O alelo mais freqüente encontrado foi o A2 (33%). Para o *locus* B as maiores freqüências foram B12 (13.2%), seguido de B5 (12.9%) (Trachtenberg *et al.*, 1988). O antígeno A2 definido sorologicamente corresponde à especificidade A\*02 definida por biologia molecular. Enquanto B12 corresponde ao B\*44 e B\*45 e B5 ao B\*51 e B\*52. Na época, o Comitê de Nomenclatura HLA da WHO (*World Healthy Organization*) apresentava 97 especificidades sorologicamente definidas (23 do *locus* A, 47 do *locus* B, 8 do C, 16 do DR e 3 do DQ). Até dezembro de 2010, já foram identificados mais de 4000 alelos *HLA-A*, *HLA-B* e *DRB1* na população mundial (EBI, 2010). O gráfico 1 demonstra a progressão do número de alelos identificados até o momento.

A informação dessa distribuição de alelos HLA permite a comparação com dados existentes em outras regiões brasileiras e a atualização da composição genética da população do Rio Grande do Sul.

Região brasileira	<i>n</i>	Alelos mais freqüentes	(%)	Haplótipos mais freqüentes	(%)	Referência
<b>Paraná</b>	3500	<i>A*02</i>	22,8	<i>A*01 B*08 DRB1*03</i>	2,4	<i>Ruiz et al., 2005</i>
		<i>B*35</i>	11,2			
		<i>DRB1*11</i>	12,5			
<b>São Paulo</b>	103	<i>DRB1*07:01</i>	13,1	Não informado	-	<i>Morgun et al., 2004</i>
		<i>DQB1*02:02</i>	12,6			
<b>Minas Gerais</b>	95	<i>A*02:01</i>	23,7	<i>A*01:01 B*08:01</i>	3,2	<i>Willians et al., 2004</i>
		<i>B*35</i>	11,0			
<b>Piauí</b>	97	<i>A*02</i>	22,7	Não informado	-	<i>Monte et al., 2004</i>
		<i>B*07</i>	10,9			
		<i>DRB1*11</i>	16,0			
		<i>DQB1*03:01</i>	20,7			
<b>Pernambuco</b>	101	<i>A*02</i>	28,7	<i>A*02 Cw*04 B*35</i>	4,8	<i>Nigam et al, 2004</i>
		<i>B*15</i>	12,3			
		<i>Cw*04</i>	22,7			

Tabela 1 – Alelos e haplótipos HLA mais freqüentes (%) em diferentes populações brasileiras.

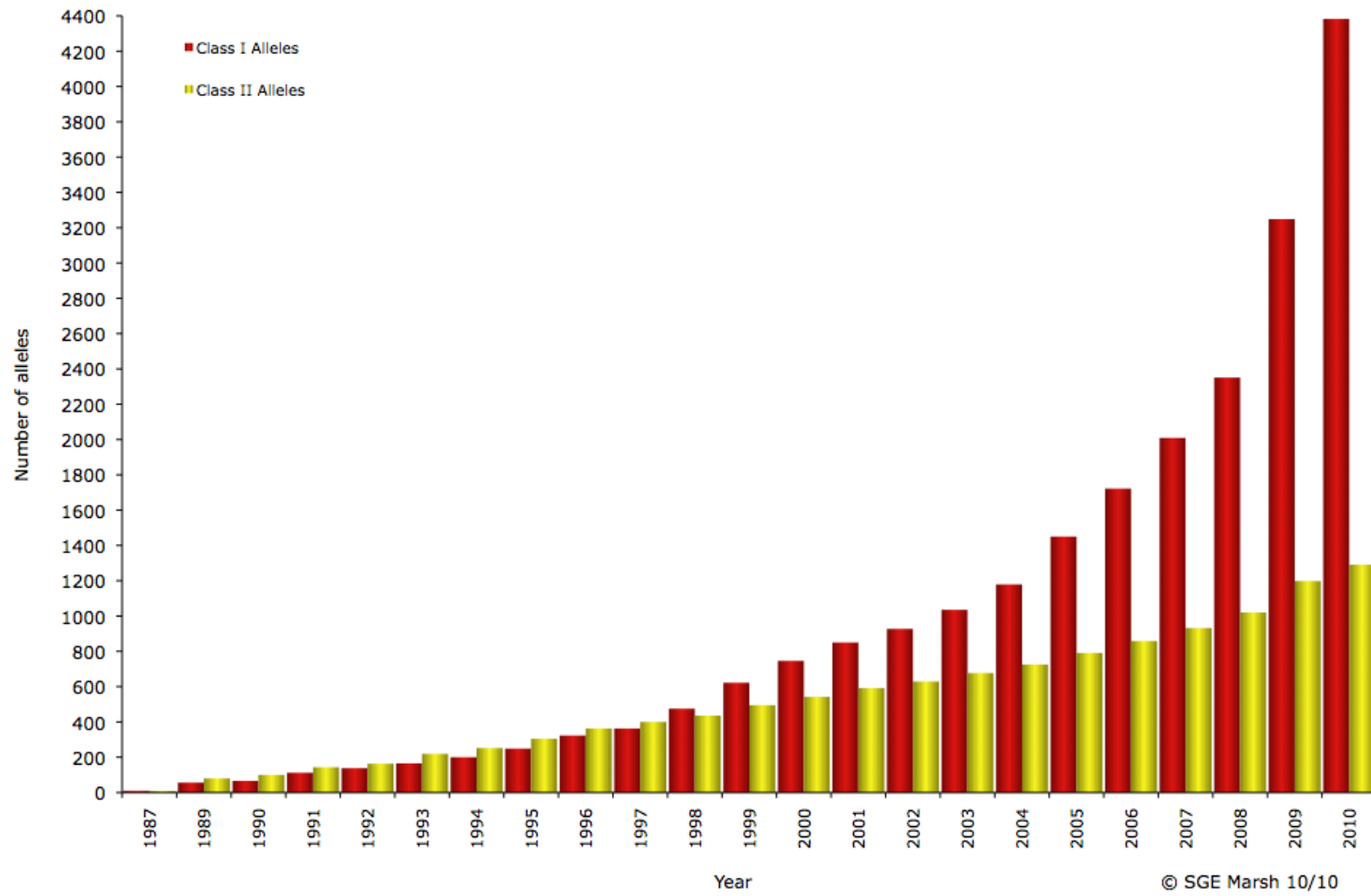


Gráfico 1 - Número de alelos HLA identificados no período de 1987 a 2010.



## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo Geral

- Determinar as freqüências de grupos alélicos *HLA -A*, *-B* e *-DRB1* em uma amostra de doadores voluntários de medula óssea do Estado do Rio Grande do Sul.

### 1.2.2. Objetivos Especificos

- Determinar as freqüências fenotípicas de HLA A, B e DRB1 na amostra para a padronização de painel virtual na investigação pré-transplante.
- Estimar os haplótipos HLA mais freqüentes nessa população.
- Comparar as diferenças de freqüências alélicas e haplotípicas entre os grupos de brancos, negros e mestiços dentro da população analisada.
- Comparar os resultados obtidos com dados já descritos na população brasileira.

## 2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

***HLA-A, -B and -DRB1* allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteers donors from Rio Grande do Sul state, Brazil**

Submetido ao periódico Human Immunology

***HLA-A, -B and -DRB1* allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul state, Brazil**

Andréa Silveira Bortolotto<sup>a,b</sup>, Márcia Fernanda Petry<sup>b</sup>, Janaína Gomes da Silveira<sup>b</sup>, Ana Rosa da Fonte Raya<sup>b</sup>, Sandra Regina Fernandes<sup>b</sup>,  
Jorge Neumann<sup>b</sup>, Cristina Bonorino<sup>a</sup>

a- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular – Instituto de Pesquisas Biomédicas – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Porto Alegre-RS, Brazil.

b- Laboratório de Imunologia de Transplantes – Complexo Hospitalar Santa Casa – Porto Alegre-RS, Brazil

\*Corresponding author: Cristina Bonorino, PhD

E-mail adress: cbonorino@pucri.br

Phone: 55 51 33203000 exp.2725

Adress: Av. Ipiranga, 6690 2º andar. Porto Alegre/RS Brazil 90610-900

## ABSTRACT

The *HLA A, B and DRB1* allele, phenotype and haplotype frequencies were studied in a sample of 5,000 volunteer bone marrow donors registered at the REDOME (Brazilian Volunteer Bone Marrow Donor Registry). The participants live in the State of Rio Grande do Sul and were classified according to ethnic group (4,428 caucasians, 324 mestizos (mixed-race) and 248 blacks). Typing was performed using the PCR-SSO method combined with Luminex technology. 21 *HLA-A*, 33 *HLA-B* and 13 *HLA-DRB1* allele groups were identified. The most frequent allele groups for each *locus* were: A\*02, B\*35 and DRB1\*13. The most frequent haplotypes were: A\*01 B\*08 DRB1\*03 in caucasians and mestizos, and A\*02 B\*15 DRB1\*04 in blacks. The allele frequencies were compared to samples of different Brazilian regions. In most comparisons no statistically significant differences were found. The most significant differences were observed in the comparison of the groups of our sample, confirming the ethnic background of this population. The referred data provides insight on the knowledge of HLA diversity in the population of Rio Grande do Sul and in the search for a better match for transplant.

Key-words: HLA alleles, Brazilian population, PCR-SSO

## 1. Introduction

The HLA (*Human Leucocyte Antigens*) typing is an important immunological tool, as well as a valuable asset in the investigation of risk factors for diseases and in organ transplant programs. These genes are located in the MHC (*Major Histocompatibility Complex*) region and encode cell surface molecules, which play an important role in the presentation of antigens and the recognition of specific “*non-self*” and “*self*” antigens[1].

The transplant of bone marrow and solid organs is an alternative therapy to some diseases and its success depends mostly on the HLA-compatibility between donor and recipient. Despite the advancements in immunosuppressive therapies and pre-transplant investigation with the use of more sensitive methods for detection of anti-HLA antibodies, allele typing and understanding of the allelic diversity are still very important [2]. This system is characterized by great polymorphism, which is an obstacle in the search for a compatible donor. Some theories were developed to explain this feature. One model suggests that this variability is maintained by positive selection of these molecules, which has been occurring since the early stages of human evolution by means of local antigen stimuli to which the populations have been exposed [3,4]. The HLA system is also characterized by an extensive linkage disequilibrium, which has an important clinical application. Patients with haplotypes in linkage disequilibrium are more likely to find a compatible donor [5]. Therefore, the investigation of such alleles and haplotypes provide insight on the study of the genetic composition and the origin of the different populations. In this regard, Brazil has an extremely diversified population, where the frequencies of some alleles may vary

according to the predominant ethnic group in the studied region. Previous studies were conducted on HLA frequency in different Brazilian regions, such as the states of Paraná [6,7,8], São Paulo [9,10,11,12], Rio de Janeiro [13], Minas Gerais [14], Goiás [19], Piauí [15] and Pernambuco[16]. Some of these data available in the literature were obtained by serological typing methods. Studies on samples from individuals of the five continents revealed the differences between the identified HLA alleles and their consequent increase in mixed-race populations [17,18]. A comparative study of five different Brazilian samples has shown that comparison of these populations has more similarities than differences, including an analysis of a group of individuals from Rio Grande do Sul composed of Caucasians and Blacks [19]. When the referred study was published, the World Health Organization Nomenclature Committee for factors of the HLA system had 97 specificities serologically defined. Until 2010, more than 4,000 *HLA-A*, *HLA-B* and *DRB1* alleles have been identified in the world population [20]. With the advancements of typing techniques, the introduction of molecular biology methods and the increased number of new alleles identified, such information had to be updated.

Rio Grande do Sul is the southernmost state in Brazil and has an area of approximately 282,000 Km<sup>2</sup> and a population estimated in more than 10 million inhabitants. The capital, Porto Alegre, has 1,409.939 inhabitants. This Brazilian region is characterized by strong influence of European settlers. The population of Rio Grande do Sul is classified as: 81.4% caucasian, 5.0% black, 13.3% mulatto and 0.3% oriental or amerindian [21]. Information on the diversity of HLA alleles enable us to estimate the probability of a patient on the waiting list for a transplant finding a donor with better immunological compatibility, and contribute to studies on population genetics and disease-related studies. The knowledge of the phenotypic frequencies

of these alleles is essential to determine HLA antibody panel reactivity (PRA). This test is performed in the pre-transplant investigation where the anti-HLA antibodies present in recipient serum are defined. In the past years, advances in these tests have made it possible to detect antibodies with the use of solid phase tests, which do not necessarily contemplate the HLA distribution representative of the assessed population [22], because they mostly include the global frequency of HLA alleles. The knowledge of data on phenotypic frequency makes possible to determine the real reactivity represented by a percentage value, based on the population group of the recipient.

The purpose of this study is to determine the phenotype, allele and haplotype frequencies of *HLA-A*, *-B* and *-DRB1* in a sample of volunteer donors of bone marrow from Rio Grande do Sul state, and compare the allele frequencies of the ethnic groups within our sample and to published data related to different Brazilian populations.

## **2- Materials and methods**

### **2.1- Sample**

A sample of 5,000 volunteer bone marrow donors registered at the Transplant Immunology Laboratory at Santa Casa Hospital, in Porto Alegre, from January 2006 to October 2008. Sixty-nine per cent of the donors were women, and the ages varied between 18 and 54 years. Most individuals in the sample live in different municipalities of the mesoregion of the Porto Alegre metropolitan area (<http://www.ibge.gov.br/>). The sample was divided into subsamples according to the type of ethnicity informed by the donor. Therefore, three different groups were generated: caucasians (n=4,428), blacks (n=248) and mestizos (individuals of

European, African and Amerindian origin, n=324). All donors signed an informed consent. The samples used for comparisons between different Brazilian states and their characteristics were as follows: Paraná (n=3500, caucasians, blacks, orientals and mestizos) [8], São Paulo (n=103, caucasians) [11], Minas Gerais (n=95, caucasians) [14], Piauí (n=97, mestizos) [15] and Pernambuco (n=101, caucasians and non-caucasians) [16]. These studies were selected because they are the most recent publications on Brazilian population which facilitates comparison since they all use molecular typing methods. The study was approved by the University Research Ethics Committee.

## **2.2 – DNA extraction and typing**

DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen<sup>®</sup> according to manufacturer's instructions. Typing was performed using the Luminex<sup>®</sup> multianalyte system with the LABType SSO One Lambda<sup>®</sup> (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) commercial kit. In this PCR reaction biotinylated primers are used. For the HLA class I amplification (*locus A e B*) two primers are used, one for exon 2 and the other one for exon 3. For the class II amplification (*locus DRB1*) one single primer is used for exon 2. The amplified biotinylated product is subjected to a hybridization process with specific sequences of given HLA alleles. These sequences are conjugated to the surface of microspheres (beads) coded by colors that are part of the Luminex system. After the hybridization stage, the SAPE (Streptavidin-Phycoerythrin conjugate) solution is added, which binds itself to the biotinylated product. The reaction is read by an advanced flow cytometry (LABScan 100). Analyses of the allele typings were performed using *HLA Fusion 1.2.1*. version software. Although this methodology



allows the identification of some alleles, in most cases only the allelic groups were identified. Therefore, only the referred information was used in our analysis.

### **2.3- Statistical analysis**

The allele and haplotype frequencies and the verification of Hardy-Weinberg equilibrium were calculated using Arlequin 3.11 version software [23]. For the determination of haplotype frequencies, the EM algorithm (algorithm of expectation-maximization) is used, as described by Excoffier and Slatkin [24]. This method allows the estimate of random haplotype frequencies based on the allelic frequencies of the sample. The Hardy-Weinberg equilibrium was verified using the Guo and Thompson method [25]. The phenotypic frequencies were calculated by direct count with the aid of SPSS 17.0 software. The statistical significance of the differences between the allelic frequencies in our sample and in samples of other Brazilian populations was calculated by chi-square test with Yates' correction, using the PEPI 4.0 software [26]. Bonferroni's correction was used with an initial significance level of  $p < 0.05$ .

### **3- Results and discussion**

The *HLA-B* and *-DRB1* loci were in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p > 0.05$ ). In the B locus the observed heterozygosity was 92.8% and the expected heterozygosity was 93.2%. For the DRB1 locus it was 88.7% and 89.6%, respectively. The values found for A locus were 86.3% and 87.4%. However, a statistically significant difference was found for this locus between the observed and expected heterozygosity ( $p = 0.003$ ). This difference can perhaps be explained by the size of the sample, because it was not observed in the separate analysis of the ethnic groups. In the analysis of the total

sample, 21 *HLA-A* allelic groups, 33 *HLA-B* and 13 *HLA-DRB1* were identified. Table 1 shows the allele and phenotype frequencies in the total sample for the three studied *loci*. The *HLA-A\*02* allele was the most frequent during the entire analysis. In *locus A* the *HLA-A\*03*, *-A\*24* and *-A\*01* alleles presented more than 10% of frequency. In *locus B* the most common allelic groups were *HLA-B\*35*, *-B\*44*, *-B\*51* and *-B\*15*, and in *locus DRB1* the *HLA-DRB1\*13*, *-DRB1\*07*, *-DRB1\*04* and *-DRB1\*11* alleles. The referred data indicate a more representative contribution of alleles of European origin [27,28,29]. On the other hand, they show the occurrence of alleles of African influence, such as the *HLA-B\*15*.

Table 2 demonstrates the comparison of these frequencies between the ethnic groups studied in our population. The frequency of the *HLA-A\*02* allele was greater in the caucasians (28.2%). Nevertheless, no statistically significant differences were observed in the comparison of the frequency of this allele among caucasians, mestizos and blacks. Some alleles of *A locus* have shown different frequencies in the comparison between the ethnic groups. Among them, the *HLA-A\*23* and *-A\*30* alleles that presented 8.0% and 9.6% of frequency in blacks compared to caucasians (3.7% and 3.1%) and mestizos (4.6% and 5.0%). However, statistically significant difference was found only in the comparison between caucasians and blacks for these alleles after Bonferroni's correction. There was a difference in the *HLA-A\*01* allelic group in the comparison between blacks and caucasians (4.2% and 10.5%, respectively), and in the *HLA-A\*34* allele in the comparison of caucasians with mestizos and blacks. In *B locus* the allele with greater difference of occurrence among the groups was the *HLA-B\*15*, with a frequency of 14.7% in blacks, 10% in mestizos and 7.9% in caucasians. There was a statistically significant difference in the *HLA-B\*53* allelic group in the comparison of mestizos and blacks with caucasians, and in the *HLA-*

*B\*81* group among blacks and caucasians. Alleles of caucasian origin, such as the *HLA-B\*35*, *-B\*44* and *-B\*51* had their frequencies reduced in the groups of mestizos and blacks. For *locus DRB1*, the greatest difference occurred for the *HLA-DRB1\*07* allelic group in the comparison between blacks and caucasians (8.4% and 13.4%, respectively).

The comparison of the most frequent allelic groups in our sample to the frequencies obtained in samples of different Brazilian regions is shown in Table 3. For the *HLA-B\*15* allelic group, for example, the analysis of a caucasian population of Belo Horizonte has demonstrated a frequency of 7.5% [14]. On the other hand, a study of blacks sample from Curitiba region has shown a frequency of 12.3% for the same allele [8] (data not shown in the table). Monte *et al* [15] found a 9.8% frequency for the *HLA-B\*15* allelic group in a sample of mestizos from Piauí state, and in the sample of Pernambuco a frequency of 12.3% was found [16]. The frequency obtained for this allele in Piauí was similar to that of our sample of mestizos, whereas the frequency of the Pernambuco sample was between the frequency of blacks and mestizos samples. The referred data confirm the mixture of ethnicities, with a smaller caucasian contribution, which is a characteristic of the Northeast region of Brazil. Nonetheless, no statistically significant differences were found in the comparison with samples from Pernambuco and Piauí. Both studies have shown that these samples of the Northeast region of Brazil are more similar to caucasian and mixed-race populations than to Amerindian populations. Therefore, the comparison between the ethnic groups of our sample and those groups of the other Brazilian populations has shown similarities, and the differences are more noticeable when blacks and caucasians individuals are compared.

Regarding the population of Paraná, statistically significant differences for some alleles were observed, even after Bonferroni's correction. The *HLA-A\*02* allele was more frequent in relation to the sample of Paraná, even in the comparison with the caucasian groups. Moreover, its occurrence was similar to that of the sample of Piauí (22.8% and 22.7%, respectively), which is predominantly composed of mixed-race individuals [8]. On the other hand, a previous study on a sample of volunteer bone marrow donors of Paraná has shown a frequency of 28.4% for the *HLA-A\*02* allele in the group of caucasians [6]. Differences were also found in the analysis of *DRB1 locus*. The *DRB1\*11* allelic group was the most common (12.5%), whereas in our analysis the *DRB1\*13* group was the most common (13.7%). Despite these differences, it can be seen that the same alleles are most frequent in each *locus*, when the samples of Paraná and Rio Grande do Sul are compared, and that most of them are characteristic of European origin populations. It is important to stress that both the samples of Rio Grande do Sul and Paraná had a greater number of individuals compared to the others. It is known a high value for *n* may cause small differences to become statistically significant. Thus, it cannot be affirmed that there are, in fact, differences between these samples. Besides, we have observed a lower frequency of caucasian alleles in the black and mixed-race ethnic subgroups in these populations.

Regarding the comparison with the other samples, it has become evident that although no statistically significant differences were observed between the frequencies, the majority of the most common alleles in each sample is in accordance to the ethnic influence of each population. Alleles such as *HLA-A\*03*, *-A\*01*, *-B\*35*, *-B\*44* and *-B\*51* have shown lower frequencies in samples of mixed-race populations in relation to our total sample and the other caucasian samples. However, there were

higher frequencies than expected of A\*03 and B\*51 alleles compared to the sample of Piauí, even when compared to our sample of mixed-race individuals. On the other hand, there was a lower frequency of the *HLA-DRB1\*07* allele, less common in the group of blacks in our sample, in the mixed-race population of Piauí. Also, there was higher frequency in this sample of *HLA-DRB1\*03* allele, more common in populations of African origin [30]. The same occurred with *HLA-A\*23*, *-A\*30* and *-A\*68* alleles, which had higher frequencies in mixed-race populations compared to the caucasian populations. This difference is more noticeable when the most frequent alleles in each sample are considered. In B *locus*, for example, there was a higher frequency of the *HLA-B\*35*, *-B\*44* and *-B\*51* alleles in the samples of Rio Grande do Sul, Paraná and Minas Gerais, whereas in Piauí and Pernambuco, the *HLA-B\*07*, *B\*15*, *B\*44* alleles and *HLA-B\*15*, *-B\*07* and *-B\*44* alleles, respectively, were more frequent. No significant differences were observed in the comparison with samples of Minas Gerais and São Paulo. In *DRB1 locus*, however, the *HLA-DRB1\*01* allele was the most frequent in the sample of São Paulo, whereas in Rio Grande do Sul and Paraná, it was the fifth most frequent allele.

Comparison with a study of HLA polymorphism in Rio Grande do Sul shows differences between some alleles [19] (data not shown). The referred study has demonstrated a frequency of 33% for the *HLA-A\*02* allele in the sample of Caucasians, compared to 28.2% in our analysis. Most alleles of B *locus* had similar frequency. However, the *HLA-B\*35* allelic group was different. While the referred study has reported only 9.2% of occurrence in the group of caucasians, our analysis has demonstrated a frequency of 12.7% for the same group. In the *HLA-B\*15* allelic group an even greater difference was observed in the comparison between the Blacks group (14.7% in our sample compared to 2.2%). Such differences may have

occurred due to the difficult identification of some alleles caused by the method of allele typing used at that time, which reinforces the need to update these data.

The frequencies of the haplotypes are shown in Table 4. It is important to remember that these frequencies presented in the analyzed sample are estimates initially based on the frequencies of alleles, and, thus, are not necessarily true. Information on the ancestors of each individual is required to identify the inherited haplotypes, and thus, inform the real distribution. The characterization of the haplotypes allows the identification of the ethnic influence in different populations and has a relevant role within the context of organ transplantation, because it facilitates the search for an ideal donor. In this analysis, the most common haplotypes found in the sample were: *A\*01 B\*08 DRB1\*03* (2.8%), *A\*29 B\*44 DRB1\*07* (1.6%) and *A\*03 B\*07 DRB1\*15* (1.3%), which is in accordance to the data reported in the population of Paraná (2.4%, 1.4% and 1.3%) [8]. On the other hand, we have observed variations in the frequencies of these haplotypes according to the ethnic group assessed in our sample. The *A\*01 B\*08 DRB1\*03* haplotype (3.0%), typical of Caucasians, were less frequent in blacks and mestizos (1.0% and 2.0%, respectively). Likewise, the *A\*02 B\*15 DRB1\*04* haplotype was more frequent in blacks (2.1%) than in mixed-race and caucasians (1.0% and 0.8%).

The characterization of the HLA composition in the Brazilian population is important for the understanding of several autoimmune diseases, and mostly for the organization of registries of volunteer bone marrow donors. In our analysis we have demonstrated that the distribution of *HLA* alleles and haplotypes was similar between the different samples of the Brazilian population, and that the greatest differences occur between the ethnic groups of the Brazilian samples. Despite the differences observed, it has become clear that the ethnic origin influences the characterization of

the *HLA* alleles of a given population: the south and southeast of Brazil have a greater frequency of alleles of caucasian origin, and the northeast is characterized by its mixed-race contribution. Further studies are needed to provide a better understanding of the *pool* of donors registered at the database of volunteer bone marrow donors. In Brazil, the REDOME (Brazilian Volunteer Bone Marrow Donor Registry) counts on almost 2.0 million registered donors ([http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=677](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=677) ). Most of them live in the southern and southeastern regions of Brazil. Few studies were conducted on the diversity of these alleles in the center-west, north and northeast of Brazil. Studies with samples of REDOME donors of various Brazilian regions would make it possible to characterize the population of volunteer donors in Brazil and could offer new ways to improve the search for a compatible donor. Studies with larger sample sizes, which are more representative, could make such comparisons easier. This would make it possible to plan the search for volunteer bone marrow donors in Brazilian areas that are still less representative in the national registry.

The data on the diversity of *HLA* alleles reported in the present study reflects the anthropological origin of the population of Rio Grande do Sul and is very important in the investigation of pre-transplant of solid organs, allowing to estimate the probability of a patient on the waiting list for a transplant finding a donor with better immunological compatibility.

### **Acknowledgements**

The authors thank Complexo *Hospitalar Santa Casa*, of Porto Alegre, for their assistance. This study was supported by CAPES. The author ASB has a CAPES-PROSUP scholarship (Masters in Cell and Molecular Biology – PUCRS).

## References

- [1] Abbas, A; Lichtmann, A. Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
- [2] Buckley RH. Transplantataion Immunology: organ and bone marrow. J Allergy Clin Immunol 2003;111(2):733-44.
- [3] Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. Nature 1975;256:50-52.
- [4] Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. Science 1996;272:67-74.
- [5] Rodey G. HLA beyond tears. 2nd ed. Houston 2000.
- [6] Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MM, Visentainer JEL, Tsuneto LT, *et al.* HLA polymorphism and evaluation of european, african and amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. Hum Biol 2000;72(4):597-617.
- [7] Braun-Prado K, Vieira Mion, AL, Farah Pereira, N, Culpi L, Petzl-Eler, ML. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. Tissue Antigens 2000;56:417-27.
- [8] Ruiz TM, da Costa SMCM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, da Graça Bicalho M: Human Leucocyte Antigen Allelic Groups and Haplotypes in a Brazilian Sample of Volunteer Donors for Bone Marrow Transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. Transplantation Proceedings 2005;37:2293-96.
- [9] Donadi EA, Maurício-da-Silva L, Paula-Santos CM, Silveira RD, Deghaide NHS, Ferraz AS, *et al.* Frequência dos antígenos de histocompatibilidade na população normal da região nordeste do estado de São Paulo Brasil. Simpósio Associação do sistema HLA com doenças no Brasil 2000;33:19-26.
- [10] Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JÁ, Donadi EA. HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. Tissue Antigens 2001;57:158-62.
- [11] Morgun A, Godcalves-Primo A, Schulzhenko N, Rampim GF, Mine KL, Gerbase-DeLima M. HLA-DQB1 and DRB1 Alleles, Cytokine Polymorphisms and KIR Gene Frequencies in a Population (Caucasian) from South East Brazil. Hum Immunol 2004;65:879-82.
- [12] Temin J, Marques GD, Morgun A, Schulzhenko N, Rampim GF, Gerbase-DeLima M. HLA-DQB1 e -DRB1 alleles and cytokines polymorphisms in a mulatto population from south east Brazil. Hum Immunol 2004;65:882-85.
- [13] Moraes ME, Fernandez-Viña M, Salatiel I, Tsai S, Moraes JR, Stastny P: HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. Tissue Antigens 1993;41:238-42.
- [14] Williams F, Nasciemnto E, Middleton D: HLA-A and -B Alleles in a Population from Belo Horizonte, Brazil. Hum Immunol 2004;65:866-70.
- [15] Monte S, Moita Neto J, Rampim G, Shulzhenko N, Morgun A, Gerbase-DeLima M. HLA polymorphism in a racially admixed sample of the population of Teresina, Piauí. Rev Assoc Med Bras 2004;50:422-26.



- [16] Nigam P, Dellalibera E, Maurício-da-Silva L, Donadi E, Silva R: Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the Northeastern State of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens* 2004;64:204-08.
- [17] Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, *et al.* Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2000;61:1048-52.
- [18] Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, *et al.* Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2001;62:645-50.
- [19] Trachtenberg A, Jobim L, Kraemer E, Salzano F, Moraes ME, *et al.* The HLA polymorphism in five Brazilian populations. *Ann Hum Biol* 1988;15:213-21.
- [20] EBI (European Bioinformatics Institute). IMGT/HLA Database, 2010.
- [21] IBGE - Pesquisa Nacional por amostra de domicílios e contagem da população. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009.
- [22] Gupta A, Sinnott P. Clinical relevance of pretransplant human leucocyte antigen donor-specific antibodies in renal patients waiting for a transplant: A risk factor. *Hum Immunol* 2009;70:618-22.
- [23] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005;1:47-50.
- [24] Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995;12:921-27.
- [25] Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992;48:361-72.
- [26] Abramson JH, Gahlinger PM. *Computer Programs for Epidemiologists: PEPI version 4.0.* Sagebrush Press, Salt Lake City, 2001.
- [27] Ribas F, Oliveira LA, Petzl-Eler ML, Bicalho MG. Major histocompatibility complex class I chain-related gene polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in Euro-Brazilians. *Tissue Antigens* 2008;72:532-38.
- [28] Carvalho AS. HLA-A, -B and -C markers in the portuguese population. *Tissue Antigens* 1983;21(1):39-44.
- [29] Piazza A, Olivetti E, Griffo RM. The distribution of HLA antigens in Italy. *Gene Geogr* 1989;3:141-64.
- [30] Assane AA, Fabrício-Silva GM, Cardoso-Oliveira J, Mabunda NEJ, Sousa AM, Jani IV, *et al.* Human leucocyte antigen -A, -B and -DRB1 allele and haplotype frequencies in the Monzabican population:a blood donor-based study. *Hum Immunol* 2010;71:1027-32.

Table 1 – HLA-A, -B and –DRB1 allelic and phenotypic frequencies in total sample (n=5000)

<b>HLA Locus</b>	<b>Fa</b>	<b>Fph</b>	<b>HLA Locus</b>	<b>Fa</b>	<b>Fph</b>	<b>HLA Locus</b>	<b>Fa</b>	<b>Fph</b>
<b>A*02</b>	0.278	0.475	<b>B*35</b>	0.125	0.236	<b>DRB1*13</b>	0.137	0.256
<b>A*03</b>	0.104	0.197	<b>B*44</b>	0.12	0.224	<b>DRB1*07</b>	0.131	0.246
<b>A*24</b>	0.103	0.196	<b>B*51</b>	0.087	0.161	<b>DRB1*04</b>	0.124	0.233
<b>A*01</b>	0.101	0.191	<b>B*15</b>	0.084	0.163	<b>DRB1*11</b>	0.119	0.220
<b>A*31</b>	0.052	0.10	<b>B*07</b>	0.07	0.133	<b>DRB1*01</b>	0.107	0.199
<b>A*11</b>	0.051	0.099	<b>B*08</b>	0.06	0.118	<b>DRB1*03</b>	0.099	0.187
<b>A*68</b>	0.048	0.094	<b>B*14</b>	0.053	0.103	<b>DRB1*15</b>	0.091	0.173
<b>A*29</b>	0.046	0.092	<b>B*40</b>	0.05	0.098	<b>DRB1*08</b>	0.061	0.119
<b>A*23</b>	0.040	0.078	<b>B*18</b>	0.047	0.092	<b>DRB1*14</b>	0.043	0.082
<b>A*30</b>	0.035	0.07	<b>B*39</b>	0.03	0.058	<b>DRB1*16</b>	0.036	0.07
<b>A*32</b>	0.035	0.069	<b>B*57</b>	0.029	0.058	<b>DRB1*12</b>	0.018	0.036
<b>A*26</b>	0.030	0.06	<b>B*49</b>	0.027	0.054	<b>DRB1*09</b>	0.015	0.031
<b>A*33</b>	0.028	0.055	<b>B*27</b>	0.026	0.052	<b>DRB1*10</b>	0.015	0.03
<b>A*25</b>	0.017	0.034	<b>B*38</b>	0.024	0.048			
<b>A*66</b>	0.008	0.016	<b>B*50</b>	0.022	0.045			
<b>A*74</b>	0.005	0.011	<b>B*58</b>	0.02	0.04			
<b>A*34</b>	0.004	0.0082	<b>B*52</b>	0.016	0.032			
<b>A*36</b>	0.003	0.0074	<b>B*13</b>	0.016	0.031			
<b>A*69</b>	0.001	0.0038	<b>B*53</b>	0.015	0.03			
<b>A*80</b>	0.0007	0.0014	<b>B*45</b>	0.011	0.023			
<b>A*43</b>	0.0003	0.0004	<b>B*37</b>	0.01	0.02			
			<b>B*41</b>	0.01	0.021			
			<b>B*55</b>	0.01	0.021			
			<b>B*48</b>	0.006	0.013			
			<b>B*56</b>	0.006	0.012			
			<b>B*42</b>	0.005	0.011			
			<b>B*47</b>	0.002	0.0005			
			<b>B*81</b>	0.002	0.0004			
			<b>B*78</b>	0.001	0.0026			
			<b>B*67</b>	0.0006	0.0012			
			<b>B*73</b>	0.0006	0.0012			
			<b>B*46</b>	0.0001	0.0002			
			<b>B*82</b>	0.0001	0.0002			

Fa= Allelic frequency, Fph= Phenotypic frequency

Table 2 – Allelic groups frequencies in total sample (n=5000) and their comparisons between ethnics groups.

HLA Locus	Total	C	M	B	HLA Locus	Total	C	M	B	HLA Locus	Total	C	M	B
<i>A*02</i>	0.278	0.282	0.260	0.223	<i>B*35</i>	0.125	0.127	0.108	0.102	<i>DRB1*13</i>	0.137	0.136	0.135	0.151
<i>A*03</i>	0.104	0.107	0.092	0.064	<i>B*44</i>	0.12	0.123	0.117	0.084	<i>DRB1*07</i>	0.131	0.134	0.123	<b>0.084</b>
<i>A*24</i>	0.103	0.104	0.10	0.09	<i>B*51</i>	0.087	0.091	0.063	0.054	<i>DRB1*04</i>	0.124	0.134	0.125	0.125
<i>A*01</i>	0.101	0.105	0.087	<b>0.042</b>	<i>B*15</i>	0.084	0.079	0.10	<b>0.147</b>	<i>DRB1*11</i>	0.119	0.122	0.10	0.092
<i>A*31</i>	0.052	0.049	0.07	0.08	<i>B*07</i>	0.07	0.071	0.078	0.038	<i>DRB1*01</i>	0.107	0.109	0.10	0.076
<i>A*11</i>	0.051	0.053	0.05	0.024	<i>B*08</i>	0.06	0.062	0.046	0.046	<i>DRB1*03</i>	0.099	0.097	0.106	0.12
<i>A*68</i>	0.048	0.046	0.058	0.06	<i>B*14</i>	0.053	0.052	0.063	0.048	<i>DRB1*15</i>	0.091	0.089	0.098	0.106
<i>A*29</i>	0.046	0.046	0.049	0.046	<i>B*40</i>	0.05	0.051	0.047	0.04	<i>DRB1*08</i>	0.061	0.059	0.070	<b>0.098</b>
<i>A*23</i>	0.040	0.037	0.046	<b>0.08</b>	<i>B*18</i>	0.047	0.049	0.038	0.032	<i>DRB1*14</i>	0.043	0.042	0.047	0.052
<i>A*30</i>	0.035	0.031	0.05	<b>0.096</b>	<i>B*39</i>	0.03	0.029	0.043	0.044	<i>DRB1*16</i>	0.036	0.035	0.041	0.04
<i>A*32</i>	0.035	0.037	0.024	0.012	<i>B*57</i>	0.029	0.029	0.029	0.038	<i>DRB1*12</i>	0.018	0.018	0.013	0.018
<i>A*26</i>	0.030	0.031	0.024	0.024	<i>B*49</i>	0.027	0.027	0.027	0.038	<i>DRB1*09</i>	0.015	0.014	0.021	0.03
<i>A*33</i>	0.028	0.026	0.027	<b>0.06</b>	<i>B*27</i>	0.026	0.027	0.026	0.012	<i>DRB1*10</i>	0.015	0.014	0.013	0.028
<i>A*25</i>	0.017	0.017	0.012	0.016	<i>B*38</i>	0.024	0.024	0.026	0.016					
<i>A*66</i>	0.008	0.008	0.006	0.012	<i>B*50</i>	0.022	0.022	0.026	0.020					
<i>A*74</i>	0.005	0.003	0.013	<b>0.038</b>	<i>B*58</i>	0.02	0.018	0.032	0.036					
<i>A*34</i>	0.004	0.003	<b>0.009</b>	<b>0.014</b>	<i>B*52</i>	0.016	0.016	0.016	0.02					
<i>A*36</i>	0.003	0.003	0.003	0.008	<i>B*13</i>	0.016	0.016	0.012	0.012					
<i>A*69</i>	0.001	0.001	0.003	0.002	<i>B*53</i>	0.015	0.012	<b>0.029</b>	<b>0.048</b>					
<i>A*80</i>	0.0007	0.0005	0.0015	0.002	<i>B*45</i>	0.011	0.010	0.013	0.026					
<i>A*43</i>	0.0003	0.0003	*	*	<i>B*37</i>	0.01	0.010	0.013	0.002					
					<i>B*41</i>	0.01	0.011	0.006	0.010					
					<i>B*55</i>	0.01	0.011	0.004	0.006					
					<i>B*48</i>	0.006	0.006	0.012	0.010					
					<i>B*56</i>	0.006	0.006	0.003	*					
					<i>B*42</i>	0.005	0.003	0.007	0.044					
					<i>B*47</i>	0.002	0.002	0.001	0.002					
					<i>B*81</i>	0.002	0.0011	0.003	<b>0.018</b>					
					<i>B*78</i>	0.001	0.0014	*	*					
					<i>B*67</i>	0.0006	0.0006	*	*					
					<i>B*73</i>	0.0006	0.0006	*	*					
					<i>B*46</i>	0.0001	0.0001	*	*					
					<i>B*82</i>	0.0001	0.0001	*	*					

C= Caucasians, M= Mestizos B= Blacks. The frequencies showed in boldface type indicate statistically significant difference in relation to the Caucasian group. Bonferroni's correction reduced statistical significance from  $p < 0.05$  to  $p < 0.0024$  for locus A,  $p < 0.0015$  for locus B and  $p < 0.0038$  for locus DRB1.

Table 3 – The 10 most common allelic groups in total sample (n=5000) for each *locus* and their comparisons between samples from different brazilian regions.

HLA Locus	Total	PR [8]	SP[11]	MG[14]	PI[15]	PE[16]
<b>A*02</b>	0.278	<b>0.228</b>	NT	0.263	0.227	<i>0.287</i>
<b>A*03</b>	0.104	<i>0.093</i>	NT	0.105	0.121	<i>0.084</i>
<b>A*24</b>	0.103	<i>0.104</i>	NT	0.116	0.098	<i>0.099</i>
<b>A*01</b>	0.101	<i>0.095</i>	NT	0.079	0.053	<i>0.084</i>
<b>A*31</b>	0.052	<i>0.044</i>	NT	0.026	0.037	<i>0.049</i>
<b>A*11</b>	0.051	<i>0.052</i>	NT	0.026	0.048	<i>0.024</i>
<b>A*68</b>	0.048	<i>0.054</i>	NT	0.084	0.081	<i>0.089</i>
<b>A*29</b>	0.046	<i>0.043</i>	NT	0.026	0.037	<i>0.029</i>
<b>A*23</b>	0.040	<i>0.039</i>	NT	0.053	0.059	<i>0.064</i>
<b>A*30</b>	0.035	<i>NI</i>	NT	0.058	0.059	<i>0.044</i>
<b>B*35</b>	0.125	<i>0.112</i>	NT	0.11	0.093	<i>0.074</i>
<b>B*44</b>	0.12	<i>0.105</i>	NT	0.10	0.098	<i>0.084</i>
<b>B*51</b>	0.087	<i>0.085</i>	NT	0.089	0.081	<i>0.069</i>
<b>B*15</b>	0.084	<b>0.07</b>	NT	0.075	0.098	0.123
<b>B*07</b>	0.07	<i>0.069</i>	NT	0.063	0.109	0.099
<b>B*08</b>	0.06	<i>0.054</i>	NT	0.074	0.027	0.014
<b>B*14</b>	0.053	<i>NI</i>	NT	0.058	0.027	0.049
<b>B*40</b>	0.05	<b>0.039</b>	NT	0.042	0.07	0.044
<b>B*18</b>	0.047	<i>0.054</i>	NT	0.063	0.032	0.049
<b>B*39</b>	0.03	<i>0.034</i>	NT	0.016	0.016	0.029
<b>DRB1*13</b>	0.137	<b>0.117</b>	0.117	NT	0.139	NT
<b>DRB1*07</b>	0.131	<i>0.12</i>	0.131	NT	0.075	NT
<b>DRB1*04</b>	0.124	<i>0.12</i>	0.098	NT	0.145	NT
<b>DRB1*11</b>	0.119	<i>0.125</i>	0.107	NT	0.16	NT
<b>DRB1*01</b>	0.107	<i>0.098</i>	0.136	NT	0.065	NT
<b>DRB1*03</b>	0.099	<b>0.085</b>	0.107	NT	0.121	NT
<b>DRB1*15</b>	0.091	<i>NI</i>	0.111	NT	0.087	NT
<b>DRB1*08</b>	0.061	<i>0.051</i>	0.098	NT	0.098	NT
<b>DRB1*14</b>	0.043	<i>0.041</i>	0.048	NT	0.048	NT
<b>DRB1*16</b>	0.036	<i>0.032</i>	0.034	NT	0.037	NT
<b>2n</b>	10000	7000	206	190	194	202

The frequencies showed in boldface type indicate statistically significant difference between total sample and specific populations. Bonferroni's correction reduced statistical significance from  $p < 0.05$  to  $p < 0.0024$  for A *locus*,  $p < 0.0015$  for B *locus* and  $p < 0.0038$  for DRB1 *locus*. PR=Paraná, SP=São Paulo, MG= Minas Gerais, PI=Piauí, PE=Pernambuco. NT=not typed, NI= not informed.

Table 4 – The 10 most common *HLA A, B, DRB1* haplotypes in total sample and in the different ethnic groups

Haplotype	Total Pop	Caucasians	Blacks	Mestizos
A*01 B*08 DRB1*03	0.028	0.03	0.01	0.02
A*29 B*44 DRB1*07	0.016	0.016	0.014	0.019
A*03 B*07 DRB1*15	0.013	0.014	0.006	0.011
A*03 B*35 DRB1*01	0.01	0.01	0.003	0.009
A*02 B*07 DRB1*15	0.01	0.01	*	0.006
A*02 B*44 DRB1*13	0.009	0.01	0.014	0.015
A*23 B*44 DRB1*07	0.008	0.008	0.002	0.01
A*02 B*44 DRB1*04	0.008	0.008	*	0.009
A*02 B*15 DRB1*04	0.007	0.008	0.021	0.01
A*02 B*44 DRB1*07	0.007	0.007	0.006	0.005

\*Did not occur in this group.

### **3. CAPÍTULO 3**

### 3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou determinar a diversidade HLA em uma amostra de doadores voluntários de medula óssea do estado do Rio Grande do Sul. Esse tipo de pesquisa disponibiliza informações importantes no processo de busca por doadores em programas de transplante de órgãos. Nossos dados também serão utilizados na determinação de reatividade contra painel, outra ferramenta imprescindível na avaliação pré-transplante.

Na nossa análise observamos um desvio no Equilíbrio de Hardy-Weinberg no *locus A* da amostra total. A perda da proporção de Hardy-Weinberg pode estar relacionada a forças naturais, como a vantagem seletiva ou recente mistura racial. Apesar desse desvio, fica evidente a proporção relativa à heterozigose observada e esperada (86.3% e 87.4%, respectivamente), representando uma diferença de apenas 1.1%. A análise das amostras estratificadas também indica que a amostra está adequada, já que esse desvio não ocorreu em nenhum dos grupos étnicos analisados. Talvez a mistura racial tenha determinado essa diferença. Outra hipótese seria o tamanho da amostra. Sabe-se que na análise de amostras grandes, pequenas diferenças podem se tornar estatisticamente significativas (Mourao-Junior, 2009). Além disso, o grau de liberdade usado pelo teste também é alto, o que poderia explicar a perda do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na estimativa de haplótipos foi possível observar que os alelos com frequências similares não aparecem necessariamente com a mesma frequência nos haplótipos. Os alelos *HLA B\*35* e o *DRB1\*13*, por exemplo, aparecem em somente um dos dez haplótipos mais frequentes. Enquanto que o *HLA B\*44* e o *DRB1\*07*

aparecem em quatro e três haplótipos, respectivamente. Também fica evidente que o haplótipo mais comum (A\*01 B\*08 DRB1\*03) não é formado pelos alelos mais comuns de cada *locus*, demonstrando o desequilíbrio de ligação característico do sistema HLA. Apesar disso optamos por não realizar o cálculo de desequilíbrio de ligação devido ao fato de não conhecermos os haplótipos reais da nossa amostra.

Nesse projeto foram comparadas as freqüências dos alelos HLA –A, -B e –DRB1 entre grupos de indivíduos de diferentes populações brasileiras. Ficou demonstrada a contribuição étnica das amostras analisadas, com evidências de que a população brasileira é formada por uma mistura de raças, e que a contribuição HLA é determinada pela etnia predominante de cada região.

Entre os grupos da nossa população observamos a contribuição HLA de acordo com o grupo étnico, com as freqüências dos alelos nos mestiços se apresentando intermediária entre os negros e caucasianos. Também foi possível demonstrar que os alelos de origem européia se apresentaram em maior número que os demais.

Dessa maneira, podemos lembrar da necessidade de investigação da diversidade representada no banco de doadores de medula óssea do Brasil, que é caracterizado por uma maior contribuição de indivíduos do sul e sudeste do país. Esses dados também sugerem análises futuras como a investigação da diversidade de outros *loci* HLA (*locus* C e DQB1, por exemplo), e das freqüências a nível alélico (quatro dígitos) na população do Rio Grande do Sul. Análises de freqüências de haplótipos em indivíduos de uma mesma família permitiriam também o conhecimento real dos haplótipos HLA mais comuns na nossa população.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMANN, A. **Cellular and Molecular Immunology**. 5ª. Philadelphia: Ed. Saunders, 2003.

ABRAMSON JH, A.; GAHLINGER PM, G. Computer Programs for Epidemiologists: PEPI version 4.0: **Sagebrush Press**, Salt Lake City 2001.

ABTO, Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes - Ano XV - Jan a Dez 2009** 2009.

ALBERT, E. Nomenclature for factors of the HLA system, 1987. **Tissue Antigens**, v. 32, p. 177-187, 1988.

ALVES, C. *et al.* Distribution and frequency of HLA alleles and haplotypes in Brazilians with type 1 diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 3, p. 436-44, 2006

BICALHO, M. G. *et al.* Haplótipos HLA mais freqüentes em doadores voluntários de medula óssea de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, p. 306-309, 2002.

BORTOLINI, M. *et al.* African-derived South American populations: a history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uniparental genetic markers. **America Journal of Human Biology**, v. 11, p. 551-563, 1999.

BRAUN-PRADO, K. *et al.* HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v. 56, n. 5, p. 417-27, 2000.

BUCKLEY, R. Transplantation Immunology: organ and bone marrow. **Journal of Allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 2, p. S733-S744, 2003.

CAILLAT-ZUCMAN, S. Molecular Mechanisms of HLA Association with Autoimmune Diseases. **Tissue Antigens**, v. 73, p. 8, 2008.

CARVALHO-SILVA, D. R. *et al.* The Phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **American Journal Of Human Genetics**, v. 68, p. 281-286, 2001.

CORGHI, D. *et al.* Distribution of the Human Leucocyte Antigen Class II Alleles in Brazilian Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, p. 884-889, 2008.

CORTES, L. *et al.* HLA class II haplotypes in Mexican systemic lupus erythematosus patients. **Human Immunology**, v. 65, p. 1469-1476, 2004.

DAUSSET, J. *In:* Terasaki P, Park I, Origins of the First HLA Specificities. **Human Immunology**, v. 65, p. 185-189, 2000.

DONADI, A. *et al.* Frequência dos Antígenos de Histocompatibilidade na População Normal da região Nordeste do Estado de São paulo, Brasil. **Simpósio Associação do Sistema HLA com Doenças no Brasil**. 33: 19-26 p. 2000.

EBI, European Bioinformatics Institute. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> 2010.

ERLICH, H. *et al.* HLA class II alleles in Amerindian populations: implications for the evolution of HLA polymorphism and the colonization of the Americas. **Hereditas**, v. 127, n. 1-2, p. 19-24, 1997.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 921-927, 1995.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361-72, 1992.

GUPTA, A.; SINNOTT, P. Clinical relevance of pre-transplant HLA donor specific antibodies (DSA) in renal patients waiting for a transplant: a risk factor. **Human Immunology**, v. 70, p. 618-622, 2009.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2009, 2010.

INCA, Instituto nacional do Câncer. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=677](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=677). 2010.

KISSMEYER-NIELSEN, F. *et al.* Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. **Lancet**, v. 2, p. 662-665,

KLEIN, J.; SATO, A. Advances in Immunology: The HLA system (first of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 10, p. 702-709, 2000.

LEE, E. *et al.* Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris. **Human Immunology**, v. 68, p. 630-643, 2007.

LOUZADA-JUNIOR, P. *et al.* HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. **Tissue Antigens**, v. 57, p. 158-162, 2001.

LÁZARO, A. *et al.* Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. **Hum Immunol**, v. 60, n. 11, p. 1138-49, 1999.

MARRERO, A. R. *et al.* Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as white in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Human Biology**, v. 17, p. 496-506, 2005.

MARSH, S. *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. **Tissue Antigens**, v. 75, p. 291-455, 2010.

MEGIORNI, F. *et al.* HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. **Human Immunology**, v. 70, p. 55-59, 2009.

MIDDLETON, D. *et al.* Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. **Hum Immunol**, v. 61, n. 10, p. 1048-52, 2000.

MIGUELES, S. *et al.* HLA-B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 97, p. 2709-2714, 2000.

MONTE, S. *et al.* [HLA polymorphism in a racially admixed sample of the population of Teresina, Piauí]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 4, p. 422-6, 2004.

MORAES, M. *et al.* HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. **Tissue Antigens**, v. 41, n. 5, p. 238-42, 1993.

MORGUN, A. *et al.* HLA-DQB1 and DRB1 Alleles, Cytokine Polymorphisms and KIR Gene Frequencies in a Population (Caucasian) from South East Brazil. **Human Immunology**, n. 65, p. 879-882, 2004.

MOURAO-JUNIOR, C. A. Questões em Bioestatística: o tamanho da amostra. **Revista Interdisciplinar de estudos experimentais**, v. 1, n. 1, p. 26-28, 2009.

NIGAM, P. *et al.* Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the Northeastern State of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 2, p. 204-9, 2004.

NOMENCLATURE, W. Nomenclature for factors of the HLA system - 1977. **Tissue Antigens**, v. 11, p. 81-86, 1978.

PROBST, C. *et al.* HLA polymorphism and evaluation of european, african and amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biology**, v. 72, n. 4, p. 597-617, 2000.

RODEY; G. **HLA Beyond Tears**. 2ª. Ed. De Novo, Houston, 2000.

RUIZ, T. M. *et al.* Human Leucocyte Antigen Allelic Groups and Haplotypes in a Brazilian Sample of Volunteer Donors for Bone Marrow Transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. **Transplantation Proceedings**, v. 37, p. 2293 - 2296, 2005.

TEMIN, J. *et al.* HLA-DQB1 and -DRB1 alleles and cytokine polymorphisms in a mulatto population from south east Brazil. **Human Immunology**, v. 65, p. 882-885, 2004.

TERASAKI, P.; MCCLELLAND, J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature**, v. 204, p. 998-1000, 1964.

THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature**, v. 401, p. 921-923, 1999.

TRACHTENBERG, A. *et al.* The HLA polymorphism in five Brazilian populations. **Ann Hum Biol**, v. 15, n. 3, p. 213-21, 1988.

TSUNETO, L. *et al.* HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 6, p. 512-26, 2003.

WILLIAMS, F. *et al.* Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. **Hum Immunol**, v. 62, n. 6, p. 645-50, 2001.

WILLIAMS, F.; NASCIMENTO, E.; MIDDLETON, D. HLA-A and -B alleles in a population from Belo Horizonte, Brazil. **Human Immunology**, v. 65, p. 866-870, 2004.

## ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

### *Submission Confirmation*

De: **ees.him.0.e977f.c1b2b64a@eesmail.elsevier.com** em nome de **Human Immunology** (js1040@columbia.edu)

Enviada: terça-feira, 18 de janeiro de 2011 13:52:49

Para: **andrea-sb@hotmail.com**

Dear Andrea,

Your submission entitled "HLA -A, -B and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul state, Brazil" has been received by Human Immunology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/him/>.

Your username is: andreasb

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/him/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/him/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Human Immunology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.