

**FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS DE GENES *HLA* EM DOADORES
DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS CADASTRADOS EM
LABORATÓRIO DO PARANÁ**

**Allelic and haplotypic frequencies of *HLA* genes in hematopoietic stem-cells donors
attended in a laboratory of Paraná**

Frequências de genes e haplótipos HLA

Jade Laís Mayer Leite
Joselito Getz
Luciana Nasser Dornelles
Liana Alves de Oliveira

RESUMO

O sucesso do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) depende de medidas eficientes que possibilitem a prevenção da doença do enxerto-contrá-hospedeiro e da compatibilidade HLA entre doador e receptor. O Laboratório de Imunogenética (LI) do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) realiza a genotipagem dos genes *HLA* e também a pesquisa de anticorpos anti-*HLA* antes da realização do TCTH. O objetivo deste trabalho é determinar as frequências alélicas e haplotípicas dos loci *HLA* de classe I e II e o desequilíbrio de ligação entre os genes *HLA* em doadores aparentados e não aparentados cadastrados no banco de dados do LI do CHC-UFPR, para auxiliar na busca de doadores, facilitando o processo de seleção, assim como na conferência de resultados complexos na pesquisa de anticorpos anti-*HLA*. As frequências alélicas foram calculadas por contagem direta. As frequências haplotípicas foram inferidas pelo algoritmo ELB e foi estimado o desequilíbrio de ligação (D') entre os genes. Os grupos alélicos dos genes *HLA* de classe I e II de maior frequência encontrados nesta população foram, respectivamente: *HLA-A*02, B*35, C*07, DRB1*07, DQB1*03* e *DPB1*04*. Os alelos dos genes *HLA* de classe I e II de maior frequência nesta população foram: *HLA-A*02:01, B*07:02, C*04:01, DRB1*07:01, DQB1*03:01* e *DPB1*04:01*. Os haplótipos de maior frequência foram *A*02-B*44, A*01-B*08-C*07, A*01-B*08-DRB1*03* e *DQB1*03-DPB1*04*. As frequências encontradas foram disponibilizadas à equipe do LI, a fim de contribuir para a compreensão da amostra presente na base de dados, assim como em resolução de possíveis resultados complexos em exames realizados.

Palavras-chave: frequências alélicas; genes *HLA*; imunogenética.

ABSTRACT

The success of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) depends on efficient measures that allow the prevention of graft-versus-host disease and, especially, HLA compatibility between donor and recipient. The Laboratório de Imunogenética (LI) of the Complexo do Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) conducts *HLA* genotyping, as well as the identification of anti-*HLA* antibodies, before HSCT. The aim of the present study was to determine the allelic and haplotypic frequencies of *HLA* class I and II loci, and to determine the linkage disequilibrium among *HLA* genes, in related and non-related donors registered in the CHC-UFPR LI database, to assist in the search of donors, facilitating the selection process, as well as in conference of complex results in the identification of anti-*HLA* antibodies. Allele frequencies were calculated by direct counting. Haplotypic frequencies

were inferred by the ELB algorithm and linkage disequilibrium between the genes (D') was also estimated. The allelic groups with the highest frequency of *HLA* class I and II genes found in this population were *HLA-A*02, B*35, C*07, DRB1*07, DQB1*03* and *DPB1*04*. The highest frequency of *HLA* class I and II alleles in this population were *HLA-A*02:01, B*07:02, C*04:01, DRB1*07:01, DQB1*03:01* and *DPB1*04:01*. The highest frequency haplotypes were *A*02-B*44, A*01-B*08-C*07, A*01-B*08-DRB1*03* and *DQB1*03-DPB1*04*. The LI team had access to the frequencies to contribute to the understanding of the sample in their database, as well as in solving possible complex results in exams.

Keywords: genes, MHC class I; genes, MHC class II; immunogenetics.

INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) constitui modalidade terapêutica para diversas doenças, como doenças hematológicas, imunológicas, ou algumas doenças genéticas ⁽¹⁾. Um dos principais objetivos do TCTH é reconstituir uma medula óssea saudável ⁽²⁾. O sucesso do procedimento depende da compatibilidade para os genes *HLA* (*Human Leucocyte Antigens*), entre outros fatores relacionados ao receptor e ao doador ⁽³⁾. A melhor fonte de células-tronco hematopoiéticas é proveniente de doador aparentado 100% compatível ⁽⁴⁾. Existe a possibilidade de busca de doadores não aparentados em caso de ausência de doador compatível dentro da família, através do Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME) ⁽⁴⁾.

A compatibilidade doador-receptor é definida principalmente pelo sistema *HLA*, localizado no cromossomo 6 humano, na posição 6p21.31, no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), que apresenta mais de 200 genes distribuídos ao longo de sua estrutura ⁽⁵⁾ e que são divididos em três classes: região de classe I, que contém os genes *HLA* de classe I; região de classe II, que contém os genes *HLA* de classe II; e a região de classe III. Os genes *HLA* de classe I e II são divididos em clássicos e não clássicos. Os genes clássicos codificam as moléculas *HLA-A, B e C* (classe I) e *HLA-DR e DQ* (classe II) ^(6,7). As moléculas *HLA* de classe I promovem diferenciação e ativação de linfócitos T citotóxicos e as moléculas *HLA* de classe II ativam células T auxiliares, que por sua vez possibilitam a diferenciação e ativação de linfócitos B e T citotóxicos efetores ⁽⁶⁾.

A herança genética do sistema *HLA* é autossômica codominante, portanto um indivíduo expressa os produtos gênicos provenientes dos cromossomos paterno e materno na superfície de suas células somáticas ⁽³⁾. As moléculas *HLA* são capazes de apresentar uma gama variada de antígenos proteicos, devido a poligenia e ao extenso polialelismo apresentado pelos genes do sistema *HLA*, o que determina uma grande variabilidade proteica, especialmente na região

de ligação ao peptídeo. Além disso, os genes *HLA* são polimórficos, tendo muitos alelos comuns por população ⁽⁷⁾.

Atualmente, as metodologias moleculares mais utilizadas para a identificação dos vários alelos *HLA* são a PCR-SSO (Reação em Cadeia da Polimerase - Sondas de Oligonucleotídeos de Sequência Específica), a PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase Alelo-específica), o SBT (Tipificação Baseada em Sequenciamento) ⁽⁸⁾ e o NGS (Sequenciamento de Nova Geração), método mais atual utilizado na pesquisa e diagnóstico clínico ⁽⁹⁾. As três primeiras metodologias citadas são realizadas no Laboratório de Imunogenética (LI) do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

Além da tipificação *HLA*, o LI realiza a pesquisa de anticorpos anti-*HLA*. Os chamados aloanticorpos doador específicos (DSA, do inglês *Donor Specific Antibodies*) são produzidos pela exposição de moléculas *HLA* exógenas ao sistema imune em eventos de sensibilização, como a transfusão de hemocomponentes, transplantes prévios e em mulheres durante a gestação. A presença dos mesmos representa um risco imunológico maior de perda do enxerto no transplante alogênico por rejeição. Recentemente, a presença desses anticorpos mostrou aumentar o risco de falha de pega primária do TCTH e, devido a esse fato, é recomendada a realização de testes de detecção dos DSA antes do TCTH ^(10,11).

Atualmente, a detecção desses anticorpos é realizada mediante ensaios de fase sólida (*Single Antigen Bead – SAB*) e por prova cruzada por citometria de fluxo (*Flow cytometry crossmatch – FCXM*), que são ensaios sensíveis e resolutivos ⁽¹²⁾. Porém, a especificidade do FCXM manteve-se relativamente fraca ⁽¹²⁾. Ainda que o desenvolvimento do ensaio SAB tenha possibilitado o aumento da capacidade de detecção dos anticorpos anti-*HLA*, são reconhecidas inúmeras limitações do teste ⁽¹²⁾. E, mesmo que estratégias de tratamento de amostras tenham sido elaboradas para melhorar os resultados ⁽¹²⁾, existem diferenças nos resultados reportados entre laboratórios ⁽¹²⁾. Os kits para detecção destes anticorpos apresentam diferenças na densidade antigênica das moléculas *HLA*, além de problemas de desnaturação de alguns tipos de moléculas *HLA*; também não contemplam todas as moléculas *HLA* que são comuns nas populações. Estes fatores podem dificultar a caracterização das especificidades dos anticorpos ⁽¹²⁾. Para isso, alguns laboratórios realizam a análise de epítomos compartilhados entre moléculas *HLA*, com finalidade de prever a reatividade de anticorpos contra incompatibilidades *HLA* nos potenciais doadores ⁽¹²⁾. Uma vez sabendo as frequências alélicas de uma determinada população, torna-se possível identificar resultados inconsistentes nos testes de detecção de anticorpos anti-*HLA*. Por exemplo, se a frequência de um determinado alelo que

codifica uma molécula HLA for baixa na população, e se no SAB for detectado um anticorpo contra este antígeno, é maior a chance de que seja um resultado falso positivo. O conhecimento destas frequências aliado a análise epitópica fornece uma segurança maior na liberação destes resultados.

Devido a necessidade de otimizar o processo de busca por um doador compatível e também pelos fatores limitantes citados anteriormente a respeito da pesquisa de anticorpos anti-HLA, a determinação da frequência alélica e haplotípica dos *loci HLA* nos doadores de células-tronco hematopoiéticas faz-se importante para que seja possível identificar os alelos e haplótipos mais comumente encontrados e, por consequência, auxiliar na busca de doadores, facilitando o processo de seleção, assim como na interpretação de resultados complexos na pesquisa de anticorpos anti-HLA. O objetivo do presente trabalho foi determinar as frequências alélicas, frequências haplotípicas dos *loci HLA* de classe I e II e estimar o desequilíbrio de ligação (D') entre os *loci* de doadores aparentados e não aparentados cadastrados no banco de dados do LI do CHC-UFPR, a fim de contribuir para a organização destas informações, que serão úteis na busca de doadores para o TCTH.

METODOLOGIA

O projeto intitulado “Frequências alélicas e haplotípicas de genes *HLA* em doadores de células tronco-hematopoiéticas do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná” foi submetido à análise e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), tendo sido devidamente aprovado (parecer 2.533.985; CAAE: 83001318.9.0000.0096).

Foram utilizados para o desenvolvimento do estudo dados de 2007 a março de 2017 cadastrados no banco de dados do LI do CHC-UFPR para análise dos *loci* do sistema *HLA*. As genotipagens das amostras foram realizadas previamente ao desenvolvimento deste trabalho, pela equipe do CHC-UFPR, em baixa e em alta resolução, utilizando as técnicas de PCR-SSO (para baixa resolução), PCR-SSP (para resolução de ambiguidades) e SBT (para alta resolução). Na tipagem de baixa resolução são determinados grupos alélicos, enquanto nas tipagens de alta resolução o alelo é determinado, considerando variações na regiões codificadora.

Neste trabalho, foram realizados os cálculos de frequência alélica e haplotípica. As frequências alélicas foram calculadas por contagem direta. As frequências haplotípicas foram inferidas pelo algoritmo ELB, incluído no pacote de programas Arlequin v. 3.5⁽¹³⁾ e o desequilíbrio de ligação entre os genes (D') foi estimado.

Dados do website “Allele frequencies” (<http://www.allelefreqencies.net/>) foram utilizados para obtenção de frequências alélicas dos genes *HLA* em outras populações, bem como artigos científicos relacionados a frequências alélicas e haplotípicas. Os critérios para incluir indivíduos no trabalho foram: ter sido cadastrado no banco de dados como doador, ter tido tipagens realizadas por biologia molecular e ter, no mínimo, resultados de tipagem para os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR*. Os critérios que excluíram indivíduos do trabalho foram: serem doadores repetidos (cadastrados como doadores para mais de um paciente, sendo que apenas uma entrada do doador foi mantida); serem doadores consanguíneos entre si (caso no qual apenas um foi mantido na análise, preferencialmente um que tivesse tipagem em alta resolução); somente terem tipagens realizadas por sorologia e apresentarem tipagens inconsistentes ou incompletas. A base de dados avaliada incluía a autoclassificação de raça/etnia de acordo com o IBGE, mas este dado não estava preenchido para todos os doadores.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos 40.484 indivíduos cadastrados no banco de dados, foi possível incluir 3.822 (menos de 10% do total de doadores cadastrados, devido principalmente ao grande número de doadores consanguíneos) de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, sendo que 67,5% são doadores aparentados, 32,5% doadores não aparentados e em 0,05% o parentesco foi descrito como inconclusivo ou não informado. Desse total selecionado, 43,7% são do sexo masculino, 42,5% do sexo feminino e o sexo não foi identificado em 13,8% desses indivíduos. Para a maior parte dos indivíduos incluídos (53,3%) não havia informação sobre autoclassificação de raça/etnia. Para os indivíduos com esta informação, 82,3% estavam classificados como brancos, 9,5% como mulatos e 8,2% tinham outra classificação. Como mesmo os mulatos em populações do sul do Brasil possuem uma significativa contribuição europeia⁽¹⁴⁾, as comparações com outras populações foram feitas com populações de origem europeia.

Foram obtidas as frequências alélicas dos *loci HLA* de classe I e dos *loci HLA* de classe II (Tabela 1) em baixa resolução. Outros alelos com frequências abaixo de 2% estão listados no Material Suplementar.

Tabela 1 – Frequências alélicas do *loci HLA* de classe I e II em baixa resolução.

<i>HLA-A</i> (n=3.822)			<i>HLA-B</i> (n=3.822)			<i>HLA-C</i> (n=2.025)		
	N	F.A(%)		N	F.A(%)		N	F.A(%)
02	2.171	28,4	35	921	12,0	07	1027	25,4
03	806	10,5	44	872	11,4	04	676	16,7
24	763	10	15	651	8,5	03	422	10,4
01	745	9,7	07	627	8,2	06	321	7,9
68	406	5,3	51	595	7,8	16	247	6,1
31	371	4,8	08	439	5,7	05	242	6,0
11	368	4,8	40	391	5,1	12	235	5,8
30	366	4,8	18	369	4,8	08	196	4,8
29	348	4,5	14	351	4,6	02	194	4,8
23	304	4,0	39	267	3,5	15	175	4,3
32	262	3,4	49	219	2,9	01	128	3,2
26	225	2,9	57	196	2,6	17	97	2,4
33	194	2,5	27	185	2,4	Outros*		2,2
Outros*		4,1	52	170	2,2			
			50	157	2,0			
			53	156	2,0			
			Outros*		14,1			
<i>HLA-DRB1</i> (n = 3.822)			<i>HLA-DQB1</i> (n = 2.196)			<i>HLA-DPB1</i> (n = 744)		
	N	F.A(%)		N	F.A(%)		N	F.A(%)
07	1004	13,1	03	1404	32,0	04	628	42,2
13	994	13,0	06	963	21,9	02	254	17,1
04	978	12,8	02	921	21,0	03	130	8,7
11	883	11,5	05	793	18,1	01	116	7,8
15	868	11,3	04	311	7,1	14	47	3,2
01	738	9,6				10	38	2,5
03	732	9,6				17	38	2,5
08	512	6,2				13	37	2,5
14	308	4,0				11	36	2,4
16	250	3,3				05	34	2,3
Outros*		4,9				105	30	2,0
						Outros*		6,7

N – número de alelos; F.A(%) – Frequência alélica; n – número total de indivíduos; * A categoria “Outros” inclui todos os grupos alélicos com frequência inferior à 2%.

Utilizando da mesma metodologia, as frequências alélicas em alta resolução dos *loci HLA* de classe I e II (Tabela 2) foram calculadas. Os alelos do gene *HLA-DPB1* pertencentes ao mesmo grupo P foram agrupados, devido a não diferenciação destes alelos em tipagens mais antigas. Outros alelos com frequências abaixo de 2% estão listados no Material Suplementar.

Tabela 2 – Frequências alélicas do *loci HLA* de classe I e II em alta resolução.

<i>HLA-A</i> (n = 1.134)			<i>HLA-B</i> (n = 1.132)			<i>HLA-C</i> (n = 1.046)		
	N	F.A(%)		N	F.A(%)		N	F.A(%)
02:01	551	24,3	07:02	174	7,7	04:01	318	15,2
01:01	235	11,2	08:01	160	7,1	07:01	284	13,6
03:01	221	9,7	44:03	149	6,6	07:02	227	10,8
24:02	205	9,0	35:01	132	5,8	06:02	175	8,4
31:01	119	5,2	51:01	120	5,3	05:01	121	5,8
29:02	107	4,7	44:02	106	4,7	03:04	120	5,7
11:01	101	4,4	14:02	101	4,5	12:03	116	5,5
23:01	98	4,3	18:01	96	4,2	08:02	105	5,0
32:01	78	3,4	15:01	89	3,9	16:01	105	5,0
68:01	74	3,3	49:01	73	3,2	03:03	86	4,1
26:01	56	2,5	53:01	52	2,3	02:02	75	3,6
30:01	54	2,4	40:01	50	2,21	01:02	63	3,0
Outros*		15,5	35:03	49	2,2	15:02	63	3,0
			38:01	48	2,1	17:01	46	2,2
			13:02	48	2,1	Outros*		9,0
			27:05	46	2,0			
			57:01	46	2,0			
			Outros*		32,0			
<i>HLA-DRB1</i> (n = 2.162)			<i>HLA-DQB1</i> (n = 1.340)			<i>HLA-DPBI</i> (n = 655)		
	N	F.A(%)		N	F.A(%)		N	F.A(%)
07:01	582	13,5	03:01	437	16,3	04:01	360	27,5
03:01	401	9,3	05:01	336	12,5	04:02	206	17,6
15:01	369	8,5	02:02	335	12,5	02:01	212	16,2
13:01	312	7,2	06:02	280	10,4	03:01	113	8,6
11:01	291	6,7	03:02	260	9,7	01:01	94	7,2
01:01	243	5,6	02:01	257	9,6	14:01	39	3
13:02	180	4,2	06:03	185	6,9	11:01	34	2,6
01:02	142	3,3	04:02	172	6,4	13:01	34	2,6
11:04	117	2,7	03:03	88	3,3	05:01	29	2,6
04:04	115	2,7	05:03	73	2,7	10:01	33	2,5
08:01	108	2,5	06:04	68	2,5	17:01	29	2,3
15:03	101	2,3	05:02	59	2,2	Outros*		7,3
04:01	95	2,2	Outros*		4,9			
14:01	91	2,1						
04:11	90	2,1						
Outros*		25,1						

N – número de alelos; F.A(%) – Frequência alélica; n – número total de indivíduos; * A categoria “Outros” inclui todos os alelos com frequência inferior à 2%.

No presente estudo, para genes HLA de classe I, os grupos alélicos mais frequentes foram A*02, B*35 e C*07, sendo os alelos mais frequentes A*02:01, HLA-B*07:02 e HLA-C*04:01. Já para classe II, os grupos alélicos mais frequentes foram DRB1*07, DQB1*03 e DPB1*04, sendo os alelos mais frequentes, HLA-DRB1*07:01, HLA-DQB1*03:01 e HLA-DPB1*04:01. A população em questão é constituída por indivíduos cadastrados como doadores em uma base de dados de um laboratório de Curitiba-PR, que fica na região sul do Brasil. A população brasileira é diversificada geneticamente devido ao cruzamento entre diferentes etnias: europeus, africanos, ameríndios e asiáticos⁽¹⁵⁾ (principalmente Japoneses, em meados de 1930)⁽¹⁶⁾. Devido ao grau de miscigenação, as especificidades HLA são bastante variáveis entre as regiões do país e entre grupos étnicos encontrados nas mesmas, tanto em frequência, quanto na presença ou ausência de alelos e haplótipos específicos⁽¹⁵⁾. Considerando a cidade de Curitiba, a chegada de imigrantes europeus, como os Alemães, Italianos e Poloneses, na região contribuiu para a composição genética populacional da cidade desde o movimento migratório no século XIX⁽¹⁷⁾. Em um estudo de Ruiz *et al.* (2005), realizado na população de Curitiba, foi constatado que entre euro-descendentes os grupos alélicos mais frequentes foram HLA-A*02, A*01, HLA-B*35, B*44, B*51 e HLA-DRB1*11, DRB1*04 e DRB1*07⁽¹⁷⁾. Todos aparecem como frequentes também na população de doadores do presente estudo. Outra comparação foi feita entre as frequências encontradas no presente estudo com frequências de populações da Polônia, disponíveis no website “AlleleFrequencies” (www.allelefrequencies.net). Esta população foi escolhida porque, neste site, foi a população europeia com maior tamanho amostral. Os alelos de maior frequência do estudo foram também encontrados na população polonesa, com exceção do alelo HLA-DQB1 mais frequente (DQB1*03): HLA-A*02:01 (24%), HLA-B*07:02 (11%), HLA-C*04:01 (12%), HLA-DRB1*07:01 (14%) e o grupo alélico HLA-DPB1*04 (56%). Em um estudo de Roque *et al.* (2014) demonstrou-se que os grupos alélicos mais frequentes em doadores de medula óssea em Ribeirão Preto-SP (sudeste brasileiro) foram HLA-A*01, B*35 e DRB1*03, com frequências de 39,2%, 14,2% e 17%, respectivamente, diferindo somente no alelo HLA-DRB1 mais frequente, o qual no presente estudo é o DRB1*07 (13,1%), sendo que o DRB1*03 (9,6%) é o sexto mais frequente. O padrão encontrado neste estudo de Ribeirão Preto revela peculiaridades demográficas da região sudeste devido ao histórico de imigração, com predominância de alelos de origem europeia⁽¹⁸⁾.

Bortolotto *et al.* (2012), em estudo com amostra de doadores voluntários de medula óssea do Rio Grande do Sul, observaram frequências próximas das que foram encontradas no presente estudo. O grupo alélico HLA-A*02 (27%) foi o mais frequente da amostra de doadores

rio-grandenses, seguidos do A*03, A*024 e A*01, os quais representaram mais de 10% da frequência total. Para os *loci HLA-B* e *DRB1* os grupos mais comuns foram o B*35, B*44, B*51, B*15, DRB1*07, DRB1*04 e DRB1*11. Os resultados indicaram representatividade maior de alelos de origem europeia, porém também indicam ocorrência de alelos de influência africana, como o B*15 ⁽¹⁹⁾.

Também utilizando o *website AlleleFrequencies*, amostras populacionais do Japão e da China apresentaram pouca similaridade para valores de frequências alélicas com a população do presente estudo. No trabalho de Nakaoka *et al.* (2013), na população japonesa, foram diferenciadas frequências alélicas de populações de diferentes regiões do Japão ⁽²⁰⁾. Foram identificados 20 alelos e estes foram encontrados nestas populações regionais com diferentes frequências, porém todos característicos da população japonesa atual, entre eles os *HLA-A*02:06*, *A*33:03*, *HLA-B*35:01*, *B*54:01*, *B*05:01*, *B*40:01*, *B*44:03*, *B*52:01*, *HLA-C*03:03*, *C*01:02*, *C*14:03*, *C*12:02*, *HLA-DRB1*15:01*, *DRB1*04:05*, *DRB1*13:02*, *DRB1*15:02*, *HLA-DPB1*02:01*, *DPB1*05:01*, *DPB1*04:01*, *DPB1*02:02*, *DPB1*09:01* (este último frequente em todos os grupos regionais) ⁽²⁰⁾. Os alelos *HLA-B*35:01*, *B*40:01*, *B*44:03*, *C*03:03*, *C*01:02*, *DRB1*15:01*, *DRB1*13:02*, *DPB1*02:01*, *DPB1*05:01* e *DPB1*04:01* na população de doadores do presente estudo também foram classificados como os mais frequentes, já os demais alelos encontrados na população japonesa foram encontrados em frequências abaixo de 2% no presente estudo.

A população norte-americana é caracterizada por quantidade ampla de grupos étnicos, indivíduos descendentes de outras nacionalidades, como europeus, africanos, asiáticos, entre outros. Isso reflete diretamente na variedade de alelos encontrados na população dos EUA. Com base no *website "AlleleFrequencies"* foi possível realizar observações a respeito das frequências alélicas nos EUA. Por exemplo, o alelo *HLA-A*02:01* apresentou frequência de 27% em descendentes de europeus, o alelo *A*01:01* apresentou frequência de 16% também neste subgrupo e 28% em indígenas da região. Outros alelos, como *A*24:02* e *A*11:01* apresentaram frequências elevadas em asiáticos residentes no país (35% para japoneses e 27% para chineses). O alelo *HLA-B*07:02*, o mais frequente alelo do *loci HLA-B* no presente estudo (7,7%), apresentou frequência de 13% em descendentes de europeus nos EUA. O alelo *HLA-B*51:01* apresentou 5% de frequência em descendentes de europeus, frequência essa próxima a que foi encontrada para esse alelo na população do presente estudo. O alelo *C*04:01* foi encontrado com frequências relativamente próximas às apresentadas no presente estudo com as encontradas em populações afrodescendentes, em descendentes de populações da América

Central, em Filipinos e em indígenas da região. Em contrapartida, foi encontrada com frequência mais alta (10%) em descendentes de europeus. Como não temos certeza da classificação quanto a raça/etnia de grande parte dos indivíduos do presente estudo, algumas diferenças com relação a outras populações eurodescendentes era esperada.

O alelo *HLA-DRB1*07:01*, o mais frequente para este *loci* na população do estudo (13,5%), foi observado em subpopulações de afrodescendentes (11%), eurodescendentes (13%) e em descendentes de asiáticos (13%), com frequências próximas das que foram encontradas no presente estudo. Os alelos do gene *HLA-DQB1* foram encontrados com frequências mais altas em subpopulações de descendentes de vietnamitas e de descendentes de populações da América Central. O alelo *DQB1*03:01*, o mais frequente para esse *loci* no que diz respeito as frequências do presente estudo, foi encontrado nas subpopulações descendentes citadas anteriormente com frequências de 33% e 19%, respectivamente. O alelo *HLA-DPB1*04:01*, o mais frequente para este *loci* no presente estudo, foi encontrado com frequência de 41% em uma amostra de aproximadamente 200 indivíduos de caucasianos da cidade de São Francisco-CA. Os demais alelos mais frequentes do presente estudo foram encontrados com frequências próximas as que foram relatadas por essa população de caucasianos em São Francisco. Em um estudo realizado por Tu *et al* (2006) com uma população de afroamericanos nos EUA, foi possível observar que os alelos *HLA-A*02:01* (o mais frequente do presente estudo para esse *loci* – 24,3%) e *A*23:01* (um dos mais frequentes do presente estudo – 4,3%) foram os dois alelos mais frequentes dessa população de afroamericanos, com 12% e 11% de frequência, respectivamente ⁽²¹⁾. Os alelos *B*07:02* (7,5%), *C*04:01* (19,6%) e *DRB1*15:03* (12,2%) atingiram frequências bastante próximas as encontradas no presente estudo, com exceção do último alelo, que apresentou 2,3%.

As frequências haplotípicas foram inferidas (Tabelas 3-5). Os haplótipos mais frequentes foram *A*02-B*44* (4,7%), *B*35-C*04* (10,6%), *A*01-B*08-C*07* (4%), *A*01-B*08-DRB1*03* (3%), *DRB1*07-DQB1*02* (11,6%) e *DQB1*03-DPB1*04* (16%). Os valores de desequilíbrio de ligação entre os genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* encontram-se no material suplementar.

Padrões de desequilíbrio de ligação (DL) entre alelos dos *loci HLA* podem fornecer informações relacionadas a história de um alelo em específico. A análise do DL e de características estruturais dos *loci* podem contribuir para a elucidação de possíveis relações evolutivas entre os alelos. Os haplótipos *HLA* podem apresentar-se com certos padrões de combinação devido a associações mais fracas, mais fortes, ou absolutas entre os alelos ⁽²²⁾. Isto

é, estes blocos de associação sugerem que podem ter ocorrido eventos como: uma diversificação rápida ou recente de uma determinada linhagem alélica ⁽²²⁾, seleção para combinações específicas ^(22,23), deriva genética ⁽²³⁾, tempo evolutivo suficiente para que haplótipos tenham

Tabela 3 – Haplótipos de baixa resolução com frequência superior a 1% e desequilíbrio de ligação entre pares de genes *HLA* de classe I.

A-B (n=3.822)	N	F.H. (%)	D'	r2	p	B-C (n=2.025)	N	F.H. (%)	D'	r2	p
A*02-B*44	358	4,7	0,18	0,0101	0,0000	B*35-C*04	429	10,6	0,88	0,5136	0,0000
A*01-B*08	278	3,6	0,59	0,1989	0,0000	B*07-C*07	315	7,8	0,93	0,2280	0,0000
A*02-B*51	266	3,5	0,23	0,011	0,0000	B*08-C*07	251	6,2	0,94	0,1813	0,0000
A*03-B*07	236	3,1	0,30	0,0695	0,0000	B*15-C*03	182	4,5	0,50	0,1894	0,0000
A*02-B*15	228	3,0	0,09	0,0020	0,0001	B*44-C*16	180	4,4	0,69	0,2107	0,0000
A*29-B*44	205	2,7	-	0,1065	0,0000	B*44-C*05	174	4,3	0,68	0,1996	0,0000
A*03-B*35	174	2,3	0,11	0,0101	0,0000	B*14-C*08	174	4,3	0,90	0,7953	0,0000
A*24-B*35	165	2,2	0,11	0,0096	0,0000	B*40-C*03	160	4	0,78	0,2694	0,0000
A*02-B*40	162	2,1	0,18	0,0045	0,0000	B*51-C*15	117	2,9	0,64	0,2480	0,0000
A*02-B*35	160	2,2	-	0,0082	0,0000	B*49-C*07	115	2,8	0,93	0,0790	0,0000
A*11-B*35	152	2,0	0,33	0,0011	0,0000	B*39-C*07	102	2,5	0,62	0,0415	0,0000
A*02-B*07	136	1,8	-	0,0020	0,0001	B*44-C*04	89	2,2	-	-	0,7326
A*02-B*18	119	1,6	-	-	0,0929	B*53-C*04	79	2	0,89	0,0867	0,0000
A*02-B*50	106	1,4	0,55	0,0158	0,0000	B*13-C*06	73	2	0,94	0,2005	0,0000
A*31-B*39	104	1,4	0,36	0,0911	0,0000	B*57-C*06	71	1,7	0,62	0,1241	0,0000
A*33-B*14	93	1,2	0,45	0,1117	0,0000	B*38-C*12	70	1,7	0,96	0,2726	0,0000
A*68-B*15	92	1,2	0,15	0,0144	0,0000	B*18-C*07	70	1,7	0,16	0,0037	0,0001
A*02-B*39	87	1,1	-	-	0,1229	B*50-C*06	68	1,7	0,81	0,1593	0,0000
A*24-B*07	78	1,0	0,03	0,0006	0,0321	B*51-C*14	56	1,4	0,85	0,1567	0,0000
						B*18-C*12	55	1,4	0,25	0,0494	0,0000
						B*42-C*17	55	1,4	1	0,5610	0,0000
						B*15-C*07	53	1,3	- 0,37	0,0041	0,0000
						B*15-C*02	53	1,3	0,21	0,0246	0,0000
						B*27-C*02	51	1,3	0,47	0,1131	0,0000
						B*18-C*05	51	1,3	0,23	0,0391	0,0000
						B*27-C*01	43	1,1	0,39	0,1267	0,0000

N – número de haplótipos; F.H. (%) – Frequência haplotípica; n – número total de indivíduos; D' – coeficiente relativo de desequilíbrio de ligação; r2 – coeficiente de correlação; p – probabilidade de significância; *apenas haplótipos com frequência superior a 1% foram incluídos na tabela.

atingido o equilíbrio em determinadas populações ⁽⁶⁾ e principalmente ligação entre os loci ⁽²³⁾. Existem diversas maneiras de medir o DL. Uma medida quantitativa de associação é denominada D', que reflete a razão entre o valor de D (coeficiente de desequilíbrio) observado e o seu valor máximo possível para determinada frequência alélica. Esta medida normalizada

permite a avaliação da magnitude do DL. Outra medida é o r^2 (coeficiente de correlação), que se baseia na correlação entre as frequências dos alelos de diferentes *loci*, podendo ser positiva e próxima de 1 (quando os alelos de um haplótipo aparecem sempre juntos) ou negativa (quando os alelos de um haplótipo não aparecem juntos) e sua grandeza é afetada pela frequência dos alelos ⁽²⁴⁾.

Tabela 4 – Haplótipos de baixa resolução com frequência superior a 1% e desequilíbrio de ligação entre pares de genes *HLA* de classe II.

DRB1-DQB1 (n=2.196)	N	F.H. (%)	D'	r2	p	DQB1-DPB1 (n=744)	N	F.H. (%)	D'	r2	p
DRB1*07-DQB1*02	509	11,6	0,80	0,3827	0,0000	DQB1*03*-DPB1*04	237	16	0,13	0,0103	0,0001
DRB1*04-DQB1*03	483	11	0,91	0,2326	0,0000	DQB1*05*-DPB1*04	123	8,3	-	-	0,1107
DRB1*15-DQB1*06	474	10,8	0,97	0,4155	0,0000	DQB1*06*-DPB1*04	118	8,0	-	0,005	0,0062
DRB1*11-DQB1*03	474	10,8	0,91	0,2297	0,0000	DQB1*03-DPB1*02	93	6,3	-	-	0,1009
DRB1*13-DQB1*06	457	10,4	0,79	0,3137	0,0000	DQB1*04-DPB1*04	77	5,2	0,41	0,0195	0,0000
DRB1*01-DQB1*05	440	10	0,99	0,5007	0,0000	DQB1*02-DPB1*04	72	4,8	-	0,0321	0,0000
DRB1*03-DQB1*02	377	8,6	0,86	0,2977	0,0000	DQB1*06-DPB1*02	67	4,5	-	-	0,0843
DRB1*08-DQB1*04	232	5,3	0,73	0,5319	0,0000	DQB1*02-DPB1*01	62	4,2	0,42	0,0612	0,0000
DRB1*14-DQB1*05	125	2,9	0,62	0,0756	0,0000	DQB1*02-DPB1*02	60	4,0	-	-	0,0981
DRB1*07-DQB1*03	98	2,2	-	0,0185	0,0000	DQB1*05-DPB1*03	43	2,9	0,19	0,0154	0,0000
DRB1*10-DQB1*05	87	2	0,99	0,0902	0,0000	DQB1*03-DPB1*03	36	2,4	-	-	0,2461
DRB1*16-DQB1*05	79	1,8	0,44	0,0298	0,0000	DQB1*03-DPB1*14	35	2,4	0,62	0,0267	0,0000
DRB1*08-DQB1*03	67	1,5	-	0,0037	0,0001	DQB1*06-DPB1*03	33	2,2	-	-	0,3723
DRB1*16-DQB1*03	66	1,5	0,19	0,0027	0,0006	DQB1*05-DPB1*02	27	1,8	-	0,0072	0,0011
DRB1*13-DQB1*03	63	1,4	-	0,0276	0,0000	DQB1*02-DPB1*17	25	1,7	0,57	0,0348	0,0000
DRB1*14-DQB1*03	53	1,2	-	-	0,4288	DQB1*06-DPB1*10	24	1,6	0,53	0,0253	0,0000
DRB1*09-DQB1*03	50	1,1	0,50	0,0093	0,0000	DQB1*06*-DPB1*05	22	1,5	0,55	0,0244	0,0000
DRB1*12-DQB1*03	47	1,1	0,64	0,0127	0,0000	DQB1*02-DPB1*11	21	1,4	0,48	0,0231	0,0000
DRB1*03-DQB1*04	45	1	0,05	0,0020	0,0029	DQB1*05-DPB1*01	19	1,3	-	-	0,7163
						DQB1*02-DPB1*03	16	1,1	-	0,0034	0,024
						DQB1*04-DPB1*01	16	1,1	0,07	0,0042	0,0123
						DQB1*05-DPB1*13	16	1,1	0,30	0,0106	0,0001

N – número de haplótipos; F.H. (%) – Frequência haplotípica; n – número total de indivíduos; D' – coeficiente relativo de desequilíbrio de ligação; r2 – coeficiente de correlação; p – probabilidade de significância; *apenas haplótipos com frequência superior a 1% foram incluídos na tabela.

Tabela 5 – Haplótipos de baixa resolução com frequência superior a 1% entre os genes *HLA-A*, -B e -C e entre *HLA-A*, -B e -DRB1.

A-B-C (n=2.025)	N	F.H. (%)
A*01-B*08-C*07	161	4
A*02-B*44-C*05	126	3,1
A*29-B*44-C*16	122	3,0
A*03-B*07-C*07	117	2,9
A*02-B*35-C*04	91	2,2
A*11-B*35-C*04	76	1,8
A*02-B*15-C*03	74	1,8
A*03-B*35-C*04	73	1,8
A*24-B*35-C*04	72	1,8
A*02-B*40-C*03	70	1,7
A*02-B*07-C*07	66	1,6
A*31-B*39-C*07	59	1,5
A*33-B*14-C*08	52	1,3
A*24-B*07-C*07	48	1,2
A*02-B*51-C*15	46	1,1
A*02-B*50-C*06	44	1,1
A*30-B*42-C*17	43	1,1
A-B-DRB1 (n=3.822)	N	F.H. (%)
A*01-B*08-DRB1*03	222	2,9
A*03-B*07-DRB1*15	142	1,9
A*29-B*44-DRB1*07	136	1,8
A*02-B*44-DRB1*04	104	1,4
A*02-B*07-DRB1*15	79	1,0

N – número de haplótipos; F.H. (%) – Frequência haplotípica; *apenas haplótipos com frequência superior a 1% foram incluídos na tabela

No presente estudo só foram considerados valores de D' e r^2 para valores de p (probabilidade de significância) abaixo de 0,05. Isto posto, foi possível observar que os haplótipos mais frequentemente encontrados dentre as combinações presentes nas tabelas 3-5 encontram-se em DL ($p < 0,05$). Em muitos casos, os valores de D' são elevados, enquanto os valores de r^2 são bem baixos. Isso ocorre devido ao fato do valor de r^2 refletir também as frequências dos alelos. Por exemplo, o haplótipo B*08-C*07 (frequência de 6%) apresentou D' muito alto e r^2 muito baixo, porque o grupo alélico C*07, que apresentou frequência de 25%, ocorre com outros alelos de *HLA-B*, além do grupo B*08, o qual revelou frequência de apenas

6%.

Sabe-se, porém, que combinações particulares dos genes ocorrem com frequência maior do que combinações aleatórias ⁽²³⁾. No presente estudo, foi constatada a frequência do haplótipo A*01-B*08-DRB*03 em 2,9%. A frequência deste haplótipo é muito próxima ao registrado no *website* “*AlleleFrequencies*” para uma amostra de indivíduos de Portugal que identificou uma frequência de 3%. O haplótipo A*03-B*07- DRB1*15, segundo mais frequente no presente estudo (1,9%), foi observado também em Portugal (1%).

Ruiz *et al.* (2005), em avaliação de perfil haplotípico de doadores de medula óssea da região de Curitiba-PR, observaram que o haplótipo mais frequente foi o HLA-A*01-B*08-DRB1*03 (2,4%), descrito como um haplótipo tipicamente europeu. O haplótipo A*02-B*44 apresentou nesta amostra 3,5% de frequência ⁽¹⁷⁾ e no presente estudo 4,7%, o que demonstrou que a amostra do LI é predominantemente de origem europeia.

Bortolotto *et al.* (2012) encontrou em doadores de medula óssea no Rio Grande do Sul que os haplótipos mais comuns foram o A*01-B*08-DRB1*03 (2.8%), A*29- B*44-DRB1*07 (1.6%) e A*03-B*07-DRB1*15 (1.3%), apresentando concordância com resultados reportados no estado do Paraná, também atingiram valores de frequência haplotípicas bastante similares aos encontrados na população do presente estudo entre os *loci* HLA-A-B-DRB1 ⁽¹⁹⁾.

Utilizando dados do *website* “Rede Brasil de Imunogenética” ⁽²⁵⁾, o qual contém dados de frequências alélicas e haplotípicas na população brasileira, foi possível observar que na região sul do país, nos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul, o haplótipo A*01-B*08-DRB1*03 apresentou frequências de 2,7% e 3,1%, frequências semelhantes a encontrada no presente estudo para este haplótipo (2,9%).

O único estudo encontrado sobre frequências haplotípicas para os genes *HLA-DQB1* e *DPB1* foi um artigo publicado por Kawashima *et al.* (2012), em indivíduos japoneses, na amostra de 418 indivíduos, o haplótipo A*33:03-B*44:03-C*14:03-DRB1*13:02-DQB1*06:04-DPB1*04:01 (4,4%) foi o mais frequente. Na população do presente estudo foi realizada a pesquisa de haplótipos HLA-DQB1-DPB1 e entre esses, o haplótipo DQB1*06-DPB1*04 apresentou-se como o terceiro mais frequente para a essa combinação de *loci* ⁽²⁶⁾. Um artigo publicado de Baisch e Capra (1993) demonstrou através de cálculos de desequilíbrio de ligação entre HLA-DQ e -DP que a associação entre eles é fraca ⁽²⁷⁾.

Através do presente trabalho foi possível traçar um perfil dos genes HLA dos doadores de células tronco-hematopoiéticas do banco de dados do LI do CHC-UFPR, mediante obtenção de frequências alélicas e haplotípicas dos genes *HLA*. Os alelos e haplótipos mais

frequentemente encontrados nesta população de doadores são característicos de populações europeias, o que é justificável sabendo a respeito dos fluxos migratórios que ocorreram de diversas regiões do globo, em especial de países europeus, para a região sul do Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Voltarelli JC, Stracieri ABPL. **Aspectos imunológicos dos transplantes de células tronco hematopoiéticas**. Simpósio: Transplante de Medula Óssea – 2ª parte, capítulo XII. Ribeirão Preto; 2000. 443 p.
2. Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME). **O que é o transplante de medula óssea**. [Acesso em 23/03/2017]. Disponível em: <http://redome.inca.gov.br/medula-ossea/o-que-e-o-transplante-de-medula-ossea/>
3. Meinerz C, Chagas M, Dalmolin LC, SilveiraMDP, Cavalhero F, Ferreira LAP, et al. **Avaliação do percentual de compatibilidade HLA entre membros da mesma família para pacientes à espera de transplante de medula óssea em Santa Catarina, Brasil**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2008;30(5): 359-362.
4. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Perguntas e respostas sobre transplante de medula óssea**. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/orientacoes/site/home/perguntas_e_respostas_sobre_transplante_de_medula_ossea. Acesso abril/2017.
5. Oliveira, RAF. **Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) na avaliação imunológica para seleção de receptor-doador para transplantes [tese]**. Pós-Graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2014; p.9.
6. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu; 2013.
7. Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia Básica: Função e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
8. Pereira NF, Oliveira DCM, Torres M, Rodrigues CA, Alencar ISB, Salomão I, et al. **Seleção de doador de medula óssea ou sangue periférico**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010; 32(Suppl 1): 03-05.
9. Santis D, Dinauer D, Duke J, Erlich HA, Holcomb CL, Lind C, et al. **16IHIW HLA typing by NGS: Workshop review**. Int J Immunogenet. 2013; 40 (Suppl 1): 72-76.
10. Torres M, Oliveira DCM, Pereira NF, Alencar ISB, Rodrigues CA, Salomão I, et al. **Seleção de doador não aparentado**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010; 32(Suppl 1): 06- 07.
11. Morin-Zorman S, Loiseau P, Taupin J-L, Caillat-Zucman S. **Donor-Specific Anti- HLA Antibodies in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. Front. Immunol. 2016; 7:1.
12. Liwski RS, Greenshields AL, Bray RA, Gebel HM. **Becoming a chef in the human leukocyte antigen kitchen: interpretation and modification of human leukocyte antigen-**

antibody assays. Current Opinion In Organ Transplantation. 2017; 22(4): 1-3.

13. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: **A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** Molecular Ecology Resources. 2010; 22:564.

14. Braun-Prado, K., Vieira Mion, A. L., Farah Pereira, N., Culpi, L., Petzl-Erler, M. L. **HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population.** Tissue antigens 2000; 56(5): 417-427.

15. Ruiz, TM. **A estrutura organizacional do Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea (REDOME) e o perfil HLA de doadores voluntários de Curitiba.** [monografia]. Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. 2004; p.4.

16. Harada, NY. **Imigração Japonesa na fotografia. Memórias e sociabilidades.** [monografia]. Curso de História, Setor de Ciências Humanas, Letras e Artes, Universidade Federal do Paraná. 2013; p.21.

17. Ruiz TM, Costa SMCM, Ribas F, Luiz PR, LIMA SS, BICALHO MG. **Human Leukocyte Antigen Allelic Groups and haplotypes in a Brazilian Sample of Volunteer Donors for Bone Marrow Transplant in Curitiba, Paraná, Brazil.** Transplantation Proceedings. 2005; p.2293-95.

18. Roque LS, Junior RT, Loffredo LCM. **Genetic diversity among volunteer donors of bone marrow in southeastern Brazil, according to the HLA system.** São Paulo Med J. 2014;132(3). p.159-60.

19. Bortolotto AS, Petry MG, Silveira JG, Raya ARF, Fernandes SR, Neumann J, et al. **HLA-A, -B and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil.** Human Immunology. (73). 2012; p.180-5.

20. Nakaoka H, Mitsunaga S, Hosomichi K, Shyh-Yuh L, Sawamoto T, Fujiwara T. **Detection of Ancestry Informative HLA Alleles Confirms the Admixed Origins of Japanese Population.** PLoSONE. 8(4). 2013; 1-5.

21. Tu B, Mack SJ, Lazaro A, Lancaster A, Thomson G, Cao K, et. al. **HLA-A, -B, - DRB1 allele and haplotype frequencies in an African American population.** Tissue Antigens. 2007. p.76-8.

22. Vina MAF, Hollenbach JA, Lyke KE, Sztein MB, Maiers M, Klitz W, et.al. **Tracking human migrations by the analysis of the distribution of HLA alleles, lineages and haplotypes in closed and open populations.** Phil Trans R Soc B. (367).2012; p.820-22 23.

23. Ridley M. **Evolução.** 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

24. Oliveira IB. **Desequilíbrio de ligação e análise de seleção genômica em cana-de- açúcar.** [dissertação]. Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás. 2014; 21-24.

25. **Rede Brasil de Imunogenética.** Disponível em: <http://imunogenetica.org/>. Acesso em junho/2018.
26. Kawashima M, Ohashi J, Nishida N, Tokunaga K. **Evolutionary Analysis of Classical HLA Class I and II Genes Suggests That Recent Positive Selection Acted on DPB1*04:01 in Japanese Population.** PLoS ONE. 7(10). 2012; 3-5.
27. Baisch J.M, Capra JD. **Linkage Disequilibrium within the HLA Complex does not extend into HLA-DP.** Scand J Immunol. 37. 1993; p.449-502.