



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Camila Ravazzi Gauch

**Diversidade de Alelos e Haplótipos HLA-A,
-B e -DRB1 em uma Amostra de Candidatos
a Transplante Renal no Brasil**

**São José do Rio Preto
2015**

Camila Ravazzi Gauch

**Diversidade de Alelos e Haplótipos HLA-A,
-B e -DRB1 em uma Amostra de Candidatos
a Transplante Renal no Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de
Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Co-orientadora: Prof^a Dra. Heloisa Cristina Caldas

São José do Rio Preto
2015

Ravazzi-Gauch, Camila

Diversidade de alelos e haplótipos HLA-A, -B e -DRB1 em uma amostra de candidatos a transplante renal no Brasil/Camila Ravazzi Gauch

São José do Rio Preto, 2015.

74p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Heloisa Cristina Caldas

1. Alelos HLA; 2. Polimorfismo HLA; 3. População Brasileira 4. Transplante

Camila Ravazzi Gauch

**Diversidade de Alelos e Haplótipos HLA-A,
-B e -DRB1 em uma Amostra de Candidatos
a Transplante Renal no Brasil**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mário Abbud Filho

1º Examinador: Prof.^a Dr.^a Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Marcela Pinhel

Suplentes: Prof.^a Dr.^a Ida Maria Maximina Fernandes

Prof.^a Dr.^a Érika Cristina Pavarino Bertelli

São José do Rio Preto, 03 de dezembro de 2015

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	01
Objetivos.....	17
2. Materiais e Métodos.....	18
3. Resultados.....	26
4. Discussão.....	35
5. Conclusões.....	40
6. Referências Bibliográficas.....	42
7. Anexos.....	51
Anexo 1. Artigo Científico.....	52

Ao meu avô Gercy José Ravazzi (in memoriam)

Aquele que sempre será meu maior exemplo de amor, ternura e bondade. Agradeço a ti por todo amparo e amor dedicado a mim e à minha família em todos os momentos de nossas vidas. Agradeço ainda, pelos valiosos ensinamentos e por ter contribuído de maneira tão grandiosa para minha formação moral e intelectual. Muito obrigada por ter sido esse avô tão maravilhoso, e que acima de tudo sempre foi um pai e um grande amigo, sem o qual eu jamais teria chegado até aqui.

Ao meu pai Luiz Antônio Ribeiro Froio (in memoriam)

Que incondicionalmente me amou, me incentivou e me encorajou diante de todos os meus sonhos e nunca mediu esforços para me proporcionar as melhores condições para que eles pudessem se realizar. Agradeço a ti por todos os ensinamentos e, principalmente por me ensinar os verdadeiros valores da vida.

Sempre será o maior exemplo de paciência, perseverança e coragem que levarei por toda minha existência. Hoje você é o anjo da guarda de nossa família e com toda certeza eu não teria chegado até aqui sem a sua presença e todo seu amor.

Muito obrigada, com eterna gratidão e infinito amor.

Agradecimentos

A Deus

Por me permitir o direito da existência. Por me guiar no caminho da perseverança, da alegria e do amor. Por todo discernimento nos momentos de dúvidas, força e coragem nos momentos de dificuldades, e amparo nos momentos de dor.

À minha mãe Mônica Cristina Wolf Ravazzi

Aquela que sempre será o meu maior exemplo de força e perseverança. Por me ensinar os verdadeiros valores morais que levarei por toda minha vida. Por me ensinar a jamais desistir e sempre estar ao meu lado, comemorando cada vitória e me fortalecendo e confortando meu coração diante de todas as dificuldades. Muito obrigada por todo amor, carinho e cuidado.

Aos meus irmãos Monize Ravazzi Gauch e Augusto Ravazzi Froio

Por estarem ao meu lado em todos os momentos de minha vida, me auxiliando e, principalmente, me ensinando a levar a vida com mais calma, alegria e esperança. Muito obrigada por todo amor, carinho e amizade.

À minha avó Therezinha Wolf Ravazzi

Pelos ensinamentos de vida, apoio e cuidado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Por confiar em meu trabalho e permitir que esse projeto fosse realizado. Por compartilhar comigo todo o seu conhecimento e profissionalismo, contribuindo grandiosamente para o meu crescimento profissional. Muito obrigada por toda orientação, sabedoria e auxílio. A quem sempre terei eterna gratidão, admiração, respeito e consideração.

À minha grande amiga e co-orientadora Prof^a Dr^a. Heloisa Cristina Caldas

Por estar ao meu lado em todos os momentos, com todo seu carinho e amizade, me recebendo sempre de maneira tão gentil e atenciosa. Por todos os ensinamentos compartilhados, extremamente valiosos para minha formação profissional. Muito obrigada por confiar em meu trabalho e ter me proporcionado oportunidades maravilhosas sem as quais eu jamais teria chegado até aqui. Sempre serei eternamente grata por todos os seus ensinamentos e sincera amizade.

Ao Miklos Maximiliano Bajay

Por todo apoio e suporte disponibilizado durante a realização de todas as análises estatísticas desse trabalho.

À minha querida amiga Carla Renata Graça

Por estar ao meu lado nos primeiros passos dessa minha caminhada, me auxiliando em todos os momentos e sempre me recebendo com muito carinho. Muito obrigada por todo apoio, ensinamentos e amizade.

A todos os amigos, integrantes da família LITEX - Laboratório de Imunologia e Transplante Experimental

Às minhas queridas amigas Camila Montoro Mazeti Felício, Greiciane M. da Silva Florim, Priscila Mata Camargo, Brenda Caroline Violin, Cinthia Dias e Glória Elisa Florido Mendes, por toda amizade, auxílio, carinho e companheirismo. Muito obrigada por todos os ensinamentos compartilhados durante essa caminhada e, principalmente por me proporcionarem momentos de tantas alegrias.

A todos os amigos, integrantes do IUN – Instituto de Urologia e Nefrologia

*Às minhas queridas amigas Fabiana O. De Mauro, Regiane Dias, Rosimeire Rueda
Plaza e Luciana Juliano Felix, pela amizade e pelos melhores momentos de convívio,
companheirismo e alegrias.*

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

*Agradeço a todos os funcionários desta Instituição, especialmente a toda equipe da
Pós-Graduação, pela atenção e disponibilidade.*

*“E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.
E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.
E quando trabalhais com amor, vós vos unis a vós próprios
e uns aos outros, e a Deus.
O trabalho é o amor feito visível.”
Gibran Khalil Gibran*

*“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”
Guimarães Rosa*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alelos e haplótipos HLA mais freqüentes (%) em diferentes populações brasileiras.....	17
Tabela 2.	Padrão de Leitura ASHI e respectiva interpretação de morte celular.....	22
Tabela 3.	Programação da PCR.....	24
Tabela 4.	Frequências alélicas e fenotípicas para o <i>locus</i> HLA-A observadas na amostra total	27
Tabela 5.	Frequências alélicas e fenotípicas para o <i>locus</i> HLA-B observadas na amostra total	28
Tabela 6.	Frequências alélicas e fenotípicas para o <i>locus</i> HLA-DRB1 observadas na amostra total.....	29
Tabela 7.	Frequências alélicas para os <i>loci</i> HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 na amostra total (n=2.624) e sua comparação entre os diferentes grupos étnicos.....	30
Tabela 8.	Frequência dos dez haplótipos HLA-A, -B e -DRB1 mais comuns observados na amostra total e nos diferentes grupos étnicos.....	32
Tabela 9.	Frequência dos dez haplótipos HLA-A:HLA-B, HLA-A:HLA-DRB1 e HLA-B :HLA-DRB1 mais comuns e seus respectivos valores de desequilíbrio de ligação na amostra total e nos diferentes grupos étnicos.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do cromossomo 6 humano destacando a estrutura gênica do MHC.....04

Figura 2. Representação esquemática da molécula MHC de classe I, destacando a fenda de ligação de peptídeos06

Figura 3. Representação esquemática da molécula MHC de classe II, destacando a fenda de ligação de peptídeos.....08

Figura 4. Representação esquemática da molécula MHC de classe III.....09

Figura 5. Representação da progressão do número de alelos HLA identificados na população mundial no período de 1987 até junho de 2015.....15

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABH	- Associação Brasileira de Histocompatibilidade
ASHI	- <i>American Society for Histocompatibility and Immunogenetics</i>
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Fa	- Frequência alélica
Ff	- Frequência fenotípica
HLA	- <i>Human Leucocyte Antigen</i>
IRC	- Insuficiência Renal Crônica
LTA	- Linfotoxina Alfa
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	- <i>Natural Killer</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SNT	- Sistema Nacional de Transplante
PCR-SSP	- <i>Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Primers</i>
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
WHO	- <i>World Health Organization</i>

RESUMO

Introdução: As moléculas HLA (*Human Leucocyte Antigens*) são proteínas codificadas por genes altamente polimórficos e estão envolvidas no processo de resposta imunológica. Os polimorfismos dos genes HLA diferem entre as populações, tanto na frequência como na presença ou ausência de alelos e haplotipos específicos, Considerando-se que a distribuição de órgãos para transplante depende da compatibilidade HLA entre doador e receptor, o conhecimento e determinação do polimorfismo HLA são de grande importância no processo de alocação de órgãos para transplantes, além de ser uma importante ferramenta em estudos populacionais.

Objetivos: 1) Determinar as frequências alélicas para os *locus* HLA-A, -B e -DRB1 em uma amostra de candidatos a transplante renal no Brasil. 2) Determinar os haplótipos HLA mais frequentes nessa amostra. 3) Comparar as diferenças de frequências alélicas e haplotípicas entre os grupos de caucasóides e negros da população analisada.

Materiais e Métodos: As frequências alélicas e haplotípicas para os *locus* HLA-A, -B e -DRB1 foram analisadas em uma amostra de 2.624 candidatos a transplante renal e classificadas de acordo com o grupo étnico (2.347 Caucasóides e 277 Negros). As especificidades HLA de classe I (AB) e de classe II (DR) foram determinadas de acordo com a técnica Microlinfocitotóxica Dependente de Complemento (CDC) e *Polymerase Chain Reaction - Sequence-specific Primers* (PCR-SSP), respectivamente. **Resultados:** Considerando a amostra total, todos os *loci* estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Foram identificados 21 grupos de alelos para o *locus* HLA-A, 34 para HLA-B e 13 para HLA-DRB1. Os alelos mais frequentes para cada *locus* foram HLA-A*02, HLA-B*35 e HLA-DRB1*11. O haplótipo mais frequente foi A*01 B*08 DRB1*03 entre a amostra de Caucasóides e A*29 B*44 DRB1*07 entre a amostra de

Negros. **Conclusões:** Os alelos HLA mais frequentes na população de candidatos a transplante renal foram HLA-A*02, HLA-B*35 e HLA-DRB*11. O haplótipo mais comum foi A*01 B*08 DRB1*03. Esse mesmo haplótipo foi o mais frequente na amostra de Caucasóide da população analisada enquanto que, A*29 B*44 DRB1*07 foi o mais comum na amostra de Negros.

Palavras-chave: Antígenos HLA; Polimorfismo HLA; População Brasileira; Transplante.

ABSTRACT

Introduction: The HLA (*Human Leukocyte Antigen*) molecules are proteins encoded by genes highly polymorphic and are involved in the immune response process. Polymorphisms of HLA genes differ between populations, both in frequency and in the presence or absence of specific alleles and haplotypes. Considering that the distribution of organs for transplant depends on HLA matching between donor and recipient, the knowledge and determination of the HLA polymorphism are of great importance in the process of allocation of organs for transplantation. Moreover, the knowledge of the HLA diversity is an important tool for studies of the origin of populations. **Objectives:** This study aimed to characterize the allele and haplotype frequencies of HLA-A, -B, and -DRB1 in a cohort of renal transplant candidates populations in the region of São José do Rio Preto (State of São Paulo), to compare the allele frequencies between Caucasian and Black in that region, as well as to compare these frequencies with different Brazilian populations reported. **Materials and Methods:** The HLA-A, -B, and -DRB1 allele and haplotypes frequencies were analyzed in a sample of 2.624 individuals and classified according to the ethnic group (2.347 Caucasians and 277 Blacks). The HLA class I (A, B) and class II (DRB1) specificities were determined by Complement-Dependent Microlymphocytotoxic (CDC) and Polymerase Chain Reaction/Sequence Specific Priming (PCR-SSP) methods, respectively. **Results:** All *loci* studied were in Hardy–Weinberg Equilibrium ($p>0.05$). Twenty-one HLA-A, 34 HLA-B and 13 HLA-DRB1 allelic groups were identified. The most frequent alleles for each *locus* were HLA-A*02, HLA-B*35, and HLA-DRB1*11. The most frequent haplotypes found were A*01 B*08 DRB1*03 among Caucasians and A*29 B*44 DRB1*07 among Blacks. **Conclusions:** The most common alleles for each locus among

the renal transplant candidates were A*02, B*35 and DRB1*11. The most common haplotype was A*01 B*08 DRB1*03. The same haplotype was the most frequent in Caucasoid sample while the haplotype A*29 B*44 DRB1*07 was the most common in the Blacks sample.

Keywords: HLA Antigens; HLA Polymorphism; Brazilian Population; Transplantation.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descoberta do Complexo Principal de Histocompatibilidade

O Complexo Principal de Histocompatibilidade ou MHC (*Major Histocompatibility Complex*) é uma região cromossômica formada por um conjunto de genes altamente polimórficos que codificam proteínas envolvidas na apresentação de antígenos e no reconhecimento por receptores de linfócitos T em processos de resposta imunológica.¹ Nos seres humanos este complexo gênico recebeu a denominação de HLA (*Human Leucocyte Antigens*) e refere-se ao conjunto de genes localizado no braço curto do cromossomo 6, englobando uma região cromossômica de 4 milhões de pares de bases de DNA.²

A primeira descrição do MHC ocorreu em 1936, e resultou de experimentos de transplantes de tecidos entre camundongos realizados por Peter Gorer e George Snell. Esses estudos demonstraram a existência de um grupo de antígenos envolvidos nos processos de rejeições dos transplantes denominados de antígenos de histocompatibilidade.^{3,4} Os produtos desse sistema gênico constituíram a principal barreira imunológica e o sucesso dos transplantes dependeria então do grau de similaridade entre doador e receptor para determinados antígenos.³⁻⁶

O MHC Humano só viria a ser descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e Van Rood, quando realizaram estudos sorológicos em pacientes politransfundidos e observaram que pessoas submetidas a transfusões sanguíneas aglutinavam leucócitos dos seus respectivos doadores. Dessa forma, os autores concluíram que transfusões e transplantes provocavam nos receptores a produção de anticorpos contra os leucócitos dos doadores.⁶

Em 1958, Jean Dausset descreveu o primeiro antígeno leucocitário humano, o qual denominou de MAC, em homenagem a três indivíduos voluntários que participaram desses estudos, cujos nomes começavam com as letras M, A e C, respectivamente. Atualmente este antígeno corresponde ao antígeno HLA A-2.⁵⁻⁷ Em 1963, Jon Van Rood e Van Leeuwen publicaram a descoberta de outro gene HLA que atualmente corresponde ao *locus* HLA-B.⁴

Posteriormente, nas décadas de 60 e 70 foi descoberto que os genes do MHC, além de estarem envolvidos na rejeição de transplantes, ainda participavam do processo de respostas imunológicas do organismo.⁴ Várias pesquisas contribuíram para a atualização de descobertas nas áreas de imunogenética e histocompatibilidade. 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 *locus* HLA.⁸

1.2. Estrutura e Expressão das Moléculas do MHC Humano

As moléculas HLA foram inicialmente estudadas devido a sua habilidade em conferir tolerância aos transplantes de tecidos e órgãos, no entanto, após inúmeros estudos e experimentos, verificou-se a importância dessas moléculas na participação das respostas imunológicas. Dessa forma, inúmeras características importantes relacionadas à estrutura e expressão dessas moléculas devem ser consideradas.^{9,10}

De acordo com a sua localização cromossômica, bem como estrutura e função dos produtos moleculares aí codificados, o MHC humano foi subdividido didaticamente em três regiões: classe I, classe II e classe III (Figura 1).¹¹

As regiões de classe I e II são altamente poligênicas e polimórficas e codificam dois grupos de proteínas estruturalmente distintas. A região de classe III encontra-se localizada entre as regiões de classe I e II e contém um grupo de genes cujos produtos estão envolvidos nas respostas inflamatórias.¹²

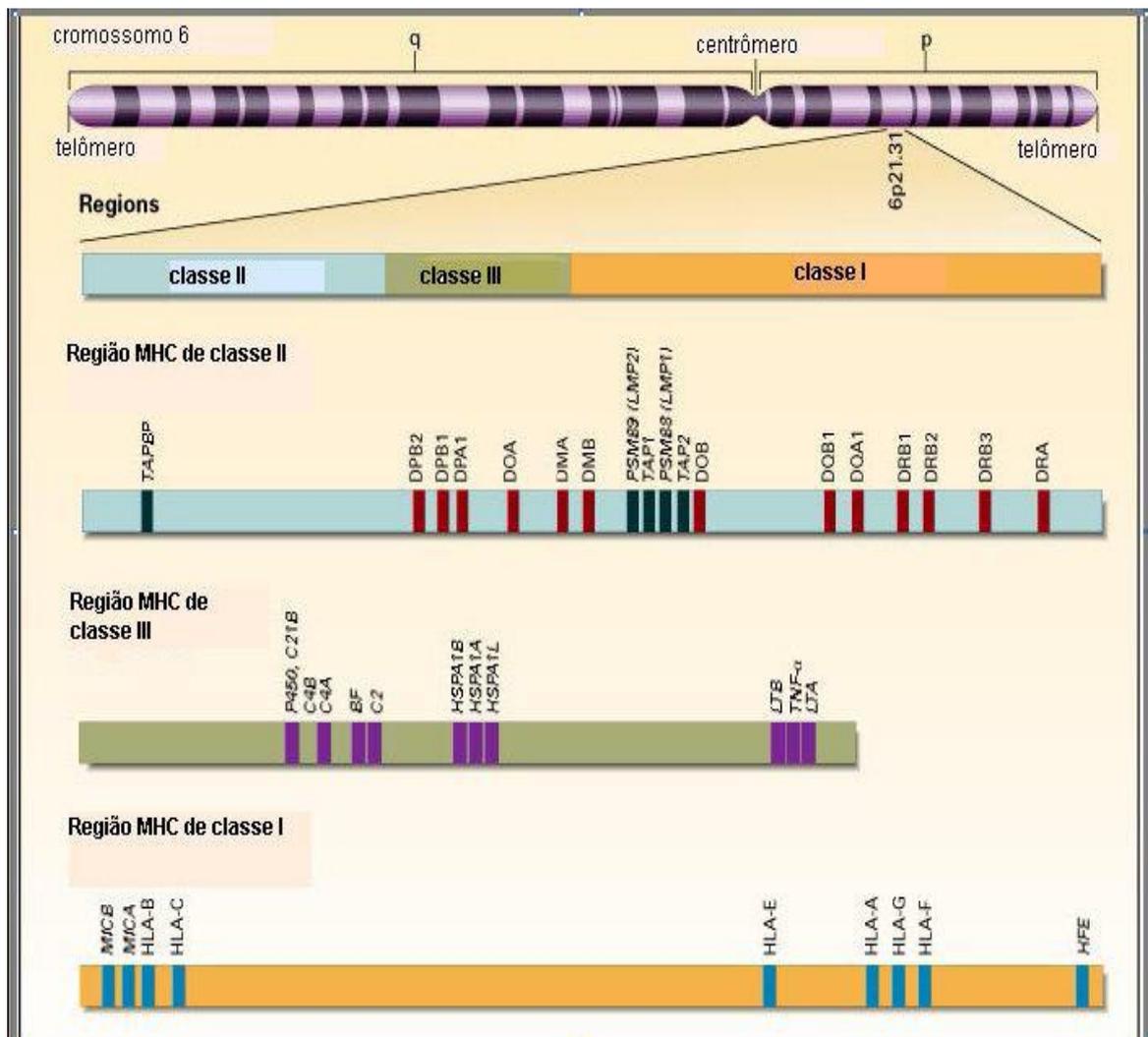


Figura 1. Representação esquemática do cromossomo 6 humano, destacando a estrutura gênica do MHC (adaptado de Klein; Sato, 2000).

1.2.1. MHC Classe I

A região de classe I possuiu 1,8 Mb de extensão e constitui a região mais telomérica do MHC.¹² Essa região é constituída pelos genes HLA-A, HLA-B e HLA-C, também conhecidos como genes HLA de classe I clássicos, e pelos genes HLA-E, HLA-F e HLA-G, conhecidos como genes não clássicos. Esses últimos são considerados pouco polimórficos e possuem distribuição limitada a certos tecidos.^{4,13}

As moléculas HLA de classe I são polipeptídeos heterodímeros compostos por uma cadeia pesada variável transmembrana hidrofóbica, denominada cadeia α , associada não covalentemente a uma molécula β_2 -microglobulina (cadeia leve), pequena proteína extracelular solúvel, não polimórfica, codificada fora da região do MHC, no cromossomo 15. A cadeia α possui de 44 a 47 kD e é formada por 3 domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$).^{14,15}

O grande polimorfismo dessas moléculas é observado nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, sendo o domínio $\alpha 3$ basicamente não polimórfico. Os domínios aminoterminais ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) compõem a fenda de ligação de peptídeos das moléculas de classe I, responsável pela ligação de antígenos intracelulares de 8 a 10 aminoácidos.⁴

O segmento $\alpha 3$ da cadeia se dobra para formar um domínio, cuja seqüência de aminoácidos é a mesma encontrada em todas as moléculas de classe I. Esse segmento apresenta uma alça que funciona como sítio para a ligação ao receptor CD8+ das células T. As extremidades da fenda de ligação de peptídeos das moléculas de classe I são fechadas, impedindo assim, a ligação de peptídeos maiores, que necessitam ser processados em fragmentos menores para que possam se ligar às moléculas do MHC e serem, então, reconhecidos pelas células T (Figura 2).⁴

Os genes de classe I caracterizam-se por codificarem uma diversidade de glicoproteínas de membrana, envolvidas em mecanismos importantes da resposta imune celular.⁴

Expressas constitutivamente em quase todas as células nucleadas do organismo, as moléculas de classe I desempenham função na apresentação de antígenos para as células T CD8+ que, ao reconhecerem os peptídeos endógenos apresentados por essas moléculas, desencadeiam uma reação citotóxica, lisando a célula alvo por meio de proteínas citoplasmáticas.¹⁶ Além disso, as moléculas de classe I estão envolvidas na modulação dos linfócitos circulantes e no controle da atividade citotóxica das células NK (*Natural Killer*).^{17,18}

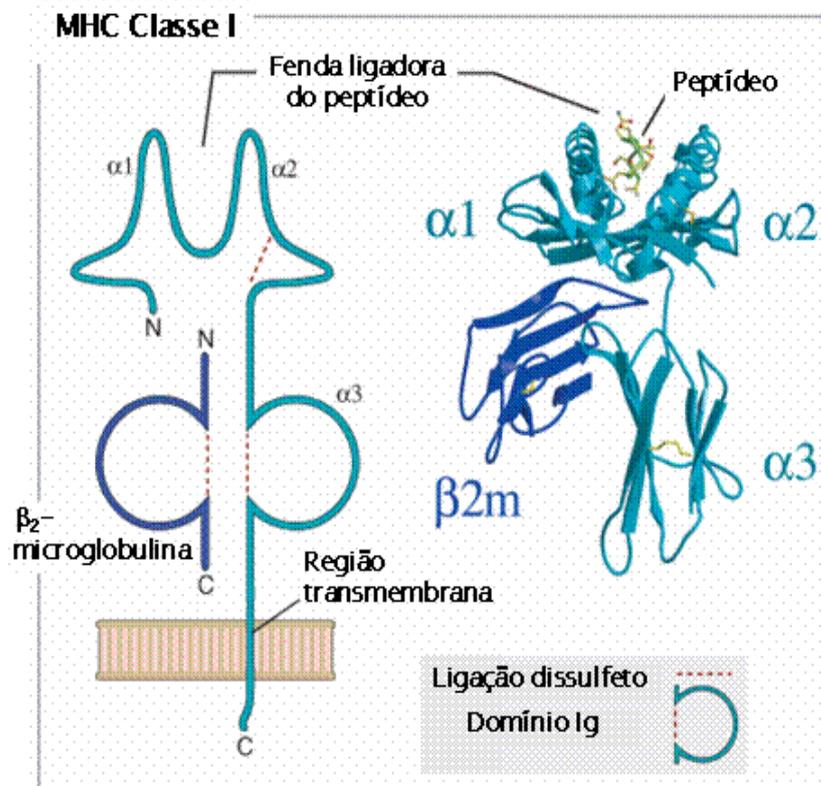


Figura 2. Representação esquemática da molécula MHC de classe I, destacando a fenda de ligação de peptídeos (adaptado de Abbas; *et. al.*,2002).

1.2.2. MHC Classe II

Os genes de classe II localizam-se na porção mais centromérica do MHC e ocupam cerca de 700 Kb. Aproximadamente 30 *loci* já foram descritos nessa região, entre eles os genes HLA-DQ, DP, DR, DM e DO.¹³

As moléculas de classe II são heterodímeros constituídos por duas cadeias glicoprotéicas, uma cadeia α e uma cadeia β , que se unem de forma não covalente. As cadeias α e β são codificadas por genes localizados no cromossomo 6 e são compostas, respectivamente, por 229 e 237 aminoácidos. Além disso, ambas as cadeias são formadas por três regiões: uma região extracelular hidrofílica, uma região transmembrana hidrofóbica e uma região intracelular hidrofílica.¹⁹

A região hidrofílica extracelular da cadeia α apresenta dois domínios, designados, respectivamente, de $\alpha 1$ e $\alpha 2$. O mesmo é observado na região hidrofílica extracelular da cadeia β , que também apresenta dois domínios denominados, respectivamente, de $\beta 1$ e $\beta 2$. Os segmentos aminoterminais $\alpha 1$ e $\beta 1$ interagem para formar a fenda de ligação de antígenos. Nas moléculas de classe II, as extremidades da fenda estão abertas, permitindo a ligação de peptídeos com 30 aminoácidos ou mais.^{15,19}

Os genes de classe II codificam a expressão de proteínas das cadeias α e β de cinco tipos de moléculas: HLA-DR, -DQ, -DP, -DM e -DO e a nomenclatura desses genes é designada por A ou B, segundo a codificação da cadeia α ou β , respectivamente. Por exemplo, HLA-DRA codifica cadeias α , bem como, HLA-DRB codifica cadeias β (Figura 3).^{1,14,15}

As moléculas HLA de classe II são expressas principalmente nas células apresentadoras de antígenos especializadas, como as células dendríticas, os macrófagos, e os linfócitos B, além de alguns outros tipos celulares, como as células endoteliais e as

células epiteliais do timo.²⁰ Essas moléculas apresentam peptídeos, derivados de microorganismos e proteínas extracelulares, aos linfócitos auxiliares TCD4+, desempenhando um papel relevante no reconhecimento de antígenos.¹⁶

As células T-CD4+ secretam citocinas capazes de recrutar e ativar um grande número de células efetoras, principalmente macrófagos e linfócitos T e B. A ativação dos linfócitos T-CD4+ tem múltiplos efeitos, propiciando a diferenciação e a proliferação dos linfócitos B, que levam à produção de anticorpos e permitem que os linfócitos T se diferenciem para as funções efetoras.^{16,18}

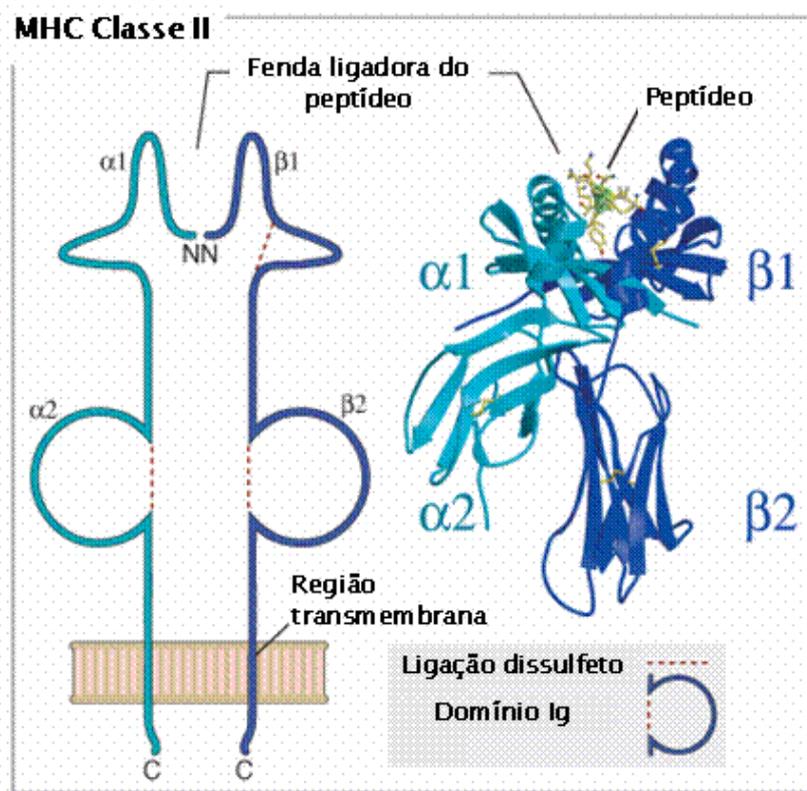


Figura 3. Representação esquemática da molécula MHC de Classe II, destacando a fenda de ligação de peptídeos (adaptado de Abbas; *et. al.*,2002).

1.2.3. MHC Classe III

A região MHC de Classe III, localizada entre as regiões de classe I e II, estende-se por uma região de 900Kb, codificando aproximadamente 70 polipeptídeos diferentes.²¹

Os genes de classe III apresentam funções variadas, destacando-se os genes responsáveis pela codificação de proteínas solúveis envolvidas na modulação e regulação da resposta imune, genes relacionados à ativação do sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) e da *21-hidroxilase*, *TNF* (Fator de Necrose Tumoral) e *LTA* (Linfotoxina alfa), os quais codificam, respectivamente, as citocinas $TNF-\alpha$ e $LTA-\alpha$, além de genes que codificam proteínas envolvidas com a resposta ao choque térmico (Figura 4).^{12,22}

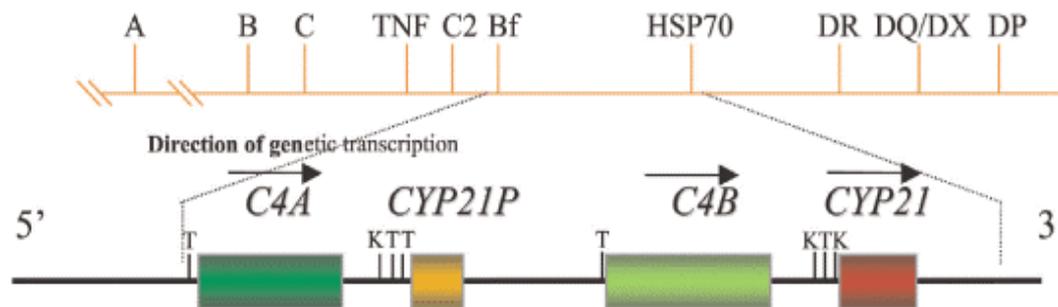


Figura 4. Representação esquemática da Molécula MHC de classe III (adaptado de Alberts, et. al., 2002).

1.3. Sistema HLA e Transplantes

A resposta imune entre receptor e doador é uma grande limitação ao êxito dos transplantes, uma vez que o enxerto pode ser reconhecido como estranho, resultando em rejeição.⁴

Os produtos antigênicos das moléculas HLA são os principais determinantes da rejeição ou aceitação de órgãos e tecidos em transplantados, já que a distribuição de órgãos depende da compatibilidade entre doador e receptor. Desse modo, a necessidade de se entender melhor o impacto do sistema HLA na sobrevida de órgãos e tecidos transplantados motivou o desenvolvimento do conhecimento sobre os genes e proteínas deste sistema, contribuindo para melhor compreensão e evolução dos transplantes de órgãos.^{4,23}

Em relação aos pacientes com Insuficiência Renal Crônica (IRC), o transplante renal é a forma de tratamento mais adequada.^{23,24} Dessa forma, quando se comparam transplantes renais com doador vivo parente e transplantes renais com doador falecido, por exemplo, verificamos que a sobrevida do enxerto a curto e em longo prazo é superior quando o doador é irmão HLA idêntico, comparado ao transplante com doador HLA haploidêntico, ambos com melhor êxito se comparados aos transplantes com irmãos HLA distintos e/ou doadores falecidos.²⁵

Após a criação do Sistema Nacional de Transplantes, deu-se início o processo de organização de Listas Únicas de Receptores, criação de Centrais Estaduais de Transplante, cadastramento de serviços e equipes especializadas e estabelecimento de critérios para o funcionamento do Sistema. Neste contexto, a partir de janeiro de 2002, a compatibilidade HLA foi introduzida como critério principal para seleção de receptores inscritos para transplante renal.²⁶

Desse modo, o estudo da frequência dos antígenos HLA de uma determinada população torna-se relevante uma vez que possibilita que os receptores sejam inscritos em listas de espera cuja região apresente alelos HLA compatíveis aos seus, diminuindo assim, o tempo em lista.

Além disso, diversos estudos avaliando a sobrevida do transplante renal após a implantação da distribuição de órgãos por compatibilidade HLA verificaram que quanto maior a compatibilidade HLA -A, -B, -DR, maior a sobrevida dos enxertos renais ²⁷, dessa maneira, as implicações da diversidade HLA na aceitação/rejeição de órgãos transplantados torna-se significativa.

1.4. Polimorfismos do Sistema HLA

O complexo HLA é considerado a região mais polimórfica encontrada no genoma humano. ²⁸ Na década de 80, pesquisadores estimaram que a heterozigose pudesse atingir aproximadamente 90% em determinados *locus* desse complexo.²⁹

Inúmeros fatores contribuem para essa variabilidade alélica presente na região MHC, como por exemplo, alta taxa mutacional, migrações humanas e a susceptibilidade individual às doenças.²⁹ É válido ressaltar ainda que, esses mecanismos podem ter atuado simultaneamente ou em diferentes tempos da história evolutiva das espécies, promovendo essa variação genética do MHC. ²⁸

O principal mecanismo responsável pela preservação dos elevados níveis de polimorfismos observados nos genes da região HLA é a seleção sobredominante, que atua favorecendo a manutenção de polimorfismos genéticos em uma determinada população, em oposição à seleção direcional que atua favorecendo um único alelo. Entre os diversos mecanismos inerentes à seleção sobredominante destacam-se “a vantagem dos heterozigotos” e a “seleção dependente da frequência”.³⁰

A “vantagem dos heterozigotos” se baseia na teoria de que esses indivíduos são capazes de reconhecer um maior número de epítopos específicos, apresentando uma vantagem adaptativa em relação aos indivíduos homozigotos. Já, a “seleção dependente

da frequência” se baseia no pressuposto de que os alelos mais raros apresentam uma vantagem seletiva maior em relação aos alelos mais comuns, para os quais os agentes externos podem já ter desenvolvido algum tipo de resistência.^{30,31} Dessa maneira, indivíduos heterozigotos apresentam, teoricamente, maiores chances de responder a maior gama de antígenos patogênicos, resultando em uma resposta imune mais eficiente.^{32,33}

Estudos de rastreamento de alelos de histocompatibilidade em diversos grupos étnicos indicam ainda que, os locais de maior polimorfismo se encontram nas regiões das cadeias α e β , que estão em contato com os peptídeos antigênicos. Uma explicação para essa observação é que a diversidade alélica tenha sido gerada justamente em decorrência da variada interação e exposição aos antígenos externos.^{34,35,36}

1.4.1. Herança dos Alelos HLA

Em razão da proximidade entre os genes do MHC, a combinação de alelos de diferentes locos de um único cromossomo costuma ser herdada em conjunto através de uma unidade denominada haplótipo.³⁷

Cada indivíduo apresenta, portanto, dois antígenos HLA para cada *locus*, sendo um de origem materna e outro de origem paterna^{4,37} e no caso de indivíduos irmãos, apresentam 25% de chance de serem genotipicamente idênticos nos *loci* HLA, 50% de chance de serem haploidênticos (compartilharem 1 haplótipo) e 25% de chance de serem distintos, ou seja, não compartilharem nenhum haplótipo.^{18,37}

Além disso, os genes do MHC são expressos de forma co-dominante em cada indivíduo. Dessa forma, cada pessoa expressa ambos os alelos que são herdados dos

pais, maximizando assim, o número de moléculas HLA disponíveis para apresentar peptídeos às células T.³⁷

1.4.2. Desequilíbrio de Ligação

O desequilíbrio de ligação é caracterizado quando determinadas combinações de alelos ocorrem com uma frequência maior ou menor do que a esperada. Em outras palavras, é um fenômeno que diz respeito a não independência de alelos, ou seja, a uma associação não aleatória.³⁸ Dessa forma, o desequilíbrio de ligação ocorre quando a frequência de um dado haplótipo difere da frequência haplotípica esperada, a qual é obtida através do produto das frequências dos alelos que constituem o haplótipo.³⁹

Diante disso, determinados alelos podem ocorrer com uma frequência menor do que a esperada, indicando que esses alelos se encontram em repulsão ou, podem ocorrer com uma frequência maior do que a esperada, indicando um acoplamento entre esses alelos.³⁸ Por exemplo, uma determinada população apresenta a frequência gênica de 0,14 (14%) para o HLA-A1 e 0,09 (9%) para o HLA-B8, então se espera que HLA-A1 e HLA-B8 estejam presente, no mesmo haplótipo, com uma frequência de 0,0126 (1,26% ou $0,14 \times 0,09$). Entretanto, a frequência observada nessa população é de 0,08 (8%), mais elevada do que a esperada, caracterizando assim, um desequilíbrio de ligação positivo.

As bases exatas para explicar o fenômeno do desequilíbrio de ligação ainda são desconhecidas. Algumas explicações possíveis incluem mutações, migrações e miscigenação racial. O desequilíbrio de ligação apresenta ainda, uma importante aplicação clínica, especialmente na seleção de doadores para transplante. Dessa forma, pacientes com haplótipo em desequilíbrio de ligação possuem maiores chances de

encontrar um doador, uma vez que a frequência desse genótipo é mais comum em determinadas populações.^{1,34,35}

1.5. Sistema HLA e Estudos Populacionais

A maior parte dos genes estruturais no genoma humano possui um alelo predominante que está presente na maioria dos indivíduos. No entanto, quando se trata dos genes HLA de classe I e II, o mesmo não é observado, uma vez que as variações nucleotídicas entre alelos de um mesmo gene HLA podem diferir consideravelmente.⁴⁰

Dessa forma, nota-se que algumas variantes alélicas HLA são restritas ou ausentes em determinados grupos populacionais enquanto outras apresentam variações em suas frequências quando observadas em diferentes populações.^{40,41}

Esta variabilidade nos genes HLA tem sido amplamente investigada em diferentes populações, auxiliando no esclarecimento das suas origens e relações evolutivas. Portanto, a caracterização da diversidade alélica e haplotípica nos principais genes do sistema HLA e as variações nucleotídicas responsáveis pelo alto grau de polimorfismo desses genes, constitui uma ferramenta muito útil para estudos populacionais.^{42,43}

Estudos realizados com amostras de indivíduos de diferentes regiões do mundo revelaram as diferenças existentes em relação a distribuição e frequência de alelos HLA.⁴⁴ As populações indígenas, por exemplo, apresentam polimorfismo de alelos HLA relativamente baixo quando comparadas com outras populações, refletindo o isolamento geográfico dessas populações.⁴⁵

Nas populações miscigenadas, como a brasileira, o polimorfismo provavelmente ocorre devido à agregação de alelos de diferentes grupos étnicos, previamente distantes uns dos outros, cada qual possuindo um conjunto de alelos distintos.⁴⁵ Nas populações

orientais observam-se também características peculiares em relação aos marcadores de susceptibilidade a doenças, diferentes daqueles observados, por exemplo, em indivíduos caucasianos.^{46,47}

A Figura 5 representa a progressão do número de alelos HLA identificados na população mundial no período de 1987 até junho de 2015.

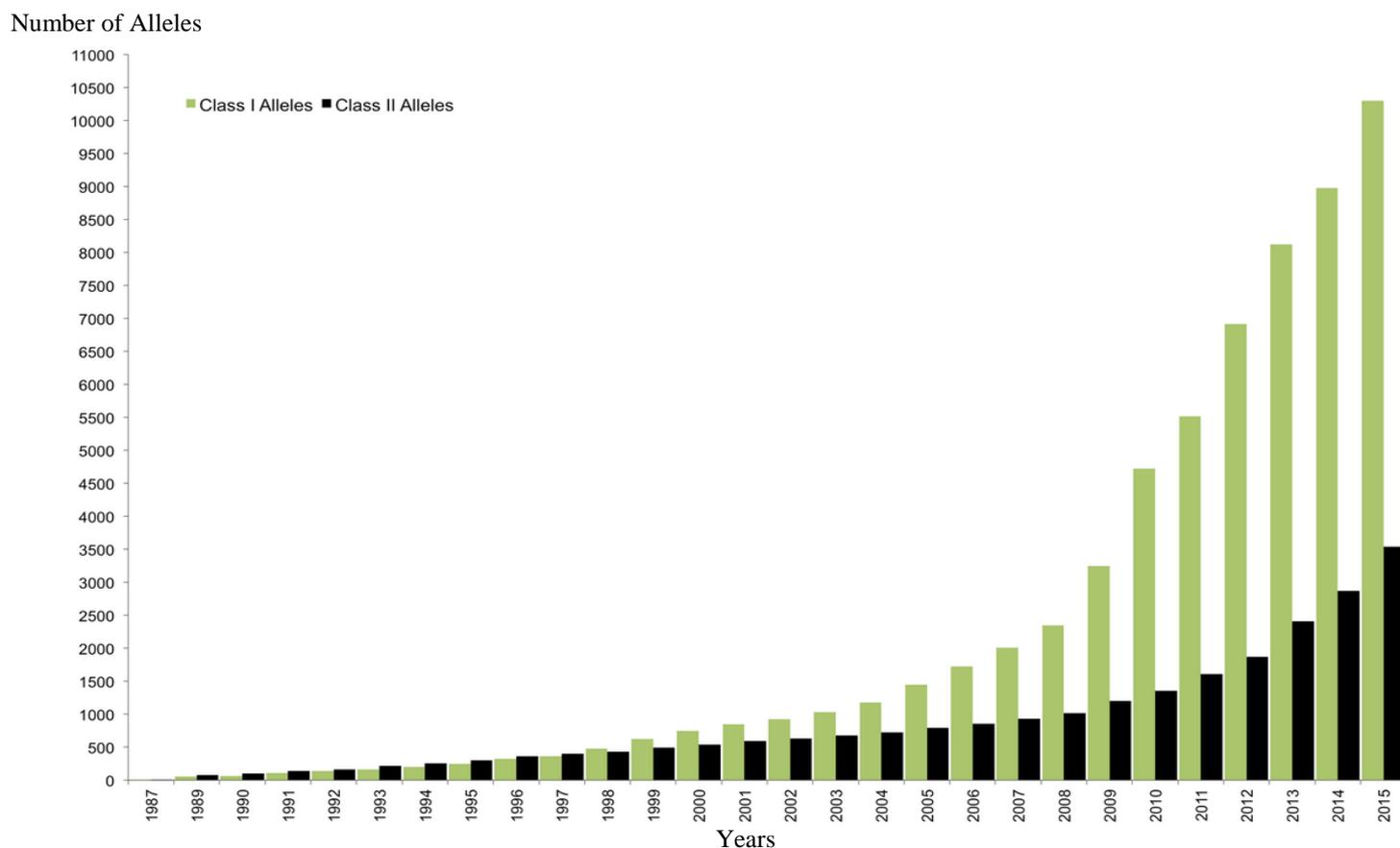


Figura 5. Representação da progressão do número de alelos HLA identificados na população mundial no período de 1987 até junho de 2015. Adaptado de: www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html. Acesso em: 01/07/2015.

1.6. Sistema HLA e a População Brasileira

A população brasileira é muito variável geneticamente, pois foi originada a partir da mistura de diferentes etnias, principalmente de caucasianos, orientais, negros e índios.⁴⁸

Desse modo, a composição de nossa população pode variar consideravelmente de uma região para outra, uma vez que diferentes regiões do país apresentam maior ou menor predominância de cada uma dessas etnias. Conseqüentemente, a freqüência dos antígenos HLA é influenciada pelas etnias predominantes em cada região.^{49,50}

Um estudo sobre a diversidade HLA na população de Teresina/Piauí, por exemplo, revelou que a freqüência das especificidades observadas foi intermediária entre os caucasianos e negros, com pouca participação de genes indígenas.⁵¹

Resultados semelhantes foram observados em outros estudos realizados no estado de Pernambuco, demonstrando que a contribuição de genes europeus e africanos na formação da população do nordeste brasileiro é muito mais relevante do que a do ameríndio.^{52,53}

Vários estudos demonstraram ainda que, um mesmo alelo HLA pode apresentar variações em sua freqüência dependendo da população em análise. O alelo HLA-A2, por exemplo, quando analisado nas populações de Porto Alegre, Curitiba, Rio de Janeiro e Goiânia, apresentou uma freqüência de aproximadamente 30%.^{51,54,55}

Por outro lado, estudos realizados na população de São Paulo, mostraram resultados bastante discrepantes. Salvadori et al.⁵⁶ relataram freqüências desse alelo em torno de 25%⁶⁶, enquanto que Rosales et al.⁵⁷ indicaram freqüências em torno de 50%.

Dessa forma, o conhecimento da freqüência dos antígenos HLA permite uma melhor compreensão da distribuição desses antígenos em cada população, possibilitando ainda a comparação com outros grupos populacionais. Esses dados ainda contribuem para melhor interpretação durante a tipificação dos antígenos HLA realizada para a seleção de doadores de transplantes de órgãos e tecidos já que a distribuição de órgãos é realizada regionalmente.

A Tabela 1 apresenta os dados de algumas publicações a respeito da distribuição HLA em diferentes regiões brasileiras.

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

Região Brasileira	<i>n</i>	Alelos mais freqüentes	(%)	Haplótipo mais freqüente	(%)	Referência
BAURU	3542	A*02	26,3	A*01 B*08 DRB1*03	1,9	<i>Salvadori et al., 2014</i>
		B*35	12,0			
		DRB1*07	14,0			
PIAUI	21,943	A*02	25,5	A*29 B*44 DRB1*07	1,4	<i>Carvalho et al., 2013</i>
		B*15	11,2			
		DRB1*13	13,7			
PARANÁ	3978	A*02	19,8	Não Informado	---	<i>Bardi et al., 2012</i>
		B*35	13,3			
		DRB1*11	14,2			
RIO GRANDE DO SUL	5000	A*02	27,8	A*01 B*08 DRB1*03	2,8	<i>Bortolotto et al., 2012</i>
		B*35	12,0			
		DRB1*13	13,8			
MINAS GERAIS	95	A*02	23,7	A*01:01 B*08:01	3,2	<i>Willians et al., 2004</i>
		B*35	11,0			

1.7. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Determinar as frequências dos grupos alélicos HLA-A, -B e -DRB1 em uma amostra de candidatos a transplante renal no Brasil.
2. Determinar os haplótipos HLA mais freqüentes nessa amostra.
3. Comparar as diferenças de frequências alélicas e haplotípicas entre os grupos de caucasóides e negros da população analisada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização da Amostra

As amostras foram caracterizadas através da análise retrospectiva dos dados de prontuários de 2.624 candidatos a transplante renal, de ambos os gêneros, predominantemente natural e procedente da região de São José do Rio Preto que foram examinados no Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto de Urologia e Nefrologia, na cidade de São José do Rio Preto, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2011.

2.1.2. Grupos Étnicos

A amostra total foi subdividida em dois grupos étnicos: Caucasoídes (n=2.347) e Negros (n=277). A caracterização étnica de cada indivíduo foi feita visualmente com base nos traços fenotípicos, como cor da pele, cabelo, características faciais, e país de origem da família.

Além disso, para cada um dos indivíduos foi preenchida uma ficha clínico-epidemiológica compreendendo dados demográficos e clínicos. Todos esses dados foram, portanto, analisados através do acesso ao banco de dados de prontuários do Laboratório de Imunologia de Transplantes.

2.2. Desenho do Estudo

O estudo foi projetado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução 466/12; Brasil, 2012) e foi encaminhado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP. O Laboratório de Transplantes do Instituto de Urologia e Nefrologia,

localizado na cidade de São José do Rio Preto-SP, é credenciado para realização de exames de histocompatibilidade, de acordo com as normas da Associação Brasileira de Histocompatibilidade (ABH) e legislação vigente – Portaria nº1.312, de 30 de novembro de 2000.

2.3. Tipificação dos Alelos HLA

2.3.1. Coleta das Amostras

A coleta do material biológico ocorreu durante o atendimento no Laboratório de Imunologia de Transplantes, sendo que para cada indivíduo foram devidamente coletados 20 mL de sangue venoso periférico. A amostra de sangue utilizada para tipagem HLA de classe I, foi coletada em um tubo com heparina sódica de 10 mL já, para tipagem HLA classe II, a amostra de sangue utilizada foi coletada em dois tubos com EDTA, de 5 mL cada.

2.3.2. Determinação dos Antígenos HLA de Classe I

A determinação dos antígenos HLA de classe I (AB) foi realizada através da técnica microlinfocitotóxica dependente de complemento.⁵⁸⁻⁶⁰ Para este procedimento, foram utilizadas as Placas Monoclonais de Tipagem HLA Classe I (*LM 172-One Lambda*, CA, USA). Estas placas monoclonais possuíam uma mistura de anticorpos monoclonais anti-Classe I conhecido e complemento de coelho, utilizados para determinar a presença de antígenos HLA de Classe I em linfócitos totais.

As placas apresentavam 72 poços, cada um contendo 1µl da mistura monoclonal específica e complemento de coelho e 5 µl de óleo mineral. Cada placa possuía, ainda, um poço controle negativo e um poço controle positivo. O controle positivo consistia

em um anticorpo monoclonal e era fortemente citotóxico para os linfócitos humanos. Este controle foi utilizado para determinar a atividade do complemento. O controle negativo consistia em um anti-soro proveniente de um indivíduo saudável do sexo masculino com grupo de sangue AB, que não apresentava qualquer reatividade citotóxica em testes com doadores aleatórios de linfócitos, sendo utilizado para determinar a viabilidade dos linfócitos.

Estas placas foram devidamente armazenadas à temperatura de -80°C e foram retiradas do local de armazenamento e descongeladas à temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) 15 minutos antes da sua utilização. Para devida aplicação na placa, foram utilizados linfócitos viáveis e, para isso, o processamento do sangue foi realizado imediatamente após a coleta.

Dessa maneira, após a realização da coleta de 10mL de sangue em um tubo com heparina sódica, ocorreu a separação do anel de linfócitos em gradiente *Ficoll-Hypaque*, densidade 1.077g/l, através da centrifugação por 30 minutos a 2500 RPM. Uma vez que o anel de linfócitos foi devidamente separado, o mesmo foi diluído em soro fisiológico (solução 5%) e centrifugado por 20 minutos a 2500 RPM para obtenção do pellet de células viáveis. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi diluído em 2 mL de solução fisiológica a 5%.

Após esse procedimento, foi iniciado o plaqueamento. Com a utilização de microseringas, foi acrescentado 1 μl de linfócitos totais em cada poço da placa. Posteriormente, as placas foram incubadas a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) durante 1 hora.

Durante o período de incubação, ocorreu morte celular em qualquer poço teste no qual o antígeno HLA da superfície celular tenha sido reconhecido pelo seu anticorpo

anti-HLA correspondente. Seguido o período de incubação, adicionou-se 10 microlitros (10µl) de corante *Stain Fix* (OLI Cat.#SF-500) em cada poço da placa. Após a adição do corante, os linfócitos negativos (vivos) foram detectados por meio de seu aspecto pequeno, luminoso e refrativo, e os linfócitos positivos (mortos) assumiram um aspecto escuro e opaco.

Cerca de cinco minutos após a adição do corante, a leitura da placa foi realizada em microscópio óptico. As reações foram pontuadas calculando a porcentagem de morte celular. Dessa forma, se o controle negativo apresentou linfócitos mortos, a porcentagem de morte celular nos poços restantes foi devidamente ajustada em conformidade. As leituras da placa seguiram o padrão de leitura ASHI (*American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*)⁶¹, que pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Padrão de Leitura ASHI e respectiva interpretação de morte celular.

Pontuação	Interpretação – Morte Celular
0-10%	Negativo
11-20%	Negativo Duvidoso
21-50%	Positivo Fraco
51-80%	Positivo
81-100%	Positivo Forte

Fonte: Protocolo Informativo – Catálogo *LM 172 (One Lambda)*.

2.3.3. Determinação dos Antígenos HLA de Classe II

Para determinação dos antígenos HLA de classe II (DRB1), foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico em dois tubos com EDTA, de 5 mL cada. As amostras foram devidamente identificadas e centrifugadas por 20 minutos, a 2500 RPM, para

obtenção da camada de leucócitos (*buffy-coat*), e a partir da mesma, realizou-se a extração do DNA.

2.3.3.1. Extração e Quantificação do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada através da metodologia GE-ILLUSTRATE, utilizando-se o *Kit Illustrate Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. A concentração de DNA das amostras foi medida pela leitura de densidade ótica, utilizando-se espectrofotômetro *GENE Quantpro RNA/DNA calculator* (GE Healthcare).

2.3.3.2. Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR-SSP, através do *Kit Micro SSP HLA Typing Trays (One Lambda, CA,USA)*. As placas pré-fabricadas de Tipagem de DNA Micro SSP apresentavam 96 poços, contendo *primers* de oligonucleotídeos com sequência específica para amplificação de alelos HLA de classe II por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Cada placa foi utilizada para tipagem de três amostras de DNA genômico, ou seja, três pacientes distintos, portanto, 32 poços para cada tipagem amostral, totalizando 96 poços por placa. O Kit apresentava ainda, uma mistura de dNTP-tampão (*Micro SSP Dmix*) para tipagem de cada amostra.

A realização da tipagem de cada amostra de DNA foi feita da seguinte forma: 2µl de Taq Polimerase foram adicionados no tubo que já continha a mistura de dNTP-tampão (Dmix). No poço controle negativo foram adicionados 1µl de água ultra-pura e 9µl da mistura Dmix + Taq Polimerase. Posteriormente, foram adicionados 39µl de

DNA no tubo contendo a mistura Dmix + Taq Polimerase (formando uma ampli-mix), e foram distribuídos 10µl dessa ampli-mix em cada poço restante da placa.

Posteriormente, a placa foi colocada em termociclador *GeneAmp PCR System* 9700 (Applied Biosystem). A programação da PCR pode ser observada na Tabela3.

Tabela 3. Programação da PCR.

Nº de Ciclos	Passos	Temp (°C)	Tempo (seg)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Final	1	4	---

Fonte: Protocolo informativo – *Kit Micro SSP HLA Typing Trays (One Lambda, CA, USA)*.

O produto da amplificação foi aplicado em gel de agarose 2,5% com brometo de etídio (100mg/ ml) e, após eletroforese, foi fotografado para análise e documentação.

2.4. Análises Estatísticas

2.4.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A significância do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi avaliada utilizando-se o procedimento, análogo ao teste exato de Fisher, descrito por Guo e Thompson⁶², adotando-se como limite de significância $p > 0,05$. Para isto, foi utilizado o programa Pypop (Python for Population Genetics) versão 7.0.⁶³

2.4.2. Frequências Alélicas e Haplotípicas

As frequências alélicas e de haplótipos, foram calculadas utilizando o software Arlequin v3.11.⁶⁴ O método de Bernstein foi utilizado para calcular as frequências fenotípicas: $f_g = 1 - (1 - f_f)^{1/2}$, onde: f_g = frequência gênica; f_f = frequência fenotípica ($f_f = n/N$); n = número de indivíduos que possuem o antígeno; N = número de indivíduos estudados.⁶⁵

A significância das diferenças entre as frequências alélicas em nossa amostra foi calculada pelo teste de correção de Yates, usando o software PEPI v. 4.0.⁶⁶ Adotou-se como limite de significância $p=0,05$ para comparar frequências entre as populações.

2.4.3. Desequilíbrio de Ligação

O desequilíbrio de ligação é definido como a diferença (D') entre a frequência observada de uma determinada combinação de alelos em um determinado *loci* e a frequência esperada, podendo ser positivo ou negativo, conforme a frequência observada seja maior ou menos do que a esperada, respectivamente.⁶⁷ O valor de D' pode assumir valores no intervalo de -1 a +1, sendo que os valores negativos indicam repulsão entre os alelos em questão e os positivos indicam acoplamento. O valor zero indica ausência de desequilíbrio de ligação, ou a situação denominada por alguns autores como “equilíbrio de ligação”.

O cálculo do desequilíbrio de ligação, assim como seu nível de significância ($p = 0,05$) foi realizado através do software Arlequin v3.11.^{64,67} O grau de significância do desequilíbrio de ligação foi avaliado através do teste exato de Fischer, em tabelas de contingência 2x2.⁶⁷

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Considerando a amostra total, todos os *loci* estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Além disso, foram identificados 21 grupos de alelos para o *locus* HLA-A, 34 para HLA-B e 13 para HLA-DRB1.

3.1. Frequência Alélica

No que se refere ao *locus* HLA-A, os alelos mais frequentes foram, respectivamente, HLA-A*02 (25,1%), -A*24 (10,4%) e -A*03 (9,6%). Em relação ao *locus* HLA-B, o HLA-B*35 apresentou a maior frequência (11,8%), seguido pelo HLA-B*44 (10,6%) e HLA-B*15 (9,5%). Já, quanto ao *locus* HLA-DRB1, os antígenos mais frequentes foram HLA-DRB1*11 (14,4%), -DRB1*13 (14,1%) e -DRB1*04 (12,7%), respectivamente. As Tabelas 4, 5 e 6 mostram, respectivamente, as frequências alélicas (Fa) e fenotípicas (Ff) das especificidades HLA observadas no estudo para os *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 na amostra total.

Tabela 4. Frequências alélicas e fenotípicas para o *locus* HLA-A observadas na amostra total (n=2.624).

Alelo	Fa	Ff
A*01	0.081	0.157
A*02	0.251	0.450
A*03	0.096	0.186
A*11	0.056	0.107
A*23	0.054	0.103
A*24	0.104	0.198
A*25	0.015	0.030
A*26	0.036	0.072
A*29	0.039	0.077
A*30	0.064	0.124
A*31	0.036	0.0712
A*32	0.025	0.049
A*33	0.028	0.056
A*34	0.009	0.017
A*36	0.004	0.009

A*43	0.002	0.004
A*66	0.014	0.027
A*68	0.057	0.112
A*69	0.002	0.004
A*74	0.013	0.026
A*80	0.003	0.007

Fa=Frequência Alélica; Ff = Frequência Fenotípica

Tabela 5. Frequências alélicas e fenotípicas para o *locus* HLA-B observadas na amostra total (n=2.624).

Alelo	Fa	Ff
B*07	0.069	0.135
B*08	0.057	0.110
B*13	0.009	0.019
B*14	0.043	0.084
B*15	0.095	0.185
B*18	0.055	0.108
B*27	0.020	0.039
B*35	0.118	0.224
B*37	0.013	0.026
B*38	0.024	0.048
B*39	0.029	0.055
B*40	0.043	0.082
B*41	0.011	0.022
B*42	0.014	0.028
B*44	0.106	0.194
B*45	0.019	0.036
B*46	0.0008	0.001
B*47	0.002	0.004
B*48	0.007	0.014
B*49	0.026	0.050
B*50	0.019	0.036
B*51	0.094	0.181
B*52	0.018	0.034
B*53	0.022	0.043
B*54	0.002	0.004
B*55	0.011	0.021
B*56	0.005	0.010
B*57	0.024	0.046
B*58	0.023	0.045
B*59	0.001	0.002
B*67	0.002	0.005
B*73	0.002	0.0003
B*78	0.002	0.003
B*81	0.004	0.004

Fa=Frequência Alélica; Ff = Frequência Fenotípica

Tabela 6. Frequências alélicas e fenotípicas para o *locus* HLA-DRB1 observadas na amostra total (n=2.624).

Alelo	Fa	Ff
DRB1*01	0.085	0.163
DRB1*03	0.123	0.223
DRB1*04	0.127	0.239
DRB1*07	0.113	0.213
DRB1*08	0.059	0.114
DRB1*09	0.021	0.041
DRB1*10	0.018	0.035
DRB1*11	0.144	0.262
DRB1*12	0.021	0.042
DRB1*13	0.141	0.263
DRB1*14	0.038	0.075
DRB1*15	0.079	0.152
DRB1*16	0.025	0.050

Fa=Frequência Alélica; Ff = Frequência Fenotípica

No que se refere as amostras de caucasóides e negros, observamos que para o *locus* HLA-A, o alelo HLA-A*30 foi mais freqüente entre os negros (8,1%) do que entre os caucasianos (6,3%), enquanto que os alelos HLA-A*01 e -A*23 foram mais frequentes no grupo caucasóide com uma freqüência de 10,6 e 5,6%, respectivamente. O mesmo foi observado para os alelos HLA-A*25 e -A*29 (1,6 e 4,1%, respectivamente).

Para o *locus* HLA-B, os alelos HLA-B*35 e -B*44 foram mais frequentes entre os caucasóides (12,0 e 10,8%, respectivamente) do que entre os negros (7,9 e 7,4%, respectivamente), enquanto que os alelos HLA-B*14, -B*15 e -B*39 foram mais frequentes entre os negros, com uma freqüência de 6,1, 9,8 e 4,9%, respectivamente. Além disso, observamos que os alelos HLA-B*46, -B*47, -B*59 e B*73 foram observados apenas no grupo caucasóide

Quanto ao *locus* HLA-DRB1, os alelos HLA-DRB1*11, -DRB1*13 e -DRB1*01 foram, respectivamente, os mais frequentes entre os caucasóides (14,5, 12,6 e 8,7%, respectivamente) do que entre os negros. Já, os alelos HLA-DRB1*14 e -DRB1*15 foram mais frequentes no grupo negróide, com freqüência de 4,2 e 9,4% respectivamente. A Tabela 7 apresenta as frequências alélicas para os *loci* HLA-A,

HLA-B e HLA-DRB1 na amostra total (n=2.624) e sua comparação entre os diferentes grupos étnicos.

Tabela 7. Frequências alélicas para os *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 na amostra total (n=2.624) e sua comparação entre os diferentes grupos étnicos.

HLA locus	Total	C	N	CXN (valor de p)
A*01	0,081	0,106	0,709	1×10^{-5}
A*02	0,251	0,250	0,264	
A*03	0,096	0,098	0,085	
A*11	0,056	0,058	0,045	
A*23	0,054	0,056	0,038	$3,7 \times 10^{-5}$
A*24	0,104	0,105	0,099	
A*25	0,015	0,016	0,009	$2,1 \times 10^{-3}$
A*26	0,036	0,037	0,029	
A*29	0,039	0,041	0,029	$1,5 \times 10^{-3}$
A*30	0,064	0,063	0,081	$8,9 \times 10^{-4}$
A*31	0,036	0,036	0,043	
A*32	0,025	0,026	0,029	
A*33	0,028	0,028	0,034	
A*34	0,009	0,009	0,013	
A*36	0,004	0,005	0,004	
A*43	0,002	0,002	0,002	
A*66	0,014	0,014	0,013	
A*68	0,057	0,058	0,056	
A*69	0,002	0,003	0,002	
A*74	0,013	0,013	0,016	
A*80	0,003	0,004	0,004	
B*07	0,069	0,071	0,063	
B*08	0,057	0,059	0,051	
B*13	0,009	0,009	0,016	
B*14	0,043	0,042	0,061	$3,2 \times 10^{-5}$
B*15	0,095	0,072	0,098	
B*18	0,055	0,055	0,065	
B*27	0,020	0,021	0,016	
B*35	0,117	0,120	0,079	
B*37	0,013	0,014	0,007	$7,7 \times 10^{-4}$
B*38	0,024	0,025	0,018	
B*39	0,029	0,027	0,049	$1,6 \times 10^{-8}$
B*40	0,043	0,042	0,056	
B*41	0,011	0,011	0,013	
B*42	0,014	0,014	0,020	
B*44	0,106	0,108	0,074	
B*45	0,019	0,019	0,025	
B*46	0,0008	0,001	-	
B*47	0,0023	0,003	-	$7,7 \times 10^{-6}$
B*48	0,0072	0,007	0,009	
B*49	0,0261	0,027	0,022	
B*50	0,0196	0,020	0,016	
B*51	0,0945	0,095	0,080	

B*52	0,0175	0,017	0,020	
B*53	0,0219	0,022	0,023	
B*54	0,0019	0,002	0,004	
B*55	0,0107	0,011	0,005	9.6x10 ⁻⁴
B*56	0,0055	0,004	0,016	6.2x10 ⁻¹⁰
B*57	0,0244	0,024	0,029	
B*58	0,0229	0,023	0,023	
B*59	0,0010	0,001	-	
B*67	0,0025	0,002	0,005	
B*73	0,0017	0,002	-	1x10-03
B*78	0,0021	0,002	0,002	
B*81	0,0042	0,004	0,009	
DRB1*01	0,085	0,087	0,064	
DRB1*03	0,123	0,122	0,104	
DRB1*04	0,127	0,125	0,108	2x10-03
DRB1*07	0,113	0,125	0,112	
DRB1*08	0,059	0,060	0,056	
DRB1*09	0,021	0,022	0,025	
DRB1*10	0,018	0,018	0,022	
DRB1*11	0,144	0,145	0,113	2x10-04
DRB1*12	0,021	0,020	0,027	
DRB1*13	0,141	0,126	0,103	1x10-09
DRB1*14	0,038	0,038	0,042	
DRB1*15	0,079	0,078	0,094	1x10-07
DRB1*16	0,025	0,027	0,009	7,3x10-12

C, caucasóides; N, negros

Os valores de p indicam diferenças significativas entre os grupos.

-, Não ocorreu no grupo.

3.2. Frequência Haplótipica

Os haplótipo mais comuns observados na amostra total foram A*01 B*08 DRB1*03, A*29 B*44 DRB1*07 e A*03 B*07 DRB1*15, cujas as frequências foram respectivamente de 1,8, 1,2 e 1,2%.

Considerando os grupos étnicos, observamos que o haplótipo A*01 B*08 DRB1*03 foi o mais frequente entre os caucasóides com uma frequência de 1,3% enquanto que, o haplótipo A*29 B*44 DRB1*07 apresentou maior frequência entre os negros, com 1,1%. Além disso, observamos que os haplótipos A*02 B*51 DRB1*13 (0,7%) e A*11 B*35 DRB1*01 (0,6%) ocorreram somente no grupo de caucasóides ao passo que, A*02 B*40 DRB1*11 (0,7%) e A*30 B*18 DRB1*03 (0,8%) foram observados somente entre os negros. A frequência dos dez haplótipos HLA-A, -B e -

DRB1 mais comuns observados na amostra total e nos diferentes grupos étnicos está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8. Frequência dos dez haplótipos HLA-A, -B e -DRB1 mais comuns observados na amostra total e nos diferentes grupos étnicos.

Haplótipo	Frequência Total	Caucasóides	Negros
A*01 B*08 DRB1*03	0.018	0.013	0.007
A*29 B*44 DRB1*07	0.012	0.008	0.011
A*03 B*07 DRB1*15	0.012	0.009	0.005
A*02 B*15 DRB1*13	0.011	0.007	0.006
A*02 B*51 DRB1*13	0.011	0.007	---
A*02 B*35 DRB1*11	0.009	0.006	0.005
A*02 B*15 DRB1*04	0.008	0.007	0.005
A*11 B*35 DRB1*01	0,008	0.006	---
A*02 B*18 DRB1*03	0.007	0.008	0.001
A*24 B*35 DRB1*11	0.006	0.007	0.003

-, Não ocorreu no grupo.

3.3. Desequilíbrio de Ligação

Os haplótipos A1-B8, A2-DR13 e B8-DR3 apresentaram um forte desequilíbrio de ligação na amostra total. O desequilíbrio de ligação mais intenso foi observado no haplótipo A1-B8 ($D' = 0,42$), que inclusive, apresentou desequilíbrio mais forte entre os indivíduos Caucasóides e uma fraca associação entre os indivíduos negros de nossa população. O haplótipo com a menor intensidade de associação foi o A2-DR3 ($D' = -0,25$). A Tabela 9 representa a frequências dos dez haplótipos HLA-A:HLA-B, HLA-A:HLA-DR e HLA-B:HLA-DR mais comuns e seus respectivos valores de desequilíbrio de ligação na amostra total e nos diferentes grupos étnicos.

Tabela 9. Frequência dos dez haplótipos HLA-A:HLA-B, HLA-A:HLA-DRB1 e HLA-B:HLA-DRB1 mais comuns e seus respectivos valores de desequilíbrio de ligação na amostra total e nos diferentes grupos étnicos.

Associação Haplótipica	Fh	D'	Fh C	D' C	Fh N	D' N
HLA-A-B						
A*02-B*51	0.0413	0.0176	0.0405	0.2346	0.0307	0.1038
A*02-B*15	0.0322	0.0081	0.0356	0.1485	0.0162	-0.1462
A*02-B*44	0.0276	0.0007	0.0273	0.0018	0.0379	0.1905
A*01-B0*8	0.0272	0.4232	0.0268	0.4100	0.0325	0.6003
A*03-B*07	0.0223	0.2463	0.0241	0.2690	0.0108	0.0946
A*03-B*35	0.0212	0.1155	0.0194	0.0893	0.0271	0.2441
A*02-B*18	0.0204	0.0064	0.0198	0.1509	0.0162	-0.0514
A*02-B*07	0.0198	0.0022	0.019	0.0240	0.0271	0.2241
A*24-B*35	0.0185	0.0662	0.02	0.0793	0.0181	0.0916
A*29- B*44	0.0183	0.3971	0.0192	0.4041	0.0126	0.3792
HLA-A-DRB1						
A*02-DRB1*04	0.0427	0.1126	0.0409	0.1269	0.0433	0.0230
A*02-DRB1*13	0.0383	0.0254	0.042	0.0844	0.0217	-0.2677
A*02-DRB1*11	0.0295	-0.1870	0.0311	-0.1992	0.0379	0.1389
A*24-DRB1*11	0.0265	0.1266	0.0268	0.1072	0.0361	0.2366
A*02-DRB1*07	0.0261	-0.0892	0.0281	-0.0325	0.0253	-0.0651
A*01-DRB1*03	0.0255	0.2158	0.0228	0.2183	0.0361	0.2371
A*02-DRB1*08	0.0246	0.2146	0.0213	0.1583	0.0307	0.3430
A*02-DRB1*03	0.0231	-0.2553	0.0224	-0.2381	0.0217	-0.2821
A*02-DRB1*01	0.0202	-0.0593	0.0185	-0.2632	0.0235	0.1389
A*03-DRB1*11	0.0187	0.0580	0.0175	0.0376	0.0253	0.2059
HLA-B-DRB1						
B*08-DRB1*03	0.037	0.5874	0.0409	0.5957	0.0433	0.4229
B*35-DRB1*11	0.0353	0.1805	0.042	0.1936	0.0217	0.1094
B*44-DRB1*07	0.0322	0.2114	0.0311	0.2007	0.0379	0.1872
B*15-DRB1*13	0.0265	0.1576	0.0268	0.1508	0.0361	0.1640

B*07-DRB1*15	0.0244	0.2926	0.0281	0.2913	0.0253	0.3378
B*51-DRB1*13	0.0183	0.0605	0.0228	0.0888	0.0361	0.0191
B*35-DRB1*01	0.0177	0.1016	0.0213	0.1148	0.0307	-0.5086
B*18-DRB1*11	0.0173	0.1954	0.0224	0.2191	0.0217	0.0605
B*18-DRB1*03	0.017	0.2072	0.0185	0.1904	0.0235	0.1023
B*15-DRB1*04	0.0166	0.0529	0.0175	0.0604	0.0253	0.0023

Fh= Frequência Haplotípica; D' =Desequilíbrio de Ligação na Amostra Total

FhC= Frequência Haplotípica entre Caucasoídes; D'C = Desequilíbrio de Ligação entre Caucasoídes.

FhN = Frequência Haplotípica entre Negros; D'N = Desequilíbrio de Ligação entre Negros.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O Brasil é um país cuja população é caracterizada por elevada miscigenação de diversos grupos étnicos devido a extensa imigração de diferentes continentes apresentando, portanto, elevada diversidade HLA. Dessa maneira, a tipificação dos antígenos de histocompatibilidade em cada região é de grande importância, auxiliando diversos estudos populacionais, favorecendo a seleção adequada de doadores em transplantes de órgãos e, ainda, atuando como importante ferramenta para os estudos de associação com as doenças.⁶⁸

A distribuição das frequências dos *loci* HLA observada no presente estudo foi semelhante à outras análises realizadas em diferentes populações brasileiras.⁶⁹⁻⁷² Considerando o *locus* HLA-A, os alelos mais frequentes observados em nossa amostra total foram, respectivamente, HLA-A*02, -A*24 e -A*03. Esses mesmos alelos também foram os mais frequentes em um estudo realizado por Salvadori, et al. na população de Bauru, município localizado na região centro-oeste do Estado de São Paulo.⁷⁰

Similar a esse estudo, o alelo HLA-A*02 também foi o mais comum em várias outras regiões do país.⁶⁹⁻⁷⁴ Comparando a frequência desse antígeno entre as diferentes populações brasileiras, observamos elevada variação em sua frequência de acordo com a região estudada. Estudos realizados no estado de São Paulo, por exemplo, apresentam uma frequência de aproximadamente 25% para esse alelo.^{69,70,74} Em contraste, a frequência obtida para esse antígeno nas populações do Rio de Janeiro atinge cerca de 30%⁷⁵ enquanto que, nas populações de Minas Gerais⁷⁵ e Piauí⁷⁶, essa frequência atinge cerca de 40%.

Considerando os alelos mais frequentes nos *loci* HLA-B e HLA-DRB1, nosso estudo apresentou resultados similares aqueles observados nas populações do Estado de Paulo^{69,70,77} e da região Sul do país^{71,72,78}. O alelo HLA-B*35, por exemplo, foi o mais

frequente em nossa população e também nas populações de Bauru⁷⁰, Rio Grande do Sul⁷¹ e Paraná⁷⁸. Já, o alelo HLA-DRB1*11 foi o mais frequente na população do Paraná⁷⁸, bem como em nossa região, e foi o segundo alelo mais comum na população de Bauru⁷⁰.

A população estudada apresentou elevada frequência de alelos característicos da população européia, como por exemplo, HLA-A * 24, HLA-B * 44, HLA-DRB1 * 11 e HLA-DRB1*13.⁷⁹⁻⁸¹ Essa semelhança é possivelmente devido ao elevado fluxo de imigrantes portugueses, espanhóis e italianos em nossa região.⁸²⁻⁸⁴ Além disso, os resultados obtidos em nosso estudo mostraram ainda a ocorrência de alelos comumente observados em populações africanas, como o HLA-B*15 e HLA-DRB1*03^{85,86}, embora cerca de apenas 4% da população seja de descendência africana.⁸⁷

Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Ayo, et al., que analisaram a diversidade HLA na região noroeste do Estado de São Paulo e observaram uma população heterogênea, composta principalmente por uma mistura de alelos HLA típicos das populações europeias e africanas.⁶⁹

Curiosamente, alguns alelos freqüentemente encontrados na população libanesa também foram observados em nossa população. Os alelos HLA-A*03 e HLA-DRB1*04, característicos da população libanesa, foram os terceiros alelos mais comuns em nosso estudo para os *loci* HLA-A e HLA-DRB1, respectivamente.^{88,89} Esses resultados podem estar relacionados ao elevado número de libaneses que participaram da colonização da nossa região.^{82,84}

A análise das freqüências alélicas entre as amostras de caucasóides e negros da nossa região mostrou que os alelos característicos das populações européias foram mais freqüentes na amostra de caucasóides, enquanto que os alelos característicos da população africana foram mais freqüentes em nossa amostra de negros.

Os alelos HLA-B*35 e -B*44, por exemplo, foram os mais frequentes nas populações caucasóides do Rio Grande do Sul⁷¹ e do Paraná⁷², bem como no nosso estudo. O mesmo foi observado para o alelo HLA-DRB1*15, mais frequente na população de Negros de estudos desenvolvidos no Rio Grande do Sul⁷¹, Paraná⁷² e Piauí⁷³ assim como em nossa população.

Estes resultados são semelhantes aqueles obtidos nos estudos de Bortolotto, et al., que mostraram que os alelos característicos de populações europeias são mais frequentes em populações predominantemente brancas⁷¹, e de Carvalho, et al., que observaram que os alelos mais comumente encontrados nas populações africanas, principalmente o HLA-B* 15, são mais frequentes em populações miscigenadas⁷³.

Nossos resultados mostraram que os haplótipos comuns em populações européias, como por exemplo, A*01 B*08 DRB1*03 e A*03 B*07 DRB1*15 foram os mais frequentes em nossa população caucasiana. Resultados semelhantes foram obtidos por Fabreti-Oliveira, et al., que observaram uma maior frequência destes haplótipos nas regiões Sul e do Sudeste do Brasil. Com relação à população negra do presente estudo, o haplótipo mais frequente foi A*29 B*44 DRB1*07, semelhante aos resultados obtidos por um estudo realizado na região nordeste do Brasil.⁸⁶

Os resultados referentes ao desequilíbrio de ligação mostraram ainda que, haplótipos característicos da população européia como, por exemplo, A*01-B*08, foi o que apresentou mais intenso desequilíbrio de ligação entre os indivíduos caucasóides do nosso estudo. Esses dados corroboram resultados obtidos em outros trabalhos que analisaram o desequilíbrio de ligação entre indivíduos caucasóides.^{51,90}

É importante ressaltar que o presente estudo é primeiro a realizar a análise da diversidade haplotípica bem como o desequilíbrio de ligação dos *loci* HLA-A, -B, e -DRB1 em São José do Rio Preto. Dessa maneira, a comparação dos resultados obtidos

em nosso trabalho com dados de outras populações foi bastante restrita uma vez que poucos trabalhos trazem essas análises.

Nosso estudo demonstrou que a região de São José do Rio Preto é caracterizada por uma população miscigenada e fortemente influenciada por alelos característicos das populações europeias, africanas e libaneses. Nossos resultados confirmam ainda que a caracterização de alelos e haplótipos de uma população específica HLA é influenciada pela etnia e está relacionada a uma história da colonização. No entanto, é importante ressaltar a necessidade de outros estudos para entender melhor a diversidade HLA na população brasileira.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1- Os alelos HLA mais freqüentes nos candidatos a transplante renal na região de São José do Rio Preto foram HLA-A*02, HLA-B*35 e HLA-DRB*11.

2- O haplótipo mais comum na região de São José do Rio Preto foi A*01 B*08 DRB1*03.

3- O haplótipo A*01 B*08 DRB1*03 foi o mais frequente na amostra de caucasóide da população analisada enquanto que, A*29 B*44 DRB1* 07 foi o mais comum na amostra de negros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodey G. HLA Beyonds Tears. 2^a ed. Houston, 2000.
2. Rhodes DA. Genetics and molecular genetics of the MHC. Rev. Immunogenet. 1999.
3. Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel eletroforesis. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America.1987; v.84:7235.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JJ. The Major Histocompatibility Complex. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W.B. Saunders, 2005.
5. Christiansen OB, Mathienses O, Husth M, Lauritsen JG, Jersil C, Grunnet N. Prognostic significance of maternal DR histocompatibility type Danish women with recurrent micarriages. Human Reproduction.1993; v.8:1843-1847.
6. Crouau-Roy B, Amadou C, Bouissou C, Clayton J, Vernet C, Ribouchon M T, Pontarotti P. Localization of the OTF3 Gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping.Genomics.1994; v.21:241-243.
7. Bell J. Chromosome crawling in the MHC. Trends in Genetics. 1989; v.5:289-290.
8. Albert E. Nomenclature for factors of the HLA system. Tissue Antigens.1987;v.32:177-187.
9. Abbas A, Lichtmann A. Cellular and Molecular Immunology. 5^aed.Saunders,2003.
10. Jensen PE. Recent advances in antigen processing and presentation. Nat Immunol. 2007; v.8:1041-8. 2007
11. Campbell RD, Ragoussis J, Trowsdale J. Map of the human MHC. Immunology Today. 1991; v.12: 445.
12. Shiina T, Inoko H, Kulski JK.An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations.Tissue Antigens.2004; v.64:631-649.
13. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. Advances in immunology. New England Journal of Medicine. 2000;v.343:782-786.
14. Nepom BS. Polyglot and Polymorphism An HLA update. Arthritis Rheum.1995, 38:1715-1721.

15. Nepom GT. Genetics of the major histocompatibility complex in rheumatoid arthritis. In: Klippel JH, eds. *Rheumatology*. 1998; v.1:57.1-12.
16. Abbas A, Lichtmann A. *Cellular and Molecular Immunology*. 5ªed.Saunders,2003.
17. Fainardi E, Rizzo R, Mechiorri L, Vaghi L, Castellazi M, Marzola A, Govoni V, Paolino E, Tola MR, Granieri E, Baricordi OR. Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*.2003;v.142:149-158.
18. Abbas A, Tripathi P, Nalk S, Agrawal S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *European Journal Immunogenetic*. 2004; v.31:275-278.
19. Brodsky FM, Lem L, Bresnahan PA. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens*.1996;7:20-32.
20. Trowsdale J, Campbell RD. The 12th International MHC map. Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication. *Medical and Scientific International Publisher*.1997; v.1: 499-504.
21. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major Histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.1994; v.91:6259-6263.
22. Matsuzara Y, Makino S, Nakagima K, Tomizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski JK, Tamiya G, Inokio H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens*.2001;v.57:397-404.
23. Salomão FA. Transplante renal. In: Pereira WA. *Manual de transplantes de órgãos e tecidos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Med. 2000; 177–201.
24. Terasaki PI, Vredevoe DL, Mickey MR et al. Serotyping for homotransplantations. VII. Selection of kidney donors for thirty-two recipients. *Ann NY Acad Sci*. 1996;129:500.
25. Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkins lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* 1993; 342:1514-1516.
26. Mendes FDR. O sistema nacional de transplantes. In: Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP. *Manual de transplante renal*. São Paulo. 2004.395p.p.371-83.
27. Pereira LA, Coria SA, Monteiro F, Scandiuzzi MC. Sistema estadual de transplantes em São Paulo: histórico, resultados e perspectivas. In: Bittar OJNV,

- Cecílio MAM, organizadores. Planejamento de saúde: conhecimento e ações. São Paulo: Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo; 2006. p.79-116.
28. Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. The application molecular genetics approaches the study of human evolution. *Nature genetics*. 2003; v.33:266-275.
 29. Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, Takahata N. Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends in Genetics*.1997;13: 90-92.
 30. Hedrick P. Evolutionary genomics. Foxy MHC selection story. *Nature*. 2004; v. 93:237-238.
 31. Spencer HG, Marks RW. The maintenance of single locus polymorphism: numerical studies of a viability selection model.*Genetics*.1988; 120: 605-613.
 32. Messaoudi I, Patino JA, Dyall R, Lemaoulte J, Nikolitch-Zugich. Direct Link Between MHC Polymorphism, T Cell Avidity, and Diversity in Immune Defense. *Science*. 2002; v.298:1797-1800.
 33. Petzl-Erler ML. MHC polymorphism evolution (of the highly polymorphic genes as seen in the human species). *Simpósio de Imunogenética*. Curitiba; 2009.
 34. Powis SH, Geraghty DE. What is the MHC. *Immunol Today*.1995;16:8-
 35. Riley E, Olerup O. HLA polymorphism and evolution. *Immunol Today*.1992; 13:333-335.
 36. Clayton J, Gee H. Major histocompatibility complex: the evolutionary angle. *Nature*.1993; 365:111-112.
 37. Trowsdale J, Campbell RD. Map of the human MHC. *Immunol. Today*.1993;14:349-352.
 38. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad, M. Patterns of Linkage Disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews. Genetics*, London. 2002;v.3:299-309.
 39. Vogel F, Motulsky AG. *Genética Humana: problemas e abordagens*. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
 40. Messaoudi I, Patino JA, Dyall R, Lemaoulte J, Nikolitch-Zugich. Direct Link Between MHC Polymorphism, T Cell Avidity, and Diversity in Immune Defense. *Science*. 2002; v.298:1797-1800.
 41. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, editors. *HLA 1991 proceedings of the eleventh*

- international histocompatibility workshop and conference. New York: Oxford Science; 1992. p. 1065.
42. Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet.*1948; v. 49:87-108.
 43. Parham P. HLA, anthropology, and transplantation. *Transpl Proc.* 1993; 25: 159-161.
 44. Middleton, D. Et al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol.* 2000; v. 61:1048-52.
 45. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta haematologica.*1958; v.20:156-166.
 46. Awata T, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y, Okuyama M, Juji T. High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DR-chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects. *Diabetes.*1990; 39:266-269.
 47. Inoue D, Sato K, Enomoto T, Sugawa H, Maeda M, Inoko H, Tsuji K, Mori T. Correlation of HLA types and clinical findings in Japanese patients with hyperthyroid Graves' disease: evidence indicating the existence of four subpopulations. *Clin Endocrinol.*1992; 36:75-82.
 48. 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. *American Journal of Human Biology.*1999; v.11, p.551- 563.
 49. Moraes JRF, Moraes MEH. Distribuição dos alelos HLA na população brasileira. *Hematol Hemoter.* 1996; 1:18-23.
 50. Carvalho-Silva DR. et al. The Phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *American Journal of Human Genetics.* 2001,v. 68: 281-286.
 51. Monte S, et al. HLA polymorphism in a racially admixed sample of the population of Teresina, Piauí. *Rev Assoc Med Bras.* 2004, v.50: 422-6.
 52. 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.* 2004, v. 64:204-9.
 53. Carvalho MG, Tsuneto LT, Moita Neto JM, Sousa L, Sales Filho HL, Macedo MB, et al. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies in Piauí volunteer bone marrow donors enrolled at the Brazilian registry. *Human Immunology* 2013;74: 1598.
 54. Tiwari JL, Terasaki PI. HLA and disease association. 1ªed. New York; 1985.

55. Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, Neumann J. HLA-A, -B, and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum Immunol* 2012; 73:180-185.
56. Salvadori LC, Santana FC, Marcos EV. Frequency of alleles and haplotypes of the human leukocyte antigen in Bauru, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014;36:108-14.
57. Rosales T, Guilherme L, Chiarella J, Marin ML, Rosales C, Melo CP, Goldberg AC, Kalil J. Human leukocyte A and B antigen, gene and haplotype frequencies in the population of the city of São Paulo in Brazil. *Braz J Med Biol.*1992;25: 39-47.
58. Terasaki PI, Bernoco F, Park MS, Ozturk G. Microdroplet testing for HLA-A,-B,-C and -D antigens. *American Journal of Clinical. Pathology.*1978;69:103-120.
59. Danilovs J, Terasaki PI, Park MS, Ayoub G. B lymphocyte isolation by thrombin nylon wool. In *Histocompatibility Testing*. Terasaki PI, Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles; 1980.287288
60. Terasaki PI, Ed., *Histocompatibility Testing*. Los Angeles, CA, 1980.
61. *ASHI Laboratory Manual*, 2nd ed. Edited by Zachary, Andrea A. and Teresi, Gary, p. 199, 1990.
62. Guo S, et al. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, v.48, n.2, Jun, p.361-72. 1992.
63. Lancaster AMP, et al. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput*, p.514-25. 2003.
64. 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.
65. Mattiuz PL. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In: Terasaki, P. I. (Ed.). *Histocompatibility testing*, Copenhagen: Munksgaard; 1970;1:193-205.
66. Abramson JH, Gahlinger PM. *Computer Programs for Epidemiologists: PEPI Version 4.0*. Salt Lake City, UT, Sagebrush Press, 2001.

67. Hartl DL, Clark AG. Principles of population genetics. Sinauer Associations Inc., Sunderland. 1997.
68. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:177-82.
69. Ayo CM, da Silveira Camargo AV, Xavier DH, Batista MF, Carneiro OA, Brandao de Mattos CC, et al. Frequencies of allele groups HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 in a population from the north-western region of São Paulo State, Brazil. *Int J Immunogenet* 2014; 42(1):19-25.
70. Salvadori LC, Santana FC, Marcos EV. Frequency of alleles and haplotypes of the human leukocyte antigen in Bauru, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014;36:108-14.
71. Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, Neumann J. HLA-A, -B, and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum Immunol* 2012;73:180-5.
72. Bardi MS, Jarduli LR, Jorge AJ, Camargo RB, Carneiro FP, Gelinski JR, et al. HLA-A, B and DRB1 allele and haplotype frequencies in volunteer bone marrow donors from the north of Parana State. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012;34:25-30.
73. Carvalho MG, Tsuneto LT, Moita Neto JM, Sousa L, Sales Filho HL, Macedo MB, et al. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies in Piaui volunteer bone marrow donors enrolled at the Brazilian registry. *Human Immunology* 2013;74: 1598.
74. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011;39:913–9.
75. Trachtenberg A, Jobim LF, Kraemer E, Salzano FM, Moraes ME, et AL. The HLAA polymorphism in Five Brazilian populations. *Ann Human Biol.* 1988;15:213-217.
76. Monte SJ, Moita Neto JM, Rampim GF, Shulzhenko N, MorgunA, Gerbase-DeLima M. Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí. *Rev Assoc Med Bras.* 2004;50:422-6.

77. Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA. HLADRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the north-eastern region of the state of Sao Paulo. *Tissue Antigens* 2001;57:158-62.
78. Ruiz TM, da Costa SM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, da Graça Bicalho M. Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a Brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. *Transplant Proc* 2005;37:2293-6.
79. Ribas F, Oliveira LA, Petzl-Erler ML, Bicalho MG. Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in euro-Brazilians. *Tissue Antigens* 2008;72:532-8.
80. Carvalho AS. HLA-A, -B and -C markers in the Portuguese population. *Tissue Antigens* 1983;21:39-44.
81. Piazza A, Olivetti E, Griffo RM. The distribution of HLA antigens in Italy. *Genes Geogr* 1989;3:141-64.
82. Ennes MA. Imigração e direitos na região noroeste paulista. *Estudos de Sociologia (Recife)* 2006;12:53-78.
83. Levy MSF. O papel da migração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). *Revista de Saúde Pública* 1974;49-90.
84. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Estados Sao Paulo. Censo demográfico 2010: migração – amostra [cited 2015 Mar 12]. Available from: <http://brasil500anos.ibge.gov.br/territorio-brasileiro-e-povoamento/portugueses>
85. Assane AA, Fabricio-Silva GM, Cardoso-Oliveira J, Mabuda NEJ, Souza AM, Jani IV, et al. Human leukocyte antigen -A, -B and -DRB1 allele and haplotype frequencies in the Mozambican population: a blood donor-based study. *Hum Immunol* 2010;71:1027-32.
86. Fabreti-Oliveira RA, E Nascimento, CG Fonseca, MA Santo. The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens* 2014;84:187-197.
87. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Estados Sao Paulo. Censo demográfico 2010 [cited 2015 Mar 12]. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=cd&o=13&i=P&c=2094>

88. Samaha H, Rahal EA, Abou-Jaoude M, Younes M, Dacchache J, Hakime N. HLA class II allele frequencies in the Lebanese population. *Mol Immunol* 2003;39:1079-81.
89. Khansa S, Hoteit R, Shammaa D, Khalek RA, El Halas H, Greige L, et al. HLA class II allele frequencies in the Lebanese population. *Gene* 2012;506:396–399.
90. Alcoceba M, Marín L, Balanzategui A, Sarasquete ME, Chillón MC, Martín-Jiménez P, et al. Frequency of HLA-A, -B and -DRB1 specificities and haplotypic associations in the population of Castilla y León (northwest-central Spain). *Tissue Antigens* 2011;78:249-255.

HLA -A, -B, and -DRB1 allele and haplotype diversity in a cohort of Brazilian renal transplant candidates

Running head: HLA diversity and renal transplant

Camila Ravazzi-Gauch^{a,b}, Miklos Maximiliano Bajay^c, Heloisa Cristina Caldas^a, Mario Abbud-Filho^{a,b}

^aLaboratory of Immunology and Experimental Transplantation-LITEX, Medical School of São José do Rio Preto– FAMERP, SP, Brazil

^bLaboratory of Immunology of Transplantation, Institute of Urology and Nephrology, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^cDepartment of Genetics, University of São Paulo-USP, Piracicaba, SP, Brazil

Institution and correspondence address:

Address reprint requests to Mario Abbud Filho, PhD

Department of Medicine/Nephrology – Medical School FAMERP-HB/FUNFARME

Laboratory of Immunology and Experimental Transplantation - LITEX

Av Brigadeiro Faria Lima 5416

CEP 15090-000, Sao José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Phone: +55 17 3201-5739

E-mail: mabbud@terra.com.br

*** Word count: 3.465**

*** Number of references: 39**

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; CDC, complement-dependent microlymphocytotoxicity; PCR-SSP, polymerase chain reaction/sequence specific priming;

Abstract

The distribution of organs for renal transplant depends on HLA matching between donor and recipient. In Brasil very few studies have evaluated HLA diversity in the renal transplant candidates. This study aimed to characterize the allele and haplotype frequencies of HLA-A, -B, and -DRB1 in a cohort of renal transplant candidates populations in the region of Sao José do Rio Preto (State of São Paulo), to compare the allele frequencies between Caucasian and Black in that region, as well as to compare these frequencies with different Brazilian populations reported. The HLA-A, -B, and -DRB1 allele and haplotypes frequencies were analyzed in a sample of 2.624 individuals and classified according to the ethnic group (2.347 Caucasians and 277 Blacks). The HLA class I (A, B) and class II (DRB1) specificities were determined by Complement-Dependent Microlymphocytotoxic (CDC) and Polymerase Chain Reaction/Sequence Specific Priming (PCR-SSP) methods, respectively. Twenty-one HLA-A, 34 HLA-B and 13 HLA-DRB1 allelic groups were identified. The most frequent alleles for each locus were HLA-A*02, HLA-B*35, and HLA-DRB1*11. The most frequent haplotypes found were A*01 B*08 DRB1*03 among Caucasians and A*29 B*15 DRB1*04 among Blacks. The most common alleles for each locus among RTx were HLA-A*02, HLA-B*35 and HLA-DRB1*11. The haplotypes A*01 B*08 DRB1*03 and A*29 B*44 DRB1*07 prevailed among Caucasians and Blacks, respectively. This study provides the first data on the HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype frequencies of renal transplant candidates populations in the region of Sao José do Rio Preto.

Keywords: HLA antigens, Genetic polymorphism, Gene frequency, Transplantation, Brazilian population.

1. Introduction

The HLA complex is located on the short arm of chromosome 6 and encodes molecules, whose alleles and haplotypes are ethnically and geographically restricted, as well as distributed in populations [1]. Major factors contributing to the distribution of HLA genes and haplotypes in human populations are isolation, migration and admixture [2-4].

Considering that the distribution of organs for renal transplant depends on HLA matching between donor and recipient [5], the knowledge and determination of the HLA polymorphism are of great importance for the strategic planning of a national recipient registry, in order to identify which donor is the best possible match [6-8].

The analysis of HLA frequency distribution in the whole population can also be used to analyze population-specific HLA disease associations in anthropological research, as well as to make inference of relationships in population data [9-11]. Moreover, HLA system shows significant linkage disequilibrium, which has an important clinical application. The investigation of these alleles and haplotypes, which are in linkage disequilibrium, may support further studies on genetic composition and origin of different populations [12]. Accordingly, the characterization of HLA polymorphism, the mechanisms of inheritance, and their associations in different human populations are of great interest [13].

The Brazilian population is characterized by a wide mixture of many ethnic groups, predominantly Caucasians of European origin, Blacks, Indians, and a large group of mixed-race descendants of these ethnic groups. As a result, the Brazilian population may vary considerably according to the region to be studied [14,15].

Considering the knowledge of the diversity and distribution of HLA alleles and haplotypes in our population may help in the process of allocation of organs for

transplantation and that in Brasil very few studies have evaluated HLA diversity (allelic and haplotypic) in the renal transplant candidates, the purpose of this study was to determine the frequencies of HLA-A, -B, and -DRB1 alleles and haplotypes in a cohort of renal transplant candidates, as well as the allele and haplotypic frequencies among ethnic groups, in the region of São José do Rio Preto, located in the northwest portion of the State São of Paulo.

2. Patients and Methods

2.1 Samples

This study included the retrospective analysis of data from medical records of 2.624 renal transplant candidates, of both genders, who underwent tissue typing at the Laboratory of Transplantation Immunology of the Institute of Urology and Nephrology, in São José do Rio Preto, from January 2000 to December 2011. All histocompatibility tests were performed aiming at renal transplant, following specific medical indication. The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Medical School (n° 131257) in accordance with current standards for human research. Because the study was carried retrospectively, the term informed consent was dispensed.

The renal transplant candidates were divided into two ethnic groups: Caucasians, n = 2.347 and Blacks, n = 277. The ethnicity of the subjects of this study was based on phenotypical traits, such as facial features, hair, skin color, body type and family country of origin, when available.

2.2 DNA extraction and HLA Typing

2.2.1 HLA Class I Typing

The HLA class I (A, B) specificities were determined by the complement-dependent microlymphocytotoxic (CDC) method [16], using Monoclonal Typing Trays LMT™ First HLA Class I, number CatalogueLM172 (One Lambda, CA, USA).

2.2.2 HLA Class II Typing

The genomic DNA was obtained from peripheral blood using the Illustra Tissue and the Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, London,UK), following the instructions provided by the manufacturers.

The HLA class II (DRB1) specificity was determined using low-resolution methods, with a SSP2L Micro SSPT™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray Kit (One Lambda, CA, USA). This kit is based on the Polymerase Chain Reaction /Sequence Specific Priming (PCR-SSP) method [17], according to the manufacturer's instructions.

3. Statistical Analysis

The allele and haplotype frequencies, as well as significant linkage disequilibrium parameters of HLA two-locus haplotypes, were calculated using the Arlequin software v 3.11 [18]. The expectation–maximization algorithm was used to determine haplotype frequencies. The Bernstein method was used to calculate the phenotype frequencies [19]. The significance of the differences between the allele frequencies in our sample and in samples of other Brazilian populations was calculated by Yates' correction test, using the PEPI v. 4.0 computer program [20]. Allele frequencies cutoff value was set at 0.05 to compare frequencies among populations.

4. Results

All loci studied were in Hardy–Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). In the analysis of the total sample, 21 HLA-A, 34 HLA-B and 13 HLA-DRB1 allelic groups were identified. The highest and lowest frequencies of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 specificities are showed in Tables 1, 2 and 3, respectively. For the HLA-A locus, the HLA-A*30 allele were more frequent among Blacks (8.1%) than among Caucasians (6.3%), whereas the HLA-A*23 allele showed the highest frequency in the Caucasians cohort (5.6%). In the HLA-B locus, the frequency of the HLA-B*35 and -B*44 alleles was higher in Caucasians (12.0 and 10.8%, respectively), whereas the HLA-B*15 and -B*14 alleles were more frequent in Blacks (9.8 and 6.1%, respectively). The HLA-B*46, -B*47, -B*59 and -B*73 alleles were observed only in Caucasians. For the HLA-DRB1 locus, the allele that showed most significant difference in terms of frequency among the samples was the HLA-DRB1*11, with a frequency of 14.5% in Caucasians and 11.3% in Blacks (Table 4).

The frequencies of the 10 most common HLA -A, -B, -DRB1 haplotypes observed in the total sample and in the different ethnic groups are summarized in Table 5. The frequencies presented in the analyzed sample are based on the allele frequencies. The most common haplotype found in the total sample was A*01 B*08 DRB1*03 (1.8%). The same haplotype showed a higher frequency in Caucasians cohort (1.0%), whereas the A*29 B*44 DRB1*07 haplotype was more frequent in Blacks (1.1%). The A*02 B*51 DRB1*13 (0.7%) and A*11 B*35 DRB1*01 (0.6%) haplotypes occurred only in Caucasians, whereas the A*02 B*40 DRB1*11 (0.7%) and A*30 B*18 DRB1*03 (0.8%) haplotypes were observed only in Blacks.

The significant linkage disequilibrium parameters of HLA two-locus haplotypes are shown in Table 6.

5. Discussion

The Brazilian population is characterized by a mixture of several ethnic groups due to extensive immigration from different continents, and therefore shows a high HLA diversity. The characterization of such allele and haplotype diversity plays an important role in organ transplant. It is also an essential tool to be applied in many population studies [21].

This study showed that the most frequent HLA-A locus antigens were A* 02 (25.1%), A* 24 (10.4%) and A* 03 (9.6%), which supports the findings of a study conducted by Salvadori,*et al.* with the population of Bauru, a Brazilian municipality in mid-western region of the State of São Paulo [22].

Concerning the most frequent alleles of HLA-B and HLA-DRB1 loci, our study showed similar results to those which analysed the frequency of HLA antigens in the populations in the State of São Paulo [22-24] and in the southern region of the country [25-27].

In the study population, there was high frequency of those alleles characteristic of the European population, namely, HLA-A*24, HLA-B*44, HLA-DRB1*11 and HLA-DRB1*13 [28-30], possibly due to high influx of Portuguese, Spanish and Italian immigrants in our region [31-33]. Additionally, the findings show the occurrence of alleles commonly observed in African populations, such as HLA-B * 15 and HLA-DRB1 * 03 [34-35], although about 4% of the population in our region is of African descent [36].

Our results confirm those reported by Ayo,*et al.*, who analysed HLA diversity in the north-western portion of the State of São Paulo and observed a heterogeneous population, composed mainly of a mixture of HLA alleles groups typical of European and African populations [23].

Interestingly, some alleles frequently found in the Lebanese population were also observed in our population. The HLA A* 03 and HLA DRB1 * 04 alleles, characteristic of the Lebanese population, were the third most common alleles in our study for the HLA-A and HLA-DRB1 loci, respectively [37-38]. This emphasises the findings related to the high number of Lebanese settlers in our region [31-33].

The analysis of allele frequencies between samples of Caucasians and Blacks in our study showed that the alleles characteristic of European populations were more frequent in our Caucasian sample, where as the most common alleles among Africans were more frequent in our sample of black population.

These results corroborate the findings reported by Bortolotto, *et al.*, who showed that alleles characteristic to European populations are more frequent in predominantly white populations [25]. They also confirm those findings reported by Carvalho,*et al.*, who observed that alleles which are more common in African populations, namely HLAB 15, are more frequent in admixed populations [39].

Importantly, this is a pioneer study about the analysis of HLA -A, -B, and -DRB1 haplotype diversity in the region of São José do Rio Preto. Our results showed that haplotypes common in European populations, namely, A*01 B*08 DRB1*03 and A*03 B*07 DRB1*15 prevailed in our Caucasian population. Similar results were obtained by Fabreti-Oliveira, *et al.*, who observed a higher frequency of these haplotypes in the southern and south-eastern parts of Brazil. The most frequent haplotype in the study black population was A*29 B*44 DRB1*07, similar to the results obtained by a study conducted within the population in the northeast of Brazil [35].

Our study demonstrates that the region of São José do Rio Preto is characterized by a racially mixed population and strongly influenced by those alleles which are characteristic of the European, African and Lebanese populations. Our results further

confirm that the characterization of HLA alleles and haplotypes of a specific population is influenced by ethnicity and it is also related to a history of colonization. However, it is important to emphasise the need of a comprehensive rational mapping to better understand the HLA diversity in the overall Brazilian population.

6. Conclusion

Our study shows that, in the renal transplant candidates populations in the region of Sao José do Rio Preto, the most common alleles for each locus were HLA-A*02, HLA-B*35 and HLA-DRB1*11. The haplotypes A*01 B*08 DRB1*03 and A*29 B*44 DRB1*07 prevailed among Caucasians and Blacks, respectively.

These data provide a better understanding of the distribution of the HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 alleles and haplotypes in our population. Furthermore, these informative data may contribute in the process of allocation of organs for transplantation in this region and across the country, helping find suitable donors, reducing the length of waiting times and increasing the survival rates among recipients.

Conflict of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

- [1]. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol* 2008;69:443–64.
- [2]. Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008;20:588-93.
- [3]. Spellman SR, Eapen M, Logan BR, Mueller C, Rubinstein P, Setterholm MI, et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood* 2012;120:259-65.
- [4]. Valluri V, Mustafa M, Santhosh A, Middleton D, Alvares M, El Haj E, et al. Frequencies of HLA-A, HLA-B, HLA-DR and HLA-DQ phenotypes in the United Arab Emirates population. *Tissue Antigens* 2005;66:107-113.
- [5]. Machado EL, Cherchiglia ML, Acúrcio FA. Profile and clinical outcome of patients in waiting list for kidney transplantation, Belo Horizonte (MG, Brazil), 2000-2005. *Ciênc Saúde Coletiva* 2011;6(3):1981-92.
- [6]. Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, et al. Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol* 2009;70:895-902.
- [7]. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor–recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007;110:4576-83.
- [8]. Hurley CK, Maiers M, Marsh SG, Oudshoorn M. Overview of registries, HLA typing and diversity, and search algorithms. *Tissue Antigens* 2007;69: 3-5.

- [9]. Sanchez-Mazas A, Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little AM, Bekmane U, et al. Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations. *Int J Immunogenet* 2012;39:459-72.
- [10]. Mack SJ1, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK, Cao K, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. *Tissue Antigens* 2009;73:17-32.
- [11]. Romphruk AV, Romphruk A, Kongmaroeng C, Klumkrathok K, Paupairoj C, Leelayuwat C. HLA class I and II alleles and haplotypes in ethnic Northeast Thais. *Tissue Antigens* 2010;75:701-711.
- [12]. Rodey G. *HLA Beyond Tears* (ed 2). Houston; Pel-Freez; 2000.
- [13]. Powis SH, Geraghty DE. What is the MHC. *Immunol Today* 1995;13:90-92.
- [14]. 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;41:238-242.
- [15]. Moraes JRF, Moraes, MEH. Distribuição dos alelos HLA na população brasileira. *Hematologia Hemoterapia* 1996;01:18-23.
- [16]. Mittal KK, Mickey MR, Singal DP, Terasaki PI. Serotyping for homotransplantation. XVIII. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* 1968;6:913-927.
- [17]. Casanova JL, Pannetier C, Jaulin C, Kourilsky P. Optimal conditions for directly sequencing double-stranded PCR products with sequenase. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4028.
- [18]. 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.

- [19]. Mattiuz PL. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In: Terasaki, P. I. (Ed.). *Histocompatibility testing*, Copenhagen: Munksgaard; 1970;1:193-205.
- [20]. Abramson JH, Gahlinger PM. *Computer Programs for Epidemiologists: PEPI Version 4.0*. Salt Lake City, UT, Sagebrush Press, 2001.
- [21]. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:177-82.
- [22]. Salvadori LC, Santana FC, Marcos EV. Frequency of alleles and haplotypes of the human leukocyte antigen in Bauru, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014;36:108-14.
- [23]. Ayo CM, da Silveira Camargo AV, Xavier DH, Batista MF, Carneiro OA, Brandao de Mattos CC, et al. Frequencies of allele groups HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 in a population from the north-western region of São Paulo State, Brazil. *Int J Immunogenet* 2014; 42(1):19-25.
- [24]. Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA. HLADRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the north-eastern region of the state of Sao Paulo. *Tissue Antigens* 2001;57:158-62.
- [25]. Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, Neumann J. HLA-A, -B, and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum Immunol* 2012;73:180-5.
- [26]. Ruiz TM1, da Costa SM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, da Graça Bicalho M. Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a Brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. *Transplant Proc* 2005;37:2293–6.

- [27]. Bardi MS, Jarduli LR, Jorge AJ, Camargo RB, Carneiro FP, Gelinski JR, et al. HLA-A, B and DRB1 allele and haplotype frequencies in volunteer bone marrow donors from the north of Parana State. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012;34:25-30.
- [28]. Ribas F, Oliveira LA, Petzl-Erler ML, Bicalho MG. Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in euro-Brazilians. *Tissue Antigens* 2008;72:532–8.
- [29]. Carvalho AS. HLA-A, -B and -C markers in the Portuguese population. *Tissue Antigens* 1983;21:39–44.
- [30]. Piazza A, Olivetti E, Griffo RM. The distribution of HLA antigens in Italy. *Genes Geogr* 1989;3:141–64.
- [31]. Ennes MA. Imigração e direitos na região noroeste paulista. *Estudos de Sociologia (Recife)* 2006;12:53-78.
- [32]. Levy MSF. O papel da migração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). *Revista de Saúde Pública* 1974;49-90.
- [33]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Estados Sao Paulo. Censo demografico 2010: migracao – amostra [cited 2015 Mar 12]. Available from: <http://brasil500anos.ibge.gov.br/territorio-brasileiro-e-povoamento/portugueses>
- [34]. Assane AA, Fabricio-Silva GM, Cardoso-Oliveira J, Mabuda NEJ, Souza AM, Jani IV, et al. Human leukocyte antigen -A, -B and –DRB1 allele and haplotype frequencies in the Mozambican population: a blood donor-based study. *Hum Immunol* 2010;71:1027-32.
- [35]. Fabreti-Oliveira RA, E Nascimento, CG Fonseca, MA Santo. The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens* 2014;84:187–197.

- [36]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Estados Sao Paulo. Censo demográfico 2010 [cited 2015 Mar 12]. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=cd&o=13&i=P&c=2094>
- [37]. Samaha H, Rahal EA, Abou-Jaoude M, Younes M, Dacchache J, Hakime N. HLA class II allele frequencies in the Lebanese population. *Mol Immunol* 2003;39:1079-81.
- [38]. Khansa S, Hoteit R, Shammaa D, Khalek RA, El Halas H, Greige L, et al. HLA class II allele frequencies in the Lebanese population. *Gene* 2012;506:396–399.
- [39]. Carvalho MG, Tsuneto LT, Moita Neto JM, Sousa L, Sales Filho HL, Macedo MB, et al. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies in Piauí volunteer bone marrow donors enrolled at the Brazilian registry. *Human Immunology* 2013;74: 1598.

Title and Legend

Table 1. HLA-A allele frequencies in the total sample (n = 2624). Fa= AlleleFrequency; Ff = PhenotypeFrequency.

Table 2. HLA-B allele frequencies in the total sample (n = 2624). Fa= AlleleFrequency; Ff = PhenotypeFrequency.

Table 3. HLA-DRB1 allele frequencies in the total sample (n = 2624). Fa= AlleleFrequency; Ff = PhenotypeFrequency.

Table 4. Allelic groups frequencies in the total sample (n = 2624) and their comparisons between ethnics groups. B, Blacks; C, Caucasians. The p values indicate a significant difference between the groups. Probability was determined by chi-squared tests using Yates correction. Allele frequencies cutoff value was set at 0.05 to compare frequencies among populations. -, Did not occur in this group.

Table 5. Frequency of the 10 most commonHLA –A, –B,–DRB1haplotypes in total sample and in the different ethnic groups. -, Did not occur in this group.

Table 6. Haplotype frequency and relative linkage disequilibrium parameter of HLA two-locus haplotypes in the total sample and in the different ethnic groups. Fa = Allele Frequency; FaC = Allele Frequency among Caucasians; D'C = Linkage Disequilibrium among Caucasians. FaB = Allele Frequency among Blacks; D'B = Linkage Disequilibrium among Blacks. D' = The linkage disequilibrium coefficient D standardized by the maximum value it can take.

Table 1. HLA-A allele frequencies in the total sample (n = 2624)

Allele	Fa	Ff
A*01	0.081	0.157
A*02	0.251	0.450
A*03	0.096	0.186
A*11	0.056	0.107
A*23	0.054	0.103
A*24	0.104	0.198
A*25	0.015	0.030
A*26	0.036	0.072
A*29	0.039	0.077
A*30	0.064	0.124
A*31	0.036	0.0712
A*32	0.025	0.049
A*33	0.028	0.056
A*34	0.009	0.017
A*36	0.004	0.009
A*43	0.002	0.004
A*66	0.014	0.027
A*68	0.057	0.112
A*69	0.002	0.004
A*74	0.013	0.026
A*80	0.003	0.007

Fa= Allele Frequency; Ff = Phenotype Frequency

Table 2. HLA-B allele frequencies in the total sample (n = 2624)

Allele	Fa	Ff
B*07	0.069	0.135
B*08	0.057	0.110
B*13	0.009	0.019
B*14	0.043	0.084
B*15	0.095	0.185
B*18	0.055	0.108
B*27	0.020	0.039
B*35	0.118	0.224
B*37	0.013	0.026
B*38	0.024	0.048
B*39	0.029	0.055
B*40	0.043	0.082
B*41	0.011	0.022
B*42	0.014	0.028
B*44	0.106	0.194
B*45	0.019	0.036
B*46	0.0008	0.001
B*47	0.002	0.004
B*48	0.007	0.014
B*49	0.026	0.050
B*50	0.019	0.036
B*51	0.094	0.181
B*52	0.018	0.034
B*53	0.022	0.043
B*54	0.002	0.004
B*55	0.011	0.021
B*56	0.005	0.010
B*57	0.024	0.046
B*58	0.023	0.045
B*59	0.001	0.002
B*67	0.002	0.005
B*73	0.002	0.0003
B*78	0.002	0.003
B*81	0.004	0.004

Fa= Allele Frequency; Ff = Phenotype Frequency

Table 3. HLA-DRB1 allele frequencies in the total sample (n = 2624)

Allele	Fa	Ff
DRB1*01	0.085	0.163
DRB1*03	0.123	0.223
DRB1*04	0.127	0.239
DRB1*07	0.113	0.213
DRB1*08	0.059	0.114
DRB1*09	0.021	0.041
DRB1*10	0.018	0.035
DRB1*11	0.144	0.262
DRB1*12	0.021	0.042
DRB1*13	0.141	0.263
DRB1*14	0.038	0.075
DRB1*15	0.079	0.152
DRB1*16	0.025	0.050

Fa= Allele Frequency; Ff = Phenotype Frequency

Table 4. Allelic groups frequencies in the total sample ($n = 2,624$) and their comparisons between ethnics groups

HLA locus	Total	C (n=2347)	B (n=277)	CXB
A*01	0.081	0.106	0.709	1×10^{-5}
A*02	0.251	0.250	0.264	
A*03	0.096	0.098	0.085	
A*11	0.056	0.058	0.045	
A*23	0.054	0.056	0.038	3.7×10^{-5}
A*24	0.104	0.105	0.099	
A*25	0.015	0.016	0.009	2.1×10^{-3}
A*26	0.036	0.037	0.029	
A*29	0.039	0.041	0.029	1.5×10^{-3}
A*30	0.064	0.063	0.081	8.9×10^{-4}
A*31	0.036	0.036	0.043	
A*32	0.025	0.026	0.029	
A*33	0.028	0.028	0.034	
A*34	0.009	0.009	0.013	
A*36	0.004	0.005	0.004	
A*43	0.002	0.002	0.002	
A*66	0.014	0.014	0.013	
A*68	0.057	0.058	0.056	
A*69	0.002	0.003	0.002	
A*74	0.013	0.013	0.016	
A*80	0.003	0.004	0.004	
B*07	0.069	0.071	0.063	
B*08	0.057	0.059	0.051	
B*13	0.009	0.009	0.016	
B*14	0.043	0.042	0.061	3.2×10^{-5}
B*15	0.095	0.072	0.098	
B*18	0.055	0.055	0.065	
B*27	0.020	0.021	0.016	
B*35	0.117	0.120	0.079	
B*37	0.013	0.014	0.007	7.7×10^{-4}
B*38	0.024	0.025	0.018	
B*39	0.029	0.027	0.049	1.6×10^{-8}
B*40	0.043	0.042	0.056	
B*41	0.011	0.011	0.013	
B*42	0.014	0.014	0.020	
B*44	0.106	0.108	0.074	
B*45	0.019	0.019	0.025	
B*46	0.0008	0.001	-	
B*47	0.0023	0.003	-	7.7×10^{-6}
B*48	0.0072	0.007	0.009	
B*49	0.0261	0.027	0.022	
B*50	0.0196	0.020	0.016	
B*51	0.0945	0.095	0.080	
B*52	0.0175	0.017	0.020	

B*53	0.0219	0.022	0.023	
B*54	0.0019	0.002	0.004	
B*55	0.0107	0.011	0.005	9.6x10 ⁻⁴
B*56	0.0055	0.004	0.016	6.2x10 ⁻¹⁰
B*57	0.0244	0.024	0.029	
B*58	0.0229	0.023	0.023	
B*59	0.0010	0.001	-	
B*67	0.0025	0.002	0.005	
B*73	0.0017	0.002	-	1x10 ⁻⁰³
B*78	0.0021	0.002	0.002	
B*81	0.0042	0.004	0.009	
DRB1*01	0.085	0.087	0.064	
DRB1*03	0.123	0.122	0.104	
DRB1*04	0.127	0.125	0.108	2x10 ⁻⁰³
DRB1*07	0.113	0.125	0.112	
DRB1*08	0.059	0.060	0.056	
DRB1*09	0.021	0.022	0.025	
DRB1*10	0.018	0.018	0.022	
DRB1*11	0.144	0.145	0.113	
DRB1*12	0.021	0.020	0.027	
DRB1*13	0.141	0.126	0.103	1x10 ⁻⁰⁹
DRB1*14	0.038	0.038	0.042	
DRB1*15	0.079	0.078	0.094	
DRB1*16	0.025	0.027	0.009	7.3x10 ⁻¹²

B, Blacks; C, Caucasians.

The p values indicate a significant difference between the groups. Probability was determined by chi-squared tests using Yates correction. Allele frequencies cutoff value was set at 0.05 to compare frequencies among populations.

-, Did not occur in this group.

Table 5. Frequency of the 10 most common HLA –A, –B, –DRB1 haplotypes in total sample and in the different ethnic groups

Haplotype	Total Frequency	Caucasians (n=2347)	Blacks (n=277)
A*01 B*08 DRB1*03	0.018	0.013	0.007
A*29 B*44 DRB1* 07	0.012	0.008	0.011
A*03 B*07 DRB1*15	0.011	0.009	0.005
A*02 B*15 DRB1*13	0.011	0.007	0.006
A*02 B*51 DRB1*13	0.011	0.010	---
A*02 B*35 DRB1*11	0.009	0.007	0.005
A*02 B*15 DRB1*04	0.008	0.007	0.005
A*11 B*35 DRB1* 01	0,008	0.006	---
A*02 B*18 DRB1* 03	0.007	0.008	0.001
A*24 B*35 DRB1* 11	0.006	0.007	0.003

-, Did not occur in this group.

Table 6. Haplotype frequency and relative linkage disequilibrium parameter of HLA two-locus haplotypes in the total sample and in the different ethnic groups

HLA A	HLA B	Fa	D'	Fa C	D' C	Fa B	D' B
2	51	0.0413	0.0176	0.0405	0.2346	0.0307	0.1038
2	15	0.0322	0.0081	0.0356	0.1485	0.0162	-0.1462
2	44	0.0276	0.0007	0.0273	0.0018	0.0379	0.1905
1	8	0.0272	0.4232	0.0268	0.4100	0.0325	0.6003
3	7	0.0223	0.2463	0.0241	0.2690	0.0108	0.0946
3	35	0.0212	0.1155	0.0194	0.0893	0.0271	0.2441
2	18	0.0204	0.0064	0.0198	0.1509	0.0162	-0.0514
2	7	0.0198	0.0022	0.019	0.0240	0.0271	0.2241
24	35	0.0185	0.0662	0.02	0.0793	0.0181	0.0916
29	44	0.0183	0.3971	0.0192	0.4041	0.0126	0.3792

HLA A	DRB1	Fa	D'	Fa C	D' C	Fa B	D' B
2	4	0.0427	0.1126	0.0409	0.1269	0.0433	0.0230
2	13	0.0383	0.0254	0.042	0.0844	0.0217	-0.2677
2	11	0.0295	-0.1870	0.0311	-0.1992	0.0379	0.1389
24	11	0.0265	0.1266	0.0268	0.1072	0.0361	0.2366
2	7	0.0261	-0.0892	0.0281	-0.0325	0.0253	-0.0651
1	3	0.0255	0.2158	0.0228	0.2183	0.0361	0.2371
2	8	0.0246	0.2146	0.0213	0.1583	0.0307	0.3430
2	3	0.0231	-0.2553	0.0224	-0.2381	0.0217	-0.2821
2	1	0.0202	-0.0593	0.0185	-0.2632	0.0235	0.1389
3	11	0.0187	0.0580	0.0175	0.0376	0.0253	0.2059

HLA B	DRB1	Fa	D'	Fa C	D' C	Fa B	D' B
8	3	0.037	0.5874	0.0409	0.5957	0.0433	0.4229
35	11	0.0353	0.1805	0.042	0.1936	0.0217	0.1094
44	7	0.0322	0.2114	0.0311	0.2007	0.0379	0.1872
15	13	0.0265	0.1576	0.0268	0.1508	0.0361	0.1640
7	15	0.0244	0.2926	0.0281	0.2913	0.0253	0.3378

51	13	0.0183	0.0605	0.0228	0.0888	0.0361	0.0191
35	1	0.0177	0.1016	0.0213	0.1148	0.0307	-0.5086
18	11	0.0173	0.1954	0.0224	0.2191	0.0217	0.0605
18	3	0.017	0.2072	0.0185	0.1904	0.0235	0.1023
15	4	0.0166	0.0529	0.0175	0.0604	0.0253	0.0023

Fa= AlleleFrequency; D' = Linkage Disequilibrium in the total sample.

FaC= AlleleFrequency among Caucasians; D'C = Linkage Disequilibrium among Caucasians.

FaB = AlleleFrequency among Blacks; D'B = Linkage Disequilibrium among Blacks.

D'= The linkage disequilibrium coefficient D standardized by the maximum value it can take.

