

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PATRICIA KEIKO SAITO

Marcadores genéticos HLA e desenvolvimento de anticorpos anti-HLA em
candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná

Maringá
2013

PATRICIA KEIKO SAITO

Marcadores genéticos HLA e desenvolvimento de anticorpos anti-HLA em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde Humana

Orientador: Prof.^a Dr.^a Sueli Donizete Borelli

Maringá

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S158m Saito, Patricia Keiko
Marcadores genéticos HLA e desenvolvimento de anticorpos anti-HLA em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná / Patricia Keiko Saito. -- Maringá, 2013.
90 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Profa. Dra. Sueli Donizete Borelli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

1. Antígenos leucocitários humanos (HLA). 2. Anticorpos anti-HLA. 3. Insuficiência renal - Transplante. 4. Polimorfismo genético. 5. Biologia molecular. 6. Histocompatibilidade. 7. Transplante renal. I. Borelli, Sueli Donizete, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed. 616.0792

MN-0000794

FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRICIA KEIKO SAITO

Marcadores genéticos HLA e desenvolvimento de anticorpos anti-HLA em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Sueli Donizete Borelli
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Luíza Tamie Tsuneto
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Sérgio Seiji Yamada
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Luíz Carlos de Mattos
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2013.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho a todos que
contribuíram para a sua realização,
e que estiveram ao meu lado nesta
etapa da minha vida.

AGRADECIMENTO(S)

A Deus, por estar presente em minha vida, guiando meus caminhos com extrema perfeição.

Aos meus pais, Marina Sadako Tsuboi Saito e Keiji Saito, pelo carinho e apoio.

Aos meus irmãos, Marcio e Ricardo, pelo incentivo.

Ao meu namorado, Roger Haruki Yamakawa, por ser meu maior companheiro e incentivador.

Obrigada pelo carinho e, principalmente, pelo apoio e paciência em todos os momentos.

À minha orientadora, Sueli Donizete Borelli, pelo apoio, incentivo, confiança e dedicação de longa data. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, e guiar-me até hoje em minha jornada acadêmica.

A todos os funcionários e professores do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em especial, ao Fabiano Cavalcante de Melo e Marco Antônio Braga, pelo suporte técnico.

Aos colegas de Mestrado em Ciências da Saúde, em especial à Rosiane Ribeiro dos Santos que, se juntou a turma do Laboratório de Imunogenética, durante o percurso do mestrado. Obrigada por sua amizade e apoio.

A todos os colegas e estagiários do Laboratório de Imunogenética da UEM.

À Érika Noguti Noda e Érica Aparecida Pereira pela ajuda na coleta de dados dos pacientes e suporte técnico.

Aos professores Luíza Tamie Tsuneto, Sérgio Seiji Yamada, Luíz Carlos de Mattos e Ricardo Alberto Moliterno, pela gentileza em participarem da comissão julgadora da dissertação, e pelas correções sugeridas.

Aos pacientes que participaram deste estudo.

Aos funcionários e clínicos dos setores de Hemodiálise.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Qualquer que seja a dificuldade, se você a encarar sem temor, sempre achará a chave da sua solução”.

(MASSAHARU TANIGUCHI)

Marcadores genéticos HLA e desenvolvimento de anticorpos anti-HLA em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná

RESUMO

O sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) possui papel de destaque entre os sistemas biológicos envolvidos no processo de rejeição. Nesse trabalho, foram avaliadas as frequências alélicas, fenotípicas e haplotípicas HLA classe I (HLA-A, -B e -C) e classe II (HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1) e anticorpos anti-HLA, em pacientes com doença renal crônica (DRC), candidatos ao transplante renal, da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. A tipificação HLA foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO), associado à tecnologia Luminex. A determinação da reatividade contra painel (PRA) e das especificidades de anticorpos anti-HLA foram realizados pelos kits LS1PRA e LS2PRA (One Lambda, Inc.), associados à tecnologia Luminex. As frequências dos genes HLA-A, -B e -DRB1 foram estudadas em 522 pacientes (319 caucasianos, 134 mestiços e 69 negros). Foram identificados 20 grupos alélicos HLA-A, 32 HLA-B e 13 HLA-DRB1. Os grupos alélicos *HLA-A*02* (25.4%), *HLA-B*44* (10.9%) e *HLA-DRB1*13* (13.9%) e o haplótipo *HLA-A*01-B*08-DRB1*03* (2.3%) foram os mais frequentes. Diferenças significativas ($p < 0.05$) foram observadas nas frequências alélicas *HLA-A*68*, *-B*08* e *-B*58* entre os grupos étnicos. As frequências dos genes HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1 foram estudadas em 366 pacientes (220 caucasianos, 95 mestiços e 51 negros). Um total de 20 grupos alélicos HLA-A, 30 HLA-B, 14 HLA-C, 13 HLA-DRB1, 6 HLA-DQA1 e 5 HLA-DQB1 foram identificados. Dos 88 grupos alélicos, foram encontrados 19 com frequência maior do que 10%. Diferenças significativas ($p < 0.05$) foram observadas nas frequências alélicas *HLA-A*68* e *-C*07* entre os grupos étnicos. O haplótipo mais frequente foi o *HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* (2.4%). A resposta imune humoral aos antígenos HLA foi avaliada em 269 pacientes, 182 (67.7%) pacientes apresentaram PRA positivo. Os potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA (gestações, transfusões sanguíneas e transplantes prévios) não apresentaram diferenças significativas, entre os grupos PRA positivo e negativo. Somente o gênero diferiu estatisticamente entre estes grupos ($p < 0.05$). Entre os pacientes com PRA positivo, 62 (34.1%) eram classe I positivos e classe II negativos; 39 (21.4%) eram classe I negativo e classe II positivos e 81 (44.5%) eram classes I e II positivos. Os grupos alélicos *HLA-A*02* (24.2%), *HLA-B*44* (10.6%) *HLA-DRB1*11* (13.6%) e os anticorpos anti-HLA

A34 (24.7%); B57 (20.9%); C15 (3.3%); C16 (3.3%); DR51 (29.1%); DQ8 (31.3%) e DP14 (1.6%) foram os mais comuns. Este estudo permitiu o conhecimento da diversidade HLA, e do perfil de anticorpos anti-HLA, em pacientes com DRC, em lista de espera por um órgão, na região Norte/Noroeste do Estado do Paraná.

Palavras-chave: Transplante. Antígenos HLA. Polimorfismo genético. Alelos. Anticorpos.

Genetic markers HLA and development of anti-HLA antibodies in renal transplant candidates from North/Northwest of Parana State

ABSTRACT

The HLA systems (Human Leukocyte Antigen) have a prominent role among the biological systems involved in the rejection process. In this study, we evaluated the HLA class I (HLA-A,-B and-C) and class II (HLA-DRB1,-DQA1 and-DQB1) allele, phenotype and haplotype and anti-HLA antibodies frequencies, in patients with chronic kidney disease (CKD), renal transplant candidates from Northern/Northwestern of Parana State, Southern Brazil. HLA typing was performed by the method of polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSO) associated with Luminex technology. The determination of panel reactive antibodies (PRA) and the specificities of anti-HLA antibodies were performed by kits LS1PRA and LS2PRA (One Lambda, Inc.) associated with Luminex technology. HLA-A,-B and -DRB1 gene frequencies were studied in 522 patients (319 Caucasians, 69 blacks and 134 mestizos). Twenty HLA-A, 32 HLA-B and 13 HLA-DRB1 allelic groups were identified. *HLA-A*02* (25.4%), *HLA-B*44* (10.9%) and *HLA-DRB1*13* (13.9%) allelic groups and *HLA-A*01 B*08 DRB1*03* haplotype (2.3%) were the most frequent. Significant differences ($p < 0.05$) were observed in the allele frequencies *HLA-A*68*, *-B*08* and *-B*58* among ethnic groups. HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 gene frequencies were studied in 366 patients (220 caucasians, 95 blacks and 51 mestizos). A total of 20 HLA-A, 30 HLA-B, 14 HLA-C, 13 HLA-DRB1, 6 HLA-DQA1 and 5 HLA-DQB1 allelic groups were identified. Of the 88 allelic groups, 19 were found with a frequency greater than 10%. Significant differences ($p < 0.05$) were observed in the allele frequencies *HLA-A*68* and *-C*07* among ethnic groups. The most frequent haplotype was *HLA-A*08 C*01 B*07 DRB1*03 DQA1*05 DQB1*02* (2.4%). The humoral immune response to HLA antigens was assessed in 269 patients, 182 (67.7%) patients had PRA positive. Potential risk factors for the development of anti-HLA antibodies (pregnancies, blood transfusions and previous transplants) showed no significant differences between PRA positive and negative groups. Only gender was statistically different between these groups ($p < 0.05$). Among patients with PRA positive, 62 (34.1%) were class I positive and class II negative; 39 (21.4%) were class I negative and class II positive and 81 (44.5%) were class I and II positive. The *HLA-A*02* (24.2%), *HLA-B*44* (10.6%) e *HLA-DRB1*11* (13.6%) allelic groups and anti-HLA-A34 (24.7%); B57 (20.9%); C15 (3.3%); C16 (3.3%); DR51 (29.1%); DQ8 (31.3%) e DP14 (1.6%) antibodies were the

most common. This study allowed the knowledge of HLA diversity and profile of anti-HLA antibodies in CKD patients in organ transplant waiting list from Northern/Northwestern of Parana State.

Keywords: Transplantation. HLA antigens. Genetic polymorphism. Alleles. Antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estrutura gênica do MHC (<i>Major Histocompatibility Complex</i>).	15
Figura 2.	Via direta e indireta de alorreconhecimento de antígenos.	17
Tabela 1.	Frequências (f) alélicas e fenotípicas no total de amostras (n = 522).	42
Tabela 2.	Frequências (f) alélicas no total de amostras (n = 522) e suas comparações entre os grupos étnicos.	44
Tabela 3.	Frequência dos 20 haplótipos HLA-A-B-DRB1 mais comuns no total de amostras e nos diferentes grupos étnicos.	47
Tabela 1.	Frequências (f) alélicas e fenotípicas HLA classe I (-A, -B e -C) no total de amostras (n=366).	62
Tabela 2.	Frequências (f) alélicas e fenotípicas HLA classe II (-DRB1, -DQA1 e -DQB1) no total de amostras (n=366).	63
Tabela 3.	Frequências (f) alélicas HLA classe I (-A, -B e -C) no total de amostras (n=366) e comparações entre os grupos étnicos.	63
Tabela 4.	Frequências (f) alélicas HLA classe II (-DRB1, -DQA1 e -DQB1) no total de amostras (n=366) e comparações entre os grupos étnicos.	66
Tabela 5.	Frequência dos 10 haplótipos HLA mais comuns no total de amostras (n=366) e nos diferentes grupos étnicos.	67
Tabela 1.	Características demográficas e potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA de acordo com resultado de PRA.	84
Tabela 2.	Frequências alélicas e fenotípicas HLA (-A, -B e -DRB1) no total de pacientes.	84
Tabela 3.	Distribuição de anticorpos anti-HLA de acordo com a porcentagem de PRA.	86
Tabela 4.	Frequência de anticorpos anti-HLA de classe I nos pacientes com PRA positivo.	87
Tabela 5.	Frequência de anticorpos anti-HLA de classe II nos pacientes com PRA positivo.	88

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II):

Human Immunology (artigo 1)

disponível em:

<http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/505763/authorinstructions > e

Tissue Antigens (artigo 2)

disponível em:

<[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1399-0039/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1399-0039/homepage/ForAuthors.html)>

Scandinavian Journal of Immunology (artigo 3)

disponível em:

<[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3083/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3083/homepage/ForAuthors.html)>

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	14
1.1. O Complexo Principal de Histocompatibilidade	14
1.2. Importância do sistema HLA no transplante de órgãos	17
1.3. Doença renal crônica e transplante renal	20
1.4. Justificativa	21
1.5. Objetivos	22
1.5.1. Geral	22
1.5.2. Específicos	22
1.6. Referências	22
2. CAPÍTULO 2	26
2.1. Artigo 1: Frequências alélicas e haplotípicas HLA-A, -B e -DRB1 em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil	26
2.2. Artigo 2: Diversidade de alelos e haplótipos HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1 em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil	48
2.3. Artigo 3: Avaliação da resposta imune humoral aos antígenos leucocitários humanos em brasileiros candidatos ao transplante renal	68
3. CAPÍTULO 3	89
3.1. Conclusões	89
3.2. Perspectivas futuras	90

1. CAPÍTULO I

1.1. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) ou MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) é uma extensa região formada por genes altamente polimórficos, responsáveis por codificar moléculas que participam de importantes processos da resposta imune. O MHC foi descoberto como um loco gênico, através de pesquisas conduzidas na década de 1930, por Peter Gorer (GORER, 1936; GORER, 1937) e na década de 1940, por George Snell (SNELL, 1948). Estes pesquisadores investigavam a rejeição de tumores e de tecidos normais alogênicos, em linhagens de camundongos. O loco, em especial, responsável pela rejeição de tecidos enxertados estava localizado no cromossomo 17 de camundongos e codificava um grupo sanguíneo polimórfico, denominado antígeno II. Consequentemente, essa região foi chamada de histocompatibilidade-2 (H-2) (ABBAS et al., 2008).

Com o desenvolvimento de técnicas de transfusão sanguínea foi possível a descoberta do MHC em humanos. Os genes do MHC estão presentes em todos os mamíferos, e são homólogos aos genes do H-2 identificados em camundongos. Em 1954, Dausset, observando indivíduos politransfundidos, verificou que, em seus soros estavam presentes anticorpos capazes de aglutinar, quando entravam em contato com leucócitos de outros indivíduos (DAUSSET, 1954). Baseado nesta descoberta, em 1958, Dausset, através da técnica de leucoaglutinação no soro de politransfundidos, descreveu o primeiro antígeno pertencente ao que, mais tarde, seria chamado de sistema HLA. Esse antígeno recebeu o nome de “Mac”, correspondente ao atual antígeno HLA-A2 (DAUSSET, 1958; TERASAKI; PARK, 2000).

Ainda em 1958, outros pesquisadores obtiveram descobertas semelhantes, através da observação de anticorpos contra leucócitos, no soro de mulheres múltíparas (VAN ROOD et al., 1958; PAYNE; ROLFS, 1958).

A partir da década de 1960, diversos pesquisadores tiveram interesse pela investigação do MHC. Para que fossem discutidos os resultados obtidos por diferentes centros de pesquisa, e a padronização, tanto dos testes utilizados quanto a nomenclatura do sistema HLA, foram criados os Encontros Internacionais de Histocompatibilidade ou IHWS (do inglês, *International Histocompatibility Workshop*). Foi assim que, em 1964, iniciou-se uma série desses encontros, com a finalidade de atualizar continuamente as descobertas, nas áreas de imunogenética e histocompatibilidade. Ao longo dos IHWS foi definido que, uma região do MHC, em humanos, receberia o nome de HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigen*), e a

primeira especificidade HLA, identificada por Dausset, e depois por outros pesquisadores, receberia o nome de HL-A2. Em 1967, foi estabelecido o Comitê de Nomenclatura dos fatores do sistema HLA da Organização Mundial da Saúde (OMS), responsável pela normatização da nomenclatura do sistema HLA (NOMENCLATURE, 1968). A comunidade científica, ao longo dos vários IHWS, caracterizou, estruturalmente e funcionalmente, vários genes pertencentes ao sistema HLA.

O MHC, localizado no braço curto do cromossomo 6 humano (segmento 6p21.3), é didaticamente dividido em 3 regiões: região de classe I, II e III (Figura 1). Cada região é constituída de diversos locos, os quais contêm genes que codificam os antígenos ou moléculas HLA de classe I e II. Tais moléculas são glicoproteínas altamente polimórficas, que diferem entre si quanto à distribuição em tecidos, estrutura e funções (ABBAS et al., 2008).

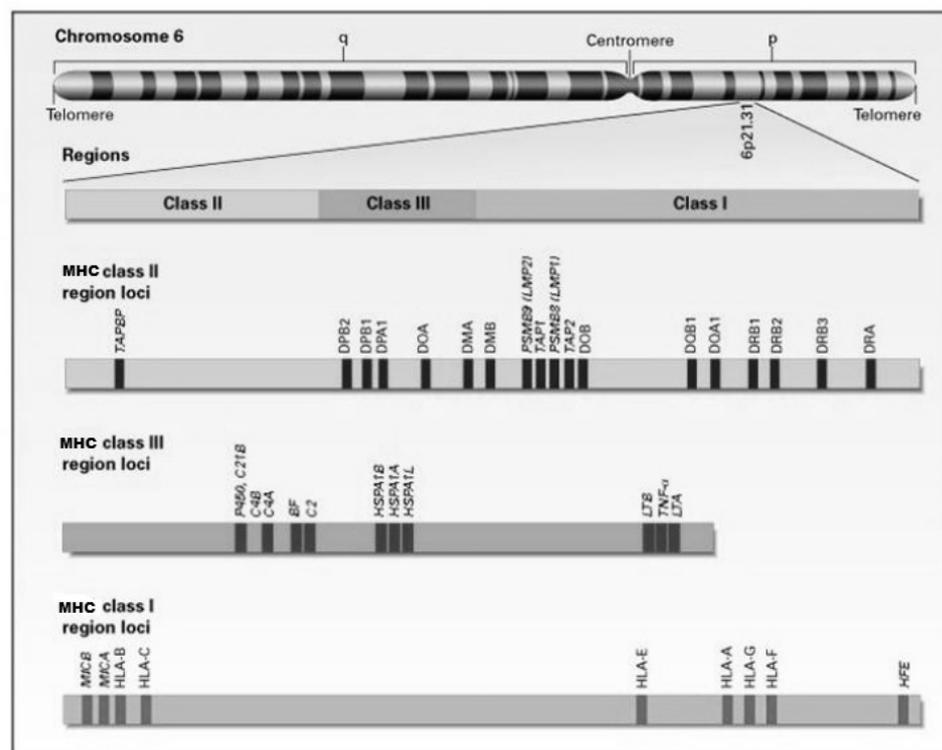


Figura 1. Estrutura gênica do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (adaptado de KLEIN; SATO, 2000).

Os genes da região de classe I codificam as moléculas clássicas HLA-A, -B e -C, presentes em células nucleadas e plaquetas, portanto, em quase todas as células somáticas do organismo. Elas se ligam aos receptores de linfócitos TCD8+, e possuem papel relevante na resposta imune, detectando alterações de expressão nas células, devido a infecções ou ao

desenvolvimento de células tumorais. Os genes da região de classe I codificam também as moléculas não clássicas HLA-E, -F e -G. Essas moléculas (HLA-E, -F e -G) possuem funções ainda pouco definidas, polimorfismos limitados e expressões restritas a determinados tipos celulares. O HLA-E e HLA-F são expressos em tecidos fetais, e o HLA-G predomina na interface materno-fetal, especialmente em citotrofoblastos invasivos. Estruturalmente, as moléculas de classe I são constituídas por uma cadeia polipeptídica pesada (cadeia α), codificada na região do MHC, de aproximadamente 44 a 47 kD, a qual se encontra ligada não covalentemente a uma proteína não polimórfica, codificada por um gene localizado no cromossomo 15 humano (β 2-microglobulina de 12 kD) (ENGELHARD, 1994; ABBAS et al., 2008).

Os genes da região de classe II codificam as moléculas HLA-DR, -DQ e -DP. As moléculas de classe II possuem uma distribuição mais restrita, se comparadas as de classe I, sendo encontradas, principalmente na superfície de células que participam diretamente da resposta imune, tais como macrófagos, monócitos, células dendríticas, células de Langerhans, linfócitos B e linfócitos T ativados. Elas se ligam aos receptores de linfócitos TCD4+ e permitem, assim, a ativação dessas células por apresentarem peptídeos derivados de organismos e proteínas extracelulares. Portanto, as moléculas do MHC desempenham papel importantíssimo no reconhecimento de antígenos. Estruturalmente as moléculas de classe II são constituídas de duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente, uma cadeia α com 32 a 34 kD e uma cadeia β de 29 a 32 kD. Ao contrário das moléculas de classe I, ambas as cadeias das moléculas de classe II são codificadas por genes do MHC (BROWN et al., 1993; ABBAS et al., 2008).

Os genes da região de classe III não codificam moléculas HLA, porém, codificam componentes do sistema complemento (C2, C4, fator B), enzima 21-hidroxilase, fator de necrose tumoral (TNFs), entre outros (ABBAS et al., 2008).

Os alelos da região do MHC são expressos codominantemente. O conjunto dos alelos MHC, presentes em cada cromossomo, é chamado de haplótipo. Todo indivíduo herda dois haplótipos, sendo um de origem materna e outro de origem paterna (ABBAS et al., 2008).

O sistema HLA pode ser uma ferramenta importante em estudos de genética de populações (PROBST et al., 2000; MONTE et al., 2004). A população brasileira é constituída pela mistura de diversas etnias e raças, gerando uma população de indivíduos mestiços. Devido à enorme extensão territorial do Brasil, bem como à diversidade de imigrantes que participaram de sua colonização, sabe-se que diferentes regiões do país apresentam

diversidades, misturas e predominância de um ou mais grupos étnicos. Portanto, entre diferentes populações, ou mesmo entre diferentes regiões do Brasil, podemos observar variação, tanto na frequência de alelos, quanto de haplótipos HLA (PROBST et al., 2000; MONTE et al, 2004).

1.2. IMPORTÂNCIA DO SISTEMA HLA EM TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS

O transplante de tecidos e órgãos é uma alternativa terapêutica para uma variedade de doenças. Uma grande limitação, para o sucesso do transplante, é a resposta imune do receptor ao tecido ou órgão do doador. Quando um órgão ou tecido alógeno é transplantado em um receptor, ele é reconhecido como estranho pelo seu sistema imune. O reconhecimento de antígenos transplantados, como próprias ou não-próprias, é determinado principalmente pelas moléculas HLA. Esse processo é conhecido como alorreconhecimento, e tem como evento central o reconhecimento do antígeno do enxerto, via MHC pelo receptor de célula T (TCR) (ABBAS et al., 2008).

O alorreconhecimento pode ocorrer por duas vias distintas: a via direta e a via indireta (Figura 2).

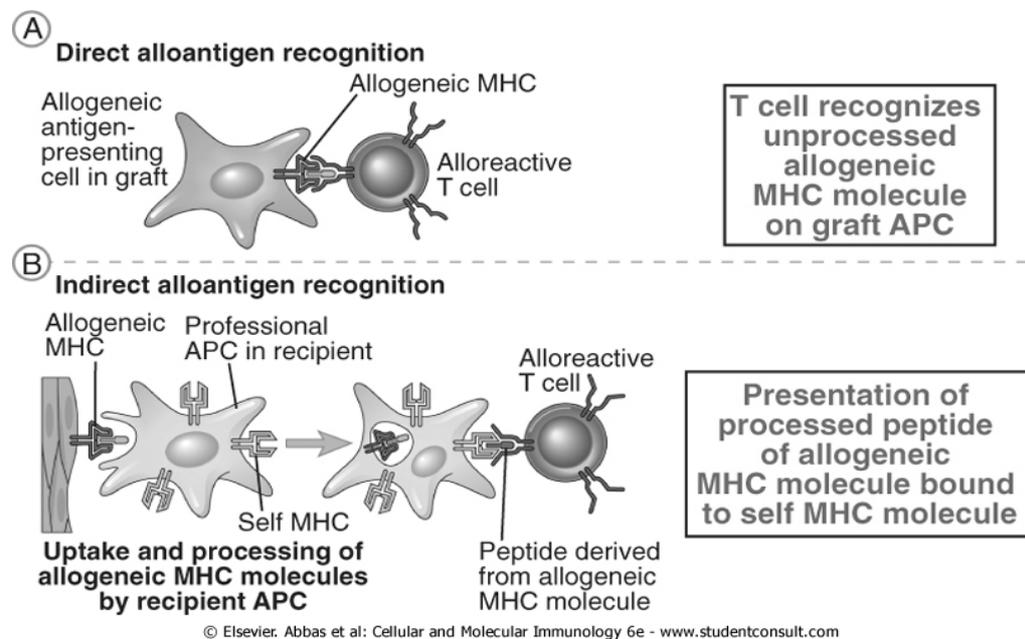


Figura 2. Via direta e indireta de alorreconhecimento de antígenos (ABBAS et al., 2008).

Ambas as vias de alorreconhecimento, direta e indireta, podem ocorrer simultaneamente, ou em tempos diferentes, no processo de rejeição. A via direta de

alorreconhecimento envolve o reconhecimento do MHC-peptídeo intacto na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) do enxerto, por linfócitos T do receptor. A via indireta envolve o reconhecimento pelos linfócitos T do receptor, de peptídeos do doador processados e apresentados via MHC pelas APCs do receptor. O processo de alorreconhecimento, por meio das vias direta ou indireta, desencadeia ativação de linfócitos T e pode resultar na rejeição do enxerto (SHERMAN; CHATTOPADHYAY, 1994; ABBAS et al., 2008).

Tanto os linfócitos T CD4+ quanto os linfócitos T CD8+ são capazes de mediar a rejeição, através de mecanismos diferentes. Os linfócitos T CD4+ se diferenciam em células efectoras, produtoras de citocinas, que irão lesar o enxerto e ativar os linfócitos B a produzir anticorpos anti-HLA. Os linfócitos T CD8+ se diferenciam em linfócitos citotóxicos, com potencialidade de destruir as células do enxerto, que expressam moléculas HLA classe I (ABBAS et al., 2008).

A rejeição de enxertos é classificada em hiperaguda, aguda e crônica, com base nas características histopatológicas, ou no curso temporal da rejeição. A resposta imune, na rejeição, pode ser dividida em dois grupos: resposta imune celular e resposta imune humoral. A distinção entre os processos celulares e humorais, nem sempre é evidente, sendo que, na maioria das rejeições, ambos os processos podem estar atuantes. A rejeição mediada por células pode se manifestar como uma rejeição aguda. Em contrapartida, a rejeição mediada por anticorpos pode se manifestar como uma rejeição hiperaguda, aguda ou crônica (CAI; TERASAKI, 2005; ABBAS et al., 2008).

A rejeição hiperaguda é caracterizada por oclusão trombótica dos vasos do enxerto, e tem início dentro de minutos ou horas, depois que os vasos do receptor são anastomosados com os do enxerto. É normalmente causada por anticorpos pré-existentes, na circulação do receptor, os quais se ligam ao endotélio do enxerto (MICHAELS et al., 2003; CAI; TERASAKI, 2005; ABBAS et al., 2008). A rejeição aguda é um processo de dano parenquimal e vascular, mediado por linfócitos T e anticorpos, e ocorre, normalmente, depois da primeira semana de transplante. Na rejeição aguda, mediada por anticorpos, geralmente ocorre disfunção do enxerto rapidamente. O processo de rejeição crônica é caracterizado por fibrose e anormalidades vasculares, com perda da função do enxerto, que ocorre durante um período prolongado. Na rejeição crônica, mediada por anticorpos, a disfunção do enxerto ocorre mais lentamente e, geralmente, é acompanhada de proteinúria (ABBAS et al., 2008).

Desde a década de 1960 já se conhece a importância dos anticorpos anti-HLA na rejeição do enxerto (KISSMEYER-NIELSEN et al., 1966). Vários estudos evidenciaram que quase todos os indivíduos que sofreram uma rejeição hiperaguda ou aguda de um órgão, sendo este o primeiro enxerto ou retransplante, podem apresentar em seus soros anticorpos anti-HLA (PATEL; TERASAKI, 1969; HALLORAN, 1990). Estes anticorpos podem ser formados, em decorrência de uma sensibilização prévia ao transplante. Normalmente, são desenvolvidos em mulheres multíparas (VAN ROOD et al., 1958; PAYNE; ROLFS, 1958; VONGWIWATANA et al., 2003), transfusões sanguíneas (DAUSSET, 1954; VONGWIWATANA et al., 2003) e transplantes prévios (THICK et al., 1984; VONGWIWATANA et al., 2003). Portanto, a detecção desses anticorpos na fase pré-transplante é uma ferramenta necessária para o sucesso do transplante.

Desde a década de 1950, a sorologia formou a base dos testes clínicos de investigação HLA. Esses testes melhoraram significativamente, quando o ensaio de leucoaglutinação foi substituído pelo teste de CDC (microlinfocitotoxicidade dependente de complemento), desenvolvido por Terasaki e McClelland em 1964 (TERASAKI; MCCLELLAND, 1964).

Historicamente, o método padrão ouro para detecção de anticorpos anti-HLA é o método de CDC. O CDC pode ser utilizado para realização do teste de prova cruzada (*crossmatch*), sendo utilizado, até hoje, na investigação pré-transplante. Através desse teste, utilizando o soro do receptor e células mononucleares do doador, é possível detectar se um paciente possui anticorpos anti-HLA específicos contra um potencial doador. Anticorpos doador-específico (DSA), detectados através da prova cruzada realizada pelo método CDC, ou seja, prova cruzada positiva, sugere contraindicação ao transplante (GEBEL et al., 2003), sendo importante para evitar a rejeição hiperaguda, e perda imediata do enxerto (PATEL; TERASAKI, 1969).

Os testes de tipificação HLA do doador e receptor também são importantes, na investigação pré-transplante, pois, o número de incompatibilidades HLA (ou seja, número de antígenos no doador diferentes do receptor) pode estar associado à menor sobrevida do enxerto (OPELZ; DÖHLER, 2007). Até a década de 1990, as tipificações HLA também eram realizadas por métodos sorológicos. Atualmente, foram substituídas por biologia molecular, por serem mais específicos e distinguirem a homoziguidade.

Outro teste de investigação pré-transplante é o teste de PRA (Reatividade contra Painel), que verifica o grau de sensibilização, geralmente em percentual, em relação a um painel de antígenos HLA. Para realizar este teste, o mesmo teste de CDC da prova cruzada

pode ser realizado, porém, utilizam-se várias células (e não somente do doador), que são representativas da distribuição de antígenos HLA, na população. Sendo que, um número percentual define a reatividade existente a esse painel de células. Esse percentual varia de 0% (não sensibilizado ou não produtor de anticorpos) a 100% (hipersensibilizado ou produtor de anticorpos) (TRIVEDI et al., 2007). De acordo com alguns estudos, pacientes com PRA elevada apresentam maiores chances de desenvolver rejeições (BARAMA et al., 2000; BRYAN et al., 2000).

Os métodos de detecção de anticorpos anti-HLA têm-se aprimorado no sentido de aumentar a sensibilidade e especificidade dos resultados. Os testes sorológicos evoluíram, e passaram a utilizar ensaios de fase sólida. Dentre as técnicas para detecção de anticorpos, anti-HLA, utilizadas atualmente, estão: ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e citometria de fluxo (*Flow Citometry*).

1.3. DOENÇA RENAL CRÔNICA E TRANSPLANTE RENAL

A doença renal crônica (DRC) é uma importante causa de morbimortalidade, gerando enormes custos aos Sistemas Nacionais de Saúde (CHERCHIGLIA et al., 2010). Verifica-se, a cada ano, um significativo aumento na incidência e prevalência da população em programa dialítico. No Brasil, segundo censo de 2011 da Sociedade Brasileira de Nefrologia, estima-se que existam mais de 91.000 pacientes, em tratamento dialítico (SBN, 2011).

O transplante renal é o tratamento de escolha para uma parcela significativa dos pacientes com DRC. Esta opção possibilita a melhoria da qualidade de vida e sobrevida desses pacientes (SAYEGH; CARPENTER et al., 2004). Levando em consideração a complexidade e custos que envolvem o processo de transplante renal, todas as formas de minimizar os riscos de rejeição são fundamentais, para o sucesso desse procedimento, e obtenção de maior sobrevida do enxerto renal.

A investigação da compatibilidade HLA, entre doador e receptor, e a avaliação pré-transplante da resposta imune humoral aos antígenos HLA são importantes para o sucesso do transplante renal (PATEL; TERASAKI, 1969; SÜSAL; OPELZ, 2002). Visando avaliar o grau de compatibilidade, entre doador e receptor, e minimizar o risco de rejeição, os candidatos ao transplante renal são submetidos a vários exames laboratoriais. Dentre estes exames estão a tipificação HLA (HLA-A, -B e -DR), e a avaliação da resposta imune humoral aos antígenos HLA (anticorpos anti-HLA), por meio do teste de PRA.

A maior compatibilidade HLA, entre doador e receptor, favorece a tolerância do sistema imune, aumentando a sobrevida do enxerto renal, tanto em transplante intervivos, quanto em doador falecido (OPELZ; DOHLER, 2007). A sensibilização pré-transplante aos antígenos HLA é um fator de risco para a falência do enxerto (BARAMA et al., 2000). Percentuais elevados de PRA, associados ou não, ao aumento de incompatibilidade HLA, entre doador e receptor, resultam em um impacto negativo na evolução do enxerto (BARAMA et al., 2000; BRYAN et al., 2000). Por estar presente em praticamente todas as células do organismo, o HLA é considerado um potente marcador de sobrevida em transplantes, apresentando papel de destaque entre os sistemas biológicos envolvidos no processo de rejeição, sendo até hoje, foco de muitos estudos.

1.4. JUSTIFICATIVA

Hoje, no Brasil, milhares de pessoas estão na lista de espera por um transplante. Enquanto aguardam por um órgão, esses futuros receptores podem entrar em contato com diferentes moléculas HLA, e desenvolver níveis variados de anticorpos contra estas moléculas. Quanto maior o percentual de sensibilização do futuro receptor em relação à população, menor é a chance de encontrar um doador apropriado, uma vez que a produção prévia de anticorpos contra o doador pode levar a uma resposta de rejeição hiperaguda.

A população brasileira é formada pela mistura de diferentes etnias e raças. Toda essa miscigenação, e diversidade étnica, pode ser um dos fatores que, dificultam a busca por um doador com melhor compatibilidade imunológica. Devido à grande extensão territorial do Brasil e às diversidades de sua colonização, diferentes regiões do país podem apresentar variação na frequência de alelos e haplótipos HLA em sua população.

A avaliação pré-transplante da resposta imune humoral aos antígenos HLA, e a compatibilidade HLA, entre doador e receptor, são importantes para o êxito do transplante renal. No entanto, no Brasil, e especialmente no Estado do Paraná, verifica-se escassez de estudos sobre diversidade HLA em candidatos ao transplante renal, principalmente, estudos de frequência dos locos HLA-C, DQA1 e DQB1, bem como de avaliação de resposta imune humoral aos antígenos HLA.

O conhecimento da diversidade e distribuição dos alelos HLA, na população de candidatos ao transplante renal, pode auxiliar na compreensão de mecanismos associados à suscetibilidade a diferentes doenças, em pacientes portadores de DRC. A avaliação tanto da diversidade alélica, quanto da resposta imune aos antígenos HLA, na fase pré-transplante,

pode contribuir para o entendimento de futuros eventos, relacionados à aceitação ou rejeição de enxertos, tornando, desta forma, importante o estudo da diversidade de alelos HLA, e avaliação da resposta imune humoral aos antígenos HLA, em candidatos ao transplante renal.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. GERAL

Avaliar as frequências de alelos, fenótipos e haplótipos HLA classe I (HLA-A, -B e -C) e classe II (HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1), e a resposta imune humoral aos antígenos HLA, em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

1.5.2. ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências de alelos HLA classe I (HLA-A, -B e -C) e classe II (HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1);
- Verificar a conformidade das frequências genotípicas observadas em relação às expectativas em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Determinar as frequências fenotípicas HLA classe I (HLA-A, -B e -C) e classe II (HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1);
- Estimar os haplótipos HLA mais frequentes;
- Comparar as frequências alélicas e haplotípicas HLA entre os grupos étnicos;
- Determinar o percentual de reatividade contra painel (PRA);
- Determinar as frequências de especificidades de anticorpos anti-HLA em pacientes com PRA positiva;
- Verificar a associação entre presença de anticorpos anti-HLA e fatores de sensibilização (gestação, transfusão sanguínea e transplante).

1.6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

BARAMA, A.; OZA, U.; PANEK, R.; BELITSKY, P.; MACDONALD, A.S.; LAWEN, J.; MCALISTER, V.; KIBERD, B. Effect of recipient sensitization (peak PRA) on graft outcome in haplo-identical living related kidney transplants. **Clinical Transplantation**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 212-217, 2000.

BROWN, J.H.; JARDETZKY, T.S.; GORGA, J.C.; STERN, L.J.; URBAN, R.G.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D. C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, London, v. 364, n. 6432, p. 33-39, 1993.

BRYAN, C.F.; SHIELD, C.D.; PIERCE, G.E.; WARADY, B.A.; AEDER, M.I.; MARTINEZ, J.; LUGER, A.M.; NELSON, P.W.; ROSS, G.; MURUVE, N.; MITCHELL, S.I. Successful cadaveric renal transplantation of patients highly sensitized to HLA Class I antigens. **Clinical Transplantation**, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 79-84, 2000.

CAI, J.; TERASAKI, P.I. Human leukocyte antigens antibodies for monitoring transplant patients. **Surgery Today**, Tokio, v. 35, n. 8, p. 605-608. 2005.

CHERCHIGLIA, M.L.; GOMES, I.C.; ALVARES, J.; GUERRA, JR. A.; ACÚRCIO, F.A.; ANDRADE, E.I.G.; ALMEIDA, A.M.; SZUSTER, D.A.C.; ANDRADE, M.V.; QUEIROZ, O.V. Determinantes dos gastos com diálises no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2000 a 2004. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 8, p. 1627-1641, 2010.

DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorpos. **Acta Haematologica**, Basel, v. 20, p. 156-166, 1958.

DAUSSET, J. Leuco agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. **Vox Sanguinis**, Basel, v. 4, p. 190-198, 1954.

ENGELHARD, V.H. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v. 12, n. 181-207, 1994.

GEBEL, H.M.; BRAY, R.A.; NICKERSON, P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: Contraindication vs. risk. **American Journal of Transplantation**, Copenhagen, v. 3, n. 12, p. 1488-500, 2003.

GORER, P.A. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v.17, n.1, p. 42-50, 1936.

GORER, P.A. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. **Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 44, n. 3, p. 691-697, 1937.

HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; RITCHIE, S.; FALK, J.; SOLEZ, K.; SRINIVASA, N.S. The significance of the anti-class I antibody response. 1. Clinical and pathological features of anti-class I mediated rejection. **Transplantation**, Baltimore, v. 49, n. 1, p. 85-91, 1990.

KISSMEYER-NIELSEN, F.; OLSEN, S.; PETERSEN, V.P.; FJELDBORG, O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. **Lancet**, London, v. 2, n. 7465, p. 662-665, 1966.

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

MICHAELS, P.J.; FISHBEIN, M.C.; COLVIN, R.B. Humoral rejection of human organ transplants. **Springer Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 25, n. 2, p. 119-140, 2003.

MONTE, S.J.; MOITA NETO, J.M.; RAMPIM, G.F.; SHULZHENKO, N.; MORGUN, A.; GERBASE-DELIMA, M.; GRUPO, HLA-UFPI. HLA polymorphism in a racially admixed

sample of the population of Teresina, Piauí. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Sao Paulo, v. 50, n. 4, p. 422-426, 2004.

NOMENCLATURE. Nomenclatura for factors of the HL-a system. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 39, n. 3, p. 483-486, 1968.

OPELZ, G.; DÖHLER, B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. **Transplantation**, Baltimore, v. 84, n. 2, p. 137-143, 2007.

PATEL, R.; TERASAKI, P.I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 280, n. 14, p. 735-739, 1969.

PAYNE, R.; ROLFS, M.R. Fetomaternal leukocyte incompatibility. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 37, n. 12, p. 1756-1763, 1958.

PROBST, C.M.; BOMPEIXE, E.P.; PEREIRA, N.F.; DALALIO, M.M.; VISENTAINER, J.E.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biology**, Detroit, v. 72, n. 4, p. 597-617, 2000.

SAYEGH, M.H.; CARPENTER, C.B. Transplantation 50 years later-progress, challenges, and promises. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 351, n. 26, p. 2761-1766, 2004.

SBN, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo de diálise SBN 2011, Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2011_publico.pdf. Acessado em: 17 jul. 2012.

SHERMAN, L.A.; CHATTOPADHYAY, S. The molecular basis of allorecognition. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v. 11, n. 385-402, 1993.

SNELL, G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 49, n. 2, p. 87-108, 1948.

SÜSAL, C.; OPELZ, G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. **Transplantation**, Baltimore, v. 73, n. 8, p. 1269-1273, 2002.

TERASAKI, P.; PARK, I. Origins of the first HLA specificities. **Human Immunology**, New York, v. 61, n. 3, p. 185-189, 2000.

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

THICK, M.; VERBI, V.; KENNEDY, L.; WELSH, K. Sensitization following kidney graft failure and blood transfusion. **Transplantation**, Baltimore, v. 37, n. 5, p. 525-526, 1984.

TRIVEDI, V.B.; DAVE, A.P.; DAVE, A.M.; PATEL, B.C. Human Leucocyte Antigen and its Role in Transplantation Biology. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 39, n. 3, p. 688-693, 2007.

VAN ROOD, J.J.; VAN LEEUWEN, A.; EERNISSE, J.G. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. **Nature**, London, v. 181, n. 4625, p. 1735-1736, 1958.

VONGWIWATANA, A.; TASANARONG, A.; HIDALGO, L.G; HALLORAN, P.F. The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 196, p. 197-218, 2003.

1. CAPÍTULO II

Artigo 1: “Frequências alélicas e haplotípicas HLA-A, -B e -DRB1 em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil”.

Página de título**Título:**

Frequências alélicas e haplotípicas HLA-A, -B e -DRB1 em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

Título abreviado:

HLA em candidatos ao transplante renal

Palavras-chave:

Transplante de rim, Alelos HLA, Haplótipos, Polimorfismo, População brasileira.

Autores:

Patrícia Keiko Saito^a, Roger Haruki Yamakawa^a, Waldir Veríssimo da Silva Júnior^b, Sueli Donizete Borelli^{a,*}.

Afiliação:

^a Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Paraná, Brasil.

^b Departamento de Estatística, Universidade estadual e Maringá, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

***Autor correspondente:**

Sueli Donizete Borelli

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Av. Colombo 5790, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Telefone: +55 44 3011.5388

E-mail: sdborelli@uem.br

Resumo

As frequências alélicas, fenotípicas e haplotípicas HLA-A, -B e -DRB1 foram estudadas em 522 pacientes renais crônicos, candidatos ao transplante renal, cadastrados em centrais de transplantes da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Os pacientes foram classificados de acordo com o grupo étnico (319 caucasianos, 134 mestiços [misturas de raças/descendentes de europeus, africanos e ameríndios] e 69 negros). A tipificação HLA foi realizada através do método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO), associado à tecnologia Luminex. Na análise do total de amostras, foram identificados 20 grupos alélicos HLA-A, 32 HLA-B e 13 HLA-DRB1. Os grupos alélicos mais frequentes, em cada *locus*, foram *HLA-A*02* (25.4%), *HLA-B*44* (10.9%) e *HLA-DRB1*13* (13.9%). Os haplótipos mais frequentes foram *HLA-A*01-B*08-DRB1*03* (2.3%), *A*02-B*44-DRB1*07* (1.2%) e *A*03-B*07-DRB1*11* (1.0%). Diferenças significativas ($p < 0.05$) foram observadas nas frequências alélicas *HLA-A*68*, *-B*08* e *-B*58* entre os grupos étnicos. Os dados do presente estudo permitiram o conhecimento da frequência alélica, fenotípica e haplotípica HLA-A, -B e -DRB1 de candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

Palavras-chave: Transplante de rim, Alelos HLA, Haplótipos, Polimorfismo, População brasileira.

1. Introdução

O transplante renal é considerado a melhor opção terapêutica, e de reabilitação, para pacientes com doença renal crônica em estágio terminal [1]. Uma grande limitação para o sucesso do transplante é a resposta imunológica do receptor ao órgão ou tecido enxertado. O reconhecimento das células transplantadas, como próprias ou não-próprias, é determinado principalmente pelos antígenos leucocitários humanos (HLA) [2]. O sistema HLA é considerado um potente marcador de sobrevida em transplantes, apresentando papel de destaque entre os sistemas biológicos envolvidos no processo de rejeição [3-5].

Os testes de tipificação HLA do doador e receptor são fundamentais na investigação pré-transplante, pois o número de incompatibilidades HLA (*mismatches*) pode estar associado à menor sobrevida do enxerto [5]. A maior compatibilidade HLA entre doador e receptor favorece a tolerância do sistema imune, e aumenta a sobrevida do enxerto tanto em transplantes intervivos, quanto em doador falecido [5-8].

A população brasileira é formada pela mistura de diferentes grupos étnicos, gerando uma população de indivíduos mestiços [9]. Toda essa miscigenação e diversidade étnica pode ser um dos fatores que, dificultam a busca por um doador com melhor compatibilidade imunológica. Devido à enorme extensão territorial do Brasil, e as diversidades de imigrantes que participaram de sua colonização, diferentes regiões do país podem apresentar variação na frequência de alelos e haplótipos HLA [10-12].

No entanto, no Brasil, e principalmente no Estado do Paraná, verifica-se escassez de estudos sobre diversidade HLA em pacientes candidatos ao transplante renal. O conhecimento da diversidade, e distribuição dos alelos HLA nesta população, pode auxiliar em processos de alocação de órgãos para o transplante e na compreensão de mecanismos associados à suscetibilidade a diferentes doenças em pacientes portadores de doença renal crônica.

Diante do exposto, nos propusemos a estudar a diversidade dos alelos e haplótipos HLA-A, -B e -DRB1 em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

2. Sujeitos e métodos

2.1. Amostras

O estudo foi realizado com 522 amostras de sangue total de pacientes renais crônicos, candidatos ao transplante renal, que estavam cadastrados em centrais de transplantes da região Norte e Noroeste do Estado do Paraná, no período de julho de 2010 a março de 2011. Somente foram incluídos pacientes com cadastros atualizados (pacientes ativos/potenciais receptores). Os pacientes foram divididos em três grupos étnicos: caucasianos (n= 319), mestiços (misturas de raças/descendentes de europeus, africanos e ameríndios) (n=134) e negros (n=69). O grupo étnico foi informado pelas centrais de transplantes, sendo utilizada a autodefinição como critério de determinação do grupo étnico. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº 333/2011).

2.2. *Extração de DNA e tipificação HLA classe I e II*

Para a realização da tipificação HLA foram coletados 5 mL de sangue total, por meio de punção venosa, em tubos a vácuo (Vacutainer; Becton and Dickson, Oxford, Inglaterra) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Em seguida, foi realizada a extração do DNA genômico, pelo método de separação por coluna, utilizando o kit comercial para extração de DNA Biopur (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. Após ajuste de concentração do DNA obtido por densidade óptica, a tipificação HLA foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO) associado à tecnologia Luminex. Neste método, o DNA genômico foi amplificado utilizando sequências “*primers*” loco-específicos biotinizados para classe I (HLA-A e -B) e classe II (HLA-DRB1) em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Na sequência, foi realizada a hibridização com sondas complementares ao DNA, conjugadas com microesferas (*beads*), marcadas com diferentes fluorocromos, para identificar sequências complementares do DNA amplificado, utilizando o kit comercial SSO-LABType (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) baixa média resolução, seguindo o protocolo do fabricante. Após hibridização, a leitura dos resultados foi realizada através do citômetro de fluxo Plataforma LABScanTM100 (One Lambda, Inc.), seguida de análise através do software HLA Fusion versão 2.0 (One Lambda, Inc.).

2.3. *Análises estatísticas*

O programa Arlequin, versão 3.11 [13], foi utilizado para os cálculos de frequência alélica e haplotípica, e verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências

haplotípicas foram estimadas, utilizando o algoritmo de maximização de expectativa (método da máxima verossimilhança). Os programas Statistica 7.0 e o software R foram utilizados para o cálculo de frequência fenotípica, e na comparação entre as frequências alélicas dos grupos étnicos. Diferenças significativas, entre as frequências alélicas dos grupos étnicos, foram calculadas pelo teste exato de Fisher, com correção de Bonferroni para comparação múltipla. Os valores de p foram considerados significativos quando inferiores a 0,05. Valores de *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança (IC) ao nível de 95% foram calculados.

3. Resultados

Entre os 522 candidatos ao transplante renal, 314 (60.1%) eram homens. O grupo étnico predominante foi o caucasiano (61.1%), seguido pelo mestiço (25.7%) e negro (13.2%).

Os *loci* HLA-A e HLA-DRB1 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). No *locus* A, a heterozigosidade observada foi de 86.4% e a esperada 89.0% ($p = 0.508$). Para o *locus* DRB1, estes valores foram de 87.3 e 89.6%, respectivamente ($p = 0.309$). No *locus* B foi de 90.6% e 93.9%, respectivamente. No entanto, foi observada diferença significativa entre a heterozigosidade observada e esperada, somente para o *locus* B ($p = 0.022$).

A tabela 1 apresenta as frequências alélicas e fenotípicas no total de amostras. Na análise do total de amostras foram identificados 20 grupos alélicos HLA-A, 32 HLA-B e 13 HLA-DRB1. Os grupos alélicos *HLA-A*02*, *-A*24* e *-A*03* foram os mais frequentes para o *locus* A. No *locus* B os grupos alélicos mais frequentes foram *HLA-B*44*, *-B*35* e *-B*51* e no *locus* DRB1 os grupos alélicos *HLA-DRB1*13*, *-DRB1*11* e *-DRB1*04* foram os mais comuns.

A tabela 2 apresenta as frequências dos grupos alélicos, no total de amostras, e em comparação com os grupos étnicos. Houve grande concordância, na distribuição das frequências alélicas, entre os três grupos étnicos. Diferenças significativas foram observadas na frequência do grupo alélico *HLA-A*68*, na comparação entre mestiços e negros (1.9 e 11.6%, respectivamente), OR: 6.89 (IC 95%: 2.47-19.26). No grupo alélico *HLA-B*08* houve diferença significativa entre mestiços e caucasianos (1.9 e 7.2%, respectivamente), OR: 4.09 (IC 95%: 1.61-10.40) e no grupo alélico *HLA-B*58* entre caucasianos e negros (1.2 e 6.5%, respectivamente), OR: 5.5 (IC 95%: 2.08-14.51).

Os haplótipos mais comuns estão representados na tabela 3. Destacaram-se o haplótipo *HLA-A*01-B*08-DRB1*03* (2.3%), *A*02-B*44-DRB1*07* (1.2%) e *A*03-B*07-DRB1*11* (1.0%) no total de amostras. O haplótipo *HLA-A*01-B*08-DRB1*03* foi o mais frequente no grupo étnico caucasiano (3.0%) e negro (2.9%) e o haplótipo *HLA-A*02-B*15-DRB1*13*, no grupo étnico mestiço (2.1%).

4. Discussão

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, sendo composta por uma variada mistura de grupos étnicos [9]. No contexto dos transplantes, toda essa miscigenação étnica pode dificultar a busca por um doador que, apresente melhor compatibilidade imunológica, principalmente no sistema HLA. A investigação de alelos e haplótipos HLA fornecem dados importantes para estudos de composição genética e origem de populações [10]. O Brasil possui uma população extremamente miscigenada, e as frequências dos alelos e haplótipos HLA podem variar de acordo com o grupo étnico predominante na região estudada [10-12].

As amostras avaliadas em nosso estudo são oriundas do Estado do Paraná, localizado na região Sul do Brasil. Este estado brasileiro é caracterizado pela forte influência da colonização europeia, mas apresenta importante número de descendentes africanos e ameríndios [10]. Tal influência pôde ser observada em nossos resultados, aos quais revelam grande contribuição de alelos HLA de origem europeia [14-16], assim como, ocorrência de alelos de influência africana [17,18].

Até onde sabemos, não existem estudos de diversidade alélica e haplotípica HLA em candidatos ao transplante renal realizados no Sul do Brasil. No entanto, um grande número de estudos de diversidade HLA foi realizado, em diferentes regiões brasileiras, utilizando indivíduos aparentemente saudáveis [10-12, 19-30].

Em nosso estudo, foi observada diferença significativa, entre a heterozigosidade observada e esperada, somente para o *locus* B. No *locus* B foi observado alto grau de heterozigosidade (90.6%), porém a população não se encontrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$). O número de indivíduos em heterozigose foi menor que o esperado. Esta diferença pode ser explicada pelo número de amostras ou segundo Chen et al. (1999) [31], em diferentes populações de indivíduos saudáveis, o desvio da proporção de Hardy-Weinberg pode estar relacionado a forças naturais, como a vantagem seletiva ou recente mistura racial,

seleção natural, ao fluxo gênico decorrente de migrações ou pode refletir dificuldades relacionados com a identificação dos alelos HLA. No entanto, devido a nossa amostra ser constituída de indivíduos portadores de doença renal crônica, ou seja, indivíduos não-saudáveis, esse desvio da proporção de Hardy-Weinberg também pode estar relacionado à própria condição patológica, estando ou não, relacionado a causas genéticas, ou devido a não exclusão de indivíduos, que possuíam algum grau de parentesco entre si.

Na comparação entre os grupos étnicos estudados, em nossa amostra, foram encontradas diferenças e similaridades nas frequências dos grupos alélicos HLA, sendo, sua distribuição geral muito semelhante aos estudos com amostras de indivíduos saudáveis, de Estados da região Sul do Brasil [12,21,22].

Apenas alguns grupos alélicos HLA exibiram diferenças significativas na comparação das frequências alélicas, entre os grupos étnicos. O *HLA-A*68* apresentou diferença significativa, na comparação das frequências alélicas entre mestiços e negros, o *HLA-B*08* apresentou diferença significativa entre mestiços e caucasianos e o *HLA-B*58*, entre caucasianos e negros, demonstrando que tais grupos alélicos HLA podem ser típicos de determinados grupos étnicos da amostra.

No entanto, grupos alélicos, comumente de origem caucasiana, como *HLA-A*02*, *-B*35*, *-B*44*, *-B*51*, *-DRB1*11* e *-DRB1*04* apresentaram frequência elevada tanto em caucasianos, mestiços e negros, não demonstrando, portanto, diferenças significativas entre os três grupos étnicos estudados. As similaridades encontradas nas frequências alélicas, entre os grupos étnicos estudados, refletem a dificuldade de definir a etnia de cada indivíduo, utilizando como base somente a avaliação física e de cor, particularmente em populações com elevado grau de miscigenação. Porém, estudos de diversidade HLA permitem o conhecimento da ancestralidade de uma população, sendo, portanto, importantes em populações como a brasileira.

Estudos de distribuição de alelos HLA com amostras de populações dos cinco continentes demonstraram diferenças entre os alelos HLA encontrados, e consequente aumento dessas diferenças em populações com misturas de etnias [32,33]. No entanto, um estudo composto por cinco diferentes amostras de populações brasileiras, composta de caucasianos e negros, demonstrou que as semelhanças nas frequências dos alelos HLA entre essas populações são muito mais evidentes do que as diferenças observadas [29], corroborando com nossos resultados.

No *locus* HLA-A, o grupo alélico *HLA-A*02* foi o mais observado em nossa amostra, assim como em outros estudos de frequência HLA, conduzidos no Sul do Brasil [12,21]. No entanto, o grupo alélico *HLA-A*02* em nossa amostra apresentou maior frequência em relação ao estudo do Paraná [21], mesmo se comparado somente entre os grupos de caucasianos dos estudos. Em relação ao estudo do Rio Grande do Sul [12], o grupo alélico *HLA-A*02* de nossa amostra apresentou menor frequência, mesmo em comparação entre os grupos de caucasianos dos estudos. Quanto ao *locus* HLA-B, o grupo alélico *HLA-B*44* foi o mais frequente, seguido pelo *HLA-B*35*. Em estudos conduzidos no Sul do Brasil esta ordem se inverte, mantendo, no entanto, os dois grupos alélicos como mais observados em suas amostras. O grupo alélico *HLA-DRB1*13* foi também o mais frequente nesse *locus*, no estudo conduzido no Rio Grande do Sul [12].

Apesar das pequenas variações nas frequências alélicas, os mesmos grupos alélicos HLA de nosso estudo estão entre os mais frequentes em amostras do Paraná [21] e Rio Grande do Sul [12], pois são alelos característicos de populações de origem europeia que, participaram ativamente na colonização destes dois estados do Sul do Brasil.

Se comparado ao estudo de frequência HLA do Estado de Pernambuco [30], localizado na região nordeste do país, que apresenta predominância de descendentes de origem africana, o grupo alélico *HLA-B*15* (12.3%) foi o mais frequente nesse estudo para o *locus* HLA-B, enquanto que em nossa amostra, encontramos o *HLA-B*44* como o mais frequente (10.9%). No entanto, nosso grupo mestiço apresentou a mesma frequência que eles relataram para *HLA-B*15*, e essa mesma frequência também foi encontrada para este grupo alélico, em afro-brasileiros do estudo do Paraná [21].

Comparativamente, houve semelhança em relação aos grupos alélicos HLA mais comuns, entre a nossa amostra como um todo, e resultados de estudos de frequência HLA de outros países americanos, como Venezuela [34], Colômbia [35], Uruguai [36], e Costa Rica [37]. Esta semelhança observada pôde ser possivelmente explicada, devido a presença de europeus que participaram da colonização desses países americanos, incluindo o Brasil.

Devido ao seu grande polimorfismo e função relacionada ao sistema imune, o sistema HLA tem sido cada vez mais estudado, como um marcador genético, envolvido na suscetibilidade a várias doenças [38,39]. O grupo alélico *HLA-A*74* e *HLA-DRB1*11* que, em nosso estudo apresentou frequência de 1.4% e 13.2%, respectivamente, foi associado positivamente com doença renal crônica terminal, em um estudo realizado com reduzido número de pacientes brasileiros, esperando o transplante renal [40].

Na análise haplotípica, foi possível observar que o haplótipo *HLA-A*01-B*08-DRB1*03*, típico de caucasianos, foi o mais comum, na nossa amostra, e no grupo étnico caucasiano (2.3% e 3.0%), o que está em concordância com os dados relatados em outros estudos do Estado do Paraná (2,4% e 2,5%) [21] e Rio Grande do Sul (2,8% e 3,0%) [12]. Entretanto, foi observado que, houve variações nas frequências dos haplótipos, de acordo com o grupo étnico avaliado em nossa amostra. O haplótipo *HLA-A*01-B*08-DRB1*03* também apareceu como o mais comum no grupo étnico negro (2.9%), no entanto, com menor frequência, se comparado com o grupo étnico caucasiano (3.0%), enquanto no grupo étnico mestiço não houve a ocorrência de tal haplótipo. Bardi et al. (2012) [22] também encontraram, em amostras do Paraná, o haplótipo *HLA-A*01-B*08-DRB1*03* como o mais comum em caucasianos (2.7%) e afro-brasileiros (1.5%). O mesmo haplótipo também foi relatado como um dos mais frequentes em americanos com ascendência italiana (4.9%), e com ascendência espanhola (2.1%) [41]. Devido ao fato da maior parte da população da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná ser de ascendência europeia, os dados, obtidos neste estudo, foram semelhantes ao perfil genético HLA, encontrado em americanos descendentes de europeus.

O haplótipo *HLA-A*02-B*15-DRB1*13* foi o mais frequente em mestiços de nossa amostra (2.1%). Os haplótipos encontrados neste grupo étnico podem ser resultantes da contribuição de alelos HLA de diferentes populações europeias, africanas ou ameríndias que colonizaram a região estudada.

As frequências dos haplótipos deste estudo foram estimadas, utilizando como base os grupos alélicos HLA encontrados em nossa amostra. As informações dos antepassados de cada indivíduo seriam necessárias para identificar os haplótipos herdados e, assim, obter a verdadeira distribuição desses haplótipos, na amostra estudada. O conhecimento da distribuição de haplótipos HLA permite a identificação da influência étnica e ancestralidade da população em estudo [12].

A similaridade genética do sistema HLA, observada através das análises de grupos alélicos e haplótipos HLA de nossa amostra, em relação a grupos populacionais da mesma região do país, pode ser explicada pela similar imigração de populações, que realizaram a colonização da região Sul do Brasil. No entanto, este estudo não pôde concluir sobre a ação evolutiva das forças de imigração na geração, ou mesmo na manutenção da diversidade genética do sistema HLA nesta população, fornecendo, porém, importante informação sobre a diversidade deste sistema entre os grupos étnicos na região estudada.

Em conclusão, a distribuição de alelos e haplótipos HLA de candidatos ao transplante renal foram muito semelhantes às amostras de outros estudos da população brasileira. Observamos maiores diferenças entre os grupos étnicos de nossa amostra e de diferentes regiões do país. A origem étnica influencia a distribuição de alelos HLA de uma determinada população. O Sul do Brasil tem maior frequência de alelos HLA de origem caucasiana, o que foi claramente observado em nossa amostra, diferentemente da região Nordeste do país, que é caracterizada por uma população mestiça, descendentes, principalmente, de africanos e que, conseqüentemente, possuem frequência elevada de alelos HLA comumente encontrados em africanos [30].

Os dados deste estudo permitiram o conhecimento da frequência de alelos, fenótipos e haplótipos HLA-A, -B e -DRB1, em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Brasil. Tais dados refletem a origem antropológica da população do Paraná, e serão importantes na compreensão da biologia da distribuição desses alelos em nossa população, bem como em estudos de suscetibilidade a diferentes doenças, em pacientes portadores de doença renal crônica, possibilitando a comparação com outros grupos populacionais, e em processos de alocação de órgãos para o transplante.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, aos pacientes que participaram deste estudo, aos clínicos e funcionários dos setores de hemodiálise e a todos que contribuíram para a sua realização, em especial à Érika Noguti Noda pelo auxílio na coleta de dados.

Referências

- [1] Garcia GG, Harden P, Chapman J. The Global Role of Kidney Transplantation. *Kidney Blood Press Res* 2012; 35:299-304.
- [2] Abbas A, Lichtmann A. *Cellular and Molecular Immunology* (ed 5). Philadelphia, Saunders, 2003.

- [3] Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2: 662-5.
- [4] Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280:735-9.
- [5] Opelz G, Döhler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 2007; 84:137-43.
- [6] Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *JAMA* 1993; 270:1339-43.
- [7] Shenton BK. The detection and relevance of pretransplant antibodies. *Transpl Immunol* 1994; 2:135-7.
- [8] Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004; 351:2761-6.
- [9] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:177-182.
- [10] Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MM, Visentainer JE, Tsuneto LT, et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 2000; 72:597-617.
- [11] Monte SJ, Moita Neto JM, Rampim GF, Shulzhenko N, Morgun A, Gerbase-DeLima M, et al. HLA polymorphism in a racially admixed sample of the population of Teresina, Piauí. *Rev Assoc Med Bras* 2004; 50:422-6.

- [12] Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, Neumann J, et al. HLA-A, -B, and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum Immunol* 2012; 73:180-5.
- [13] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; 1:47-50.
- [14] Carvalho AS. HLA-A, -B and -C markers in the Portuguese population. *Tissue Antigens* 1983; 21:39-44.
- [15] Piazza A, Olivetti E, Griffo RM. The distribution of HLA antigens in Italy. *Genes Geogr* 1989; 3:141-64.
- [16] 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.
- [17] Assane AA, Fabricio-Silva GM, Cardoso-Oliveira J, Mabunda NEJ, Sousa 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.
- [18] Paximadis M, Mathebula TY, Gentle NL, Vardas E, Colvin M, Gray CM, et al. Human leukocyte antigen class I (A, B, C) and II (DRB1) diversity in the black and Caucasian South African population. *Hum Immunol* 2012; 73:80-92.
- [19] Braun-Prado K, Vieira Mion AL, Farah Pereira N, Culp L, Petzl-Erler ML. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* 2000; 56:417-27.
- [20] Dalalio MMO, Sell AM, Toda LY, Cano M FF, Sossai CR, Fracalossi L. Frequência dos antígenos HLA- A e HLA- B em populações das regiões de Curitiba e Norte/Noroeste do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum* 2002 24:743-8.

- [21] 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.
- [22] Bardi MS, Jarduli LR, Jorge AJ, Camargo RBOG, 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.
- [23] Donadi EA, Maurício-da-Silva L, Paula-Santos CM, Silveira RD, Deghaide NHS, Ferraz AS, et al. Frequência dos antígenos de histocompatibilidade na população normal da região nordeste do estado de São Paulo Brasil. *Simp Assoc Sist HLA Doenças Brasil* 2000; 33:19–26.
- [24] Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA. HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. *Tissue Antigens* 2001; 57:158–62.
- [25] Morgun A, Godcalves-Primo A, Schulzhenko N, Rampim GF, Mine KL, Gerbase-DeLima M. HLA-DQB1 and DRB1 alleles, cytokine polymorphisms and KIR gene frequencies in a population (Caucasian) from south east Brazil. *Hum Immunol* 2004; 65:879–82.
- [26] Temin J, Marques GD, Morgun A, Schulzhenko N, Rampim GF, Gerbase-DeLima M. HLA-DQB1 e -DRB1 alleles and cytokines polymorphisms in a mulatto population from south east Brazil. *Hum Immunol* 2004; 65:882–5.
- [27] Moraes ME, Fernandez-ViÒa M, Salatiel I, Tsai S, Moraes JR, Stastny P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. *Tissue Antigens* 1993; 41:238–42.
- [28] Williams F, Nascimnto E, Middleton D. HLA-A and -B alleles in a population from Belo Horizonte, Brazil. *Hum Immunol* 2004; 65:866–70.

- [29] Trachtenberg A, Jobim LF, Kraemer E, Salzano FM, Moraes ME, et al. The HLA polymorphism in five Brazilian populations. *Ann Hum Biol* 1988; 15:213–21.
- [30] Nigam P, Dellalibera E, Maurício-da-Silva L, Donadi EA, Silva RS. Polymorfismo HLA class I genes in the Brazilian population from the northeastern state of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens* 2004; 64:204–8.
- [31] Chen JJ, Hollenbach JA, Trachtenberg EA, Just JJ, Carrington M, Rønningen KS, et al. Hardy-Weinberg testing for HLA class II (DRB1, DQA1, DQB1, and DPB1) loci in 26 human ethnic groups. *Tissue Antigens* 1999; 54:533-42.
- [32] Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, et al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2000; 61:1048–52.
- [33] Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, et al. Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2001; 62:645–50.
- [34] Del Pilar Fortes M, Gill G, Paredes ME, Gamez LE, Palacios M, Blanca I, Tassinari P. Allele and haplotype frequencies at human leukocyte antigen class I and II genes in Venezuela's population. *Ann Biol Clin (Paris)* 2012; 70:175-81.
- [35] Arias-Murillo YR, Castro-Jimenez MA, Rios-Espinosa MF, Lopez-Rivera JJ, Echeverry-Coral SJ, Martínez-Nieto OM. Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allelic, genotypic, and haplotypic frequencies in Colombian population. *Colomb Med* 2010; 4:336-43.
- [36] Alvarez, M Sans, R Toledo, M Sosa, M Bengochea F Salzano. HLA gene and haplotype frequencies in Uruguay. *Int J Anthropol.* 1993; 8:163-8.
- [37] Arrieta-Bolaños E, Maldonado-Torres H, Dimitriu O, Hoddinott MA, Fowles F, Shah A, et al. HLA-A, -B, -C, -DQB1, and DRB1,3,4,5 allele and haplotype frequencies in the Costa

Rica Central Valley Population and its relationship to worldwide populations. *Hum Immunol* 2011; 72:80-6.

[38] Kaimen-Maciel DR, Reiche EM, Borelli SD, Morimoto HK, Melo FC, Lopes J, et al. HLA-DRB1* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. *Mol Med Report* 2009; 2:993-8.

[39] Giarola LB, Santos RR, Bedendo J, Silva Júnior WV, Borelli SD. HLA molecules and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in Southern Brazil. *BMC Res Notes* 2012; 5: 90.

[40] Crispim JC, Mendes-Júnior CT, Wastowski IJ, Palomino GM, Saber LT, Rassi DM, et al. HLA polymorphisms as incidence factor in the progression to end-stage renal disease in Brazilian patients awaiting kidney transplant. *Transplant Proc* 2008; 40:1333-6.

[41] Mack SJ, Tu B, Yang R, Masaberg C, Ng J, Hurley CK. Human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies in Americans originating from southern Europe: Contrasting patterns of population differentiation between Italian and Spanish Americans. *Hum Immunol* 2011; 72:144-9.

Tabelas (Tables)

Tabela1. Frequências (f) alélicas e fenotípicas no total de amostras (n = 522).

HLA locus	f alélica	f fenotípica	HLA locus	f alélica	f fenotípica	HLA locus	f alélica	f fenotípica
<i>A*01</i>	0.0929	0.1858	<i>B*07</i>	0.0699	0.1398	<i>DRB1*01</i>	0.0929	0.1858
<i>A*02</i>	0.2538	0.5077	<i>B*08</i>	0.0536	0.1073	<i>DRB1*03</i>	0.1121	0.2241
<i>A*03</i>	0.0939	0.1877	<i>B*13</i>	0.0172	0.0345	<i>DRB1*04</i>	0.1264	0.2529
<i>A*11</i>	0.0527	0.1054	<i>B*14</i>	0.0316	0.0632	<i>DRB1*07</i>	0.1216	0.2433
<i>A*23</i>	0.0517	0.1034	<i>B*15</i>	0.0843	0.1686	<i>DRB1*08</i>	0.0575	0.1149
<i>A*24</i>	0.1015	0.2031	<i>B*18</i>	0.0498	0.0996	<i>DRB1*09</i>	0.0125	0.0249
<i>A*25</i>	0.0192	0.0383	<i>B*27</i>	0.0259	0.0517	<i>DRB1*10</i>	0.0230	0.0460
<i>A*26</i>	0.0431	0.0862	<i>B*35</i>	0.1073	0.2146	<i>DRB1*11</i>	0.1322	0.2644
<i>A*29</i>	0.0402	0.0805	<i>B*37</i>	0.0125	0.0249	<i>DRB1*12</i>	0.0115	0.0230
<i>A*30</i>	0.0584	0.1169	<i>B*38</i>	0.0268	0.0536	<i>DRB1*13</i>	0.1389	0.2778
<i>A*31</i>	0.0374	0.0747	<i>B*39</i>	0.0364	0.0728	<i>DRB1*14</i>	0.0354	0.0709
<i>A*32</i>	0.0268	0.0536	<i>B*40</i>	0.0489	0.0977	<i>DRB1*15</i>	0.0958	0.1916
<i>A*33</i>	0.0316	0.0632	<i>B*41</i>	0.0201	0.0402	<i>DRB1*16</i>	0.0402	0.0805
<i>A*34</i>	0.0096	0.0192	<i>B*42</i>	0.0239	0.0479			
<i>A*36</i>	0.0048	0.0096	<i>B*44</i>	0.1092	0.2184			
<i>A*66</i>	0.0134	0.0268	<i>B*45</i>	0.0211	0,0421			
<i>A*68</i>	0.0508	0.1015	<i>B*47</i>	0.0019	0.0038			
<i>A*69</i>	0.0010	0.0019	<i>B*48</i>	0.0038	0.0077			
<i>A*74</i>	0.0144	0.0287	<i>B*49</i>	0.0316	0.0632			
<i>A*80</i>	0.0029	0.0057	<i>B*50</i>	0.0268	0.0536			
			<i>B*51</i>	0.0958	0.1916			

<i>B*52</i>	0.0163	0.0326
<i>B*53</i>	0.0211	0.0421
<i>B*54</i>	0.0010	0.0019
<i>B*55</i>	0.0077	0,0153
<i>B*56</i>	0.0019	0.0038
<i>B*57</i>	0.0278	0.0556
<i>B*58</i>	0.0201	0.0402
<i>B*67</i>	0.0019	0.0038
<i>B*78</i>	0.0010	0.0019
<i>B*81</i>	0.0019	0.0038
<i>B*82</i>	0.0010	0.0019

Tabela 2. Frequências (f) alélicas no total de amostras (n = 522) e suas comparações entre os grupos étnicos.

HLA	alélica	alélica	alélica	alélica	CXM	OR(IC95%)	CXN(p	OR(IC95%)	MXN(p	OR(IC95%)
<i>locus</i>	Total	C	M	N	(p		valor)		valor)	
					valor)					
A*01	0.0929	0.0972	0.0933	0.0725						
A*02	0.2538	0.2602	0.2612	0.2101						
A*03	0.0939	0.0878	0.1194	0.0725						
A*11	0.0527	0.0564	0.0560	0.0290						
A*23	0.0517	0.0549	0.0448	0.0507						
A*24	0.1015	0.1113	0.0821	0.0942						
A*25	0.0192	0.0188	0.0261	0.0072						
A*26	0.0431	0.0408	0.0485	0.0435						
A*29	0.0402	0.0455	0.0299	0.0362						
A*30	0.0584	0.0486	0.0709	0.0797						
A*31	0.0374	0.0455	0.0224	0.0290						
A*32	0.0268	0.0313	0.0224	0.0145						
A*33	0.0316	0.0266	0.0261	0.0652						
A*34	0.0096	0.0047	0.0149	0.0217						
A*36	0.0048	-	0.0112	0.0145						
A*66	0.0134	0.0094	0.0187	0.0217						
A*68	0.0508	0.0502	0.0187	0.1159					0.00114	6.89 (2.47- 19.26)
A*69	0.0010	0.0016	-	-						
A*74	0.0144	0.0063	0.0299	0.0217						
A*80	0.0029	0.0031	0.0037	-						

<i>B*07</i>	0.0699	0.0737	0.0448	0.1014		
<i>B*08</i>	0.0536	0.0721	0.0187	0.0362	0.0248	4.09 (1.61- 10.40)
<i>B*13</i>	0.0172	0.0188	0.0187	0.0072		
<i>B*14</i>	0.0316	0.0298	0.0373	0.0290		
<i>B*15</i>	0.0843	0.0721	0.1231	0.0652		
<i>B*18</i>	0.0498	0.0596	0.0373	0.0290		
<i>B*27</i>	0.0259	0.0298	0.0224	0.0145		
<i>B*35</i>	0.1073	0.1034	0.1119	0.1159		
<i>B*37</i>	0.0125	0.0141	0.0112	0.0072		
<i>B*38</i>	0.0268	0.0251	0.0336	0.0217		
<i>B*39</i>	0.0364	0.0345	0.0336	0.0507		
<i>B*40</i>	0.0489	0.0486	0.0410	0.0652		
<i>B*41</i>	0.0201	0.0219	0.0187	0.0145		
<i>B*42</i>	0.0239	0.0157	0.0410	0.0290		
<i>B*44</i>	0.1092	0.1097	0.1082	0.1087		
<i>B*45</i>	0.0211	0.0188	0.0299	0.0145		
<i>B*47</i>	0.0019	0.0016	-	0.0072		
<i>B*48</i>	0.0038	0.0031	0.0037	0.0072		
<i>B*49</i>	0.0316	0.0329	0.0299	0.0290		
<i>B*50</i>	0.0268	0.0235	0.0336	0.0290		
<i>B*51</i>	0.0958	0.1082	0.0933	0.0435		
<i>B*52</i>	0.0163	0.0157	0.0187	0.0145		
<i>B*53</i>	0.0211	0.0172	0.0224	0.0362		

<i>B*54</i>	0.0010	0.0016	-	-		
<i>B*55</i>	0.0077	0.0063	0.0112	0.0072		
<i>B*56</i>	0.0019	0.0031	-	-		
<i>B*57</i>	0.0278	0.0235	0.0336	0.0362		
<i>B*58</i>	0.0201	0.0125	0.0149	0.0652	0.0279	5.5 (2.08- 14.51)
<i>B*67</i>	0.0019	-	0.0075	-		
<i>B*78</i>	0.0010	0.0016	-	-		
<i>B*81</i>	0.0019	0.0016	-	0.0072		
<i>B*82</i>	-	-	-	0.0072		
<i>DRB1*01</i>	0.0929	0.0862	0.0933	0.1232		
<i>DRB1*03</i>	0.1121	0.1144	0.0970	0.1304		
<i>DRB1*04</i>	0.1264	0.1238	0.1343	0.1232		
<i>DRB1*07</i>	0.1216	0.1317	0.1119	0.0942		
<i>DRB1*08</i>	0.0575	0.0596	0.0485	0.0652		
<i>DRB1*09</i>	0.0125	0.0141	0.0075	0.0145		
<i>DRB1*10</i>	0.0230	0.0235	0.0299	0.0072		
<i>DRB1*11</i>	0.1322	0.1285	0.1306	0.1522		
<i>DRB1*12</i>	0.0115	0.0078	0.0187	0.0145		
<i>DRB1*13</i>	0.1389	0.1442	0.1567	0.0797		
<i>DRB1*14</i>	0.0354	0.0408	0.0261	0.0290		
<i>DRB1*15</i>	0.0958	0.0846	0.1119	0.1159		
<i>DRB1*16</i>	0.0402	0.0408	0.0336	0.0507		
2n	1044	638	268	138		

C, caucasianos; M, mestiços; N, negros; -. Não ocorreu neste grupo

Tabela 3. Frequência dos 20 haplótipos HLA-A-B-DRB1 mais comuns no total de amostras e nos diferentes grupos étnicos.

Haplótipo HLA	Total	Caucasianos	Mestiços	Negros
<i>A*01-B*08-DRB1*03</i>	0.0227	0.0302	-	0.0290
<i>A*02-B*44-DRB1*07</i>	0.0118	0.0157	0.0112	0.0072
<i>A*03-B*07-DRB1*11</i>	0.0104	0.0016	0.0112	0.0290
<i>A*02-B*15-DRB1*04</i>	0.0102	0.0141	0.0048	-
<i>A*02-B*35-DRB1*03</i>	0.0096	0.0031	-	0.0217
<i>A*33-B*14-DRB1*01</i>	0.0096	0.0078	-	0.0217
<i>A*02-B*44-DRB1*13</i>	0.0095	0.0141	0.0037	-
<i>A*30-B*42-DRB1*03</i>	0.0085	0.0094	-	-
<i>A*02-B*39-DRB1*16</i>	0.0085	0.0110	0.0075	-
<i>A*11-B*35-DRB1*01</i>	0.0081	0.0097	0.0037	-
<i>A*02-B*51-DRB1*14</i>	0.0074	0.0047	0.0075	-
<i>A*02-B*18-DRB1*11</i>	0.0067	0.0025	-	-
<i>A*23-B*44-DRB1*07</i>	0.0067	0.0094	0.0037	-
<i>A*24-B*35-DRB1*11</i>	0.0067	0.0117	-	0.0072
<i>A*02-B*07-DRB1*01</i>	0.0066	0.0063	-	-
<i>A*26-B*38-DRB1*13</i>	0.0066	0.0063	0.0037	-
<i>A*02-B*07-DRB1*15</i>	0.0064	0.0094	-	-
<i>A*02-B*15-DRB1*13</i>	0.0064	-	0.0213	-
<i>A*30-B*13-DRB1*07</i>	0.0063	0.0078	-	-
<i>A*02-B*50-DRB1*07</i>	0.0061	0.0078	-	-

-. Não ocorreu neste grupo.

Artigo 2: “Diversidade de alelos e haplótipos HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1 em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil”.

Página de título**Título:**

Diversidade de alelos e haplótipos HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1 em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

Título resumido:

Diversidade HLA em candidatos ao transplante renal

Autores:

Patrícia Keiko Saito^{1*}, Roger Haruki Yamakawa^{1*}, Waldir Veríssimo da Silva Júnior^{2*}, Sueli Donizete Borelli^{1*}.

Afiliação:

¹Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, Brasil.

*Todos os autores contribuíram igualmente para este trabalho.

Correspondência:

Sueli Donizete Borelli

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Av. Colombo 5790, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Telefone: +55 44 3011.5388

E-mail: sdborelli@uem.br

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Resumo

Frequências de alelos, fenótipos e haplótipos dos antígenos leucocitários humanos (HLA) dos *loci* HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1 foram estudados, em uma amostra de 366 candidatos ao transplante renal, da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Os participantes foram classificados, de acordo com o grupo étnico, (220 caucasianos, 95 mestiços [misturas de raças/descendentes de europeus, africanos e ameríndios] e 51 negros). A tipificação HLA foi realizada, utilizando o método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO), associado à tecnologia Luminex. Um total de 20 grupos alélicos HLA-A, 30 HLA-B, 14 HLA-C, 13 HLA-DRB1, 6 HLA-DQA1 e 5 HLA-DQB1 foram identificados. Dezenove grupos alélicos (*HLA-A*02, -A*24, -B*35, -B*44, -C*04, -C*07, -DRB1*03, -DRB1*04, -DRB1*07, -DRB1*11, -DRB1*13, -DQA1*01, -DQA1*02, -DQA1*03, -DQA1*05, -DQB1*02, -DQB1*03, -DQB1*05 e -DQB1*06*) foram encontrados com frequência maior do que 10%. Diferenças significativas ($p < 0.05$) foram observadas nas frequências alélicas *HLA-A*68* e *-C*07*, entre os grupos étnicos. Os três haplótipos mais frequentes foram *HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* (2.5%), *HLA-A*02-B*51-C*15-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03* (1.0%) e *HLA-A*24-B*35-C*04-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03* (0.9%). Os dados do presente estudo permitiram o conhecimento da distribuição de alelos, e haplótipos HLA-A, -B -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1, em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

Palavras-chave (Keywords): alelos; brasileiros; haplótipos; antígenos leucocitários humanos; polimorfismo, transplante renal.

Introdução

Os genes do sistema HLA (*human leukocyte antigens*) estão localizados no braço curto do cromossomo 6, e são responsáveis por codificar os antígenos HLA de classe I (HLA-A, -B, -C) e classe II (HLA-DR, -DQ, -DP), relevantes no transplante de órgãos (1). O sistema HLA é considerado um importante marcador de sobrevida em transplantes, apresentando papel de destaque, entre os sistemas biológicos envolvidos no processo de rejeição de enxertos (2,3). Embora a importância da compatibilidade HLA-A, -B e -DR, em transplante de órgãos sólidos, já seja conhecida há muitos anos (3,4), o papel do HLA-C e -DQ, em termos de sensibilização ou sobrevivência do enxerto, tem sido documentado (5,6).

A população brasileira é uma das mais miscigenadas do mundo (7), podendo dificultar a busca por um doador, com melhor compatibilidade imunológica, no sistema HLA. A investigação de alelos e haplótipos HLA é importante para estudos de composição genética e origem das populações (8). No Brasil, as frequências dos alelos e haplótipos HLA podem variar, de acordo com o grupo étnico predominante em cada região (8,9,10).

Até onde sabemos, não existem estudos no Brasil sobre diversidade HLA em candidatos ao transplante renal, principalmente, estudos de frequência dos *loci* HLA-C, -DQA1 e -DQB1. O conhecimento da diversidade e distribuição dos alelos HLA, na população de candidatos ao transplante renal, poderá auxiliar em processos de alocação de órgãos para transplante, e na compreensão de mecanismos associados à suscetibilidade a diferentes doenças, em pacientes portadores de doença renal crônica.

Neste estudo avaliamos as frequências de alelos e haplótipos HLA -A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1, em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil.

Materiais e método

Amostras

O estudo foi realizado com 366 amostras de sangue total de pacientes renais crônicos, candidatos ao transplante renal, que estavam cadastrados em centrais de transplante da região Norte e Noroeste do Estado do Paraná, no período de julho de 2010 a março de 2011. Somente foram incluídos pacientes com cadastros atualizados (pacientes ativos/potenciais receptores). Os pacientes foram divididos em três grupos étnicos: caucasianos (n=220),

mestiços (misturas de raças/descendentes de europeus, africanos e ameríndios) (n=95) e negros (n=51). O grupo étnico foi informado pelas centrais de transplante, sendo utilizada a autodefinição, como critério de determinação do grupo étnico. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº 333/2011).

Extração de DNA e tipificação HLA classe I e II

Para a realização da tipificação HLA foram coletados 5 mL de sangue total, por meio de punção venosa, em tubos a vácuo (Vacutainer; Becton and Dickson, Oxford, Inglaterra), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Em seguida, foi realizada a extração do DNA genômico, pelo método de separação por coluna, utilizando o kit comercial para extração de DNA Biopur (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. Após ajuste de concentração do DNA, obtido por densidade óptica, foi realizado o método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO), associado à tecnologia Luminex. Neste método, o DNA genômico foi amplificado, utilizando sequências “*primers*” loco-específicos biotinilados, para classe I (HLA-A, -B, -C) e classe II (-DRB1, -DQA1, -DQB1), em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguido de hibridização com sondas complementares ao DNA, conjugadas com microesferas (*beads*), marcadas com diferentes fluorocromos, para identificar sequências complementares do DNA amplificado, utilizando o kit comercial SSO-LABType (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Após hibridização, a leitura dos resultados foi realizada através do citômetro de fluxo Plataforma LABScanTM100 (One Lambda, Inc.), seguida de análise, através do software HLA Fusion, versão 2.0 (One Lambda, Inc.). Os resultados obtidos foram de baixa média resolução.

Análises estatísticas

O programa Arlequin versão 3.11 (11) foi utilizado para os cálculos de frequências alélicas e haplotípicas e verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências haplotípicas foram estimadas, utilizando o algoritmo de maximização de expectativa (método da máxima verossimilhança). Os programas Statistica 7.0 e o software R foram utilizados para o cálculo de frequência fenotípica, e na comparação entre as frequências alélicas dos grupos étnicos. Diferenças significativas, entre as frequências alélicas dos grupos étnicos, foram calculadas, utilizando o teste exato de Fisher, com correção de Bonferroni, para comparação

múltipla. Os valores de *p* foram considerados significativos, quando inferiores a 0,05. Valores de *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança (IC), ao nível de 95%, foram calculados.

Resultados

Entre os 366 candidatos ao transplante renal participantes, 229 (62.6%) eram homens. O grupo étnico predominante foi o caucasiano (60.1%), seguido pelo mestiço (26.0%) e negro (13.9%).

Todos os *loci* HLA investigados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). No *locus* A, a heterozigosidade observada foi de 86.3% e a esperada 90.0% ($p = 0.396$). Para o *locus* B, estes valores foram de 90.2 e 94.0%, respectivamente ($p = 0.074$). No *locus* C foi de 89.1% e 88.4% ($p = 0.595$), respectivamente. Para o *locus* DRB1, estes valores foram de 87.1% e 89.6% ($p = 0.065$), respectivamente. No *locus* DQA1 foi de 68.6% e 72.8% ($p = 0.506$), respectivamente e no *locus* DQB1 foi de 72.9% e 76.4% ($p = 0.515$), respectivamente.

A tabela 1 apresenta as frequências alélicas e fenotípicas HLA classe I (-A, -B e -C), no total de amostras. Foram identificados 20 grupos alélicos HLA-A, 30 HLA-B e 14 HLA-C. Os grupos alélicos *HLA-A*02*, *-A*24*, *-B*35*, *-B*44*, *-C*07* e *-C*04* foram encontrados com frequência maior do que 10%.

A tabela 2 apresenta as frequências alélicas e fenotípicas HLA classe II (-DRB1, -DQA1 e DQB1), no total de amostras. Foram identificados 13 grupos alélicos HLA-DRB1, 6 HLA-DQA1 e 5 HLA-DQB1. Os grupos alélicos *HLA-DRB1*03*, *-DRB1*04*, *-DRB1*07*, *-DRB1*11*, *-DRB1*13*, *-DQA1*01*, *-DQA1*02*, *-DQA1*03*, *-DQA1*05*, *-DQB1*02*, *-DQB1*03*, *-DQB1*05* e *DQB1*06* foram encontrados com frequência maior do que 10%.

As tabelas 3 e 4 apresentam as frequências dos grupos alélicos, no total de amostras, e em comparação com os grupos étnicos. Houve grande concordância na distribuição das frequências alélicas, entre os três grupos étnicos. Diferenças significativas foram observadas na frequência do grupo alélico *HLA-A*68*, na comparação entre caucasianos e negros (5,0% e 14,7%, respectivamente), OR: 3.27 (IC 95%: 1.51-6.90), e entre mestiços e negros (2.1 e 14,7%, respectivamente) OR: 7.96 (IC 95%: 2.44-33.91). No grupo alélico *HLA-C*07* houve diferença significativa entre mestiços e caucasianos (15.2 e 27.0%, respectivamente), OR: 2.06 (IC 95%: 1.30-3.34).

Os haplótipos mais comuns estão representados na tabela 5. Os haplótipos *HLA-A*01 B*08 C*07 DRB1*03 DQA1*05 DQB1*02* (2.4%), *A*02 B*51 C*15 DRB1*11 DQA1*05*

*DQB1*03* (0.9%) e *A*24 B*35 C*04 DRB1*11 DQA1*05 DQB1*03* (0.9%) foram os mais comuns no total de amostras. O haplótipo *HLA-A*01 B*08 C*07 DRB1*03 DQA1*05 DQB1*02* foi o mais frequente no grupo étnico caucasiano (2.9%) e negro (3.9), e o haplótipo *HLA-A*02-B*51-C*15-DRB1*11 DQA1*05-DQB1*03* foi o mais frequente no grupo étnico mestiço (2.1%).

Discussão

No Brasil, até onde sabemos, não existem estudos de diversidade HLA, envolvendo os *loci* HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1, em candidatos ao transplante renal. Estudos, ao redor do mundo, abordando a diversidade HLA, em portadores de doença renal crônica ou em candidatos ao transplante renal são escassos (12). Ocorrendo, na grande maioria, estudos envolvendo os *loci* HLA-A, -B e -DRB1 (12), ou quando há a análise de outros *loci* como, HLA-C, -DQA1 e DQB1, são estudos de investigação do perfil populacional, utilizando indivíduos aparentemente saudáveis (13,14,15). No Brasil, um grande número de estudos de diversidade HLA foi realizado, em diferentes regiões brasileiras, utilizando indivíduos saudáveis, porém, nenhum envolvendo os *loci* HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e DQB1 conjuntamente (8,9,10,16,17,18,19,20,21,22).

A população brasileira é caracterizada por uma grande mistura de grupos étnicos, resultado da imigração de populações oriundas de vários países, que realizaram a colonização do Brasil, durante cinco séculos, verificando-se uma mistura inter-racial de componentes europeus, africanos, ameríndios e asiáticos (7). A investigação de alelos e haplótipos HLA é importante, pois fornecem dados da origem das populações de um determinado país (8), além de auxiliar em estudos de suscetibilidade às doenças (23,24).

As amostras avaliadas, neste estudo, são oriundas da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, localizado na região Sul do Brasil. A população deste estado brasileiro apresenta grande influência da colonização européia, apresentando grande número de indivíduos caucasianos. No entanto, verifica-se, também, importante número de descendentes africanos e ameríndios em sua população (8). Tal influência pôde ser observada nos resultados do presente estudo, aos quais revelam grande contribuição dos alelos HLA de origem europeia, como o *HLA-A*02*, *-B*35* e *-B*44* (25, 26, 27,28), assim como, a ocorrência de alelos de origem africana, como o *HLA-A*30* e *-B*15* (29, 30,31).

Devido a sua função biológica, e elevado grau de polimorfismo, o sistema HLA tem sido cada vez mais estudado como um marcador genético, envolvido na suscetibilidade de várias doenças (23,24). O grupo alélico *HLA-A*74* e *HLA-DRB1*11* que, neste estudo, apresentou frequência alélica de 1.5% e 13.9%, respectivamente, foi associado positivamente com doença renal crônica terminal, em um estudo com pacientes brasileiros, esperando o transplante renal (32).

Na comparação geral, entre as frequências alélicas de todos os *loci* HLA investigados e, os grupos étnicos da amostra deste estudo foram encontradas mais similaridades do que diferenças, sendo a distribuição geral em relação aos *loci* HLA-A, -B e DRB1, semelhante aos estudos da região Sul do Brasil, onde a maioria da população também foi descrita como de caucasianos (10,17).

Apenas alguns grupos alélicos HLA exibiram diferenças significativas na comparação das frequências alélicas, entre os grupos étnicos. O *HLA-A*68* apresentou diferença significativa na comparação entre caucasianos e negros e entre mestiços e negros e o *HLA-C*07*, entre mestiços e caucasianos. Demonstrando assim que, estes alelos podem ser característicos de determinado grupo étnico, na população estudada. No entanto, os grupos alélicos que possuem geralmente frequência elevada em caucasianos, como o *HLA-A*02*, *HLA-B*35*, *-B*44*, *-B*51*, *-C*04*, *-DRB1*11*, *-DRB1*04*, *-DQA1*05* e *-DQB1*03* apresentaram frequências semelhantes e elevadas tanto em caucasianos, mestiços e negros e, portanto, não demonstraram diferenças significativas, entre os três grupos étnicos estudados.

As similaridades encontradas nas frequências alélicas, entre os grupos étnicos estudados, refletem a miscigenação de grupos étnicos da população brasileira, e a dificuldade de definir a etnia de cada indivíduo, com base na autodefinição, e utilizando somente a avaliação física e cor. Porém, estudos de diversidade HLA auxiliam no conhecimento da ancestralidade, e do grau de miscigenação de uma população, sendo, portanto, importantes em populações com grande mistura de etnias, como a encontrada no Brasil. Foi observado em estudos com amostras de populações dos cinco continentes, diferenças entre os alelos HLA encontrados, e aumento dessas diferenças em populações que apresentavam alto grau de miscigenação de etnias (33,34). No entanto, um estudo de cinco diferentes amostras de populações brasileiras, composta tanto de caucasianos quanto de negros, demonstrou maiores semelhanças nas frequências dos alelos HLA entre essas populações do que diferenças (22), como foi observado na comparação das frequências HLA entre os grupos étnicos do presente estudo.

Muitas vezes, as frequências alélicas HLA do grupo étnico mestiço não foram as intermediárias, entre negros e caucasianos, em razão do grupo étnico mestiço ser constituído pela mistura de diferentes populações de origem européia, africana ou ameríndia que colonizaram a região estudada.

Na análise haplotípica, foram observadas variações de frequências dos haplótipos, de acordo com o grupo étnico avaliado, em nossa amostra. O haplótipo *HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* foi o mais comum, no total de nossa amostra (2.4%), no grupo étnico caucasiano (2.9%) e negro (3.9%), porém, no grupo étnico mestiço não houve a ocorrência de tal haplótipo. No entanto, o haplótipo *HLA-A*02-B*51-C*15-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03* foi o mais comum no grupo étnico mestiço (2.1%), sendo que em caucasianos e negros não houve a ocorrência de tal haplótipo. Os haplótipos, encontrados no grupo étnico mestiço, podem ser resultantes da contribuição de alelos HLA de diferentes populações europeias, africanas ou ameríndias.

Nosso estudo está em concordância com outros estudos, conduzidos no Sul do Brasil, onde o haplótipo *HLA-A*01-B*08-DRB1*03* foi o mais frequente, no total de amostras (10,17). Tal haplótipo também foi o mais comum em caucasianos (2,7%) e afro-brasileiro (1,5%) no estudo do estado do Paraná (18). Em relação a estudos de outros países, em americanos descendentes de europeus o haplótipo *HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03* (4.3%) (28) e o haplótipo *DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* (13,14%) (35) também foram os mais frequentes. O haplótipo *HLA-A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02* foi encontrado, em populações caucasianas européias das Ilhas Baleares (Balearic Island) de Ibiza, Majorca e Minorca localizadas no Mar Mediterrâneo (Espanha), com frequência de 6.1%, 5.7% e 0.8% respectivamente (36), e da Albânia (3.1%) (37).

As frequências dos haplótipos deste estudo foram estimadas, utilizando-se como base os alelos HLA identificados na amostra em estudo. O conhecimento da distribuição de haplótipos fornece informações importantes de influência étnica, e de ancestralidade das populações em estudo, informações estas que, no contexto do transplante, podem auxiliar na busca por um doador com melhor compatibilidade imunológica HLA (10).

Em conclusão, os dados deste estudo permitiram o conhecimento da diversidade de alelos, fenótipos e haplótipos HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) e classe II (HLA-DRB1, -DQA1 e DQB1), em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Tais dados serão importantes para compreensão da biologia da distribuição desses alelos em nossa população, bem como em estudos de suscetibilidade a

diferentes doenças, em pacientes portadores de doença renal crônica; e em processos de alocação de órgãos para o transplante.

Agradecimentos

Agradecemos aos pacientes que participaram deste estudo, à Érika Noguti Noda pela ajuda na coleta de dados dos pacientes, bem como ao Fabiano Cavalcante de Melo e Marco Antonio Braga, pelo suporte técnico. Este estudo foi financiado, em parte, pelo Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária, CNPq e CAPES.

Referências

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular* (ed 6). Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.
2. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2: 662-665.
3. Opelz G, Döhler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 2007; 84:137-143.
4. Wujciak T, Opelz G. Evaluation of HLA matching for CREG antigens in Europe. *Transplantation* 1999; 68:1097–1099.
5. Tran TH, Dohler B, Heinold A, Scherer S, Ruhstroth A, Opelz G. Deleterious impact of mismatching for human leukocyte antigen-C in presensitized recipients of kidney transplants. *Transplantation* 2011; 92:419–425.
6. Tambur AR, Leventhal JR, Friedewald JJ, Ramon DS. The complexity Of human leukocyte antigen (HLA)-DQ antibodies and its effect on virtual crossmatching. *Transplantation* 2010; 90:1117–1124.

7. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:177-182.
8. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MM, Visentainer JE, Tsuneto LT, et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 2000; 72:597-617.
9. Nigam P, Dellalibera E, Maurício-da-Silva L, Donadi EA, Silva RS. Polymorphismo HLA class I genes in the Brazilian population from the northeastern state of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens* 2004; 64:204–208.
10. Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, Neumann J, et al. HLA-A, -B, and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum Immunol* 2012; 73:180-185.
11. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005;1:47-50.
12. Fu Q, Wang C, Zeng W, Liu L. The correlation of HLA allele frequencies and HLA antibodies in sensitized kidney transplantation candidates. *Transplant Proc* 2012; 44(1):217-221.
13. Djoulah S, Sanchez-Mazas A, Khalil I, Benhamamouch S, Degos L, Deschamps I, et al. HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 DNA polymorphisms in healthy Algerian and genetic relationships with other populations. *Tissue Antigens* 1994; 43:102-109.
14. Arrieta-Bolaños E, Maldonado-Torres H, Dimitriu O, Hoddinott MA, Fowles F, Shah A, et al. HLA-A, -B, -C, -DQB1, and DRB1,3,4,5 allele and haplotype frequencies in

- the Costa Rica Central Valley Population and its relationship to worldwide populations. *Hum Immunol* 2011; 72:80-86.
15. Cano P, Testi M, Andreani M, Khoriaty E, Monsef JB, Galluccio T, et al. HLA population genetics: a Lebanese population. *Tissue Antigens* 2012; 80:341-355.
 16. Braun-Prado K, Vieira Mion AL, Farah Pereira N, Culp L, Petzl-Erler ML. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* 2000; 56:417-427.
 17. 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; 37:2293-2296.
 18. Bardi MS, Jarduli LR, Jorge AJ, Camargo RBOG, 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.
 19. Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA. HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. *Tissue Antigens* 2001; 57:158-162.
 20. Moraes ME, Fernandez-ViÒa M, Salatiel I, Tsai S, Moraes JR, Stastny P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. *Tissue Antigens* 1993; 41:238-242.
 21. Williams F, Nasciemnto E, Middleton D. HLA-A and -B alleles in a population from Belo Horizonte, Brazil. *Hum Immunol* 2004; 65:866-870.
 22. Trachtenberg A, Jobim LF, Kraemer E, Salzano FM, Moraes ME, Moraes JR, et al. The HLA polymorphism in five Brazilian populations. *Ann Hum Biol* 1988; 15:213-221.

23. Kaimen-Maciel DR, Reiche EM, Borelli SD, Morimoto HK, Melo FC, Lopes J, et al. HLA-DRB1* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. *Mol Med Report* 2009; 2:993-998.
24. Giarola LB, Santos RR, Bedendo J, Silva Júnior WV, Borelli SD. HLA molecules and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in Southern Brazil. *BMC Res Notes* 2012; 5: 90.
25. Carvalho AS. HLA-A, -B and -C markers in the Portuguese population. *Tissue Antigens* 1983; 21:39-44.
26. Piazza A, Olivetti E, Griffio RM. The distribution of HLA antigens in Italy. *Genes Geogr* 1989; 3:141–164.
27. 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; 72:532–538.
28. Mack SJ, 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; 7:17-32.
29. Lulli P, Mangano VD, Onori A, Batini C, Luoni G, Sirima BS, et al. HLA-DRB1 and -DQB1 loci in three west African ethnic groups: genetic relationship with sub-Saharan African and European populations. *Hum Immunol* 2009; 70:903-909.
30. Assane AA, Fabricio-Silva GM, Cardoso-Oliveira J, Mabunda NEJ, Sousa 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; 71:1027-1032.

31. Paximadis M, Mathebula TY, Gentle NL, Vardas E, Colvin M, Gray CM, et al. Human leukocyte antigen class I (A, B, C) and II (DRB1) diversity in the black and Caucasian South African population. *Hum Immunol* 2012; 73:80-92.
32. Crispim JC, Mendes-Júnior CT, Wastowski IJ, Palomino GM, Saber LT, Rassi DM, et al. HLA polymorphisms as incidence factor in the progression to end-stage renal disease in Brazilian patients awaiting kidney transplant. *Transplant Proc* 2008; 40:1333-1336.
33. Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, et al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2000; 61:1048–1052.
34. Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, et al. Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2001; 62:645–650.
35. Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, et al. New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens* 2003; 62:296-307.
36. Crespí C, Milà J, Martínez-Pomar N, Etxagibel A, Muñoz-Saa I, Priego D, et al. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. *Tissue Antigens* 2002; 60:282-291.
37. Sulcebe G, Sanchez-Mazas A, Tiercy JM, Shyti E, Mone I, Ylli Z, et al. HLA allele and haplotype frequencies in the Albanian population and their relationship with the other European populations. *Int J Immunogenet* 2009; 36:337-343.

Tabelas

Tabela 1. Frequências (f) alélicas e fenotípicas HLA classe I (-A, -B e -C) no total de amostras (n=366).

HLA-A	f alélica	f fenotípica	HLA-B	f alélica	f fenotípica	HLA-C	f alélica	f fenotípica
A*01	0.0997	0.1995	B*07	0.0669	0.1339	C*01	0.0328	0.0656
A*02	0.2500	0.5000	B*08	0.0574	0.1148	C*02	0.0738	0.1475
A*03	0.0997	0.1995	B*13	0.0150	0,0301	C*03	0.0861	0.1721
A*11	0.0560	0.1120	B*14	0.0287	0.0574	C*04	0.1489	0.2978
A*23	0.0519	0.1038	B*15	0.0820	0.1639	C*05	0.0383	0.0765
A*24	0.1011	0.2022	B*18	0.0478	0.0956	C*06	0.0970	0.1940
A*25	0.0246	0.0492	B*27	0.0328	0.0656	C*07	0.2309	0.4617
A*26	0.0451	0.0902	B*35	0.1120	0.2240	C*08	0.0328	0.0656
A*29	0.0396	0.0792	B*37	0.0096	0.0191	C*12	0.0902	0.1803
A*30	0.0546	0.1093	B*38	0.0301	0.0601	C*14	0.0246	0.0492
A*31	0.0314	0.0628	B*39	0.0355	0.0710	C*15	0.0492	0.0984
A*32	0.0232	0.0464	B*40	0.0519	0.1038	C*16	0.0533	0,1066
A*33	0.0260	0.0519	B*41	0.0178	0.0355	C*17	0.0383	0.0765
A*34	0.0082	0.0164	B*42	0.0232	0.0464	C*18	0.0041	0.0082
A*36	0.0055	0.0109	B*44	0.1107	0.2213			
A*66	0.0068	0.0137	B*45	0.0219	0.0437			
A*68	0.0560	0.1120	B*47	0,0014	0.0027			
A*69	0.0014	0.0027	B*48	0.0041	0.0082			
A*74	0.0164	0.0328	B*49	0.0328	0.0656			
A*80	0.0027	0.0055	B*50	0.0301	0.0601			
			B*51	0.0915	0.1831			
			B*52	0.0150	0.0301			
			B*53	0.0219	0.0437			
			B*54	0.0014	0.0027			
			B*55	0.0096	0.0191			
			B*56	0.0014	0.0027			
			B*57	0.0273	0.0546			

B*58	0.0178	0.0355
B*81	0.0014	0.0027
B*82	0.0014	0.0027

Tabela 2. Frequências (f) alélicas e fenotípicas HLA classe II (-DRB1, -DQA1 e -DQB1) no total de amostras (n=366).

HLA-DRB1	f alélica	f fenotípica	HLA-DQA1	f alélica	f fenotípica	HLA-DQB1	f alélica	f fenotípica
<i>DRB1*01</i>	0.0997	0.1995	<i>DQA1*01</i>	0.4044	0.8087	<i>DQB1*02</i>	0.2063	0.4126
<i>DRB1*03</i>	0.1079	0.2158	<i>DQA1*02</i>	0.1243	0.2486	<i>DQB1*03</i>	0.3333	0.6667
<i>DRB1*04</i>	0.1352	0.2705	<i>DQA1*03</i>	0.1448	0.2896	<i>DQB1*04</i>	0.0601	0.1202
<i>DRB1*07</i>	0.1161	0.2322	<i>DQA1*04</i>	0.0519	0.1038	<i>DQB1*05</i>	0.1954	0.3907
<i>DRB1*08</i>	0.0505	0.1011	<i>DQA1*05</i>	0.2650	0.5301	<i>DQB1*06</i>	0.2049	0.4098
<i>DRB1*09</i>	0.0137	0.0273	<i>DQA1*06</i>	0.0096	0.0191			
<i>DRB1*10</i>	0.0205	0.0410						
<i>DRB1*11</i>	0.1393	0.2787						
<i>DRB1*12</i>	0.0123	0.0246						
<i>DRB1*13</i>	0.1284	0.2568						
<i>DRB1*14</i>	0.0423	0.0847						
<i>DRB1*15</i>	0.0970	0.1940						
<i>DRB1*16</i>	0.0369	0.0738						

Tabela 3. Frequências (f) alélicas HLA classe I (-A, -B e -C) no total de amostras (n=366) e comparações entre os grupos étnicos.

HLA	f alélica total	f alélica C	f alélica M	f alélica N	C X M p-valor	C X N p-valor	M X N p-valor	OR(IC95%)	OR(IC95%)
<i>A*01</i>	0.0997	0.1000	0.1053	0.0882	ns	ns	ns		
<i>A*02</i>	0.2500	0.2545	0.2632	0.2059	ns	ns	ns		
<i>A*03</i>	0.0997	0.0977	0.1316	0.0490	ns	ns	ns		
<i>A*11</i>	0.0560	0.0591	0.0579	0.0392	ns	ns	ns		
<i>A*23</i>	0.0519	0.0545	0.0421	0.0588	ns	ns	ns		

A*24	0.1011	0.1114	0.0789	0.0980	ns	ns	ns		
A*25	0.0246	0.0250	0.0316	0.0098	ns	ns	ns		
A*26	0.0451	0.0409	0.0579	0.0392	ns	ns	ns		
A*29	0.0396	0.0523	0.0263	0.0098	ns	ns	ns		
A*30	0.0546	0.0455	0.0526	0.0980	ns	ns	ns		
A*31	0.0314	0.0341	0.0263	0,0294	ns	ns	ns		
A*32	0.0232	0.0295	0.0158	0.0098	ns	ns	ns		
A*33	0.0260	0.0227	0.0105	0.0686	ns	ns	ns		
A*34	0.0082	0.0023	0.0158	0.0196	ns	ns	ns		
A*36	0.0055	-	0.0158	0.0098	ns	ns	ns		
A*66	0.0068	0.0068	0.0105	-	ns	ns	ns		
A*68	0.0560	0.0500	0.0211	0.1471	ns	0.0300	3.27 (1.51-6.90)	0.00108	7.96 (2.44-33.91)
A*69	0.0014	0.0023	-	-	ns	ns	-	-	
A*74	0.0164	0.0068	0.0368	0.0196	ns	ns	ns	ns	
A*80	0.0027	0.0045	-	-	ns	ns	-	-	
B*07	0.0669	0.0705	0.0474	0.0882	ns	ns	ns	ns	
B*08	0.0574	0.0727	0.0263	0.0490	ns	ns	ns	ns	
B*13	0.0150	0.0136	0.0263	-	ns	ns	ns	ns	
B*14	0.0287	0.0295	0.0263	0.0294	ns	ns	ns	ns	
B*15	0.0820	0.0614	0.1263	0.0882	ns	ns	ns	ns	
B*18	0.0478	0.0636	0.0316	0.0098	ns	ns	ns	ns	
B*27	0.0328	0.0386	0.0263	0.0196	ns	ns	ns	ns	
B*35	0.1120	0.1159	0.1053	0.1078	ns	ns	ns	ns	
B*37	0.0096	0.0114	0.0053	0.0098	ns	ns	ns	ns	
B*38	0.0301	0.0273	0.0368	0.0294	ns	ns	ns	ns	
B*39	0.0355	0.0295	0.0316	0.0686	ns	ns	ns	ns	
B*40	0.0519	0.0500	0.0421	0.0784	ns	ns	ns	ns	
B*41	0.0178	0.0182	0.0158	0.0196	ns	ns	ns	ns	
B*42	0.0232	0.0091	0.0421	0.0490	ns	ns	ns	ns	
B*44	0.1107	0.1159	0.1000	0.1078	ns	ns	ns	ns	
B*45	0.0219	0.0205	0.0316	0.0098	ns	ns	ns	ns	
B*47	0.0014	0.0023	-	-	ns	ns	-	-	

B*48	0.0041	0.0023	0.0053	0.0098	ns	ns	ns
B*49	0.0328	0.0364	0.0263	0.0294	ns	ns	ns
B*50	0.0301	0.0295	0.0421	0.0098	ns	ns	ns
B*51	0.0915	0.0977	0.1000	0.0490	ns	ns	ns
B*52	0.0150	0.0159	0.0158	0.0098	ns	ns	ns
B*53	0.0219	0.0182	0.0211	0.0392	ns	ns	ns
B*54	0.0014	0.0023	-	-	ns	ns	-
B*55	0.0096	0.0068	0,0158	0,0098	ns	ns	ns
B*56	0,0014	0.0023	-	-	ns	ns	-
B*57	0.0273	0.0227	0.0368	0.0294	ns	ns	ns
B*58	0,0178	0.0136	0.0158	0.0392	ns	ns	ns
B*81	0.0014	0.0023	-	-	ns	ns	-
B*82	0.0014	-	-	0.0098	-	ns	ns
C*01	0.0328	0.0341	0.0368	0.0196	ns	ns	ns
C*02	0.0738	0.0682	0.0895	0.0686	ns	ns	ns
C*03	0.0861	0.0636	0.1053	0.1471	ns	ns	ns
C*04	0.1489	0.1568	0.1316	0.1471	ns	ns	ns
C*05	0.0383	0.0386	0.0421	0.0294	ns	ns	ns
C*06	0.0970	0.1000	0.1105	0.0588	ns	ns	ns
C*07	0.2309	0.2705	0.1526	0.2059	0.0196	2.06 (1.30-3.34)	ns
C*08	0.0328	0.0364	0.0211	0.0392	ns	ns	ns
C*12	0.0902	0.0932	0.0895	0.0784	ns	ns	ns
C*14	0.0246	0.0205	0.0368	0.0196	ns	ns	ns
C*15	0.0492	0.0477	0.0474	0.0588	ns	ns	ns
C*16	0.0533	0.0500	0.0632	0.0490	ns	ns	ns
C*17	0.0383	0.0205	0.0632	0.0686	ns	ns	ns
C*18	0.0041	-	0.0105	0.0098	ns	ns	ns

C, caucasianos; M, mestiços; N, negros.

- .Não ocorreu neste grupo.

ns, não significativo.

Tabela 4. Frequências (f) alélicas HLA classe II (-DRB1, -DQA1 e -DQB1) no total de amostras (n=366) e comparações entre os grupos étnicos.

HLA	f alélica Total	f alélica C	f alélica M	f alélica N	C X M p-valor	C X N p-valor	M X N p-valor
<i>DRB1*01</i>	0.0997	0.0886	0.1105	0.1275	ns	ns	ns
<i>DRB1*03</i>	0.1079	0.1136	0.0895	0.1176	ns	ns	ns
<i>DRB1*04</i>	0.1352	0.1364	0.1316	0.1373	ns	ns	ns
<i>DRB1*07</i>	0.1161	0.1341	0.0895	0.0882	ns	ns	ns
<i>DRB1*08</i>	0.0505	0.0477	0.0474	0.0686	ns	ns	ns
<i>DRB1*09</i>	0.0137	0.0159	0.0105	0.0098	ns	ns	ns
<i>DRB1*10</i>	0.0205	0.0227	0.0211	0.0098	ns	ns	ns
<i>DRB1*11</i>	0.1393	0.1364	0.1368	0.1569	ns	ns	ns
<i>DRB1*12</i>	0.0123	0.0068	0.0263	0.0098	ns	ns	ns
<i>DRB1*13</i>	0.1284	0.1250	0.1632	0.0784	ns	ns	ns
<i>DRB1*14</i>	0.0423	0.0477	0.0316	0.0392	ns	ns	ns
<i>DRB1*15</i>	0.0970	0.0864	0.1053	0.1275	ns	ns	ns
<i>DRB1*16</i>	0.0369	0.0386	0.0368	0.0294	ns	ns	ns
<i>DQA1*01</i>	0.4044	0.3909	0.4474	0.3824	ns	ns	ns
<i>DQA1*02</i>	0.1243	0.1386	0.1000	0.1078	ns	ns	ns
<i>DQA1*03</i>	0.1448	0.1432	0.1421	0.1569	ns	ns	ns
<i>DQA1*04</i>	0.0519	0.0455	0.0579	0.0686	ns	ns	ns
<i>DQA*05</i>	0.2650	0.2705	0.2526	0.2647	ns	ns	ns
<i>DQA1*06</i>	0.0096	0.0114	0.0000	0.0196	ns	ns	ns
<i>DQB1*02</i>	0.2063	0.2318	0.1684	0.1667	ns	ns	ns
<i>DQB1*03</i>	0.3333	0.3205	0.3316	0.3922	ns	ns	ns
<i>DQB1*04</i>	0.0601	0.0614	0.0579	0.0588	ns	ns	ns
<i>DQB1*05</i>	0.1954	0.1909	0.2053	0.1961	ns	ns	ns
<i>DQB1*06</i>	0.2049	0.1955	0.2368	0.1863	ns	ns	ns

C, caucasianos; M, mestiços; N, negros.

- .Não ocorreu neste grupo.

ns, não significativo

Tabela 5. Frequência dos 10 haplótipos HLA mais comuns no total de amostras (n=366) e nos diferentes grupos étnicos.

Haplótipo	Total	caucasianos	Mestiços	Negros
HLA-A-B-C-DRB1-DQA1-DQB1				
<i>A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02</i>	0.0246	0.0295	-	0.0392
<i>A*02-B*51-C*15-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03</i>	0.0096	-	0.0210	-
<i>A*24-B*35-C*04-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03</i>	0.0094	0.0159	-	0.0098
<i>A*11-B*35-C*04-DRB1*01-DQA1*01-DQB1*05</i>	0.0082	0.0114	-	-
<i>A*02-B*35-C*04-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02</i>	0.0082	0.0090	-	-
<i>A*02-B*07-C*07-DRB1*01-DQA1*01-DQB1*05</i>	0.0082	0.0045	-	-
<i>A*26-B*38-C*12-DRB1*13-DQA1*01-DQB1*06</i>	0.0082	0.0068	0.0105	-
<i>A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQA1*01-DQB1*06</i>	0.0082	0.0045	-	-
<i>A*02-B*40-C*03-DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03</i>	0.0080	0.0102	-	-
<i>A*02-B*39-C*12-DRB1*16-DQA1*0-DQB1*05</i>	0.0068	0.0091	-	-

- .Não ocorreu neste grupo.

Artigo 3: “Avaliação da resposta imune humoral aos antígenos leucocitários humanos em brasileiros candidatos ao transplante renal”.

Página de título**Título do artigo:**

Avaliação da resposta imune humoral aos antígenos leucocitários humanos em brasileiros candidatos ao transplante renal

Título resumido:

Anticorpos anti-HLA em candidatos ao transplante renal

Autores :

Patrícia Keiko Saito¹, Roger Haruki Yamakawa¹, Waldir Veríssimo da Silva Júnior², Sueli Donizete Borelli¹.

Instituições:

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Estatística, Universidade estadual e Maringá – UEM, Maringá, Paraná, Brasil.

Autor para correspondência:

Sueli Donizete Borelli

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Av. Colombo 5790, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Telefone: +55 44 3011.5388

E-mail: sdborelli@uem.br

Contagem total de palavras: 3188 palavras

Contagem de palavras do resumo: 248 palavras

Título científico apropriado: Imunologia Clínica

Resumo

A sensibilização pré-transplante aos antígenos leucocitários humanos (HLA) é um fator de risco para a falência do enxerto. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune humoral aos antígenos HLA, em 269 pacientes renais crônicos, candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Brasil. A tipificação HLA foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO) associado à tecnologia Luminex pelo kit comercial SSO-LABType (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA). A determinação do percentual de reatividade contra painel (PRA) e especificidades de anticorpos anti-HLA foram realizados, utilizando os kits comerciais LS1PRA e LS2PRA (One Lambda, Inc.), através da tecnologia Luminex. O grupo com PRA positivo consistiu de 182 (67.7%) pacientes, e o grupo com PRA negativo 87 (32.3%) pacientes. Apenas o gênero apresentou diferença significativa entre os dois grupos. Entre os 182 pacientes com PRA positivo, 62 (34.1%), eram classe I positivos e classe II negativos; 39 (21.4%) eram classe I negativos e classe II positivos; 81 (44.5%) eram classes I e II positivos. Os grupos alélicos *HLA-A*02*, *-A*24*, *-A*01*, *-B*44*, *-B*35*, *-B*15* *-DRB1*11*, *-DRB1*04* e *-DRB1*13* foram os mais frequentes. As especificidades de anticorpos anti-HLA mais comuns foram: A34; B57; C15; C16; DR51; DQ8 e DP14. Os dados do presente estudo permitiram o conhecimento do perfil de anticorpos anti-HLA, em pacientes renais crônicos, em lista de espera por um órgão na região Norte/Noroeste do Paraná, sendo observada alta sensibilização aos antígenos HLA (PRA positivo) na amostra estudada.

Introdução

Desde a década de 1960, já se conhece a importância dos anticorpos anti-HLA no transplante de órgãos [1]. Vários estudos evidenciaram que, indivíduos que sofreram uma rejeição hiperaguda de um órgão, ou episódios de rejeição aguda, sendo este o primeiro enxerto ou retransplante, podem apresentar em seus soros anticorpos anti-HLA [1-3]. Estes anticorpos podem ser formados, em decorrência de gestações [4-6] e transfusões sanguíneas [6, 7], além de transplantes prévios [6, 8].

A detecção dos anticorpos anti-HLA é uma ferramenta importante para o sucesso do transplante [2, 9] uma vez que, a sensibilização pré-transplante aos antígenos HLA é um fator de risco para a falência do enxerto [10, 11]. Pacientes com elevados percentuais de reatividade contra painel (PRA) apresentam probabilidades maiores de rejeição [10-12].

Estudos sobre o perfil imunológico relacionado a anticorpos anti-HLA classe I (A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP), em populações de brasileiros, candidatos ao transplante renal, são escassos, particularmente no Estado do Paraná. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune aos antígenos HLA em pacientes renais crônicos, candidatos ao transplante renal, da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

Materiais e métodos

Pacientes

O estudo foi realizado com 269 pacientes renais crônicos, que estavam cadastrados nas centrais regionais de transplantes da região Norte e Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, em julho de 2010. Somente foram incluídos pacientes com cadastros atualizados (pacientes ativos/potenciais receptores). Os dados referentes às características demográficas, e de potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA (transfusões, gestações e transplantes prévios) foram informados pelas centrais de transplantes e clínicas de hemodiálise.

De acordo com os resultados de percentual de reatividade contra painel (PRA), os pacientes foram divididos em grupos de PRA negativo (PRA=0) e PRA positivo (PRA>0). Posteriormente, pacientes com PRA positivo foram subdivididos em 2 grupos, de acordo com

o valor de PRA classe I e classe II, separadamente. O grupo 1 incluiu pacientes com PRA entre 1% a 50%, e o grupo 2 incluiu pacientes com PRA entre 51% a 100% .

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil (Parecer nº 333/2011).

Extração de DNA e tipificação HLA classe I e II

Para a realização da tipificação HLA, foram coletados 5 mL de sangue total por meio de punção venosa em tubos a vácuo (Vacutainer; Becton and Dickson, Oxford, Inglaterra), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Em seguida, foi realizada a extração do DNA genômico pelo método de separação por coluna, utilizando o kit comercial para extração de DNA Biopur (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. Após ajuste de concentração do DNA, obtido por densidade óptica, foi realizado o método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO), associado à tecnologia Luminex, kits comerciais SSO-LABType para classe I (HLA-A, -B) e classe II (HLA-DRB1) (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA), que apresentam resultados de baixa e média resolução, seguindo o protocolo do fabricante. Após o processamento das amostras, foi realizada a leitura de resultados através do citômetro de fluxo Plataforma LABScanTM100 (OneLambda, Inc.), seguida de análise através do software HLA Fusion versão 2.0. (One Lambda, Inc.).

Determinação do percentual de reatividade contra painel (PRA) e de especificidades de anticorpos HLA

Para determinação do percentual de reatividade contra painel (PRA) e especificidades de anticorpos anti-HLA foram utilizados os soros dos pacientes e os kits LS1PRA e LS2PRA (One Lambda, INC, Canoga Park, CA, USA), associado à tecnologia Luminex, seguindo o protocolo do fabricante. Após o processamento das amostras, foi realizada a leitura de resultados através do citômetro de fluxo Plataforma LABScanTM100 (One Lambda, Inc.), seguida de análise através do software HLA Fusion versão 2.0 (One Lambda, Inc.), utilizando para análise a fluorescência mínima recomendada pelo fabricante (intensidade de fluorescência mediana igual ou maior que 500).

Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa Statistica 7. As frequências alélicas e fenotípicas foram calculadas por contagem direta. O teste exato de Fisher foi utilizado na comparação das características demográficas e potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA, entre os grupos em estudo. O nível de significância do teste estatístico adotado foi de 95% ($p < 0.05$).

Resultados

As características demográficas e potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA, de acordo com resultado de PRA, estão representados na tabela 1.

O grupo com PRA positivo consistiu de 182 (67.7%) pacientes, e o grupo com PRA negativa 87 (32.3%) pacientes. Apenas o gênero apresentou diferença significativa entre os dois grupos. O grupo PRA positivo apresentou maior número de indivíduos do gênero feminino, e o grupo PRA negativo, maior número de indivíduos do gênero masculino.

As frequências dos grupos alélicos HLA-A, -B e -DRB1 dos pacientes podem ser observadas na tabela 2. Os grupos alélicos *HLA-A*02*, *-A*24* e *-A*01* foram os mais frequentes para o *locus* A. No *locus* B os grupos alélicos mais frequentes foram *HLA-B*44*, *-B*35* e *-B*15*, e no *locus* DRB1 os grupos alélicos *HLA-DRB1*11*, *-DRB1*04* e *-DRB1*13* foram os mais comuns.

A distribuição de anticorpos anti-HLA, de acordo com a porcentagem de PRA, está demonstrada na tabela 3.

Entre os 182 pacientes com PRA positivo, 62 (34.1%) eram classe I positivos e classe II negativos; 39 (21.4%) eram classe I negativo e classe II positivos; 81 (44.5%) eram classes I e II positivos. De acordo com as porcentagens de PRA de classe I, 97 (67.8%) pacientes foram do grupo 1 e 46 (32.2%) foram do grupo 2. Para classe II, 69 (57.5%) pacientes foram do grupo 1 e 51 (42.5%) foram do grupo 2.

A frequência geral de anticorpos anti-HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ e -DP, no grupo de pacientes com PRA positivo, está representado nas tabelas 4 e 5. As especificidades de anticorpos anti-HLA mais frequentes foram: A34; B57; C15; C16; DR51; DQ8 e DP14.

Discussão

Muitos estudos demonstraram a importância dos antígenos HLA no transplante de órgãos, e o efeito que, os anticorpos anti-HLA possuem na sobrevida e rejeição de enxertos [1-3, 13]. Por este motivo, antes do transplante ser realizado, há necessidade de garantir a melhor compatibilidade imunológica entre o doador e o receptor. Além da compatibilidade, é necessário averiguar a existência de anticorpos pré-formados, uma vez que, a presença desses anticorpos, no receptor contra antígenos específicos do doador, pode resultar em uma resposta deletéria ao transplante [1, 9]. Desse modo, a definição das especificidades de anticorpos anti-HLA, no soro de pacientes renais crônicos, candidatos ao transplante, é de suma importância.

A produção de anticorpos anti-HLA ocorre como resultado de eventos sensibilizantes [4-8]. No entanto, podem haver diferenças interindividuais para o desenvolvimento desses anticorpos. Diferentemente de resultados de estudos, realizados em outros países [14-16], a maioria dos pacientes avaliados, neste estudo, apresentou PRA positivo (67,7%). No entanto, as metodologias utilizadas para determinação do percentual de reatividade contra painel foram diferentes entre os estudos. O elevado número de pacientes sensibilizados para os antígenos HLA, também, pode ser explicado, em parte, pela não utilização do monitoramento pré-transplante de anticorpos anti-HLA, como critério para realização de transfusões sanguíneas mais seletivas, não atentando para a possibilidade de sensibilização destes pacientes aos antígenos HLA, através das transfusões sanguíneas.

Diversos estudos relataram as gestações, transfusões sanguíneas e os transplantes prévios, como os potenciais fatores de risco para desenvolvimento de anticorpos anti-HLA [6, 17]. A grande maioria dos pacientes investigados, neste estudo, já realizou transfusões sanguíneas (59,5%), alguns pacientes já realizaram transplantes prévios (7,4%) e a maioria das mulheres já teve gestações (79,4%).

O processo de gestação como fator imunogênico na produção de anticorpos da mãe contra os antígenos do pai que o feto carrega, já foi relatado por diversos estudos [4, 5]. Estudos de Heise et al. (2001) [14], Ozdemir et al. (2004) [15] e Karahan et al. (2009) [16] encontraram associação da gestação com a produção de anticorpos anti-HLA. No presente estudo, a grande maioria das pacientes já teve gestações, e podem ter sido sensibilizadas nesse processo. No entanto, os grupos PRA positivo e negativo não diferiram quanto a esse potencial fator de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA. Uma possível explicação pode estar na existência de compatibilidade materna aos antígenos HLA do pai que

o feto carrega, ou na imunogenicidade (maior ou menor) de determinados antígenos HLA, aos quais a gestante possa ter entrado em contato, através do feto.

A transfusão sanguínea continua sendo um importante fator de sensibilização em pacientes em hemodiálise. Apesar do emprego da eritropoetina recombinante humana em pacientes em hemodiálise, ter resultado em melhora no nível de hemoglobina e nos sintomas da anemia, reduzindo significativamente o número de transfusões necessárias, sua utilização não eliminou completamente a necessidade de transfusões sanguínea por parte dos pacientes [18-20].

Foram poucos os pacientes que realizaram transplantes prévios. O transplante de órgãos sofreu grande progresso, tanto na terapia imunossupressora, quanto nos exames e acompanhamentos laboratoriais. Este progresso reflete no número de casos de rejeição e, conseqüentemente, na redução do número de pacientes que retornam à fila de espera, após um transplante mal sucedido. Phelan et al. (2012) [21] acompanharam 2.381 transplantados renais, observando que, apenas 190 pacientes apresentaram rejeição. Os mesmos autores relataram uma diminuição dos casos de rejeição, no decorrer dos anos, sendo de 7% em 1990 e menos de 1% em 2009.

No entanto, os grupos PRA positivo e negativo não diferiram quanto aos potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA, diferente dos resultados encontrados em estudos realizados em outros países [14-16]. Porém, o presente estudo foi realizado em uma amostra de renais crônicos brasileiros, diferindo também dos demais estudos, por apresentar maior número de pacientes com PRA positivo em relação ao PRA negativo, além de utilizar uma metodologia de determinação de PRA e anticorpos anti-HLA diferente.

Entre os pacientes com PRA positivo, foi observado elevado número de pacientes positivos para ambas as classes (I e II) de anticorpos anti-HLA (44.5%). Conseqüentemente, como esperado, foi elevado também o número de *loci* HLA, aos quais os anticorpos eram reativos no grupo com PRA entre 51% a 100% (grupo 2) em relação ao grupo com PRA, entre 1% a 50% (grupo 1), para as duas classes de anticorpos anti-HLA.

Foi observado que, uma parcela importante dos pacientes com PRA positivo apresentaram PRA entre 51% a 100%, demonstrando alto grau de sensibilização aos antígenos HLA, tanto de classe I quanto de classe II, em pacientes renais neste estudo.

Nosso estudo também apresentou a frequência de especificidades de anticorpos anti-HLA-C e anti-HLA-DP, geralmente, pouco explorados em estudos de perfis de anticorpos. A

significância clínica de anticorpos anti-HLA-C e anti-HLA-DP pré-transplante não tem sido muito investigado, apesar de estudos já terem relatado o efeito de HLA-C e -DP sobre a sobrevivência do enxerto renal. Estudos com pacientes HLA-C incompatíveis demonstraram um aumento na chance de rejeição aguda [22, 23], rejeição hiperaguda [24], rejeição mediada por anticorpos aguda [25, 26] e rejeição crônica [27], na presença de anticorpos anti-HLA-C. Qiu et al. (2005) [28] detectaram anticorpos anti-HLA-DP, em uma frequência maior, em pacientes que rejeitaram seus enxertos, do que aqueles com enxerto funcionante, encontrando anticorpos anti-HLA-DP em 5.1% de 138 receptores de transplante renal com enxertos funcionantes, e em 19.5% de 185 pacientes com enxertos rejeitados, atentando para o fato de 13% dos pacientes que, haviam rejeitado o enxerto, apresentaram apenas anti-HLA-DP, como anticorpo anti-HLA [28]. Relatos de rejeição aguda [25, 29, 30] e rejeição mediada por anticorpos crônica [31], em receptores de transplante renal, na presença de anticorpos anti-HLA-DP também foram realizados. Justificando-se, portanto, a importância do conhecimento e estudo das especificidades desses anticorpos, com a finalidade de melhorar a sobrevivência do enxerto.

A frequência de grupos alélicos HLA encontrada neste estudo foi semelhante ao de indivíduos saudáveis do Sul do Brasil [32-34]. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, sendo composta por diversos grupos étnicos [35], e de acordo com o grupo étnico predominante, na região estudada, podem ocorrer variações nas frequências dos alelos HLA [33, 36, 37]. As amostras avaliadas, no presente estudo, são oriundas do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Esse estado brasileiro, assim como os demais estados do Sul do Brasil, é caracterizado pela forte influência da colonização europeia, mas apresenta importante número de descendentes africanos e ameríndios em sua população [36]. Tal influência pôde ser observada nos resultados deste estudo que, revelaram enorme contribuição de grupos alélicos HLA de origem europeia, como o *HLA-A*24* e *-B*44* [38-40], assim como, a ocorrência de grupos alélicos de influência africana, como o *HLA-A*30* e *-B*15* [41, 42].

Os grupos alélicos HLA mais frequentes, no presente estudo, foram *HLA-A*02*, *-A*24*, *-A*01*, *-B*44*, *-B*35*, *-B*15*, *-DRB1*11*, *-DRB1*04* e *-DRB1*13*. Enquanto as especificidades de anticorpos anti-HLA para os *loci* A, B e DR mais frequentes foram A34, A24, A68, B57, B58, B27, DR51, DR12 e DR9. Houve semelhanças, mas também diferenças, entre os grupos alélicos HLA, e as especificidades de anticorpos anti-HLA encontrados neste estudo, o que está em concordância com os resultados encontrados, em outro estudo de correlação, entre frequência de alelos HLA e anticorpos anti-HLA, em candidatos ao

transplante renal [43]. Antígenos HLA incompatíveis, geralmente, produzem um anticorpo específico para esse antígeno. Desse modo, seria de esperar que, a frequência de especificidade do anticorpo anti-HLA se correlacionaria, naturalmente, com a frequência do fenótipo na população, ou seja, se um fenótipo HLA possui frequência baixa na população, os anticorpos, específicos para este fenótipo, também seriam raros. No entanto, Idica et al., 2006 [44] demonstraram que, a imunização contra fenótipos de frequência baixa pode ocorrer frequentemente, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Foi observado, no presente estudo que, antígenos poucos frequentes, como A34, A68, B58, DR9, DR12 estão entre os que mais induziram a produção de anticorpos anti-HLA. Esta constatação também pode ser explicada pela mistura de grupos étnicos da população brasileira, levando a uma variedade de combinações de haplótipos e alelos HLA e, conseqüentemente, maiores probabilidades de incompatibilidades HLA e sensibilização aos antígenos HLA.

Heise et al. (2001) [14] e Karahan et al. (2010) [16] evidenciaram que, determinados fenótipos HLA podem estar associados ao desenvolvimento de anticorpos anti-HLA, em pacientes renais crônicos. Karahan et al. (2010) [16] demonstraram que, as frequências dos fenótipos HLA-A3, HLA-A66 e HLA-B18 foram significativamente elevadas em pacientes PRA positivos, em relação aos pacientes PRA negativos e que, o alelo DRB1*07 foi mais frequente em pacientes com histórico de eventos de sensibilização e não produção de anticorpos anti-HLA, sugerindo que, o DRB1*07 pode ser associado ao baixo risco de formação de anticorpos anti-HLA. Heise et al. (2001) [14] encontraram associação positiva para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA com os fenótipos HLA de classe I (HLA-A10, -A19, -A36, -B42 e -B53), e associações negativas com os fenótipos HLA classe I (A1, A2, A11; B8, B12, B40) e classe II (DR1, DR4, DR7). Ainda no mesmo estudo, foi apresentado o fenótipo DR3 associado a elevados valores de PRA, e baixa sobrevida do enxerto, e os fenótipos DR1 e DR4 associados com baixos valores de PRA, e boa sobrevida do enxerto. No entanto, alguns fenótipos HLA, como o HLA-A2 e -B18, que demonstraram associações negativas ou positivas nestes estudos, são frequentes, tanto em pacientes renais crônicos do presente estudo, quanto em populações de indivíduos saudáveis [33, 34]. Estes estudos corroboram para a importância do conhecimento da diversidade HLA, e perfil de anticorpos dirigidos ao sistema HLA, no contexto dos transplantes.

As limitações do presente estudo estão, particularmente, na utilização de pequeno número de amostras, e nas dificuldades para obtenção de informações de sensibilização (gestações, transfusões sanguíneas e transplantes prévios), em virtude da maioria das clínicas

de hemodiálise e centrais de transplantes não possuem um sistema de dados eficiente e atualizado para tais informações. As transfusões sanguíneas não foram avaliadas pelo número de transfusões realizadas, em razão das diferentes centrais de transplantes e clínicas de hemodiálise divergirem quanto ao número de bolsas de hemoderivados correspondentes a transfusões sanguíneas. Apesar dessas limitações, o presente estudo revelou dados importantes sobre a sensibilização aos antígenos HLA.

Os dados deste estudo permitiram o conhecimento do perfil de anticorpos anti-HLA, em pacientes renais crônicos, em lista de espera por um órgão da região Norte/Noroeste do Paraná, sendo observada alta sensibilização aos antígenos HLA (PRA positivo), na amostra estudada. A avaliação da resposta imune aos antígenos HLA, na fase pré-transplante, poderá contribuir para futuros estudos de associação de alelos HLA, e desenvolvimento de anticorpos anti-HLA em pacientes brasileiros, portadores de doença renal crônica e, para o entendimento de futuros eventos, relacionados à aceitação ou rejeição de enxertos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação Araucária, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro. Gostaríamos também de agradecer à Érika Noguti Noda, e Érica Aparecida Pereira pela ajuda na coleta dos dados e suporte técnico. Estamos muito gratos a todos os pacientes que participaram deste estudo.

Conflito de interesses

Todos os autores declaram não ter nenhum conflito de interesse.

Declaração autor

Todos os autores contribuíram igualmente para este trabalho.

Referências (References)

1. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2:662-65.

2. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280:735-9.
3. Halloran PF, Wadgyman A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. 1. Clinical and pathological features of anti-class I mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49:85-91.
4. Van Rood JJ, Van Leeuwen A, Eernisse JG. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 1958; 181:1735-6.
5. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 1958; 37:1756-63.
6. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG, Halloran PF. The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev* 2003; 196:197-218.
7. Dausset J. Leuco agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 1954; 4: 190-8.
8. Thick M, Verbi V, Kennedy L, Welsh K. Sensitization following kidney graft failure and blood transfusion. *Transplantation* 1984; 37:525-6.
9. Süsal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 2002; 73:1269-73.
10. Abe M, Kawai T, Futatsuyama K. et al. Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63:1616-9,
11. Barama A, Oza U, Panek R. et al. Effect of recipient sensitization (peak PRA) on graft outcome in haplo-identical living related kidney transplants. *Clin Transplant* 2000;14:212-7.

12. Matas AJ, Gillingham K, Payne WD. et al. Should I accept this kidney? *Clin Transplant* 2000; 14: 90-5.
13. Egfjord M, Jakobsen BK, Ladefoged J. No impact of cross-reactive group human leucocyte antigen class I matching on long-term kidney graft survival. *Scand J Immunol* 2003; 57:362-5.
14. Heise E, Manning C, Thacker L. HLA phenotypes of ESRD patients are risk factors in the panel-reactive antibody (PRA) response. *Clin Transplant* 2001; 15 Suppl 6:22-7.
15. Ozdemir FN, Sezer S, Akcay A. et al. Panel reactive antibody positivity and associated HLA antibodies in Turkish renal transplant candidates. *Transpl Immunol* 2004; 12:185-8.
16. Karahan GE, Seyhun Y, Oguz F et al. Anti-HLA antibody profile of Turkish patients with end-stage renal disease. *Transplant Proc* 2009; 41:3651-4.
17. Ling M, Marfo K, Masiakos P et al. Pretransplant anti-HLA-Cw and anti-HLA-DP antibodies in sensitized patients. *Hum Immunol* 2012; 73:879-83.
18. Kliger AS, Fishbane S, Finkelstein FO. Erythropoietic stimulating agents and quality of a patient's life: individualizing anemia treatment. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7:354–57.
19. Goodnough LT, Strasburg D, Riddell JT, Verbrugge D, Wish J. Has recombinant human erythropoietin therapy minimized red-cell transfusions in hemodialysis patients? *Clin Nephrol* 1994; 41:303–7.
20. Tanhehco YC, Berns JS. Red blood cell transfusion risks in patients with end-stage renal disease. *Semin Dial* 2012; 25:539-44.
21. Phelan PJ, O'Kelly P, Tarazi M et al. Renal allograft loss in the first post-operative month: causes and consequences. *Clin Transplant* 2012; 26:544-9.

22. Frohn C, Fricke L, Puchta JC, Kirchner H. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:355–60.
23. Tran TH, Dohler B, Heinold A, Scherer S, Ruhenstroth A, Opelz G. Deleterious impact of mismatching for human leukocyte antigen-C in presensitized recipients of kidney transplants. *Transplantation* 2011; 92:419–25.
24. Chapman JR, Taylor C, Ting A, Morris PJ. Hyperacute rejection of a renal allograft in the presence of anti-HLA-Cw5 antibody. *Transplantation* 1986, 42:91–3.
25. Gilbert M, Paul S, Perrat G et al. Impact of pretransplant human leukocyte antigen-C and -DP antibodies on kidney graft outcome *Transpl Proc* 2011; 43:3412–4.
26. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011; 11:1543-4.
27. Duquesnoy RJ, Marrari M. Detection of antibodies against HLA-C epitopes in patients with rejected kidney transplants. *Transpl Immunol* 2011; 24: 164-71.
28. Qiu J, Cai J, Terasaki PI, El-Awar N, Lee JH. Detection of antibodies to HLA-DP in renal transplant recipients using single antigen beads. *Transplantation* 2005; 80:1511-3.
29. Goral S, Prak EL, Kearns J. et al. Preformed donor-directed anti-HLA-DP antibodies may be an impediment to successful kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:390–2.
30. Singh P, Colombe BW, Francos GC, Martinez Cantarin MP, Frank AM. Acute humoral rejection in a zero mismatch deceased donor renal transplant due to an antibody to an HLA-DP alpha. *Transplantation* 2010; 90:220–1.

31. Thauinat O, Hanf W, Dubois V. et al. Chronic humoral rejection mediated by anti-HLA-DP alloantibodies: insights into the role of epitope sharing in donor-specific and non-donor specific alloantibodies generation *Transpl Immunol* 2009; 20:209–11.
32. 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.
33. Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, et al. HLA-A, -B, and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum Immunol* 2012; 73:180-185.
34. Bardi MS; Jarduli LR; Jorge AJ 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.
35. 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.
36. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MM, Visentainer JE, Tsuneto LT, et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 2000; 72:597-617.
37. Nigam P, Dellalibera E, Maurício-da-Silva L, Donadi EA, Silva RS. Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the northeastern state of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens* 2004; 64:204–8.
38. Carvalho AS. HLA-A, -B and -C markers in the Portuguese population. *Tissue Antigens* 1983; 21:39–44.
39. Piazza A, Olivetti E, Griffio RM. The distribution of HLA antigens in Italy. *Genes Geogr* 1989; 3:141–64.

40. 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; 72:532–38.
41. Assane AA, Fabricio-Silva GM, Cardoso-Oliveira J, 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.
42. Paximadis M, Mathebula TY, Gentle NL et al. Human leukocyte antigen class I (A, B, C) and II (DRB1) diversity in the black and Caucasian South African population. *Hum Immunol* 2012; 73:80-92.
43. Fu Q, Wang C, Zeng W, Liu L. The correlation of HLA allele frequencies and HLA antibodies in sensitized kidney transplantation candidates. *Transplant Proc* 2012; 44:217-21.
44. Idica A, Sasaki N, Hardy S, Terasaki P. Unexpected frequencies of HLA antibody specificities present in sera of multitransfused patients. *Clin Transpl* 2006; 139-59.

Tabelas

Tabela 1. Características demográficas e potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA de acordo com resultado de PRA.

	PRA - Positivo (n=182)	PRA - Negativo (n=87)	p - valor
Idade média (anos)	52.0 ± 13.2	52.4 ± 12.0	
Gênero			
Masculino	106 (58.2%)	66 (75.9%)	0.0064
Feminino	76 (41.8%)	21 (24.1%)	
Grupo étnico			
Caucasiano	104 (57.1%)	52 (59.7%)	
Mestiços	54 (29.7%)	16 (18.4%)	
negros	20 (11.0%)	14 (16.1%)	
orientais	4 (2.2%)	5 (5.8%)	
Potenciais fatores de risco			
Média de duração da diálise (anos)	7.0 ± 3.8	6.3 ± 3.4	
Alguma transfusão (nº de pacientes)	110 (60.4%)	50 (57.5%)	
Alguma Gravidez (nº de mulheres)	62 (81.6%)	15 (71.4%)	
História de Transplante prévio (nº de pacientes)	16 (8.8%)	4 (4.6%)	

Tabela 2. Frequências alélicas e fenotípicas HLA (-A, -B e -DRB1) no total de pacientes.

HLA- A*	frequência alélica	frequência fenotípica	HLA- B*	Frequência alélica	frequência fenotípica	HLA- DRB1*	frequência alélica	Frequência fenotípica
01	0.1041	0.2082	07	0.0613	0.1227	01	0.0855	0.1710
02	0.2416	0.4833	08	0.0558	0.1115	03	0.1097	0.2193
03	0.0892	0.1784	13	0.0186	0.0372	04	0.1338	0.2677
11	0.0651	0.1301	14	0.0260	0.0520	07	0.1115	0.2230
23	0.0446	0.0892	15	0.0874	0.1747	08	0.0558	0.1115
24	0.1152	0.2305	18	0.0390	0.0781	09	0.0204	0.0409
25	0.0316	0.0632	27	0.0242	0.0483	10	0.0260	0.0520
26	0.0372	0.0743	35	0.1041	0.2082	11	0.1357	0.2714
29	0.0242	0.0483	37	0.0112	0.0223	12	0.0093	0.0186
30	0.0520	0.1041	38	0.0279	0.0558	13	0.1301	0.2602

31	0.0335	0.0669	39	0.0409	0.0818	14	0.0446	0.0892
32	0.0279	0.0558	40	0.0651	0.1301	15	0.1078	0.2156
33	0.,0279	0.0558	41	0.0186	0.0372	16	0.0297	0.0595
34	0.0093	0.0186	42	0.0242	0.0483			
36	0.0074	0.0149	44	0.1059	0.2119			
66	0.0112	0.0223	45	0.0223	0.0446			
68	0.0576	0.1152	47	0.0019	0.0037			
69	0.0019	0.0037	48	0.0093	0.0186			
74	0.0149	0.0297	49	0.0316	0.0632			
80	0.0037	0.0074	50	0.0335	0.0669			
			51	0.0836	0.1673			
			52	0.0204	0.0409			
			53	0.0242	0.0483			
			54	0.0056	0.0112			
			55	0.0112	0.0223			
			56	0.0019	0.0037			
			57	0.0260	0.0520			
			58	0.0149	0.0297			
			81	0.0019	0.0037			
			82	0.0019	0.0037			

Tabela 3. Distribuição de anticorpos anti-HLA de acordo com a porcentagem de PRA.

	Grupo 1	Grupo 2
	PRA = 1% - 50%	PRA = 51% - 100%
Anti-Classe I		
(N=143)		
Anti-locus A	23	4
Anti-locus B	42	0
Anti-locus C	1	0
Anti-locus A+B	26	29
Anti-locus A+C	0	0
Anti-locus B+C	2	0
Anti-locus A+B+C	3	13
Anti-classe II		
(N=120)		
Anti-locus DR	21	4
Anti-locus DQ	10	1
Anti-locus DP	0	0
Anti-locus DR+DQ	36	38
Anti-locus DR+DP	0	0
Anti-locus DQ+DP	0	0
Anti-locus DR+DQ+DP	2	8

Tabela 4. Frequência de anticorpos anti-HLA de classe I nos pacientes com PRA positivo.

anti-HLA-A	frequência	anti-HLA-B	frequência	anti-HLA-C	frequência
anti-A1	0.1758	anti-B7	0.1484	anti-C1	0.0055
anti-A2	0.2143	anti-B8	0.1374	anti-C4	0.0220
anti-A3	0.0714	anti-B13	0.0989	anti-C6	0.0110
anti-A11	0.0989	anti-B18	0.1044	anti-C7	0.0055
anti-A23	0.1978	anti-B27	0.1703	anti-C9	0.0055
anti-A24	0.2308	anti-B35	0.1538	anti-C12	0.0110
anti-A25	0.1319	anti-B37	0.0330	anti-C14	0.0110
anti-A26	0.0879	anti-B38	0.0495	anti-C15	0.0330
anti-A29	0.0769	anti-B39	0.1044	anti-C16	0.0330
anti-A30	0.0769	anti-B41	0.0440	anti-C18	0.0055
anti-A31	0.1044	anti-B42	0.1374		
anti-A32	0.1319	anti-B44	0.0934		
anti-A33	0.1264	anti-B45	0.0934		
anti-A34	0.2473	anti-B46	0.0055		
anti-A36	0.1154	anti-B47	0.0385		
anti-A66	0.1429	anti-B48	0.1319		
anti-A68	0.2253	anti-B49	0.1154		
anti-A69	0.1868	anti-B50	0.1209		
anti-A74	0.0385	anti-B51	0.1209		
anti-A80	0.0824	anti-B52	0.1264		
		anti-B53	0.1154		
		anti-B54	0.1044		
		anti-B55	0.1044		
		anti-B56	0.1484		
		anti-B57	0.2088		
		anti-B58	0.1813		
		anti-B59	0.0604		
		anti-B60	0.1593		
		anti-B61	0.1374		
		anti-B62	0.0934		
		anti-B63	0.1319		
		anti-B64	0.0769		
		anti-B65	0.1044		
		anti-B67	0.1538		
		anti-B71	0.0659		
		anti-B72	0.0659		
		anti-B73	0.0275		
		anti-B75	0.0604		
		anti-B76	0.0659		
		anti-B78	0.0989		
		anti-B81	0.1374		
		anti-B82	0.0769		

Tabela 5. Frequência de anticorpos anti-HLA de classe II nos pacientes com PRA positivo.

anti-HLA-DR	frequência	anti-HLA-DQ	frequência	anti-HLA-DP	frequência
anti-DR1	0.2308	anti-DQ2	0.0934	anti-DP1	0.0055
anti-DR4	0.2198	anti-DQ4	0.0769	anti-DP2	0.0055
anti-DR7	0.2143	anti-DQ5	0.0714	anti-DP3	0.0110
anti-DR8	0.2198	anti-DQ6	0.0989	anti-DP4	0.0055
anti-DR9	0.2747	anti-DQ7	0.2088	anti-DP5	0.0110
anti-DR10	0.1538	anti-DQ8	0.3132	anti-DP13	0.0110
anti-DR11	0.1484	anti-DQ9	0.2967	anti-DP14	0.0165
anti-DR12	0.2802			anti-DP18	0.0055
anti-DR13	0.1923				
anti-DR14	0.1374				
anti-DR15	0.2033				
anti-DR16	0.2473				
anti-DR17	0.1868				
anti-DR18	0.1703				
anti-DR51	0.2912				
anti-DR52	0.1209				
anti-DR53	0.1868				
anti-DR103	0.1923				

2. CAPÍTULO III

3.1. CONCLUSÕES

Como opção, apresentamos neste tópico as conclusões gerais da dissertação. As conclusões específicas estão ao longo dos três artigos que, compõem esta dissertação.

Os dados deste estudo serviram como base para o conhecimento das frequências de alelos, fenótipos e haplótipos HLA classe I (HLA-A, -B e -C) e classe II (HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1) e do perfil de anticorpos anti-HLA em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

Observamos maiores similaridades do que diferenças, na comparação geral das frequências alélicas HLA, entre os grupos étnicos deste estudo. A distribuição, tanto de alelos, quanto de haplótipos HLA de candidatos ao transplante renal foi muito semelhante a de estudos abrangendo populações saudáveis da região Sul do Brasil. Devido a maior parte da população do Sul do Brasil ser de origem caucasiana, e de descendência europeia, os alelos e haplótipos HLA encontrados, neste estudo, refletem a origem genética dos povos que, participaram ativamente na colonização tanto do Estado do Paraná, quanto dos demais estados do Sul do Brasil.

Foi observada, também, alta sensibilização aos antígenos HLA classe I e II, entre os pacientes investigados, onde a grande maioria apresentou PRA positiva, e grande diversidade de especificidades de anticorpos anti-HLA.

3.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento da distribuição de alelos e haplótipos HLA, na população de candidatos ao transplante renal e em diferentes grupos étnicos, poderá contribuir em estudos de associação e suscetibilidade a diversas doenças, aos quais os pacientes portadores de doença renal crônica são acometidos, bem como auxiliar em futuros estudos de implicações dessa diversidade alélica para o desenvolvimento de anticorpos.

A determinação dos alelos HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1, em uma amostra de candidatos ao transplante renal, também auxiliará na futura padronização do painel virtual, para realização da reatividade contra painel (PRA) virtual, como teste de auxílio na investigação pré-transplante, pois permitirá que a reatividade obtida seja, de fato, correspondente aos antígenos da população de nossa região.

A avaliação da resposta imune aos antígenos HLA contribuirá para o entendimento de futuros eventos relacionados a aceitação ou rejeição do enxerto.