

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

ROGER HARUKI YAMAKAWA

Polimorfismo HLA e Duffy em candidatos ao transplante renal da região
Norte/Noroeste do Estado do Paraná

Maringá
2013

ROGER HARUKI YAMAKAWA

Polimorfismo HLA e Duffy 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)

Y19p Yamakawa, Roger Haruki
Polimorfismo HLA e Duffy em candidatos ao
transplante renal da região norte/noroeste do estado
do Paraná / Roger Haruki Yamakawa. -- Maringá, 2013.
53 f. : il., figs., tabs.

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

1. Insuficiência Renal. 2. Transplante de rim. 3.
Grupo sanguíneo Duffy. 4. Receptores de citocinas.
5. Antígenos HLA. 6. Genética populacional. 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. 616.0796
616.614

ECSL-00679

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROGER HARUKI YAMAKAWA

Polimorfismo HLA e Duffy 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. Luiz Carlos de Mattos
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Eliane Litsuko Tomimatsu Shimauti
Universidade Estadual de Maringá

Pro. 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
aqueles que contribuíram para
sua realização.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus familiares, Alcírio Harumio Yamakawa, Luzia Norico Wakai Yamakawa e Melina Ayumi Yamakawa, pela confiança, dedicação, carinho e incentivo durante toda minha vida.

À minha namorada, Patrícia Keiko Saito, pela amizade, paciência e companheirismo.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Sueli Donizete Borelli, por sua dedicação, competência e profissionalismo, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa, a quem tenho grande admiração, carinho e respeito.

Aos professores, Drs. Luiz Carlos de Mattos e Cinara de Cássia Brandão de Mattos, pelo apoio e parceria.

Aos professores, pesquisadores e funcionários do laboratório de Imunogenética da UEM: Ricardo Alberto Moliterno, Luiza Tamie Tsuneto, Rafael de Campos Bezerra, Márcia Machado de Oliveira Dalalio, Ana Maria Sell, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Fabiano Cavalcante de Melo, Marco Antonio Braga, Silvana Pereira da Silva, Édina de Fátima Alcarde Amendoa Pupin, Helen Cristiane da Silva e Neuza Romão Barreto.

Ao professor, Dr. João Bedendo, pelo incentivo e orientação.

Às companheiras de laboratório Rosiane dos Santos, Jocimara Mazzola, Alessandra Matta, Rafaela Ussueli e Laiane Denski.

Aos estagiários do laboratório de Imunogenética da UEM

À Prof^ª. Dr^ª. Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti pelas contribuições e sugestões para melhoria desse trabalho.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PCS-UEM)

Aos colegas de minha turma do Mestrado em Ciências da Saúde.

Aos funcionários do laboratório Histogene.

Aos colaboradores das clínicas de hemodiálise.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram em meu trabalho, meu sincero agradecimento.

EPÍGRAFE

“A semente do bem se origina no sentimento fraterno de querer alegrar ou favorecer os semelhantes.”

Mokiti Okada

Polimorfismo HLA e Duffy em candidatos ao transplante renal da região Norte/Noroeste do Estado do Paraná

RESUMO

Os sistemas leucocitário humano (HLA) e eritrocitário Duffy são considerados antígenos de histocompatibilidade principais e secundários, respectivamente, e podem ser potenciais biomarcadores para a doença renal crônica (DRC). Nesse estudo, foi avaliado o polimorfismo dos grupos alélicos HLA e antígenos Duffy, em pacientes portadores de DRC, à espera de um transplante. A tipificação HLA foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase-sequência específica de oligonucleotídeos (PCR-SSO), associado à tecnologia Luminex. Para a definição dos fenótipos eritrocitários Duffy foi utilizado o método de aglutinação em colunas de gel, com anti-soros monoclonais anti-Fy^a e anti-Fy^b. No primeiro artigo, foram estudados os fenótipos Duffy, ABO e Rh em 231 pacientes renais. Dentre os pacientes investigados, 46,3% eram do grupo sanguíneo O, e 89,2% eram Rh positivos. Não houve diferença, estatisticamente significativa, nas frequências ABO e Rh entre pacientes e indivíduos saudáveis. O fenótipo Fy(a+b+) foi o mais prevalente. Foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nas frequências dos fenótipos Fy(a+b+) e Fy(a+b-) entre pacientes e indivíduos saudáveis da mesma região. No segundo artigo, o polimorfismo dos antígenos Duffy e dos grupos alélicos HLA foram estudados em 183 pacientes. O fenótipo Fy(a+b+) novamente foi o mais prevalente. Foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nas frequências dos fenótipos Fy(a+b+) e Fy(a+b-), entre pacientes e indivíduos saudáveis da mesma região. Os grupos alélicos HLA mais frequentes para cada locus foram: HLA-A*02 e -B*51 e -DRB1*11. Quando comparadas às frequências dos grupos alélicos HLA dos pacientes com indivíduos saudáveis, observamos que o HLA-B*42, HLA-B *45, -B*51 e DRB1*03 foram mais frequentes em pacientes ($p < 0,05$) e o HLA-B*44 em indivíduos saudáveis ($p < 0,05$). Este estudo permitiu o conhecimento do polimorfismo dos grupos alélicos HLA e antígenos Duffy, em pacientes com DRC, à espera de um transplante. Foi possível observar o envolvimento do fenótipo Duffy Fy(a+b-), e de alguns grupos alélicos HLA na DRC, sugerindo alguma relação da expressão de seus antígenos com a doença.

Palavras-chave: Insuficiência Renal. Transplante. Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy. Antígenos HLA. Receptores de Citocinas. Genética Populacional.

HLA and Duffy polymorphism in renal transplant candidates in North/Northwest of Parana State

ABSTRACT

The human leukocyte system (HLA) and the Duffy erythrocyte system are considered primary and secondary antigens of histocompatibility, respectively, and may be potential biomarkers for chronic kidney disease (CKD). In this study, we evaluated the HLA allelic polymorphism and antigens of Duffy in CKD patients waiting for a transplant. The HLA typing was performed, by the method of polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSO), associated with Luminex technology. For the definition of Duffy phenotypes was used agglutination gel columns method with monoclonal antisera anti-Fya and anti-Fyb. In the first article, we studied the phenotypes Duffy, ABO and Rh in 231 renal patients. Among the patients studied, 46.3% were blood group O and 89.2% were positive Rh. There was no statistically significant difference in the frequencies between ABO and Rh patients and healthy subjects. The phenotype Fy(a+b+) was the most watched. There were statistically significant differences in the frequencies of Fy(a+b+) and Fy(a+b-) between patients and healthy subjects from the same region. In the second article, the polymorphism of the Duffy antigens and HLA allelic groups were studied in 183 patients. The phenotype Fy(a+b+) was the most watched. There were statistically significant differences in the frequencies of Fy(a+b+) and Fy(a+b-) between patients and healthy subjects from the same region. The most frequent HLA allelic groups for each locus were: HLA-A*02 and -B*51 and -DRB1*11. When comparing the frequencies of HLA allelic groups of patients with healthy subjects, we found that the HLA-B*42, HLA-B*45,-B*51 and DRB1*03 were more frequent in patients ($p < 0.05$) and HLA-B*44 in healthy subjects ($p < 0.05$). This study allowed the knowledge of HLA allelic groups polymorphism and Duffy antigens in CKD patients waiting for a transplant. It was possible to observe the involvement of Duffy phenotype Fy(a+b-) and some HLA allelic groups in the DRC, suggesting some association between the expression of their antigens with the disease.

Keywords: Renal Insufficiency. Transplantation. Duffy Blood-Group System. HLA Antigens. Receptors, Cytokine. Genetics, Population.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura das moléculas HLA de Classe I e II (MHC Classe I e MHC Classe II).	13
Figura 2. Estrutura da glicoproteína Duffy.	17
Table 1. General characteristics of chronic kidney disease patients in the northwestern region of the state of Paraná, Brazil.	35
Table 2. Frequency of ABO erythrocyte phenotypes of chronic kidney disease patients (CKDP) and voluntary blood donors (VBD).	36
Table 3. Frequencies of erythrocyte phenotypes Rh in chronic kidney disease patients (CKDP) and voluntary bone marrow donors (VBMD) from the northwestern region of the state of Paraná, Brazil.	36
Table 4. Frequency of erythrocyte phenotypes Duffy in chronic kidney disease patients (CKDP) and voluntary bone marrow donors (VBMD) from the northwestern region of the state of Paraná, Brazil.	37
Table 5. Distribution of phenotypes Duffy according to ethnicity of chronic kidney disease patients from the northwestern region of the state of Paraná, Brazil.	37
Tabela 1. Características gerais dos pacientes nefropatas da região sul do Brasil.	50
Tabela 2. Frequência dos fenótipos Duffy em pacientes nefropatas da região sul do Brasil.	50
Tabela 3. Frequência dos alelos HLA-A, -B e -DRB1 em pacientes nefropatas da região sul do Brasil.	51
Tabela 4. Frequência dos fenótipos Duffy dos pacientes nefropatas do sul do Brasil comparada com indivíduos saudáveis de outros estudos.	52
Tabela 5. Distribuição dos grupos alélicos HLA mais prevalentes nos pacientes nefropatas sul brasileiros comparada com indivíduos saudáveis de outros estudos.	52

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): Clinical & Experimental Immunology (artigo 1)

disponível em:

<[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2249](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2249)> e

PLOS ONE (artigo 2)

disponível em:

< <http://www.plosone.org/home.action>>

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	12
1.1. INTRODUÇÃO.....	12
1.2. SISTEMA HLA.....	12
1.3. SISTEMA ERITROCITÁRIO DUFFY.....	15
1.4. JUSTIFICATIVA.....	18
1.5. OBJETIVOS.....	18
1.5.1. Geral	18
1.5.2. Específicos	18
1.6. REFERÊNCIAS.....	19
2. CAPÍTULO 2	24
2.1. ARTIGO 1: “Duffy histology and blood system: association of Fy ^a antigen with chronic kidney disease (CKD)”.....	24
2.2. ARTIGO 2: “Polimorfismo de antígeno leucocitário e eritrocitário em pacientes nefropatas da região sul do Brasil”.....	38
3. CAPÍTULO 3	53
3.1. CONCLUSÕES.....	53
3.2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53

1. CAPÍTULO I

1.1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o primeiro sucesso no transplante de órgãos ocorreu, em 1954, na cidade de Boston, EUA, onde foi realizado um transplante de rins, entre gêmeos idênticos. Este fato foi um marco para o tratamento da doença renal crônica (DRC) terminal (MURRAY, 2011). O fator mais importante no transplante de órgãos continua sendo a compatibilidade entre doador e receptor. Essa compatibilidade, atualmente, é definida através da tipagem sanguínea e, principalmente, pela tipagem HLA (*Human Leucocyte Antigen*). Quanto mais semelhantes forem os alelos HLA do doador e do receptor, melhores serão os resultados. Por este motivo, laboratórios de histocompatibilidade e centrais de transplante que, atendem estes pacientes, mantêm um banco de dados com as tipagens HLA, seguindo o que preconiza a política nacional de transplantes de órgão e tecidos¹. Esses bancos de dados, por garantirem uma consulta rápida da tipagem HLA de doadores e receptores, favorecem a melhor distribuição de órgãos.

1.2. SISTEMA HLA

O sistema HLA foi descoberto em 1958, quando Jean Dausset observou a capacidade do soro de pessoas politransfundidas aglutinar leucócitos de outros indivíduos, descrevendo assim, a primeira molécula HLA que, foi chamada de MAC (atualmente HLA-A*02) (DAUSSET, 1958; PORTO; PONTES, 2007). Em 1963, Van Rood e Van Leeuwen descobriram o primeiro loco do sistema de antígenos leucocitários humanos, chamado de 4 (FOUR) (atualmente HLA-B) (VAN ROOD; VAN LEEUWEN, 1963). Posteriormente, surgiram evidências de novos sistemas antigênicos análogos, associados ao HLA-C (SOLHEIN et al.,1973) e HLA-DR (DUQUESNOY; MARRARI; ANNEN, 1979). As investigações levaram ao reconhecimento, em 1983, dos genes que codificam os isotipos HLA-DR, HLA-DQ e DP. Atualmente, a estrutura e função dos genes do sistema HLA, já são conhecidos detalhadamente (STEINMETZ; HOOD, 1983; BJORKMAN et al., 1987).

O Sistema HLA está inserido nos genes do MHC (*Major Histocompatibility Complex*), localizado no braço curto do cromossomo 6, na posição p21.3 (LAMM, 1974, SENGER et al., 1993). Existem duas classes de moléculas MHC: MHC de Classe I, a que codifica os antígenos HLA Classe I (locos A, B e C), e MHC de Classe II, a que codifica os antígenos

¹ Lei nº9.434/97, Lei nº10.211/01, Lei nº8.080/90 e Lei nº8.142/90.

HLA Classe II (DR, DQ e DP), classes que diferem em sua estrutura e função (JANEWAY et al., 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A estrutura das moléculas do sistema HLA de Classe I (Figura 1) consiste em duas cadeias polipeptídicas, ligadas de forma não covalentes, à cadeia α (ou cadeia pesada) de 44 a 47 kDa e, a cadeia β_2 -microglobulina, uma subunidade de 12 kDa, não codificada pelo MHC. Os segmentos aminoterminais α_1 e α_2 interagem para formar uma plataforma de oito fitas, em estrutura β -pregueada, nas quais se apoiam duas α -hélices paralelas. Esta estrutura forma a fenda de ligação de peptídeos, nas moléculas de Classe I, sendo a região onde se concentra o polimorfismo da molécula, devido às substituições nucleotídicas, nos éxons 2 e 3. As moléculas de MHC da Classe II (Figura 1) são compostas de duas cadeias polipeptídicas, ligadas de forma não-covalente, uma cadeia α com 32 a 34 kDa e uma cadeia β de 29 a 32 kDa. Ao contrário das moléculas de Classe I, ambas as cadeias das moléculas de Classe II são codificadas por genes MHC polimórficos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

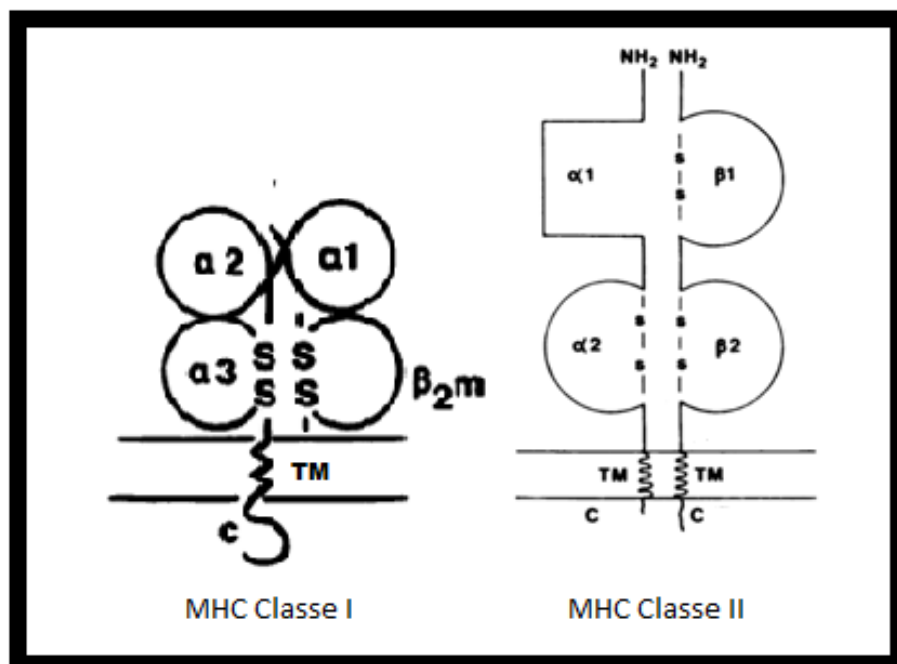


Figura 1. Estrutura das moléculas HLA de Classe I e II (MHC Classe I e MHC Classe II). A molécula HLA de Classe I possui três domínios extracelulares classificados em α_1 , α_2 e α_3 , um segmento transmembrana (TM) e uma pequena cauda citoplasmática (C). A molécula β_2 microglobulina (β_2m) está particularmente ligada ao domínio α_3 fora da célula. A molécula HLA de Classe II possui uma cadeia α e uma β , as quais possuem dois domínios extracelulares cada uma, α_1 e α_2 , e β_1 e β_2 , respectivamente, além de um segmento transmembrana e uma porção citoplasmática. Adaptado de BODMER (1987).

Entre os locos de Classe I e os locos de Classe II existe uma porção não relacionada, ocupada por genes que, desempenham outras funções do sistema imune, e por outros sem função definida. Esses locos são denominados como região MHC de Classe III. Nessa região, estão presentes os locos que codificam proteínas do complemento, genes de citocinas, o gene da enzima 21-hidroxilase (CYP 21B); gene do citocromo P-450, bem como alguns genes de proteínas de choque térmico (HSP) (JANEWAY et al., 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005;). As moléculas HLA de Classe I são expressas, na maioria das células humanas nucleadas, e são as principais responsáveis pela apresentação de antígenos endógenos. Quando há uma infecção viral ou alteração de proteínas da própria célula, as proteínas citosólicas são degradadas no proteossomo, formando peptídeos capazes de se ligar às moléculas HLA de Classe I, resultando em um complexo na superfície celular. Os linfócitos T CD8⁺ reconhecem esse complexo, e desencadeiam uma resposta que, resulta na eliminação da célula (DOHERTY; ZINKERNAGEL, 1975; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As moléculas HLA de Classe II são expressas principalmente nos macrófagos e células dendríticas. Essas moléculas estão envolvidas na apresentação dos antígenos às células T CD4⁺, ativando-as. As células apresentadoras de antígenos (APCs) interiorizam as proteínas extracelulares nos endossomas que, por ação de enzimas, são clivadas. Após o processamento, essas proteínas são ligadas ao MHC de Classe II, formando um complexo que migra até a superfície celular, para ser reconhecido pelos linfócitos T CD4⁺. A partir desse reconhecimento, serão secretadas citocinas que, desencadeiam as cascatas de reações imunológicas (MAGALHÃES; BOHLKE; NEUBARTH, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O sistema HLA tem como característica principal o seu alto grau de polimorfismo, sendo considerado o conjunto de genes mais polimórfico, entre todos os locos expressos no genoma humano. Atualmente, já foram identificados mais de 8000 alelos diferentes para o HLA de Classe I e II (DORAK et al., 2006; EBI, 2012).

Pelo fato do sistema HLA ser composto de moléculas, encontradas na superfície dos leucócitos, e em quase todas as células de tecidos, e seus genes serem extremamente polimórficos e co-dominantes (JANEWAY et al., 2002), a compatibilidade dos antígenos HLA do doador e do receptor torna-se essencial, pois os anticorpos anti-HLA, presentes no soro do receptor, representam um sério fator de risco para o transplante, podendo gerar um fenômeno chamado de Rejeição Mediada por Anticorpos (AMR) e, conseqüente perda do enxerto (TERASAKI; OZAWA, 2004; GLOOR, et al. 2008).

Além do complexo sistema HLA, outros sistemas, presentes no organismo humano, estão envolvidos no estudo da compatibilidade entre doador e receptor. Os sistemas eritrocitários são importantes parâmetros utilizados na transfusão e no transplante, sendo o ABO e Rh os mais conhecidos e relevantes, porém, muito se discute a respeito da participação do sistema Duffy.

1.3. SISTEMA ERITROCITÁRIO DUFFY

O sistema eritrocitário Duffy está relacionado com reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias, doença hemolítica do recém-nascido (DANIELS et al., 2002) e em processos de rejeição de órgãos (SEGERER et al., 2003; LERUT et al., 2007).

A descoberta do sistema eritrocitário Duffy ocorreu em 1950, quando Cutbush et al. (1950) identificaram um novo anticorpo, presente no soro de um paciente hemofílico politransfundido. Este novo anticorpo foi chamado de anti-Fy^a, e o novo sistema, batizado em homenagem ao paciente em questão, o Sr. Duffy (CUTBUSH; MOLLISON; PARKIN, 1950; CUTBUSH; MOLLISON, 1950). No ano seguinte, foi relatada a existência do anticorpo anti-Fy^b, par antitético do anti-Fy^a, encontrado no soro de uma mulher múltipara (IKIN et al., 1951).

Os antígenos Fy^a e Fy^b são os principais representantes do sistema Duffy, sendo produtos de seus respectivos alelos FY*A e FY*B. Estes antígenos estão presentes, nos eritrócitos, a partir da 6^a semana de gestação (TOIVANEN; HIRVONEN, 1973). Os soros anti-Fy^a e anti-Fy^b permitem a definição de três fenótipos maiores dentro da população caucasiana: Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+). A ausência dos antígenos Fy^a e Fy^b nos eritrócitos define um quarto fenótipo Fy(a-b-), comum em indivíduos afro-descendentes (CUTBUSH; MOLLISON, 1950; CHAUDHURI et al., 1995). Além dos eritrócitos, o antígeno Duffy é expresso em outros tecidos como: rim, baço, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide, e em células de Purkinje do cerebelo (CHAUDHURI et al., 1995; HADLEY; PEIPER, 1997; GIRARD et al., 1999).

O gene Duffy está localizado no braço longo do cromossomo 1, na região 1q22-23 (DONAHUE et al., 1968; MATHEW et al., 1994). Os antígenos Fy^a e Fy^b são codificados por duas formas alélicas, FY*A e FY*B, que diferem por uma substituição de base no nucleotídeo 125. No alelo FY*A, a base é a guanina (G) que, produz um códon para glicina, no aminoácido 42 (Gly⁴²) e, no alelo FY*B, a base é adenina (A), que produz um códon para ácido aspártico (Asp⁴²). Essa substituição de um aminoácido, no domínio amino-terminal da proteína, é suficiente para definir os dois antígenos antitéticos, levando à identificação dos

fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+) (CHAUDHURI et al., 1995; IWAMOTO et al., 1995; MALLINSON et al., 1995).

O fenótipo Fy(a-b-) apresenta bases moleculares diversas. Por este motivo, as frequências deste fenótipo são discrepantes em afro-descendentes e caucasianos (MENY, 2010). A mutação que possibilita o fenótipo Fy(a-b-) em indivíduos afro-descendentes está localizada na posição -33T>C da região promotora do alelo FY*B que interrompe o sítio de ligação do fator de transcrição GATA-1, resultando na ausência de expressão do antígeno Fy^b apenas nos eritrócitos, não alterando a expressão desta proteína em outros tecidos (TOURNAMILLE et al., 1995; IWAMOTO et al., 1996). O mesmo fenótipo Fy(a-b-) identificado em caucasianos é causado por mutações pontuais do tipo substituição e deleção, ocorrendo a não expressão da proteína Duffy tanto em eritrócitos quanto nos outros tecidos. No estudo de Rios et al. (2000) foram identificadas mutações pontuais codificando “*stop codons*” prematuros para ambos os alelos, FY*A e FY*B. Assim, as proteínas traduzidas apresentavam-se instáveis e de rápida degradação (MALLISON et al., 1995; RIOS et al., 2000).

A glicoproteína Duffy (GPD) (Figura 2) é uma molécula com um peso molecular de 35-43kDa, também considerada um receptor de quimiocinas, sendo chamada de DARC (*Duffy Antigen Receptor Chemokine*), além de exibir uma homologia com o receptor de Interleucina-8 (IL-8) de humanos e coelhos (HADLEY et al., 1984; NEOTE, et al., 1994; CHAUDHURI et al., 1994).

A GPD pode ser constituída dos epítomos Fy^a e Fy^b, além dos epítomos Fy3, Fy4, Fy5 e Fy6. Os epítomos Fy^a e Fy^b estão localizados no domínio extracelular, e o epítomo Fy3 está localizado na terceira alça extracelular. O epítomo Fy6 foi mapeado em um heptapeptídeo, englobando os resíduos 19-25. E, este epítomo está localizado entre dois sítios glicosilados (MOORE; WOODROW; MCCLELLAND, 1982; TANNER et al., 1988; MURPHY, 1994). Masouredis et al. (1980) estimaram que hemácias Fy(a+b-) e Fy(a-b+) carregam entre 13.000 e 14.000 sítios antigênicos Fy^a e Fy^b, respectivamente (MASOUREDIS et al., 1980).

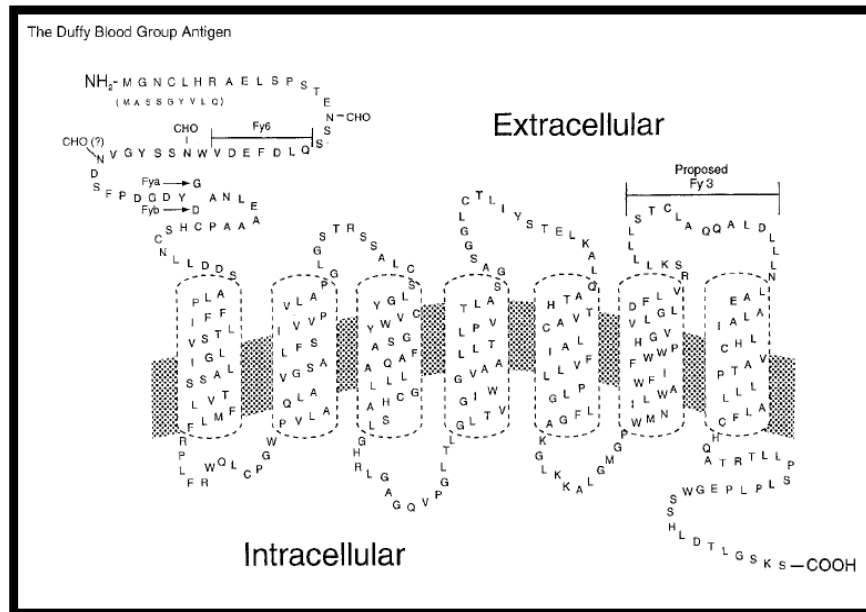


Figura 2. Estrutura da glicoproteína Duffy. A glicoproteína Duffy ou DARC possui em sua estrutura sete domínios transmembranas, três alças e um domínio amino-terminal extracelular, três alças e um domínio carboxi-terminal intracelular, podendo apresentar seus epítomos, representado na figura pelas regiões dos antígenos Fya, Fyb, Fy3 e Fy6. Adaptado de HADLEY; PEIPER (1997).

Uma das principais funções do sistema Duffy está relacionada com a entrada dos agentes maláricos *Plasmodium knowlensi* e *Plasmodium vivax* nos eritrócitos (MILLER et al., 1975; MILLER et al., 1976). Outro papel atribuído ao sistema Duffy está relacionado à função de receptor de citocinas. Foi estabelecido por Darbonne et al. (1991) que, os eritrócitos possuem receptores para quimiocinas, dentre estes, o DARC (DARBONNE et al., 1991). Em 1994 foi observado que a organização dos dois éxons do gene DUFFY é a mesma encontrada nos genes de outros receptores de quimiocinas (NEOTE et al., 1994; CHAUDHURI et al., 1994; MURPHY, 1994). Supõe-se que, essa característica do antígeno DARC também esteja relacionada ao mecanismo de regulação dos altos níveis de quimiocinas, produzidas em algumas situações patológicas. Desta forma, os eritrócitos desempenhariam a função de “escoadouro” de substâncias tóxicas, devido à interação DARC-quimiocinas (DARBONNE et al., 1991). Por outro lado, a glicoproteína Duffy também está presente nas células endoteliais das vênulas pós-capilares, a sua expressão pode favorecer o deslocamento dos granulócitos para os sítios de inflamação, resultado da sinalização das quimiocinas ligadas ao receptor (TOURNAMILLE, 2000).

Em estudos sobre a influência dos fenótipos Duffy, na evolução de pacientes transplantados renais, foi observada uma queda na função renal, associada ao fenótipo Fy(a-b-) (AKALIN; NEYLAN, 2003). Segerer et al. (2003) observaram o aumento da expressão de

DARC, em pacientes que apresentavam rejeição, celular e humoral, associada à maior deposição da fração C4d em capilares peritubulares (SEGERER et al., 2003). Além disso, Lerut et al. (2007), em estudo de investigação da participação do sistema Duffy no transplante renal, concluiu que, os enxertos doador/receptor incompatíveis para o sistema Duffy tinham, significativamente, mais lesões crônicas em comparação com os enxertos doador/receptor compatíveis, sugerindo o envolvimento dos antígenos Duffy, no processo de rejeição.

Outros estudos demonstram a interdependência dos sistemas HLA e Duffy. Picard et al., (2009) relataram a existência de uma relação positiva entre os grupos alélicos HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*15, na apresentação de peptídeos do antígeno Fy^a, em indivíduos com fenótipo Fy(a-b-).

1.4. JUSTIFICATIVA

A maior compatibilidade possível entre o doador e receptor é o primeiro quesito necessário para o sucesso do transplante. Por esse motivo, os exames laboratoriais utilizam os antígenos de histocompatibilidade mais relevantes, como parâmetro de comparação. Tendo em vista a participação dos sistemas HLA e Duffy como antígenos de histocompatibilidade principais e secundários, respectivamente e, considerando-se suas funções fisiológicas, relacionadas à resposta imune em diversas doenças e processos inflamatórios, torna-se importante a pesquisa da frequência de seus antígenos na população. No caso dos pacientes renais crônicos, esses dados favorecem um melhor entendimento da relação entre os antígenos leucocitário e eritrocitário ao desenvolvimento da doença renal, além de contribuir no planejamento de distribuição de órgãos, de acordo com o perfil imunológico de cada região.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Geral

Avaliar os polimorfismos das moléculas HLA (Classe I e II) e Duffy (Fy^a e Fy^b) em pacientes com doença renal crônica à espera de um transplante.

1.5.2. Específicos

Verificar a tipagem ABO e Rh dos pacientes.

Comparar as frequências ABO e Rh dos pacientes renais com outros estudos na população saudável.

Verificar os fenótipos Duffy da população estudada.

Verificar a tipificação molecular HLA dos pacientes.

Comparar o polimorfismo HLA e Duffy dos pacientes com estudos utilizando populações saudáveis.

1.6. REFERÊNCIAS

MURRAY, J.E. Ronald Lee Herrick Memorial: June 15, 1931-December 27, 2010. **American Journal of Transplantation**, v. 11(3), p. 419, 2011.

DAUSSET, J. Iso-leuko-antibodies. **Acta Haematology**, v. 20, p. 156-166, 1958.

PORTO, L.C.M.S.; PONTOS, L.F.S. **Estudos de associação HLA x doenças: extratos do I Simposio Brasileiro**. Rio de Janeiro: EdUERJ; 2007.

VAN ROOD, J.J.; VAN LEEUWEN, A. Leukocyte grouping. A method and its application. **Journal of Clinical Investigation**, v. 42, p. 1382-1390, 1963.

SOLHEIM, B.G.; BRATLIE, A.; SANDBERG, A.; STAUB-NIELSEN, L.; THORSBY E. Further evidence of a third HL-A locus. **Tissue Antigens**, v. 3, p. 439-453, 1973.

DUQUESNOY, R.J.; MARRARI, M.; ANNEN, K. Identification of an HLA-DR-associated system of B-cell alloantigens. **Transplantation Proceedings**, v. 11(4), p. 1757-1760, 1979.

STEINMETZ, M.; HOOD, L. Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. **Science**, v. 222(4625), p. 727-733, 1983.

BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, v. 329(6139), p. 506-512, 1987.

LAMM, L.U. Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome no. 6 in a family with a pericentric inversion. **Human Heredity**, v. 24, p. 273-284, 1974.

SENGER, G., RAGOISSIS, J., TROWSDALE, J. AND SHEER, D. Fine mapping of the MHC class II region within 6p21 and evaluation of probe ordering interphase fluorescence in situ hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 61, p. 49-53, 1993.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro; Elsevier; 2005.

BODMER, W.F. The HLA system: structure and function. *Journal of Clinical Pathology*, v. 40, p. 948-958, 1987.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. 5ª ed. Porto Alegre; Artmed, 2002.

DOHERTY, P.C.; ZINKERNAGEL, R.M. A biological role for the major histocompatibility antigens. **Lancet**, v. 305, p. 1406-1409, 1975.

MAGALHÃES, P.S.C.; BOHLKE, M.; NEUBARTH, F. Complexo principal de histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. **Revista de Medicina da UCPEL Pelotas**, v. 2, p. 54-59, 2004.

EBI. European Bioinformatics Institute. IMGT/HLA Database. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>. Acesso em 26 de agosto de 2012.

DORAK, M.T.; SHAO, W.; MACHULLA, H.K.; LOBASHEVSKY, E.S.; TANG, J.; PARK, M.H.; KASLOW, R.A. Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization. **Genes and Immunity**, v.7, p. 450-467, 2006.

TERASAKI, P.I.; OZAWA, M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *American Journal of Transplantation*, v. 4(3), p. 438-443, 2004.

GLOOR, J.; COSIO, F.; LAGER, D.J.; STEGALL, M.D. The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. **American Journal of Transplantation**, v. 8, p. 1367-73, 2008.

DANIELS, G.; POOLE, J.; DE SILVA, M.; CALLAGHAN, T.; MACLENNAN, S.; SMITH, N. The clinical significance of blood group antibodies. **Transfusion Medicine**, v. 12, p. 287-295, 2002.

SEGERER, S.; BÖHMIG, G.A.; EXNER, M.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P.; KERJASCHKI, D.; SCHLÖNDORFF, D.; REGELE, H. When renal allografts turn DARC. **Transplantation**, v. 75, p. 1030-1034, 2003.

LERUT, E.; VAN DAMME, B.; NOIZAT-PIRENNE, F.; EMONDS, M.P.; ROUGER, P.; VANRENTERGHEM, Y.; PIRENNE, J.; ANSART-PIRENNE, H. Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? **Transfusion**, v. 47(1), p. 28-40, 2007.

CUTBUSH, M.; MOLLISON, P.L.; PARKIN, D.M. A new human blood group. **Nature**, v. 165, p. 188-189, 1950.

CUTBUSH, M.; MOLLISON, P.L. The Duffy blood group system. **Heredity**, v. 4, p. 383-389, 1950.

IKIN, E.W.; MOURANT, A.E.; PETTENKOFFER, H.J.; BLUMENTHAL, G. Discovery of the excepted haemagglutinin anti-Fyb. **Nature**, v. 168, p. 1077-1078. 1951.

TOIVANEN, P.; HIRVONEN, T. Antigens Duffy, Kell, Kidd, Lutheran and Xg a on fetal red cells. **Vox Sanguinis**, v. 24(4), p. 372-376, 1973.

CHAUDHURI, A.; ZBRZEZNA, V.; POLYAKOVA, J.; POGO, A.O. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: Restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in non erythroid tissues in Duffy-negative individuals. **Blood**, v.85, p.615-621, 1995.

HADLEY, T.J.; PEIPER, S.C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v. 89, p. 3077-3091, 1997.

GIRARD, J.P.; BAEKKEVOLD, E.S.; YAMANAKA, T., HARALDSEN, G.; BRANDTZAEG, P.; AMALRIC, F. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. **American Journal of Pathology**, v.155, p.2043-2055, 1999.

DONAHUE, R. P.; BIAS, W. B.; RENWICK, J. H.; MCKUSICK, V. A. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 61, p. 949-955, 1968.

MATHEW, S.; CHAUDHURI, A.; MURTY, V.V.; POGO, A.O. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (Fy) at 1q22-23 by fluorescence in situ hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.67, p.68, 1994.

NEOTE, K.; MAK, J.Y.; KOLAKOWSKI, L.F. JR.; SCHALL, T.J. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. **Blood**, v. 84, p. 44-52, 1994.

IWAMOTO, S.; OMI, T.; KAJII, E.; IKEMOTO, S. Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. **Blood**, v. 85, p. 622-626, 1995.

MALLINSON, G.; SOO, K.S.; SCHALL, T.J.; PISACKA, M.; ANSTEE, D.J. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. **British Journal of Haematology**, v. 90, p. 823-839, 1995.

MENY, G. M. The Duffy blood group system: a review. **Immunohematology**, v. 26(2), p. 51-56, 2010.

TOURNAMILLE, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy negative individuals. **Nature Genetics**, v. 10, p. 224-228, 1995.

IWAMOTO, S.; LI, J.; SUGIMOTO, N.; OKUDA, H.; KAJII, E. Characterization of the Duffy gene promoter: evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 222, p. 852-859, 1996.

RIOS, M.; CHAUDHURI, A.; MALLINSON, G.; SAUSAIS, L.; GOMENSORO-GARCIA, A.E.; HANNON, J.; ROSENBERGER, S.; POOLE, J.; BURGESS, G.; POGO, O.; REID, M. New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. **British Journal of Haematology**, v. 108(2), p. 448-454, 2000.

CHAUDHURI, A.; ZBRZEZNA, V.; POLYAKOVA, J.; POGO, A.O.; HESSELGESSER, J.; HORUK, R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 7835-7838, 1994.

HADLEY, T.J.; DAVID, P.H.; MCGINNISS, M.H.; MILLER, L.H. Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fya antigen. **Science**, v. 223, p. 597–599, 1984.

MOORE, S.; WOODROW, C.F.; MCCLELLAND, D.B.L. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rho(D), (c), (E) and Fya. **Nature**, v. 295, p. 529-531, 1982.

TANNER, M.J.; ANSTEE, D.J.; MALLINSON, G.; RIDGWELL, K.; MARTIN, P.G.; AVENT, N.D.; PARSONS, S.F. Effect of endoglycosidase F-peptidyl N-glycosidase F preparations on the surface components of the human erythrocyte. **Carbohydrate Research**, v. 178, p. 203-212, 1988.

MURPHY, M.T. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 593-633, 1994.

MASOUREDIS, SP.; SUDORA, E.; MAHAN, L.; VICTORIA, E.J. Quantitative immunoferritin microscopy of Fya, Fyb, Jka, U, and Dib antigen site numbers on human red cells. **Blood**, v. 56, p. 969-977, 1980.

MILLER, L.H.; MASON, S.J.; DVORAK, J.A.; MCGINNISS, M.H.; ROTHMAN, I.K. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. **Science**, v. 189, p. 561-563, 1975.

MILLER, L.H.; MASON, S.J.; CLYDE, D.F.; MCGINNISS, M.H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype FyFy. **New England Journal of Medicine**, v. 295, p. 302-304, 1976.

DARBONNE, W.C.; RICE, G.C.; MOHLER, M.A.; APPLE, T.; HEBERT, C.A.; VALENTE, A.J.; BAKER, J.B. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88(4), p. 1362-1369, 1991.

TOURNAMILLE, C. Bases moléculaires et relations structure-fonction des antigènes de groupe sanguin Duffy: récepteur de chimiokines et de *Plasmodium vivax*. **Transfusion Clinique et Biologique**. v.7, p. 497-509, 2000.

HORUK, R.; CHITNIS, C.E.; DARBONNE, W.C.; COLBY, T.J.; RYBICKI, A.; HADLEY, T.J.; MILLER, L.H. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. **Science**, v. 261, p. 1182-1184, 1993.

AKALIN, E.; NEYLAN, J.F. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. **Transplantation**, v. 75, p. 1496-1500, 2003.

SEGERER, S.; BOHMIG, G.A.; EXNER, M.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P.; KERJASCHKI, D.; SCHLONDORFF, D.; REGELE, H. When renal allografts turn DARC. **Transplantation**, v. 75, p. 1030-1034, 2003.

PICARD, C.; FRASSATI, C.; BASIRE, A.; BUHLER, S.; GALICHE, V.; FERRERA, V.; REVIRON, D.; ZAPPITELLI, J.P.; BAILLY, P.; CHIARONI, J. Positive association of

DRB1 04 and DRB1 15 alleles with Fya immunization in a Southern European population. **Transfusion**, v. 49(11), p. 2412-2417, 2009.

2. CAPÍTULO II

- 2.1. ARTIGO 1: “Duffy histology and blood system: association of Fy^a antigen with chronic kidney disease (CKD)”

**DUFFY HISTOLOGY AND BLOOD SYSTEM: ASSOCIATION OF FY^A
ANTIGEN WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE (CKD)**

Authors: Roger Haruki Yamakawa¹; Patrícia Keiko Saito¹; Cinara de Cássia Brandão de Mattos²; Fabiana Nakashima; Ana Iara da Costa Ferreira; Luiz Carlos Mattos²; Sueli Donizete Borelli¹

Affiliation

¹Department of Basic Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá – Maringá, PR, Brazil.

²Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Short Title

Duffy Blood System and Chronic Kidney Disease

Correspondence and offprint requests to:

Corresponding author:

Sueli Donizete Borelli

Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Avenida Colombo 5790,

87020-900, Maringá, PR, Brazil.

Telephone: +55 44 3011 5388

E-mail: sdborelli@uem.br

Summary

Frequency of erythrocyte phenotypes ABO, Rh, Duffy and their association with CKD patients in the Southern region of Brazil was evaluated. It was used direct hemagglutination method in tubes to define ABO and Rh erythrocyte phenotypes and agglutination in gel columns method defined Duffy erythrocyte phenotype. Pearson's χ^2 test was used to detect differences among phenotype frequencies with regard to studies undertaken with voluntary blood (VBD) and voluntary bone marrow (VBMD) donors. No statistically significant differences in general frequencies of ABO erythrocyte phenotypes were reported when compared to VBDs or among all four phenotypes. There were not reported statistically significant differences between Rh erythrocyte phenotypes compared to VBMD. Rates were statistically significant with phenotype Fy(a+b+), OR=0.691 (IC 0.4975-0.9612) and p=0.0343 and with phenotype Fy(a+b-), OR=2.347 (IC 1.543-3.571) and p=0.0001, when compared to VBMD. Phenotype Fy(a+b-) is associated to great risk for chronic kidney disease.

Keywords: blood group antigens; immunohematology; transplantation; chronic disease; renal dialysis.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) comprises a kidney lesion with progressive and irreversible loss of kidney functions [1].

Several studies have been undertaken worldwide to detect genetic markers involving CKD susceptibility and the rejection of kidney allografts [2,3,4,5]. However, lack of data exists that would underpin the association between antigens of blood groups and CKD in Brazilian population.

According to a review by Lögdberg et al. [6], 30 blood group systems are extant in humans. Current analysis evaluates the frequency of erythrocyte phenotypes ABO, Rh, Duffy and their association with CKD patients in Southern Brazil.

Subjects and Methods

Ethical aspects of the study

Current investigation was approved by the Ethics Committee in Research of the State University of Maringá (Process 18592).

Selection of patients

A total of 231CKD patients under treatment in Maringá (the Northwestern region of Paraná state, southern Brazil) were selected between January and March 2011. Inclusion criteria were CKD patient, undergoing hemodialysis, over 18 years old, signing of free consent term.

Data collection

Data were collected from medical clinical records in the hemodialysis clinics. Ethnicity was determined by self-definition.

Blood collecting

It was collected 5 mL of blood were collected from each patient by venous puncture in vacuum tubes (Vacutainer; Becton and Dickson, Oxford UK) with anti-coagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Identification of erythrocyte phenotypes ABO, Rh and Duffy

Erythrocyte phenotypes ABO and Rh were defined by the hemagglutination method standardized in tubes (Fresenius Kabi, São Paulo, Brazil). Gel column agglutination method was employed to define Duffy erythrocyte phenotypes. (Diamed Latinoamerica, Lagoa Santa MG Brazil).

Statistical analysis

GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, Inc. La Jolla CA USA) was used for statistical calculations and Pearson's χ^2 test detected differences between the frequencies of phenotypes Rh and Duffy analyzed with regard to a study undertaken with voluntary bone marrow donors (VBMD) in the same region [7]. The same Pearson's χ^2 test detected differences between the frequencies of the phenotypes ABO with regard to a study with voluntary blood donors (VBD) in São Paulo [8]. Odds Ratio and Confidence Interval at 95% were calculated and error α was equal to 5%.

Results

Table 1 shows the general characteristics of 231 CKD patients under analysis. Patients' mean age was 54.42 (\pm 15.47 years) (\pm Mean Standard Deviation), ranging between 18 and 90 years. Further, 129 patients (55.84%) had undergone between 1 and 5 years of hemodialysis. Table 2 shows that representatives of all erythrocyte phenotypes ABO could be found among the patients analyzed. When compared to healthy population of VBD [8], no statistically significant differences were reported in general frequencies ($\chi^2 = 3,504$; $p = 0.320$) and in comparisons among the four phenotypes (Table 2).

Further, 89.2% of patients were positive to Rh phenotype. No statistically significant differences in the frequency of Rh erythrocyte phenotypes ($\chi^2 = 0.884$; $p = 0.347$) were reported in CKD patients and in VBMD [7] (Table 3).

Phenotypes Fy(a+b+) and Fy(a-b+) were more predominant among kidney patients under analysis and among VBMD [7] (Table 4). Phenotypes Fy(a+b+) and Fy(a+b-) were found respectively in 39.0% and 25.1% of patients studied.

The general comparison among current results and those by Guelsin et al. [7] is shown in Table 4. Statistically significant differences of Duffy phenotype frequency were observed ($\chi^2 = 19.857$; $GL = 3$; $p = 0.0002$).

Comparative analysis of the phenotypes Fy(a+b+) + Fy(a-b+) and Fy(a+b-) + Fy(a-b-) suggests that the antigen Fy^b functions as a protective factor for CKD (OR: 0.4143 (IC 95%: 0.2796 – 0.6140), χ^2 : 19.005; $p < 0.0001$).

Table 5 shows the distribution of Duffy phenotypes according to patients' ethnicity.

Discussion

Since antigen Duffy is related to inflammation response mechanisms [9] and occurs on the surface of endothelial cells [10,11], it may be asked whether it may be related to kidney lesion in CKD.

A comparative analysis among CKD patients and VBMD showed that the frequency of antigen Fy^a was higher in CKD patients. When Duffy erythrocyte phenotypes of kidney patients were compared to those of VBMD of the same region [7], rates become statistically significant, with phenotype Fy(a+b+) having OR=0.691 (IC 95% 0.4975-0.9612) and $p=0.0343$ and phenotype Fy(a+b-) having OR=2.347 (IC 95% 1.543-3.571) and $p=0.0001$. The other phenotypes, or rather, approximately 36% of the sample, failed to show any statistically significant rates (Table 4). This fact suggested an association between the chronic

kidney condition and Fy^a and the same antigen might be a risk factor for the illness. Phenotypes Fy(a+b+) and Fy(a-b+) were more predominant among kidney patients under analysis and among VBMD, but the phenotype Fy(a+b-) showed higher frequency in patients than in the group of volunteers. It was possible through statistical tests was possible to observe this difference, and the frequency of the phenotype Fy (a+b-) was two times higher in patients. The general comparison among current results and those by Guelsin et al. [7] had statistically significant differences of Duffy phenotypes ($\chi^2= 19.857$; GL = 3; p = 0.0002). When frequencies of phenotypes Fy(a+b-) and Fy(a-b+) were compared, they also showed statistically significant differences (OR= 2.384 (IC 95% 1.488 – 3.822); $\chi^2= 12.460$ and p= 0.004).

Studies by Luo et al. [12] and Zarbock et al. [13] with knock-out mice for Duffy molecules showed that knock-out mice in a neutrophil-dependent kidney failure model have lower neutrophil infiltrates and better kidney function than wild type in the local damage model. Faults in neutrophil movement are associated with kidney protection. These same authors also reported that wild mice had higher bond chemokines levels in the blood.

Caucasian ethnicity among CKD patients under analysis was predominant in the highly ethnical miscigenation country population as Brazil (Table 1). The high prevalence of the phenotype Fy(a+b+) in 39% of the population of patients studied was also registered, with 43.7% of patients featuring phenotype Fy(a+b+) were Caucasians (Table 5). Such phenotype characteristic occurs in European populations which provide approximately 43% of individuals with phenotype Fy(a+b+) [14]. On the other hand, Brazil has one of the most heterogeneous populations in the world, featuring the miscegenation of European, African, Asian and Amerindian populations [15]. The current study should also represent an interracial mixture that makes skin color or ethic self-determination a rather imprecise datum and a difficult categorization factor of individuals with regard to their ethnicity and their correct

association with blood groups. Therefore, results on ethnicity in current study should not be defining factors for the southern region of Brazil.

Studies for the most predominant Duffy phenotype in a population are useful for a region's epidemiological profile [7,14]. In the case of CKD patients, the survey is relevant due to the Duffy phenotype association with renal transplantation [3,16] since these patients may be potential receptors too.

In their study on the association of Duffy blood systems and kidney transplants in Afro-American peoples, Akalin et al. [3] reported that patients with Duffy(a-b-) have a shorter graft survival with regard to delayed graft function (DGF). They also emphasize that Duffy mitigates the inflammation effects of DGF since it functions as a chemokine outlet. Besides, negative Duffy patients should be more vulnerable to DGF. Moreover, in a similar study on the participation of Duffy and Kidd blood groups in kidney transplant, Lerut et al. [16] concluded that mismatching kidney grafts Duffy donor/receptor had significantly more chronic lesions when compared to matching grafts donor/receptor. The above suggested the role of Duffy antigens and, in a lesser mode, of Kidd as lower histological matching antigens and their potential role in transplants. They could even be involved in kidney graft rejection.

Current investigation showed limitations in evaluating a small number of patients. In fact, not all patients undertaking dialysis in the region were studied, owing to the inclusion of few clinics. The influence of the phenotype Duffy in post-transplant interval was not investigated.

It may be concluded that the phenotype Fy(a+b-) is associated with higher risks in chronic kidney diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank Fundação Araucária, CAPES and CNPq for funding support. We also wish to thank the hemodialysis clinics for the data and technical support. We are very grateful for all patients who participated in this study.

Disclosure

All authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- 1- Junior JER. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *J Bras Nefrol* 2004; 26:1-3.
- 2- Chin GK, Adams CL, Carey BS, Shaw S, Tse WY, Kaminski ER. The value of serum neopterin, interferon-gamma levels and interleukin-12B polymorphisms in predicting acute renal allograft rejection. *Clin Exp Immunol* 2008; 152(2): 239-44.
- 3- Akalin E, Neylan JF. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. *Transplantation* 2003; 75:1496–1500.
- 4- Mange KC, Prak EL, Kamoun M et al. Duffy antigen receptor and genetic susceptibility of African Americans to acute rejection and delayed function. *Kidney Int* 2004; 66:1187-1192.
- 5- Karahan GE, Kekik C, Oguz FS et al. Association of HLA phenotypes of end-stage renal disease patients preparing for first transplantation with anti-HLA antibody status. *Ren Fail* 2010; 32:380-383.

- 6- Lögberg I, Reid ME, Zelinski T. Human blood group genes 2010: Chromosomal locations and cloning strategies revisited. *Transfus Med Rev* 2011;25:36-46.
- 7- Guelsin GA, Sell AM, Castilho L et al. Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Paraná, southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011; 33:21-25.
- 8- Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PD, Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22:23-32.
- 9- Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:687-694.
- 10-Peiper SC, Wang ZX, Neote K et al. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med* 1995; 181:1311-1317.
- 11-Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, et al. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in non-erythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood* 1995;85:615-621.

- 12-Luo H, Chaudhuri A, Zbrzezna V, et al. Deletion of the murine Duffy gene (Dfy) reveals that the Duffy receptor is functionally redundant. *Mol Cell Biol* 2000; 20:3097–3101.
- 13-Zarbock A, Schmolke M, Bockhorn SG et al. The Duffy antigen receptor for chemokines in acute renal failure: a facilitator of renal chemokine presentation. *Crit Care Med* 2007; 35:2156–2163.
- 14-Howes RE, Patil AP, Piel FB et al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun* 2011; 2:266.
- 15-Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:177-182.
- 16-Lerut E, Van Damme B, Noizat-Pirenne F et al. Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? *Transfusion* 2007; 47:28-40.

Tables

Table 1. General characteristics of chronic kidney disease patients in the Northwestern region of Parana state, Brazil.

Variable	n	%
Gender		
Male	140	60.6
Female	91	39.4
Age (years)		
18-30	18	7.8
31-40	25	10.8
41-50	47	20.3
51-60	62	26.8
61-70	40	17.3
71-80	32	13.8
Above 80	7	3.0
Ethnicity		
Caucasians	151	65.4
Mestizos	48	20.8
Blacks	24	10.4
Oriental	8	3.5
Time of dialysis (years)		
Less than 1	64	27.7
1 to 5	129	55.8
6 to 10	26	11.2
Over 10	12	5.2

Table 2. Frequency of ABO erythrocyte phenotypes of chronic kidney disease patients (CKDP) and voluntary blood donors (VBD).

Phenotype	CKDP		VBD		OR	IC 95%	χ^2	p
	N	%	N	%				
A	91	39.4	830	33,7	1.278	0.968 – 1.686	2.782	0.095
B	28	12.1	343	13,9	0.852	0.564 – 1.286	0.440	0.507
AB	5	2.2	77	3,1	0.658	0.274 – 1.711	0.377	0.539
O	107	46.3	1212	49,2	0.890	0.679 – 1.166	0.603	0.437
Total	231	100.0	2462	100.0				

CKDP: current study; VBD: NOVARETTI et al., 2000.

Table 3. Frequencies of erythrocyte phenotypes Rh in chronic kidney disease patients (CKDP) and voluntary bone marrow donors (VBMD) from northwestern region of the Parana state, Brazil.

Phenotype	CKDP		VBMD		OR	IC 95%	χ^2	p
	N	%	N	%				
Rh pos	206	89.2	345	86.2	1.314	0.794 - 2.173	0.884	0.347
Rh neg	25	10.8	55	13.8				
Total	231	100.0	400	100.0				

CKDP: current study; VBMD: GUELSIN et al., 2011.

Table 4. Frequency of erythrocyte phenotypes Duffy in chronic kidney disease patients (CKDP) and voluntary bone marrow donors (VBMD) from the northwestern region of the Parana state, Brazil.

Phenotypes	CKDP		VBMD		OR	IC 95%	χ^2	p
	N	%	N	%				
Fy(a+b+)	90	39.0	192	48.0	0.691	0.497 - 0.961	4.481	0.034
Fy(a+b-)	58	25.1	50	12.5	2.347	1.543 - 3.571	15.532	0.0001
Fy(a-b+)	72	31.2	148	37.0	0.771	0.546 - 1.088	1.943	0.163
Fy(a-b-)	11	4.7	10	2.5	1.950	0.815 - 4.666	1.679	0.195
Total	231	100.0	400	100.0				

CKDP: current study; VBMD: GUELSIN et al., 2011.

Table 5. Distribution of phenotypes Duffy according to ethnicity of chronic kidney disease patients from northwestern region of the Parana state, Brazil.

Ethnicity	Phenotype								Total
	Fy(a-b-)		Fy(a+b-)		Fy(a+b+)		Fy(a-b+)		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Caucasians	4	2.6	31	20.5	66	43.7	50	33.1	151
Mestizos	3	6.2	15	31.2	14	29.2	16	10.6	48
Blacks	4	16.7	8	33.3	6	25.0	6	25.0	24
Oriental	0	0	4	50.0	4	50.0	0	0	8

2.2. ARTIGO 2: “Polimorfismo de antígenos leucocitário e eritrocitário em pacientes nefropatas da região Sul do Brasil”

POLIMORFISMO DE ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIO E ERITROCITÁRIO EM PACIENTES NEFROPATAS DA REGIÃO SUL DO BRASIL

AUTORES

Roger Haruki Yamakawa¹, Patricia Keiko Saito¹, Waldir Veríssimo da Silva Junior², Luiz Carlos de Mattos³, Sueli Donizete Borelli^{1*}.

INSTITUIÇÕES

1-Department of Basic Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá – Maringá, PR, Brazil.

2-Departament of de Statistics, Universidade estadual e Maringá, Maringá, PR, Brasil

3-Departament of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

***Autor para correspondência:**

Sueli Donizete Borelli

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Avenida Colombo 5790,

87020-900, Maringá, PR, Brazil.

Telephone: +55 44 3011 5388

E-mail: sdborelli@uem.br

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo dos antígenos leucocitários humanos (HLA) e eritrocitários Duffy, em pacientes nefropatas da região Sul do Brasil.

Materiais e métodos: Participaram desse estudo 183 pacientes, portadores de doença renal crônica (DRC), acima de 18 anos de idade, em regime de hemodiálise, atendidos na região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Para a definição HLA dos pacientes, utilizou-se o kit comercial “LABType®SSO” locos -A,-B e -DRB1. Os fenótipos Duffy foram obtidos através da metodologia de aglutinação em colunas de gel, utilizando os anti-soros monoclonais anti-Fy^a e anti-Fy^b.

Resultados: Do total de pacientes estudados, a faixa etária mais prevalente foi de 51 a 70 anos (43%). Quanto ao gênero, a etnia, e o tempo de diálise, a maior prevalência incidiu nos homens (62%), brancos (62%) e 1 a 3 anos (40%), respectivamente. O fenótipo Fy(a+b+) foi o mais frequente, representado por aproximadamente 35% da população. O fenótipo Fy(a-b-) foi o mais raro, observado em 5% da população estudada. Na análise do total de amostras, foram identificados 19 grupos alélicos HLA-A, 30 grupos para o HLA-B e 13 para o HLA-DRB1. Os 15 alelos HLA mais frequentes, na população do presente estudo, foram: HLA-A*01, -A*02, -A*03, -A*11, -A*24; HLA-B*07, -B*15, -B*35, -B*44, -B*51; HLA-DRB1*03, -DRB1*04, -DRB1*07, -DRB1*11 e -DRB1*13. A frequência dos fenótipos Fy(a+b-) e Fy(a+b+) da população estudada, quando comparada com indivíduos saudáveis da mesma região, apresenta diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,0001$, $OR = 2,56$ ($IC_{95\%} = 1,60-4,07$) e $p = 0,0039$, $OR = 1,71$ ($IC_{95\%} = 1,18-2,51$), respectivamente. Quando comparadas as frequências dos grupos alélicos HLA dos pacientes com indivíduos saudáveis, observou-se que, o HLA-B*42, -B *45, -B*51 e DRB1*03 foram mais frequentes em pacientes ($p < 0,05$), e o HLA-B*44 em indivíduos saudáveis ($p < 0,05$).

Conclusão: As frequências dos antígenos Duffy e HLA variam entre as diferentes populações. O polimorfismo destes dois marcadores, quando comparado entre os pacientes nefropatas sul brasileiros e outros estudos sugerem que, os antígenos Duffy e os grupos alélicos HLA podem estar envolvidos com a DRC. Novos estudos serão necessários para analisar a influência destes marcadores, na evolução da DRC, bem como na evolução do transplante.

Palavras-chave: Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy, Antígenos HLA, Genética Populacional, Insuficiência Renal, Antígenos de Histocompatibilidade, Transplante.

INTRODUÇÃO

O sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) é composto de moléculas encontradas na superfície dos leucócitos, bem como em quase todas as células de tecidos. Seus genes são extremamente polimórficos e co-dominantes [1]. Diversos estudos relataram a participação dos alelos HLA associados a diversas doenças [2,3]. Além disso, o sistema HLA desempenha importante papel no transplante, uma vez que, a compatibilidade dos antígenos HLA do doador e do receptor é essencial na prevenção da rejeição [4].

Além do complexo sistema HLA, outros sistemas presentes no organismo humano estão envolvidos no estudo da compatibilidade, entre doador e receptor. Os sistemas eritrocitários são importantes parâmetros utilizados na transfusão e no transplante, sendo o ABO e Rh os mais conhecidos e relevantes, porém, muito se discute a respeito da participação do sistema eritrocitário Duffy, uma vez que, esse sistema está relacionado com reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias, doença hemolítica do recém-nascido [5] e em processos de rejeição de órgãos [6,7].

Sabendo da importância do sistema Duffy e do sistema HLA, muitos estudos conseguiram traçar o perfil eritrocitário e leucocitário, em populações saudáveis de várias regiões do mundo [8,9,10,11,12], porém, poucos estudos definiram o perfil deste sistema em pacientes com Doença Renal Crônica (DRC). Considerando que, a DRC é uma doença crônica e os pacientes acometidos por ela são potenciais candidatos a um transplante, o objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo dos antígenos leucocitários humanos (HLA) e eritrocitários Duffy em pacientes nefropatas da região Sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos pacientes

Foram selecionados pacientes de ambos os gêneros, portadores de DRC, acima de 18 anos, em regime de hemodiálise, atendidos na cidade de Maringá, região Noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil, no período de janeiro a março 2011.

Coleta de dados

Dados referentes à faixa etária, gênero, etnia e tempo de diálise dos pacientes foram obtidos de prontuários médicos existentes nas clínicas de hemodíalises. O critério de determinação étnica foi realizado por meio da autodefinição.

Tipificação HLA

Foram coletados 5mL de sangue de cada paciente em tubos “Vacutainer” (*Becton and Dickson*, Oxford, Inglaterra), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como

anticoagulante. Foi retirada a camada leucocitária e realizada a extração do DNA genômico pelo método “PureLink™” (*Invitrogen Life Technologies*). A partir do DNA extraído, utilizou-se o kit comercial “LABType®SSO” locos -A,-B e -DRB1 (*One Lambda, INC, Canoga Park, CA, USA*) para a tipificação HLA dos pacientes. Esta técnica é constituída de um processo de amplificação do DNA, hibridização, leitura em aparelho específico (LABScan™ 100) e interpretação em software (HLA Fusion™). Todo o procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

Tipificação Duffy

Para a definição dos fenótipos eritrocitários Duffy foi utilizado o método de aglutinação, em colunas de gel, segundo as instruções do fabricante. Um volume igual a 10µL da suspensão de hemácias a 3% de cada amostra, preparada em diluente isotônico, fornecido pelo fabricante, foi adicionado a microtubos do cartão de tipagem contendo 30µL dos anti-soros monoclonais anti-Fy^a e anti-Fy^b (Diamed Latinoamerica, Lagoa Santa, MG, Brasil), respectivamente. Cada cartão foi centrifugado a 1.000 rpm durante 15 minutos, e os resultados foram determinados com base na presença ou ausência de aglutinação.

Análise Estatística

A análise estatística foi feita através dos programas “Microsoft Excel 2007” e “Statistica - versão 7”. Como parâmetro de comparação, foi utilizado o teste exato de Fisher e a estimativa do risco relativo, avaliado por meio de OR (*odds ratio*) com intervalo de confiança de 95%.

Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (Processo UEM 18592). Todos os procedimentos seguidos estiveram de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta a realização de pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil e com a Declaração de Helsinki de 1975, revisado em 2000.

RESULTADOS

As características gerais (faixa etária, gênero, etnia e tempo de diálise) dos pacientes estudados estão representados na Tabela 1. Do total de 183 pacientes estudados, o gênero masculino foi o mais observado, representando 62% da população. A etnia branca foi predominante, com 62% da população e, 40% dos pacientes estavam em tratamento entre 1 e 3 anos.

Podemos observar, na Tabela 2, a frequência dos fenótipos Duffy dos pacientes nefropatas estudados. O fenótipo Fy(a+b+) foi o mais frequente, representado por, aproximadamente, 35% da população. O fenótipo Fy(a-b-) foi o mais raro, observado em 5% da população estudada.

Na análise do total de amostras, foram identificados 19 grupos alélicos HLA-A, 30 grupos para o HLA-B e 13 para o HLA-DRB1. Os grupos alélicos HLA-A*02, -A*03 e -A*24 foram os mais frequentes para o locus A. No locus B os grupos alélicos mais frequentes foram HLA-B*35 -B*44, e -B*51 e, no locus DRB1 os grupos alélicos HLA-DRB1*04, -DRB1*11 e HLA-DRB1*13 foram os mais comuns. A frequência dos alelos HLA observados está demonstrada na Tabela 3.

Na Tabela 4, está representada a comparação feita entre a frequência dos fenótipos Duffy dos pacientes nefropatas e outros estudos com indivíduos saudáveis do Estado do Paraná (mesma região do presente estudo) [10], São Paulo [8] e do mundo [11]. A frequência dos 15 alelos HLA mais encontrados nos pacientes nefropatas foi comparada com a frequência de outros estudos em indivíduos saudáveis do Estado do Paraná [9] e do Rio Grande do Sul [12]. Esta comparação pode ser observada na Tabela 5.

DISCUSSÃO

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, sendo composta por uma enorme mistura de grupos étnicos [13]. No contexto dos transplantes, toda essa miscigenação étnica pode dificultar a busca por um doador que apresente melhor compatibilidade imunológica, sendo necessária a investigação dos antígenos de histocompatibilidade predominantes em uma população.

Na população de pacientes nefropatas estudada, o fenótipo Duffy Fy(a+b+) foi o mais observado, representando quase 35% da população. Este valor ficou muito próximo ao encontrado por outros autores [10]. Guelsin et al. [10], no estudo do polimorfismo dos sistemas eritrocitários em indivíduos saudáveis da população do Estado do Paraná, encontraram uma frequência de 48% para o fenótipo Fy(a+b+). Quando comparados os resultados dos dois estudos, observa-se uma diferença estatisticamente significativa, indicando uma maior predominância desse fenótipo na população de indivíduos saudáveis ($p=0,0039$, $OR= 1,71$ ($IC95\%=1,18-2,51$)). Outra frequência que apresentou uma diferença significativa, na comparação desses estudos, foi a do fenótipo Fy(a+b-), sendo duas vezes mais predominante nos pacientes nefropatas ($p<0,0001$, $OR=2,56$ ($IC95\%=1,60-4,07$)) (Tabela4). Por se tratar de dois estudos realizados com indivíduos da mesma região do Estado, estes

dados comparativos sugerem alguma relação do fenótipo Duffy com a DRC. Desta forma, novos estudos são necessários para esclarecer esta relação.

Na comparação com o estudo de Novaretti et al. [8] foram observadas diferenças estatisticamente significantes em quase todos os fenótipos Duffy, sendo a diferença mais marcante observada na comparação das frequências do fenótipo Fy(a-b-) ($p < 0,0001$, OR=8,53 (IC95%=4,49;18,20) (Tabela 4). Essas diferenças, possivelmente, estão relacionadas à etnia predominante das populações, uma vez que, no estudo de Novaretti et al. [8] cerca de 66% dos indivíduos era composta por negros e mulatos, e a população do presente estudo foi composta, na grande maioria, por indivíduos que se declararam caucasianos ou brancos (62%), sendo apenas 35% negros e mulatos. Estudos demonstram que o fenótipo Fy(a-b-) é característico de indivíduos afro-descendentes, isto acontece devido à mutação que ocorre na posição -33T>C da região promotora do alelo FY*B, resultando na ausência de expressão do antígeno Fy^b, apenas nos eritrócitos, não alterando a expressão desta proteína em outros tecidos [11,14,15]. O mesmo fenótipo Fy(a-b-) é identificado raramente em caucasianos, sendo causado por mutações pontuais do tipo substituição e deleção, ocorrendo a não expressão da proteína Duffy, tanto em eritrócitos, quanto nos outros tecidos [16,17,18].

Quando comparamos os fenótipos Duffy dos pacientes nefropatas, com o levantamento mundial feito por Howes et al. [11], podemos verificar diferenças significativas nos fenótipos Fy(a-b+) e Fy(a-b-), indicando maior frequência do fenótipo Fy(a-b+) na população de pacientes do que na população mundial ($p=0,0019$, OR=1,67 (IC95%=1,20;2,29). A falta de expressão dos antígenos Duffy é, proporcionalmente, maior na população mundial do que nos pacientes nefropatas. Esta relação foi observada pela existência de uma maior frequência do fenótipo Fy(a-b-) na população mundial ($p=0,0004$, OR=2,81 (IC95%=1,49;5,97) (Tabela 4). Estudos de Luo et al. [19] e Zarbock et al. [20] demonstraram que, ratos *knock-out* para o antígeno Duffy possuíam menor infiltrado de células, e melhor função renal do que os selvagens em modelo de injúria local. Essa falha no movimento de neutrófilos está associada com a proteção renal.

O antígeno Duffy pode ser encontrado em células não eritróides [21,22,23]e, por este motivo, sua expressão na superfície dessas células pode funcionar como um fator de histocompatibilidade, influenciando na sobrevivência de um enxerto. Lerut et al. [7], em estudo de investigação da participação do sistema Duffy no transplante renal, concluíram que, os enxertos renais doador/receptor incompatíveis (*mismatching*) para o sistema Duffy apresentavam, significativamente, mais lesões crônicas em comparação com os enxertos doador/receptor compatíveis (*matching*). Isto sugere que, os antígenos Duffy poderiam atuar

como antígenos de histocompatibilidade secundários. Além disso, Segerer et al. [6] observaram o aumento da expressão de moléculas Duffy, em pacientes que apresentavam rejeição, celular e humoral, associada à maior deposição da fração C4d em capilares peritubulares.

A investigação do polimorfismo HLA fornece dados importantes para estudos de genética e populações de um determinado país [24]. O Brasil possui uma população com grande miscigenação étnica, e por isso as frequências dos alelos HLA podem variar, de acordo com o grupo étnico predominante, na região estudada [12,24,25]. Estudos realizados, com amostras de populações dos cinco continentes, revelaram diferenças entre as frequências dos alelos HLA encontrados, e aumento dessas diferenças em populações com misturas de raças [26,27]. No entanto, um estudo composto de diferentes amostras de populações brasileiras, composta por caucasianos e negros, demonstrou que, as semelhanças entre as frequências dos alelos HLA dessas populações são maiores do que as diferenças encontradas [28], o que corrobora com o que foi observado neste estudo.

Os 15 alelos HLA mais frequentes, na população do presente estudo, foram: HLA-A*01, -A*02, -A*03, -A*11, -A*24; HLA-B*07, -B*15, -B*35, -B*44, -B*51; HLA-DRB1*03, -DRB1*04, -DRB1*07, -DRB1*11 e -DRB1*13. Comparando os resultados das frequências HLA dos pacientes nefropatas desse estudo, com os indivíduos saudáveis de Ruiz et al. [9] e Bortoloto et al. [12], ambos estudos com amostras também da região Sul do Brasil, podemos observar uma grande semelhança entre as populações (Tabela 5). Porém, houve diferença estatística entre os grupos alélicos HLA-B*42, B*44, B*45, B*51 deste estudo, e o de Bortolotto et al. [12], e entre grupos alélicos HLA-B*44, B*51, DRB1*03 deste estudo e o estudo de Ruiz et al. [9]. Os grupos alélicos HLA-B*42, HLA-B *45, -B*51 e DRB1*03 foram mais frequentes em pacientes ($p < 0,05$), e o HLA-B*44 em indivíduos saudáveis ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Devido ao elevado grau de polimorfismo de seus genes, o sistema HLA tem sido estudado como marcador genético envolvido na suscetibilidade de diversas doenças [2,3]. Em um estudo de caso-controle com pequeno número de pacientes nefropatas brasileiros, da região Sudeste aguardando o transplante renal, os grupos alélicos HLA-A*74 e HLA-DRB1*11 apresentaram associação positiva com DRC terminal, [29].

De fato, as frequências dos antígenos Duffy e HLA variam entre as diferentes populações. O polimorfismo destes dois marcadores, quando comparados entre os pacientes nefropatas sul brasileiros, e indivíduos saudáveis de diferentes regiões do Brasil e do mundo sugerem que, os antígenos Duffy e os grupos alélicos HLA podem estar envolvidos com a DRC. Novos

estudos serão necessários para analisar a influência destes marcadores, na evolução da DRC, bem como na evolução do transplante.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos aos pacientes que fizeram parte desse estudo e à Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos pelas sugestões e críticas na leitura do manuscrito.

CONFLITOS DE INTERESSE

Nenhum

REFERÊNCIAS

1. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002) *Imunobiologia*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed.
2. Kaimen-Maciel DR, Reiche EM, Borelli SD, Morimoto HK, Melo FC, et al. (2009) HLA-DRB1* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. *Mol Med Report* 2: 993-998.
3. Giarola LB, Santos RR, Bedendo J, Silva Júnior WV, Borelli SD (2012) HLA molecules and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in Southern Brazil. *BMC Res Notes* 5: 90.
4. Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD (2008) The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *American Journal of Transplantation* 8: 1367-1373.
5. Daniels G, Poole J, de Silva M, Callaghan T, MacLennan S, et al. (2002) The clinical significance of blood group antibodies. *Transfus Med* 12: 287-295.
6. Segerer S, Böhmig GA, Exner M, Colin Y, Cartron JP, et al. (2003) When renal allografts turn DARC. *Transplantation* 75: 1030-1034.

7. Lerut E, Van Damme B, Noizat-Pirenne F, Emonds MP, Rouger P, et al. (2007) Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? *Transfusion* 47: 28-40.
8. Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF (2000). Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucásicos e negróides na cidade de São Paulo. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 22: 23-32.
9. Ruiz TM, da Costa SM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, et al. (2005) Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. *Transplant Proc* 37: 2293-2296.
10. Guelsin GAS, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, de Melo FC, et al. (2011) Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Paraná, southern Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 33: 21-25.
11. Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, et al. (2011) The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun* 2: 266.
12. Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, et al. (2012) 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* 73: 180-185.
13. 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.
14. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C (1995) Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy negative individuals. *Nat Genet* 10: 224-228.
15. Iwamoto S, Li J, Sugimoto N, Okuda H, Kajii E (1996). Characterization of the Duffy gene promoter: evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 852-859.

16. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ (1995) Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 90: 823-839.
17. Rios M, Chaudhuri A, Mallinson G, Sausais L, Gomensoro-Garcia AE, et al. (2000) New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. *Br J Haematol* 108: 448-454.
18. Meny GM (2010) The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology* 26: 51-56.
19. Luo H, Chaudhuri A, Zbrzezna V, He Y, Pogo AO (2000) Deletion of the murine Duffy gene (Dfy) reveals that the Duffy receptor is functionally redundant. *Mol Cell Biol* 20: 3097–3101.
20. Zarbock A, Schmolke M, Bockhorn SG, Scharte M, Buschmann K, et al. (2007) The Duffy antigen receptor for chemokines in acute renal failure: a facilitator of renal chemokine presentation. *Crit Care Med* 35: 2156–2163.
21. Chaudhuri A, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO (1995) The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: Restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in non erythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood* 85: 615-621.
22. Hadley TJ, Peiper SC (1997) From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 89: 3077-3091.
23. Girard JP, Baekkevold ES, Yamanaka T, Haraldsen G, Brandtzaeg P, et al. (1999) Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am. J. Pathol* 155: 2043-2055.

24. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MM, Visentainer JE, et al. (2000) HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 72: 597-617.
25. Nigam P, Dellalibera E, Maurício-da-Silva L, Donadi EA, Silva RS (2004) Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the northeastern state of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens* 64: 204–208.
26. Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, et al. (2000) Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 61: 1048–1052.
27. Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, et al. (2001) Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 62: 645–650.
28. Trachtenberg A, Jobim LF, Kraemer E, Salzano FM, Moraes ME, et al. (1988) The HLA polymorphism in five Brazilian populations. *Ann Hum Biol* 15: 213–221.
29. Crispim JC, Mendes-Júnior CT, Wastowski IJ, Palomino GM, Saber LT, et al. (2008) HLA polymorphisms as incidence factor in the progression to end-stage renal disease in Brazilian patients awaiting kidney transplant. *Transplant Proc* 40: 1333-1336.

TABELAS

Tabela 1 – Características gerais dos pacientes nefropatas da região Sul do Brasil.

Variáveis	n (183)	f
Faixa etária (anos)		
18-30	14	0,076503
31-50	65	0,355191
51-70	79	0,431694
acima de 70	25	0,136612
Gênero		
Feminino	69	0,377049
Masculino	114	0,622951
Etnia		
Oriental	5	0,027322
Branca	114	0,622951
Mestiça	42	0,229508
Negra	22	0,120219
Tempo de diálise (anos)		
Menos de 1	41	0,224044
1 a 3	74	0,404372
4 a 6	38	0,20765
Acima de 6	30	0,163934

Tabela 2 – Frequência dos fenótipos Duffy em pacientes nefropatas da região sul do Brasil.

Fenótipo Duffy	Pacientes Nefropatas (n=183)	
	n	f
Fy(a+b-)	49	0,27
Fy(a+b+)	64	0,35
Fy(a-b+)	60	0,33
Fy(a-b-)	10	0,05

Tabela 3 - Frequência dos alelos HLA-A, -B e -DRB1 em pacientes nefropatas da região Sul do Brasil.

HLA-A	n	f	HLA-B	n	f	HLA-DRB1	n	f
01	35	0,0956284	07	28	0,0765027	01	32	0,0874317
02	85	0,2322404	08	17	0,0464481	03	42	0,1147541
03	40	0,1092896	13	6	0,0163934	04	52	0,1420765
11	26	0,0710383	14	13	0,0355191	07	39	0,1065574
23	19	0,0519126	15	30	0,0819672	08	21	0,057377
24	43	0,1174863	18	21	0,057377	09	7	0,0191257
25	6	0,0163934	27	12	0,0327869	10	11	0,0300546
26	16	0,0437158	35	37	0,1010929	11	55	0,1502732
29	12	0,0327869	37	3	0,0081967	12	2	0,0054645
30	20	0,0546448	38	9	0,0245902	13	39	0,1065574
31	17	0,0464481	39	15	0,0409836	14	18	0,0491803
32	11	0,0300546	40	15	0,0409836	15	34	0,0928962
33	13	0,0355191	41	8	0,0218579	16	14	0,0382514
34	3	0,0081967	42	9	0,0245902	17	0	0
36	2	0,0054645	44	24	0,0655738			
66	1	0,0027322	45	12	0,0327869			
68	13	0,0355191	47	1	0,0027322			
69	1	0,0027322	48	2	0,0054645			
74	3	0,0081967	49	9	0,0245902			
80	0	0	50	10	0,0273224			
43	0	0	51	44	0,1202186			
			52	10	0,0273224			
			53	9	0,0245902			
			54	1	0,0027322			
			55	4	0,010929			
			56	1	0,0027322			
			57	7	0,0191257			
			58	6	0,0163934			
			67	2	0,0054645			
			81	1	0,0027322			
			78	0	0			
			82	0	0			
			73	0	0			
			46	0	0			

Tabela 4 – Frequência dos fenótipos Duffy dos pacientes nefropatas do Sul do Brasil comparada com indivíduos saudáveis de outros estudos [8,10,11].

Fenótipo Duffy	Pacientes nefropatas (n=183)		GUELSIN et al (2011) (PR) (n=400)			NOVARETTI et al (2000) (SP) (n=2462)			HOWES et al (2011) (Mundo) (n=50578)		
	n	f	f	p - valor	OR (IC95%)	f	p - valor	OR (IC95%)	f	p - valor	OR (IC95%)
Fy(a+b-)	49	0,27	0,125	<0,0001	2,56 (1,60;4,07)	0,17	0,0012	1,80 (1,25;2,56)	0,33	0,0594	-
Fy(a+b+)	64	0,35	0,48	0,0039	1,71 (1,18;2,51)	0,22	0,0001	1,91 (1,37;2,66)	0,30	0,1452	-
Fy(a-b+)	60	0,33	0,37	0,3521	-	0,28	0,2026	-	0,23	0,0019	1,67 (1,20;2,29)
Fy(a-b-)	10	0,05	0,025	0,0853	-	0,33	<0,0001	8,53 (4,49;18,20)	0,14	0,0004	2,81 (1,49;5,97)
TOTAL	183	1	0,99			0,99			0,99		

Tabela 5 – Distribuição dos grupos alélicos HLA mais prevalentes nos pacientes nefropatas sul brasileiros comparada com indivíduos saudáveis de outros estudos [9,12].

Alelo HLA	Pacientes nefropatas (n=183)		RUIZ et al (2005) (PR) (n= 3500)			BORTOLOTO et al (2012) (RS) (n=5000)		
	n	f	f	p - valor	OR (IC95%)	f	P - valor	OR (IC95%)
HLA-A*								
01	35	0,095628	0,095	0,9273		0,101	0,7914	
02	85	0,23224	0,228	0,8481		0,278	0,0568	
03	40	0,10929	0,093	0,311		0,104	0,7275	
11	26	0,071038	0,052	0,1187		0,051	0,0922	
24	43	0,117486	0,104	0,43		0,103	0,3818	
HLA-B*								
07	28	0,076503	0,069	0,597		0,07	0,6027	
15	30	0,081967	0,07	0,4013		0,084	1	
35	37	0,101093	0,112	0,6089		0,125	0,1963	
44	24	0,065574	0,105	0,0134	1,67 (1,1;2,66)	0,12	0,0009	1,94 (1,28;3,09)
51	44	0,120219	0,085	0,0278	1,47 (1,04;2,05)	0,087	0,0309	1,43 (1,01;1,99)
HLA-DRBI*								
03	42	0,114754	0,073	0,0057	1,65 (1,15;2,31)	0,099	0,3277	
04	52	0,142077	0,12	0,2172		0,124	0,2953	
07	39	0,106557	0,12	0,5079		0,131	0,2051	
11	55	0,150273	0,125	0,1694		0,119	0,072	
13	39	0,106557	0,117	0,6159		0,137	0,1027	

3. CAPÍTULO III

3.1. CONCLUSÕES

Apresentamos neste tópico as conclusões gerais do presente trabalho. As conclusões específicas estão descritas ao longo dos artigos que fazem parte desta dissertação.

Este estudo permitiu o conhecimento do polimorfismo dos grupos alélicos HLA e de antígenos Duffy, em pacientes candidatos ao transplante renal da região Norte/ Noroeste do Estado do Paraná, sendo possível observar o envolvimento do fenótipo Duffy e de alguns grupos alélicos HLA na DRC, sugerindo alguma relação da expressão de seus antígenos com a doença.

Através do estudo do polimorfismo HLA e Duffy foi possível traçar o perfil desses marcadores, em potenciais candidatos ao transplante de uma região. Assim, dados deste estudo podem ser utilizados como parâmetros epidemiológicos, na distribuição de órgãos na área sul-brasileira. No mesmo estudo, a comparação dos perfis HLA e Duffy dos pacientes com a população saudável evidenciou a diferença existente entre regiões e suas populações.

3.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo de antígenos de histocompatibilidade, principal e secundário, na DRC auxilia na compreensão da doença, seleção no transplante de órgãos e evolução do enxerto.

O conhecimento do polimorfismo HLA, na população de candidatos ao transplante, poderá contribuir em estudos de associação e suscetibilidade a diversas doenças às quais os pacientes portadores de DRC são acometidos.

O antígeno Duffy está presente em outras células, além dos eritrócitos. Por ser considerado um receptor de citocinas, ele possui um importante papel nos processos inflamatórios. E, em virtude dessa característica, sua participação na evolução da doença renal precisa ser melhor investigado.

A relação dos sistemas HLA e Duffy não ocorre apenas de forma independente no organismo. Em casos de incompatibilidade dos antígenos Duffy, entre doador e receptor, o sistema HLA desempenha sua função na apresentação desses antígenos, desencadeando uma resposta apropriada. O polimorfismo existente na expressão das moléculas HLA e Duffy pode influenciar nesta relação, tornando necessária uma pesquisa mais aprofundada sobre o mecanismo de interação, entre as diferentes moléculas do sistema HLA e produtos do gene Duffy.