

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Doutorado em Bioinformática**

**ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA)**  
**NA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA PARA A**  
**SELEÇÃO DE RECEPTOR-DOADOR PARA**  
**TRANSPLANTES**

**Belo Horizonte**  
**2014**

**Raquel Aparecida Fabreti de Oliveira**

**ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA)  
NA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA PARA A  
SELEÇÃO DE RECEPTOR-DOADOR PARA  
TRANSPLANTES**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioinformática pelo programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

***Orientador:*** Prof. Dr. Marcos Augusto dos Santos

***Co-Orientador:*** Prof. Dr. Evaldo Nascimento

**Belo Horizonte  
2014**

043

Oliveira, Raquel Aparecida Fabreti de.

Antígenos leucocitários humanos (HLA) na avaliação imunológica para a seleção de receptor-doador para transplantes [manuscrito] / Raquel Aparecida Fabreti de Oliveira. - 2014.

196 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Marcos Augusto dos Santos. Co-Orientador: Evaldo Nascimento.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Antígenos de histocompatibilidade HLA - Teses. 2. Complexo principal de histocompatibilidade - Teses. 3. Seleção natural - Teses. 4. Linhagem (Genética) - Teses. 5. Transplante de órgãos, tecidos, etc - Teses. 6. DNA - Teses. 7. Bioinformática - Teses. I. Santos, Marcos Augusto dos. II. Nascimento, Evaldo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



ATA DA DEFESA DE TESE

44/2014  
 entrada  
 1º/2010  
 CPF:  
 035.415.826-00

**Raquel Aparecida Fabreti de Oliveira**

Às dez horas do dia **07 de maio de 2014**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) na avaliação Imunológica para a seleção de receptor-Doador para transplantes**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Bioinformática**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Marcos Augusto dos Santos**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Marcos Augusto dos Santos	UFMG	Aprovado
Dr. Evaldo Nascimento	Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte	Aprovada
Dr. Frederico Ferreira Campos Filho	UFMG	Aprovada
Dra. - Ana Maria Caetano de Faria	UFMG	Aprovada
Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrinho Pôrto	UERJ	Aprovado
Dr. José Augusto Nogueira Machado	Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte	APROVADO
Dr. Bráulio Roberto Gonçalves Marinho Couto	Centro Universitário de Belo Horizonte	Aprovado

Pelas indicações, a candidata foi considerada: aprovada.  
 O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.  
**Belo Horizonte, 07 de maio de 2014.**

Dr. Marcos Augusto dos Santos - Orientador [Assinatura]  
 Dr. Evaldo Nascimento - Co-Orientador [Assinatura]  
 Dr. Frederico Ferreira Campos Filho [Assinatura]  
 Dra. - Ana Maria Caetano de Faria - UFMG [Assinatura]  
 Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrinho Pôrto [Assinatura]  
 Dr. José Augusto Nogueira Machado [Assinatura]  
 Dr. Bráulio Roberto Gonçalves Marinho Couto [Assinatura]



*Dedicatória:*  
À minha filha Júlia, meu estímulo maior.  
Espero ser um exemplo de vida para você.

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Minas Gerais**, Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ciência da Computação do Instituto de Ciências Exatas e ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática por permitirem a minha participação no programa e a todos os professores pelos ensinamentos.

Às **outras Instituições** envolvidas, como Instituto de Ensino e Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, aos grupos de Transplante renal dos Hospitais de Clínicas da UFMG, Felício Rocho, Universitário São José, ao MG-Transplantes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG). Ao Laboratório **IMUNOLAB** - Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de transplantes pelo fornecimento da estrutura, suporte financeiro da pesquisa e aos funcionários do Setor Técnico que colaboraram na execução dos testes para obtenção dos dados utilizados neste estudo.

Ao **Professor Doutor Marcos Augusto dos Santos** pela orientação científica, apoio e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Professor Doutor Evaldo Nascimento** pela co-orientação, confiança, disponibilidade e estímulo essenciais nessa pesquisa.

A minha avó **Maria Zopelari Fabreti**, grande mulher, enorme saudade. O meu maior pesar é ela não poder estar presente.

A **minha família**, pelo carinho, pela amizade, por vibrar sempre com minhas vitórias, compreensão e apoios tão essenciais durante o desenvolvimento desse trabalho. Cada um deles, certamente, sabe como me ajudaram.

Ao **Marcos** por apoiar minhas decisões e compartilhar as dificuldades.

Aos **pacientes e doadores** pela disponibilização voluntária das amostras biológicas, pela lição de vida e solidariedade ao próximo.

A **Deus** por tudo.

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	v
Lista de tabelas.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de anexos.....	x
Resumo .....	1
Abstract .....	2
Apresentação .....	3
1. Introdução.....	7
1.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade .....	8
1.2 Estruturas das moléculas HLA .....	11
1.3 Funções das moléculas HLA.....	12
1.4 Polimorfismo nos <i>loci</i> HLA .....	13
1.5 Nomenclatura HLA .....	16
1.6 Evolução do sistema HLA .....	17
1.7 Diversidade HLA nas populações .....	19
1.8 Importância do sistema HLA nos transplantes de órgãos e tecidos .....	21
1.8.1 Transplantes de órgãos sólidos .....	21
1.8.2 Transplantes de tecidos .....	24
1.9 O contexto dos transplantes de órgãos e tecidos no Brasil .....	26
2. Justificativa .....	29
3. Objetivos.....	31
Objetivo Geral .....	32
Objetivos específicos .....	32
3. Resultados e discussões .....	33
Descrição de novas mutações nos <i>loci</i> HLA em indivíduos de Minas Gerais .....	34
Caracterização da diversidade genética da população brasileira com base no HLA50	
Transplante renal: avaliação imunológica, clínica e sobrevida .....	91
4. Conclusões gerais e contribuições.....	112
5. Perspectivas .....	114

6. Referências Bibliográficas.....	116
7. Anexos.....	124
Anexo I: Resumos apresentados e publicados em congressos durante o período de preparação da tese .....	125
Anexo II Fundamentos de Imunologia de Transplantes. <i>In</i> Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos.....	129
Anexo III: Dados complementares sobre Sequências HLA submetidas aos bancos de dados EMBL, GenBank, e DDBJ. ....	154
Anexo IV: Nomenclatura HLA para os novos alelos definida pelo do Comitê de nomenclatura da Organização Mundial da Saúde .....	174
Anexo V: Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte .....	190
Anexo VI: Termo de Consentimento Informado e Esclarecido.....	191
Anexo VII: Certificados de aulas ministradas para profissionais da área da saúde .....	193

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa dos genes do MHC humano ..... 10
- Figura 2: Número de antígenos e alelos HLA identificados de 1987 a setembro de 2014 ..... 13
- Figura 3: A) Mapa das posições polimórficas representadas por meio do número de aminoácidos diferentes encontrados em uma determinada posição. O número 1 no eixo y indica as posições monomórficas. B) Aminoácidos polimórficos encontrados em cada posição comparados com uma sequência consenso com as posições polimórficas empilhados em colunas acima da base de consenso. Estas colunas são ordenadas com os aminoácidos mais frequentes na base da coluna. Os aminoácidos que são observados uma única vez nesta posição são mostrados com letra minúscula (Robinson *et al*, 2013) ..... 15
- Figura 4: Nomenclatura HLA oficial definida pelo Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde ..... 17
- Figura 5: Distribuição HLA na população mundial. Supporting online material Solberg *et al.* (2008) ..... 20
- Figura 6: Taxas de Sobrevida dos enxertos em relação a A) grau de parentesco entre o par doador-receptor (Süsal *et al*, 2013), B) número de incompatibilidades HLA-A, HLA-B, and HLA-DR para receptores de órgãos de doador falecido transplantados (Valor  $P < 0.001$ ) (Süsal *et al*, 2013) ..... 21
- Figura 7: Influência da compatibilidade HLA na sobrevida do enxerto em pacientes com anticorpos anti HLA classe I e II ..... 22
- Figura 8: Sobrevida de enxerto de pacientes sem anticorpos anti-HLA, com anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA) e com anticorpos anti-HLA não DSA (NDSA) e (Lachmann *et al.*, 2009) ..... 23
- Figura 9: Sequência de resíduos de aminoácidos polimórficos da estrutura do HLA necessários para a ligação dos AloAc com os Eplets, aqui representados pelo anticorpo monoclonal OK2H12. No painel acima, os alelos A\*03:01, A\*11:01 e A\*32:01 compartilham Eplets que são críticos para a ligação do OK2H12. No painel abaixo, os

alelos A\*30:01 e A\*31:01 diferem daqueles do painel acima no resíduo 56R e não são ligantes do mesmo anticorpo. O alelo A\*24:02 possui diferentes resíduos em várias posições e, também, não é ligante do anticorpo OK2H12 (Adaptado de Duquesnoy *et al.*, 2005)..... 25

Figura 10: Sobrevida de pacientes transplantados em relação à compatibilidade alélica nos *loci* HLA-A, -B, -C, ou -DRB1. Na comparação entre incompatibilidade alélica e antigênia (P=0.924) e na 8/8 versus 7/8 (P = 0,001). (Fürst *et al.*, 2013)..... 26

Figura 11: Representação espacial dos dados analisados pelo Programa Structure. Cada indivíduo está representado como um ponto colorido ..... 53

Figura 12: Árvore construída pelo algoritmo Neighbor Joining ..... 53



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de proteínas, alelos e alelos nulos nos <i>loci</i> HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1.....	14
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AloAc	Aloanticorpos
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CNCDO	Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos
CNV	Número Variável de Cópias
DECH	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
DL	Desequilíbrio de Ligação
DSA	Anticorpos anti-HLA do Doador
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HSCBH	Hospital Santa Casa de Belo Horizonte
IMGT/HLA	Immunogenetic HLA Sequence Database
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INDEL	Inserção ou Deleção
Mb	Mega Base
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBR	Região de ligação do peptídeo
PCR-SSOP	Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe
PRA	Painel de reatividade de anticorpos contra antígenos HLA
PYPOP	Python for Population Genetics
REDOME	Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea
REREME	Registro Brasileiro de Receptores de Medula Óssea
RMA	Rejeição Mediada por Anticorpos
RENACORD	Registro Nacional de Doadores de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
SAB	Single Antigen Beads
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SCUP	Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
SNP	Polimorfismo de Base Única
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
SUS	Sistema Único de Saúde
TCIE	Termo de Consentimento Informado e Esclarecido

TCTH Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas  
WHO Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE ANEXOS

Anexo I .....	124
1.1 Resumo publicado nos Anais do X-Meeting da Associação Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional (Florianópolis, outubro/2011) .....	125
1.2 Resumo publicado no Anais do XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (São Paulo, agosto/2013).....	126
1.3 Resumo publicado no Anais do XIII Congresso Brasileiro de Transplantes - ABTO (Rio de Janeiro, outubro/2013) .....	127
1.4 Resumo publicado no Anais do I Congresso do Sistema Brasileiro de Transplantes (Brasília, dezembro/2013).....	128
Anexo II Fundamentos de Imunologia de Transplantes. <i>In</i> Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos. ....	129
Anexo III Dados complementares sobre Sequências HLA submetidas aos bancos de dados EMBL, GenBank, e DDBJ .....	154
Anexo IV Nomenclatura HLA para os novos alelos definida pelo Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde. ....	174
Anexo V Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte. ....	190
Anexo VI Termo de Consentimento Informado e Esclarecido. ....	191
Anexo VII Certificados de aulas ministradas para profissionais da área da saúde ....	193

## RESUMO

Os antígenos leucocitários humanos (HLA) são altamente polimórficos e influenciam no sucesso dos transplantes de órgãos e tecidos. A distribuição dos alelos e haplótipos HLA variam na população mundial, dificultando a identificação de indivíduos não aparentados geneticamente semelhantes no HLA. O objetivo foi estudar a molécula HLA no contexto dos transplantes incluindo a identificação de novas variantes alélicas HLA, analisar a diversidade genética da população brasileira a fim de determinar possíveis diferenças entre as macrorregiões do Brasil, e elaborar um protocolo para classificar os receptores de órgãos pelo risco de terem rejeição e com isso melhorar a sobrevida do transplante renal. A amostra foi constituída com base em dados de dois grupos distintos. O grupo um com 566 indivíduos saudáveis não relacionados cadastrados como doadores no REDOME (Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea). Neste grupo, os dados de HLA foram analisados usando diversos métodos e algoritmos, alguns dos quais foram desenvolvidos durante este trabalho de tese. As sequências dos novos alelos HLA-A\*80:03, HLA-B\*07:184, -B\*27:102, -B\*41:27, -B\*42:19, -B\*42:20, -B\*50:32, -B\*51:151, -B\*57:63, -B\*57:64, -B\*58:42 de classe I e HLA-DRB1\*04:11:03, -DRB1\*10:05, -DRB1\*15:94, -DRB1\*16:22 foram depositadas nos bancos de dados EMBL, GenBank, e DDBJ. Na população brasileira, foi observada uma composição genética heterogênea, com diferentes distribuições nas frequências HLA alélicas e haplotípicas entre as macrorregiões brasileiras. Esse estudo além de mostrar a grande diversidade HLA e a heterogeneidade genética da população brasileira, poderá contribuir para elaboração de estratégias de busca de doadores voluntários de medula óssea para o REDOME e também auxiliar na elaboração de protocolos clínicos para otimizar a avaliação de compatibilidade entre o para receptor-doador. No grupo dois, 337 receptores que foram submetidos ao transplante de rim de doadores vivos ou falecidos. No estudo clínico, os receptores foram classificados como de baixo risco (LR), médio (MR), alto (HR) ou muito alto risco (SR) de terem rejeição com base no exame Painel de reatividade de anticorpos contra antígenos HLA (PRA) usando Single Antigen Beads (SAB). A sobrevida dos enxertos foi avaliada após um ano de transplante. De uma forma geral, neste estudo foi observado que os pacientes do grupo de baixo risco tiveram menos episódios de rejeição e melhor sobrevida do enxerto quando comparados com os pacientes classificados nos grupos de médio, alto e muito alto risco (p-value <0,05).

## ABSTRACT

The Human leukocyte antigens (HLA) are highly polymorphic and influence in the transplantation success of organs and tissues. The distribution of alleles and haplotypes HLA vary in the world population, making it difficult the identification of unrelated individuals genetically similar in HLA. The objective was to study the HLA molecule in the context of transplantation, including the identification of new allelic variants of HLA, analyze the genetic diversity of the population in order to determine possible differences among regions of Brazil, and elaborate a protocol to classify organ recipients by risk for rejection and thereby improve kidney transplantation survival. The sample was composed by from two distinct groups. In the group one, 566 healthy unrelated individuals registered as donors in REDOME (Brazilian Registry of Bone Marrow Donors Volunteer), In this study, the HLA data were analyzed using several methods and algorithms, some of which were developed during this thesis work. The sequences of the new HLA-A\*80:03, HLA-B\*07:184, -B\*27:102, -B\*41:27, -B\*42:19, -B\*42:20, -B\*50:32, -B\*51:151, -B\*57:63, -B\*57:64, -B\*58:42 de classe I e HLA-DRB1\*04:11:03, -DRB1\*10:05, -DRB1\*15:94, -DRB1\*16:22 were deposited in EMBL, GenBank and DDBJ database. In the Brazilian population, was observed a heterogeneous genetic composition, with different distributions in HLA allelic and haplotype frequencies among Brazilian regions. It may contribute to development of strategies for search voluntary bone marrow donors for REDOME and also assist in developing clinical protocols to optimize the assessment of compatibility between recipient-donor. The group two was composed by 337 recipients who underwent kidney transplantation from living or deceased donors. The receptors were classified as low risk (LR), medium (MR), high (HR) or very high risk (SR) having rejection based on PRA Single Antigen Beads (SAB) test. The survival of the grafts was assessed after one year of transplantation. In general, in the clinical study of transplant patients, it was observed that patients classified as low risk group had fewer episodes of rejection and better graft survival when compared with patients in the group of medium, high and very high risk ( $p$ -value $<0.05$ ).



## **APRESENTAÇÃO**

No Brasil, o alto número de transplantes realizados anualmente impressiona quando comparado ao de países desenvolvidos. No entanto, quando analisado em relação à necessidade da população, esse número ainda é insuficiente e as listas de espera para transplante têm aumentado, apesar das campanhas de incentivo à doação de órgãos, promovidas pelos Governos Federal e Estadual, Hemocentros, Associações Científicas e profissionais da área da saúde. Assim, o número de doadores por milhão de habitantes continua bem abaixo da meta brasileira para órgãos sólidos até 2017, ou seja, de 20 doadores por milhão de habitantes.

A melhoria da legislação brasileira na regulamentação das atividades de transplantes, a criação do Sistema Nacional de Transplantes (SNT), o financiamento público dos procedimentos relacionados aos transplantes nos Centros Transplantadores credenciados dos estados foram essenciais para colocar o país entre os primeiros lugares em número de transplantes de órgãos e tecidos do mundo. No entanto, a maioria dos brasileiros não conhece em detalhes os resultados do programa de transplantes do país. Existem importantes estudos estatísticos no Brasil mostrando o número de transplantes categorizados por órgão ou tecido, por unidade da federação, número de notificações de potenciais doadores, causas da não concretização da doação, faixa etária, sexo, óbitos, grupo sanguíneo dos doadores, pacientes em Lista de Espera, censo por diálise, entre outros. Esses estudos retratam, principalmente, o cenário anterior aos transplantes, sendo necessária uma avaliação criteriosa, também, posterior aos transplantes. Outros estudos ainda estão em andamento com resultados parciais publicados, como os da Rede Brasil de Imunogenética que é financiada pelo Ministério da Saúde.

No Brasil existem poucos estudos multicêntricos que retratam a evolução clínica e imunológica de pacientes submetidos a transplantes, como dados de sobrevida do enxerto, causas de perdas do enxerto e óbitos de pacientes. Esses dados poderiam ser utilizados na padronização de protocolos que incluiriam desde a seleção de doadores até a definição do tratamento com drogas imunossupressoras, antibióticoterapia ou outros que poderiam ser realizados após o transplante. Tais estudos são fundamentais para nortear as condutas médicas, reduzir o tempo de isquemia fria do enxerto e também de internação dos pacientes, visando reduzir as intercorrências clínicas no pós-transplante, melhorar a sobrevida dos enxertos e finalmente orientar nas estratégias de campanhas por doadores não relacionados de órgãos e tecidos. Certamente, esses estudos, somados aos estímulos do Governo Federal, seriam utilizados na elaboração de diretrizes para uniformizar as condutas nos transplantes e transformar o Brasil em uma potência mundial em transplantes de órgãos e tecidos. Nenhuma

mudança de política pública nessa área deveria ser embasada somente em resultados e estudos de outros países. Deve-se garantir que os resultados dos transplantes realizados no Brasil sejam de conhecimento público e que, a partir desses resultados, questões importantes sejam amplamente discutidas e aprimoradas em benefício dos pacientes.

Assim, o principal objetivo desse trabalho foi contribuir para a divulgação de dados científicos, a formação de massa crítica e a obtenção de experiências na área que possam ser usadas pelas equipes transplantadoras na formulação de diretrizes e protocolos clínicos e imunológicos, como os que foram aplicados no transplante renal, cujos dados apresentamos nesta tese (Capítulo 3). Com base nesses dados, novos protocolos estão sendo elaborados, juntamente com as equipes médicas de transplantes de fígado e de células-tronco hematopoiéticas do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte (HSCBH) onde essas atividades estão sendo mais intensamente discutidas pela Clínica de transplantes, coordenada pelo Doutor Walter Antônio Pereira. Nessa Instituição, está em atividade o Curso de Pós-Graduação em Medicina com área de concentração em transplantes e, em elaboração, o curso de Mestrado em Transplantes de órgãos e tecidos humanos.

Esse trabalho de tese teve a participação voluntária de centenas de pacientes, com assinatura do Termo de Consentimento Informado e Esclarecido (TCIE) (anexo VI). Como principais pesquisadores-orientadores participaram desse trabalho, o professor Doutor Marcos Augusto dos Santos, do Departamento de Ciência da Computação do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais e o médico e professor Doutor Evaldo Nascimento, do Instituto de Ensino e Pesquisas e Médico Imunologista de Transplantes da Clínica de Transplantes do HSCBH.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HSCBH (Nº 675/2008) e teve apoio financeiro do Laboratório IMUNOLAB – Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes Ltda, Belo Horizonte, MG.

## **Organização**

Com o advento das tecnologias de sequenciamento automático de DNA, identificação de anticorpos específicos anti-Antígenos Leucocitários Humano (HLA), as avaliações clínicas e imunológicas antes e depois dos transplantes de órgãos e tecidos têm sido mais precisas, contribuindo para o sucesso dos transplantes, elevando a taxa de sobrevida e, conseqüentemente, melhor qualidade de vida para os pacientes. Essas novas tecnologias permitiram estudos de avaliação da diversidade genética da população brasileira e a descrição de 15 novas mutações nos *loci* HLA, observadas em indivíduos de Minas Gerais pelo nosso

grupo. O estudo do receptor candidato a transplante de órgão sólido foi amplamente beneficiado pela descrição do padrão imunológico de pacientes, permitindo uma avaliação de risco de rejeição antes e após o transplante.

Com o conhecimento científico e a experiência adquirida durante o período da tese, foi possível publicar um capítulo de livro para profissionais da área de saúde (Anexo II) que foi utilizado em várias aulas e cursos ministrados por nós (Anexo VII). O texto da tese compreende uma introdução sobre o sistema HLA e sua importância nos transplantes de órgãos e tecidos, Justificativa e objetivos. Oito artigos publicados foram apresentados na seção de Resultados e Discussão. Finalmente, foram apresentadas as conclusões gerais, contribuições, perspectivas, as referências bibliográficas complementares às dos artigos e os anexos.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade

Na década de 50 com o sucesso do primeiro transplante renal entre irmãos gêmeos geneticamente idênticos (Murray *et al.*, 1958), maior atenção passou a ser dada a compatibilidade de tecidos ou histocompatibilidade em transplantes para evitar as rejeições. A primeira descoberta de um HLA (*Human Leucocyte Antigens*) foi feita pelo médico hematologista francês Jean Dausset, que identificou o aloantígeno denominado HLA-A2 (Dausset, 1958).

A partir de 1950, vários estudos contribuíram para um maior conhecimento dos genes que codificam as moléculas HLA, entre os pesquisadores pode-se destacar Bernard Amos, USA; Richard Batchelor, UK; Ruggero Ceppellini, Itália; Paul Engelfriet, Holanda; Wolfgang Mayr, Áustria; Flemming Kissmeyer-Nielsen, Dinamarca; Ray Shulman, USA; Paul Terasaki, USA; Roy Walford, USA e Erik Thorsby, Noruega (Park *et al.*, 1970).

Devido à complexidade do sistema HLA vários Workshops Internacionais de Histocompatibilidade (IHWSs) foram realizados nos quais os pesquisadores da área reuniam-se para discutir os dados de pesquisas, trocar reagentes, técnicas, comparar resultados e comunicar novas descobertas. O primeiro IHWS, organizado por Amos, ocorreu em 1964 nos Estados Unidos com o objetivo principal de comparar diferentes técnicas para detectar antígenos leucocitários usados por diferentes pesquisadores da época (Amos, 1965; Thorsby 2009). Após o terceiro IHWS, em 1968, um Comitê da Organização Mundial da Saúde foi criado para uniformizar a nomenclatura HLA. Este Comitê é o responsável por nomear oficialmente os alelos e loci HLA.

Os primeiros estudos evidenciando a correlação entre HLA e sobrevida do enxerto renal foram apresentados por Patel e Terasaki, (1969). Em 1972, foi demonstrado que a interação molecular entre os linfócitos T e B requeriam a participação das moléculas HLA (Kindred *et al.*, 1972). Em 1974, Rolf Zinkernagel e Peter Doherty demonstraram que as moléculas HLA estavam diretamente envolvidas no reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T (Zinkernagel *et al.*, 1974 ).

Os primeiros loci HLA descobertos foram os HLA-A e -B (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1968), sendo em seguida descoberto o locus HLA-C (Solheim *et al.*, 1973). A descoberta do locus HLA-D foi divulgada no sexto IHWS em 1975 (Thorsby *et al.*, 1975). Estudos posteriores mostraram que o locus HLA-D consistia de vários *loci* diferentes fortemente ligados, que codificavam três diferentes séries de determinantes denominados de DR, DQ e DP.

Nas décadas de 70 e 80, foram introduzidos os termos de Classe I para descrever os antígenos HLA-A, -B e -C e Classe II para descrever os antígenos HLA -DR, DQ e DP e já se sabia que a



região HLA era localizada no braço curto do número de cromossomos 6 (Klein, 1977; Thorsby, 2009) , na região do MHC (*Major Human Histocompatibility*).

Em 1986, foi demonstrada a restrição do MHC para a resposta imune mediada por linfócitos T em humanos por Goulmy *et al.*, (1977) trabalhando como linfócitos T citotóxicos e por Bergholtz *et al.*, (1977) com linfócitos T helper. Bjorkman *et al.*, (1987a, 1987b) forneceram explicações que mudaram o paradigma não só da área do HLA mas também da imunologia em geral, demonstraram, utilizando cristalografia de raios X, a estrutura da molécula HLA-A2 e de peptídeo desconhecido encontrado em um sítio dessa molécula. Esses estudos corroboraram com os achados de que as moléculas HLA eram apresentadoras de peptídeos.

Desde a década de 50, os estudos e descobertas científicas na área do HLA demonstraram que os antígenos de histocompatibilidade tem papel essencial na imunologia pelo seu envolvimento em toda fase indutora da resposta imune celular e humoral. Em transplantes, a compatibilidade HLA está associada na sobrevivência do enxerto em longo prazo e a incompatibilidade HLA está envolvida diretamente na reatividade imunológica receptor anti doador que pode levar a processos de rejeição celular ou humoral (Opelz *et al.*, 2007).

As bases fundamentais dos transplantes estão intimamente relacionadas ao Complexo Principal de Histocompatibilidade humano, MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (Klein, 1986). O MHC encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.3, ocupando ~4Mb, o que corresponde a 0,13% do genoma humano, mas contém ~0.5% (~160) dos ~32000 genes codificadores de proteínas conhecidas (Shiina *et al.*, 2009). Cerca de 250 genes descritos no MHC têm papel fundamental no sistema imunológico (MHC sequencing consortium, 1999; Shiina *et al.*, 2009). Os produtos gênicos do MHC participam tanto da resposta imune adaptativa no processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T e na inflamação quanto na resposta imune inata por meio da interação com as células Natural Killer (Shiina *et al.*, 2009). Historicamente, o interesse no MHC surgiu a partir de experimentos sobre rejeição de tecidos transplantados entre camundongos. Os genes do MHC estão presentes em todos os vertebrados, tendo no homem a designação de HLA, por terem sido detectados, primeiramente, na superfície de leucócitos. Os genes HLA são os mais polimórficos do genoma humano, com milhares de alelos descritos (Horton *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2013). Essas moléculas são de fundamental importância em numerosas funções do sistema imune, incluindo a seleção clonal, indução de tolerância, imunidade mediada por células T, resposta inflamatória e produtos celulares como as citocinas e anticorpos. Consequentemente, há grande interesse médico no papel do MHC, pois está diretamente relacionado com a rejeição de órgãos e tecidos e a suscetibilidade para algumas doenças infecciosas e autoimunes (Trowsdale *et al.*, 2013).

O MHC é dividido de acordo com a estrutura e a função dos produtos gênicos em três regiões, como: classe I, classe II e classe III (Shiina *et al.*, 2004) (Figura 1). As regiões de classe I e II codificam dois grupos de proteínas estruturalmente distintas. A região de classe III encontra-se localizada entre as regiões de classe I e II, e contém um grupo de genes cujos produtos estão envolvidos nas respostas inflamatórias, tais como: as proteínas do sistema complemento (C2, C4 e Bf), citocinas (TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , LTA e LTB), proteínas do choque térmico, entre outras. A região de classe III contém 75 *loci* distribuídos dentro de 0,9 Mb de DNA (Williams, 2001; Shiina *et al.*, 2004, Shiina *et al.*, 2009).

Na porção mais telomérica do MHC, localiza-se a região de classe I que ocupa aproximadamente 1,8 Mb e contém 128 *loci*, dos quais 19 são *loci* HLA. Três são considerados *loci* HLA clássicos (HLA-A, HLA-B e HLA-C), cujos produtos gênicos são expressos por todas as células nucleadas, três são classificados como *loci* HLA não clássicos (HLA-E, HLA-F e HLA-G) e 12 pseudogenes (HLA-S/17, -X, -N/30, -L/92, -J/59, -W/80, -U/21, -K/70, -16, -H/54, -90 and -75), (Williams, 2001; Shiina *et al.*, 2004; Shiina *et al.*, 2009). Nos pseudogenes, o HLA-H/54 codifica duas sequências diferentes de mRNA (AK090500 e AK308374). Os genes HLA de classe I não clássicos diferem dos genes HLA clássicos no polimorfismo limitado, na distribuição tecidual do gene expresso e no fato de que eles podem apresentar funções ainda pouco definidas na medicina dos transplantes.

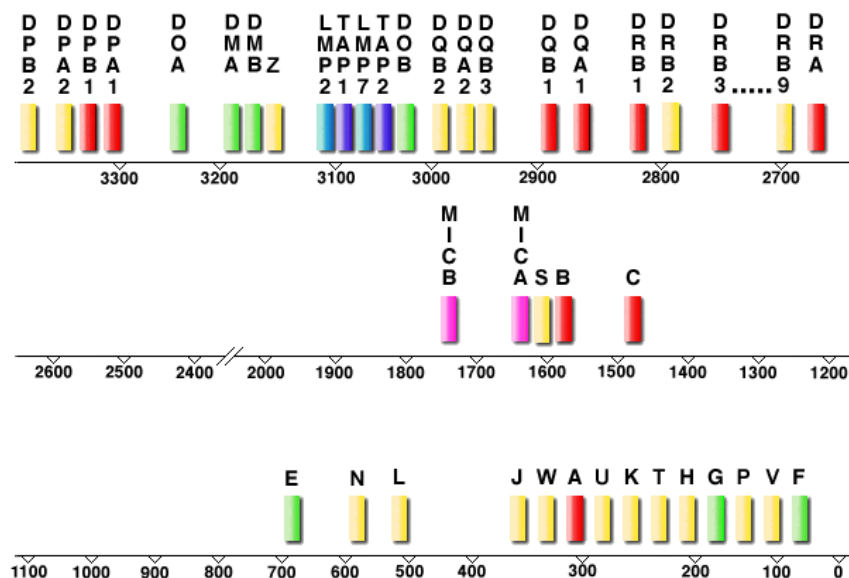


Figura 1: Mapa dos genes do MHC humano. Os genes HLA clássicos estão representados em vermelho, os genes HLA não clássicos em verde, os pseudogenes em amarelo, e os genes em rosa, azul e turquesa são genes relacionados com HLA, como exemplo, o gene TAP2, envolvido no processamento de peptídeos. Os *loci* de classe III não foram representados nesta figura esquemática. Fonte: "Site do Instituto Anthony Nolan Trust Histocompatibility Laboratories". <http://hla.alleles.org/alleles/index.html>.

Na região mais centromérica do MHC, encontra-se a região de classe II com aproximadamente 0,7Mb de DNA contendo genes que codificam as cadeias alfa e beta dos *loci* clássicos de classe II (HLA-DP, HLA-DQ e HLA DR) e não clássicos (HLA-DM e HLA-DO). Existem 27 *loci* identificados dentro da região de classe II, com 17 genes que codificam proteínas, sete genes candidatos e cinco pseudogenes (Shiina *et al.*, 2009). A região de classe II consiste de uma série de sub-regiões, cada uma contendo os genes  $\alpha$  e  $\beta$  codificando as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. A família de gene DR consiste de um único gene DRA e mais de nove genes DRB. O gene DRA codifica uma cadeia  $\alpha$  invariável que se liga a várias cadeias  $\beta$  codificadas pelos genes DRB. Os haplótipos HLA de certos alelos DRB1 contêm especificamente os *loci* DRB3, DRB4 ou DRB5 (Shiina *et al.*, 2004).

Conforme descrito acima, são características do MHC a alta densidade de genes, o elevado polimorfismo e o agrupamento de genes com funções relacionadas ao sistema imune (Horton *et al.*, 2004; Shiina *et al.*, 2014).

## 1.2 Estruturas das moléculas HLA

As moléculas HLA da classe I são formadas por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia  $\alpha$  (pesada), codificada pelo MHC com peso molecular de 44kD, e uma cadeia  $\beta$  codificada no cromossomo 15, com peso molecular de 12 kD. A cadeia  $\alpha$  é formada por um polipeptídeo central contendo um ou dois oligossacarídeos. A cadeia  $\beta$  interage não covalentemente com a porção extracelular da cadeia  $\alpha$ , não tendo assim ligação direta com a célula (Marsh *et al.*, 2000). A molécula HLA de classe I é dividida em quatro domínios: um domínio extracelular aminoterminal de ligação com peptídeos, um domínio extracelular semelhante à imunoglobulina, um domínio transmembrânico, e um domínio citoplasmático. A cadeia  $\alpha$  é dividida em  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . O sítio de ligação com peptídeos encontra-se entre as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ . O segmento  $\alpha 3$  da cadeia pesada e a cadeia  $\beta$  formam um domínio denominado microglobulina que é semelhante ao de imunoglobulina na molécula de classe I (Horton *et al.*, 2004).

As moléculas do MHC de Classe II são formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente. As duas cadeias de classe II são semelhantes entre si, sendo a cadeia  $\alpha$  (32 a 34 kD) um pouco maior do que a cadeia  $\beta$  (29 a 32 kD). Nas moléculas da classe II, ambas as cadeias polipeptídicas contêm grupos oligossacarídeos e, também, aminoterminais extracelulares e carboxiterminais intracelulares, e mais de dois terços de cada cadeia estão localizados no espaço extracelular (Marsh *et al.*, 2000). As duas cadeias da molécula HLA de classe II são codificadas por dois diferentes genes MHC e, com poucas exceções, ambas as

cadeias de classe II são polimórficas. As partes extracelulares das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são subdivididas em dois segmentos denominados  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  ou  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . A região de ligação dos peptídeos na molécula HLA classe II é formada pela interação das duas cadeias, mais especificamente entre os segmentos  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  (Horton *et al.*, 2004).

### 1.3 Funções das moléculas HLA

Os polimorfismos nos genes HLA de classe I localizam-se essencialmente nos exons 2 e 3, os quais codificam, respectivamente, para as estruturas moleculares  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  do receptor de membrana onde se localiza o sítio de ligação aos antígenos (Malissen *et al.*, 1982). O exon 2 codifica o domínio  $\beta 1$ , estrutura extracelular do receptor de membrana responsável pela ligação aos antígenos, onde concentra a maior parte dos polimorfismos nos genes de Classe II.

A função básica das moléculas HLA é promover o reconhecimento dos peptídeos pelos linfócitos T CD8+ e T CD4+ cujas funções efetoras são distintas e estão intimamente ligadas às moléculas HLA. Esse reconhecimento pode ocorrer por duas vias distintas: a via citosólica e a via endolítica (Marsh *et al.*, 2000). Na via citosólica, a molécula HLA de classe I associa-se ao peptídeo endógeno medindo de 8-10 resíduos de aminoácidos, ligados na fenda formada entre os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (Gatti *et al.*, 2003, Marsh *et al.*, 2000). Esses peptídeos serão reconhecidos pelos linfócitos T CD8+ que tem função citotóxica capaz de matar as células infectadas por vírus ou por outros patógenos intracelulares ou células tumorais (Horton *et al.*, 2004, Doherty *et al.*, 1975).

Na via endolítica, o antígeno exógeno, fagocitado pela célula apresentadora de antígeno é digerido por enzimas proteolíticas, origina diversos peptídeos medindo de 12-24 resíduos de aminoácidos que se ligam na fenda formada pelo domínio  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  da molécula HLA classe II (Gatti *et al.*, 2003, Marsh *et al.*, 2000). O complexo formado migra para a superfície da célula onde é reconhecido pelos linfócitos T CD4+ que possuem uma ampla gama de funções efetoras, todas envolvendo a produção de citocinas que agem sobre outras células do sistema imune. Em geral, os antígenos apresentados pelas moléculas HLA de classe II são derivados de patógenos presentes no espaço extracelular (Horton *et al.*, 2004, Doherty *et al.*, 1975). Dessa forma, os genes HLA classe I e II desempenham papel fundamental na resposta imune adaptativa.

Dentre os genes HLA, nove estão envolvidos com a apresentação dos peptídeos e são chamados de genes HLA clássicos, sendo que na região de classe I se localizam os *loci* HLA-A, -B e -C e, na região de classe II, os *loci* DPA1, DPB1, DQA1, DQB1, DRA, DRB1 (Williams, 2001).

## 1.4 Polimorfismo nos *loci* HLA

O elevado polimorfismo nos genes HLA torna pouco provável que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente na população expressem moléculas HLA idênticas. Essa diferença genética pode ser vista como a base da rejeição do enxerto (Buhler *et al.*, 2012). O polimorfismo nos *loci* HLA torna esse sistema o que se apresenta com maior variabilidade genética no genoma humano (Horton *et al.*, 2004). Um total de 12406 sequências de alelos HLA foram publicadas no banco de dados *Immunogenetics HLA* (IMGT/HLA) versão 3.18.0 de outubro de 2014 (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>), sendo um banco de dados específico para sequências HLA. Na figura 2 e tabela 1 pode ser observado o número de novos antígenos e alelos HLA identificados e publicados de 1987 a setembro de 2014. Considerando os *loci* clássicos HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1, mais de 11.000 variantes alélicas já foram identificadas até o momento (Robinson *et al.*, 2013). Entre os *loci* HLA Classe I, o HLA-B é o mais polimórfico com mais de 3500 alelos descritos (Horton *et al.*, 2004). Esta variabilidade tem crescido continuamente devido à descoberta de novos alelos, podendo resultar na codificação de proteínas que diferem umas das outras em um ou mais aminoácidos (Pereira *et al.*, 2009).

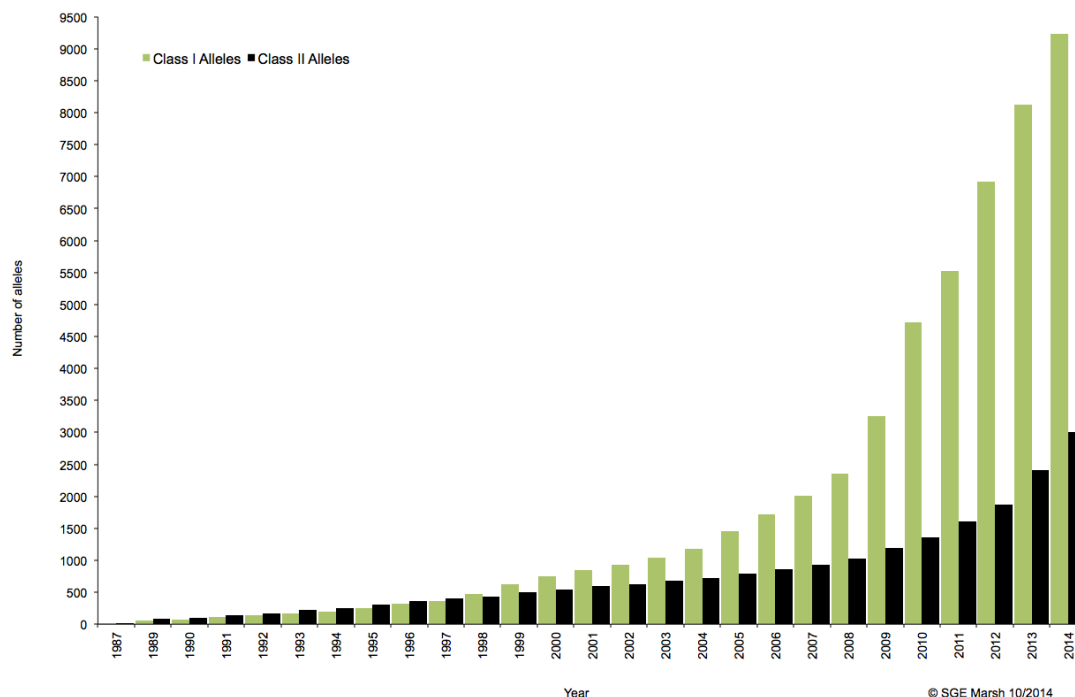


Figura 2: Número de antígenos e alelos HLA identificados de 1987 a setembro de 2014. Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html> (Robinson *et al.*, 2013)

**Tabela 1:** Número de alelos, proteínas e alelos nulos nos *loci* HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1.

Genes	HLA Classe I			HLA Classe II	
	A	B	C	DRB1	DQB1
Alelos	2946	3693	2466	1582	712
Proteínas	2077	2741	1739	1165	473
Alelos nulos	138	122	74	36	17

Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html> (Robinson *et al.*, 2013). Acessado em dezembro de 2014.

As posições polimórficas nas sequências de aminoácidos do *locus* HLA-B, de acordo com a versão 3.15.0 do IMGT/HLA banco de dados (Robinson *et al.*, 2013) podem ser, como exemplo, observadas na figura 3A e 3B.

O polimorfismo de base única (SNP) é o tipo mais comum de variação observada nos *loci* HLA (Horton *et al.*, 2004). Polimorfismos do tipo inserção ou deleção (InDel) (Stewart *et al.*, 2004), número variável de cópias (CNVs) e conversão gênica são outros mecanismos de geração de diversidade genética nos *loci* HLA (Trowsdale *et al.*, 2013; Street *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2009; McCarroll *et al.*, 2006; Simon-Sanchez *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2008). Os haplótipos HLA-DR consistem de números de cópias de genes DR codificantes e não-codificantes. As sequências DRB expressas são determinadas para quatro *loci* DRB\*1, 3, 4 e 5. As sequências DRB1 são altamente polimórficas, estão presentes em todos os haplótipos, enquanto o DRB\* 3, 4 e 5 estão presentes somente em alguns haplótipos.

A diversidade nucleotídica sinônima em genes humanos não HLA é cerca de 0,03% a 0,11% (Li *et al.*, 1991). Por outro lado, a diversidade nucleotídica sinônima é cerca de 4,0% para classe I e de 8,0% para o *locus* DRB1 (Satta 1992; Takahata, 1993). Este valor é 50 a 100 vezes maior que os *loci* não HLA. Klein *et al.* (1986) concluíram que essa diferença não pode ser atribuída à alta taxa de mutação nos *loci* HLA, porque a taxa de substituição nucleotídica sinônima estimada de comparações interespecíficas de genes DRB1 é baixa quanto a observada para outros genes (Satta, 1992).

As substituições de nucleotídeos entre as diferentes linhagens alélicas HLA são somente uma vez e meia maior no *exon 2* que nos *introns*, o que elevou a 20 vezes a magnitude em comparação com os alelos dentro de cada linhagem alélica. Esta característica pode indicar seleção no *exon 2*, que codifica a PBR (*Peptide Biding Region*). De acordo com Takahata *et al.*, 1998, (1) a diversidade nucleotídica tanto intra quanto interlinhagem HLA é maior nos *exons* que codificam o PBR do que nos *exons* que codificam outras regiões; (2) para a maioria dos *exons*, a diversidade entre linhagens é muito maior do que a diversidade nucleotídica dentro

das linhagens; (3) a média de diversidade dentro e entre as linhagens é pelo menos 20 vezes maior que em outros *loci* não HLA; e (4) a diversidade nucleotídica é estimada em  $3,9 \pm 1,2\%$  no *locus* HLA-A,  $3,4 \pm 1,1\%$  no *locus* HLA-B e  $6,0 \pm 1,1\%$  no *locus* HLA-DRB1. A diversidade nucleotídica sinônima é muito maior nos *loci* HLA do que a observada nos *loci* não HLA. Na figura 3B observa-se que a maioria das mutações nos *loci* HLA resultou em troca de aminoácido.

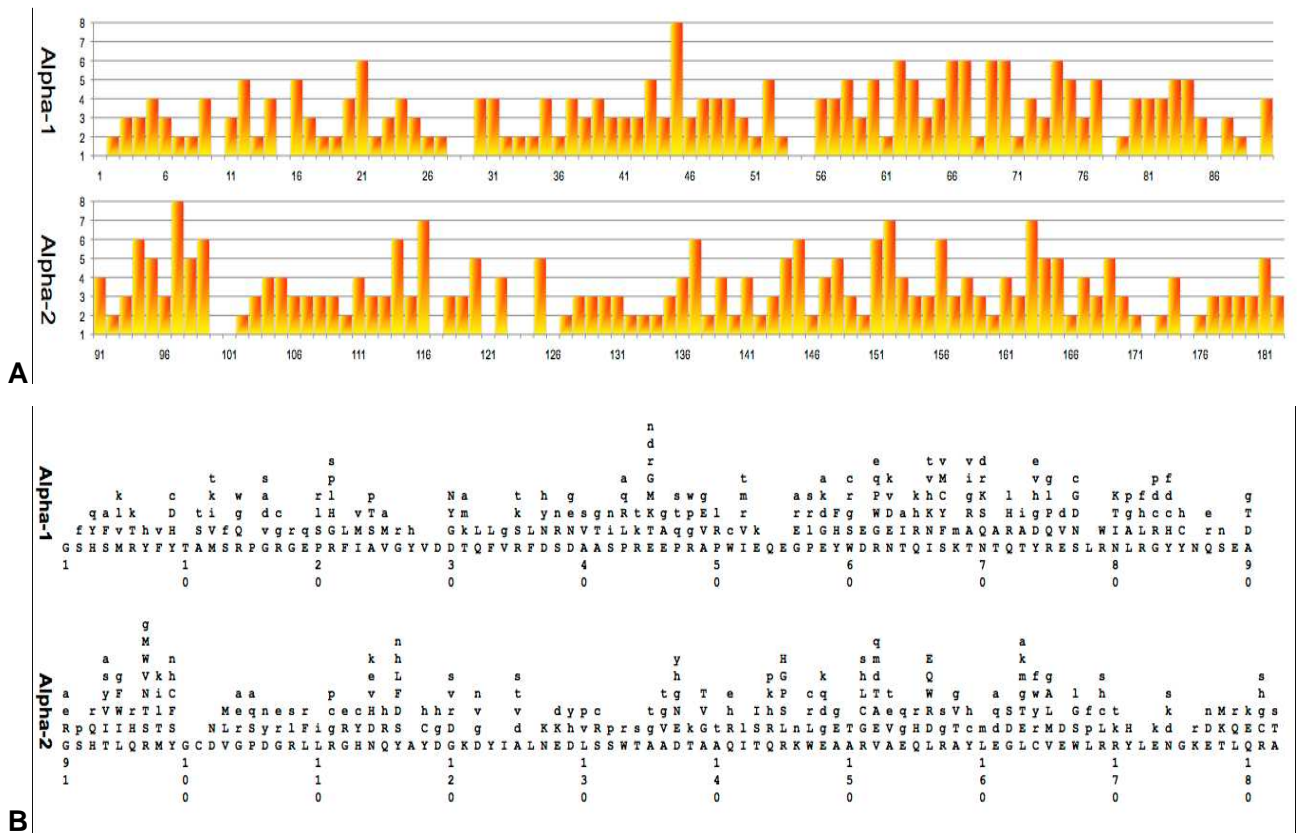


Figura 3: Mapa das posições polimórficas em sequência do *locus* HLA-B. A) representadas por meio do número de aminoácidos diferentes encontrados em uma determinada posição. O número 1 no eixo y indica as posições monomórficas. B) Aminoácidos polimórficos encontrados em cada posição comparados com uma sequência consenso com as posições polimórficas empilhados em colunas acima da base de consenso. Estas colunas são ordenadas com os aminoácidos mais frequentes na base da coluna. Os aminoácidos que são observados uma única vez nesta posição são mostrados com letra minúscula (Robinson *et al*, 2013).

## 1.5 Nomenclatura HLA

Com a elevada diversidade genética tornou-se necessário o estabelecimento de regras para a nomenclatura dos *loci* HLA, tendo sido organizado, em 1968, o primeiro encontro do Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (WHO Nomenclature-Committee, 1968). O nome de cada alelo HLA tem um número único correspondente até quatro conjuntos de dígitos separados por dois pontos. O nome do alelo HLA é dependente da sequência de DNA do alelo e do seu mais próximo alelo HLA relacionado. Todos os alelos HLA recebem um nome com pelo menos quatro dígitos, o que corresponde aos dois primeiros conjuntos de dígitos (Marsh *et al.*, 2010).

Um código de quatro dígitos distingue os alelos que diferem em nível de proteínas codificadas. Desta forma, foi possível acomodar os diferentes alelos, identificados por meio de métodos moleculares, constituindo cada grupo sorológico. A utilização de um asterisco depois da designação do nome do *locus* permitiu distinguir a caracterização alélica por métodos moleculares ou por métodos sorológicos. Em 1990, foi adicionado um quinto dígito para distinguir as sequências que diferem apenas por substituições nucleotídicas sinônimas (mutações silenciosas) (Bodmer *et al.*, 1991).

O banco de dados IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>) contém uma compilação das sequências HLA humanas e ferramentas para a exploração desses dados, como o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). A base de dados do IMGT/HLA é atualizada regularmente e um comitê internacional se reúne periodicamente para padronizar a nomenclatura HLA, que foi submetida à atualização nos últimos anos para acomodar o grande número de novos alelos. Em resumo, cada *locus* tem a sua própria designação seguida por um asterisco (tais como HLA-A\* e HLA-C\*). Estes são seguidos por designações de alelos, que são números exclusivos que compõem até quatro conjuntos de dígitos separados por dois pontos (figura 4). Um sufixo, também, pode ser adicionado ao nome do alelo para indicar proteínas com nula (N) ou baixa (L) expressão e aquelas que são secretadas (S) no citoplasma (C), aberrante (A), ou questionável (Q).



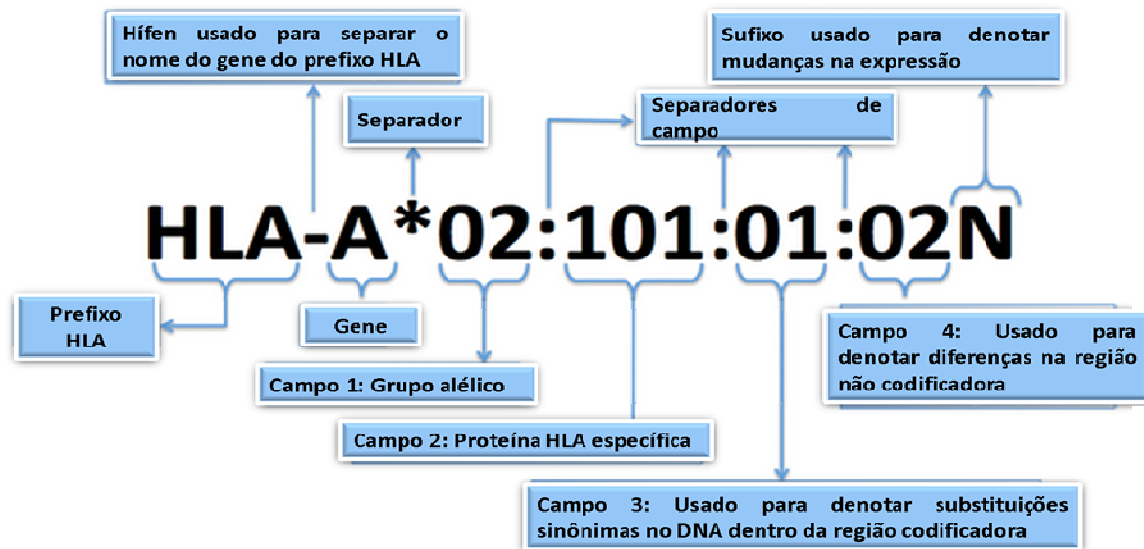


Figura 4: Nomenclatura HLA oficial definida pelo Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde. Fonte: <http://hla.alleles.org/alleles/index.html>.

### 1.6 Evolução do sistema HLA

O MHC originou-se de repetidas duplicações e conversões de genes ao longo de milhões de anos de evolução dos vertebrados (Kasahara *et al.*, 1996; Kasahara *et al.*, 1997). A grande quantidade e diversidade de informação disponível sobre a variabilidade, estrutura e função dos genes do sistema HLA apresentam padrões de variação que mostram sinais evidentes de seleção. A frequência de indivíduos homocigotos nos *loci* HLA é significativamente inferior ao esperado em condições neutras em inúmeras populações humanas (Tiercy *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 2000; Mack *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2004). A variação nos *loci* HLA é essencialmente concentrada nas regiões envolvidas na codificação dos sítios de ligação aos antígenos dos receptores de membrana, situação susceptível de não ter sido originada a partir de uma evolução neutra (Parham *et al.*, 1988; Valdes *et al.*, 1999). O maior número de substituições não sinônimas nas regiões que codificam para os sítios de ligação aos antígenos revela, também, a atuação da seleção natural, privilegiando o aumento da variação funcionalmente relevante (Hughes *et al.*, 1988).

Os alelos de diferentes *loci* HLA são frequentemente encontrados nos cromossomos em combinações que ocorrem em frequências distintas daquelas esperadas, com base na associação aleatória de alelos em *loci* diferentes, resultando em desequilíbrio de ligação (DL), uma característica genética observada entre os genes HLA de classe I e II, apresentando valores significativos em várias populações do mundo (Trachtenberg, Vinson *et al.*, 2007; Tu,

Mack *et al.*, 2007; Mack, Tu *et al.*, 2009). O DL é muitas vezes quase completo entre os *loci* fortemente ligados, enquanto genes menos fortemente ligados (separados por uma distância física maior) mostram valores intermediários de DL (Hedrick, P. W, 2000). Desta forma, apesar da grande quantidade de alelos expressos em cada *locus* HLA, o número de haplótipos observados na população é muito menor que o esperado teoricamente (Myers *et al.*, 2005).

Em algumas regiões do MHC, a concordância entre a distância física e a taxa de recombinação é menor que o esperado, dado o padrão de 1% de recombinação por Mb de DNA na meiose. A taxa de recombinação entre os *loci* HLA-A e HLA-B, por exemplo, é de 0,31% (Carrington, 1999), o que é menor que o esperado para um segmento de DNA de 1,4 Mb. Esse contraste tem sido atribuído ao DL, que pode estar associado à ocorrência de sítios de recombinação não aleatórios (Carrington, 1999). A diversidade haplotípica é inversamente relacionada ao DL entre os *loci* HLA, e a diminuição do DL entre os *loci* é proporcional ao aumento da distância física e, de uma forma geral, reflete sua probabilidade aumentada de recombinação (Dawson *et al.*, 2002). Sob condições neutras, uma mutação recém-introduzida inicialmente seria de baixa frequência na população, mas, ao mesmo tempo, demonstra completo DL com o haplótipo na qual se originou. Com o passar do tempo, a frequência deve aumentar para ele ser detectável no restante da população, mas o DL com as variantes ligadas diminuirão gradualmente devido à recombinação (Hedrick, 2000). Evidências empíricas sugerem, entretanto, que esta relação entre DL e distância não é uniforme e que o genoma humano, ao invés disso, é organizado em blocos regionais de alto DL interno, com pouco ou nenhum DL entre os blocos. Dentro dos blocos, poucos haplótipos comuns representam a maioria dos cromossomos até mesmo em diferentes populações, e os eventos de recombinação são localizados entre os blocos no chamado “hotspots” de recombinação (Hedrick, 2000).

As causas possíveis para o DL incluem mutações, migrações, miscigenação racial e seleção natural. Uma hipótese mais remota propõe que alguma vantagem evolutiva é derivada da associação de certos alelos HLA e que esta vantagem seria suficiente como justificativa para que os mecanismos habituais randômicos e de recombinação genética não ocorram. Este extenso desequilíbrio de ligação tem aplicação clínica em transplante de órgãos e tecidos (Bortolotto *et al.*, 2012). Os pacientes que possuem haplótipos com alelos HLA com ligações mais fracas terão mais dificuldades para encontrar doadores (Sanchez-Mazas *et al.*, 2000; Bortolotto *et al.*, 2012).

### 1.7 Diversidade HLA nas populações

As frequências alélicas e haplotípicas dos *loci* HLA variam entre as diferentes populações e grupos étnicos. Esta variabilidade nos genes HLA tem sido amplamente investigada em diferentes populações, de forma a otimizar a busca por doadores para transplantes (Tu *et al.*, 2007). As frequências alélicas nos genes HLA têm demonstrado ser mais similares entre populações com origens comuns. Desta forma, as frequências alélicas e a presença ou ausência de determinados alelos específicos permitem inferir sobre a origem e relações entre as populações e podem ser úteis no recrutamento de doadores (figura 5). O extenso polimorfismo e o desequilíbrio de ligação existente entre diferentes *loci* do sistema HLA têm sido amplamente utilizados como marcadores genéticos em estudos antropológicos (Pimtanonthai *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2002; Piancatelli *et al.*, 2004; Ayed *et al.*, 2004).

A caracterização da diversidade alélica e haplotípica nos principais genes do sistema HLA constitui uma importante ferramenta em estudos populacionais. Estes genes altamente polimórficos têm se revelado como muito importantes no estudo da história das migrações humanas (Arnaiz-Villena *et al.*, 2001; Gómez-Casado *et al.*, 2001).

Os alelos dos diferentes genes do sistema HLA são frequentemente transmitidos em bloco de geração em geração e certas combinações observadas nos haplótipos são encontradas mais frequentemente do que o esperado pelas respectivas frequências alélicas. Nesse caso, o desequilíbrio de ligação resultou de uma localização fisicamente próxima dos *loci* envolvidos e do efeito das forças seletivas (Huttley *et al.* 1999). Têm sido identificados inúmeros haplótipos do sistema HLA, cuja distribuição geográfica coincide com a existência de relações passadas entre as populações (Arnaiz-Villena *et al.*, 2001; Sanchez-Velasco *et al.*, 2003). Por exemplo, os haplótipos A\*010101-B\*0801-DRB1\*030101 e A\*2902- B\*4403-DRB1\*0701 são de origem Europeia, considerando-se o primeiro de influência Celta (Muro *et al.*, 2001).

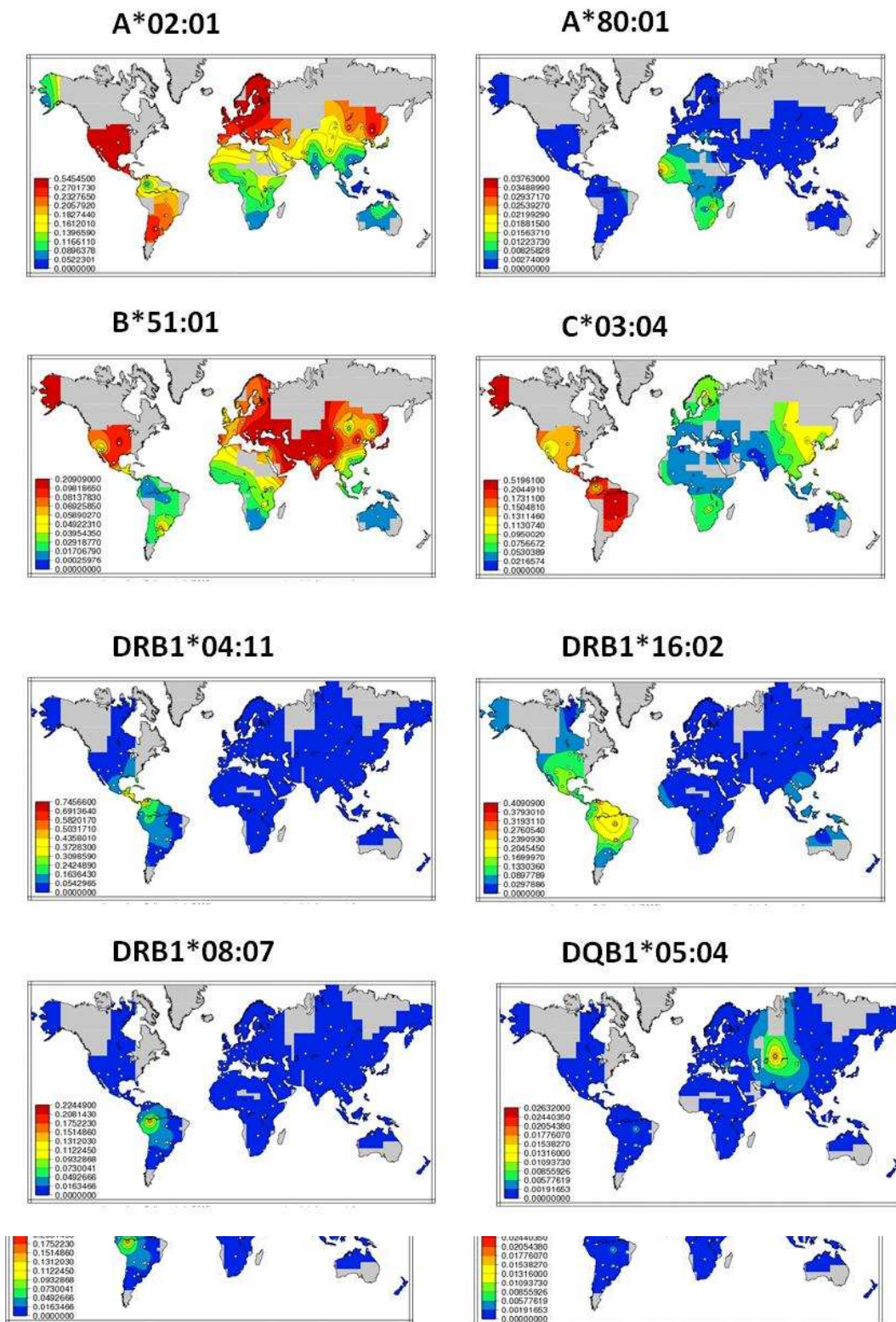


Figura 5: Distribuição HLA na população mundial. Supporting online material Solberg *et al.* (2008). Fonte: [www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata).

## 1.8 Importâncias do sistema HLA nos transplantes de órgãos e tecidos

### 1.8.1 Transplantes de órgãos sólidos

A rejeição tem sido a principal barreira para o sucesso do transplante de órgãos, envolvendo o reconhecimento de antígenos incompatíveis nos tecidos do enxerto, que induzem resposta imune celular e humoral e subsequente destruição do órgão transplantado (Opelz *et al.*, 2007). Os principais genes envolvidos na compatibilidade genética em transplantes são os genes do sistema HLA. As incompatibilidades HLA são caracterizadas por diferenças genéticas entre receptor e doador nos alelos dos *loci* HLA. O receptor que recebe um transplante de órgão com o menor número de incompatibilidades HLA terá uma melhor sobrevivência do enxerto, pois as diferenças genéticas entre receptor e doador podem estimular o sistema imune do receptor a rejeitar o enxerto (Opelz *et al.*, 2007). Nos últimos anos, devido à modernização dos procedimentos para os transplantes, como a melhora do tratamento com drogas imunossupressoras, redução do tempo de isquemia fria de órgãos de doador falecido entre outros, tem sido mostrada uma tendência de se reduzir a importância da compatibilidade HLA nos transplantes renais (Su *et al.*, 2004). Entretanto, várias descobertas recentes destacam a importância da compatibilidade HLA como um fator que reduz significativamente as taxas de rejeições e falhas dos enxertos (Süsal *et al.*, 2013). Existe até mesmo uma tendência em se dar mais importância à compatibilidade HLA entre o par receptor-doador, estendendo os estudos de HLA a nível alélico ou mesmo de epítipo (Süsal *et al.*, 2013). O impacto da compatibilidade HLA pode ser observado na Figura 6, na qual rins de doadores vivos aparentados transplantados com HLA idêntico ao receptor tiveram melhores taxas de sobrevivência do que rins transplantados com doadores vivos relacionados haploidênticos ou de doadores falecidos.

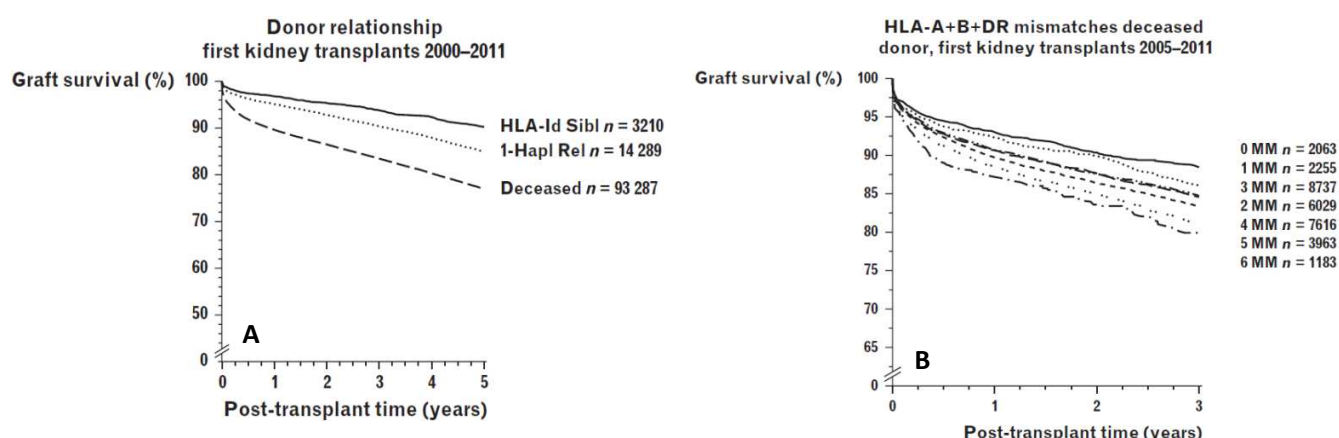


Figura 6. Taxas de sobrevivência de enxertos em relação a A) grau de parentesco entre o par receptor-doador (Süsal *et al.*, 2013), B) Número de incompatibilidades HLA-A, HLA-B e HLA-DR para receptores de órgãos de doadores falecidos (Valor  $P < 0.001$ ) (Süsal *et al.*, 2013). MM = Mismatch

Outro fator que influencia diretamente na sobrevida do enxerto é o padrão imunológico do receptor, caracterizado principalmente pela presença de aloanticorpos anti-HLA (AloAc) de classe I e II no sangue do receptor antes do transplante (Süsal *et al.*, 2009) (figura 7). Desde os primeiros relatos feitos por Patel e Teresaki (Patel *et al.*, 1969), demonstrando o importante papel da resposta imune na rejeição mediada por anticorpos (RMA) de órgãos sólidos, vários estudos estão sendo publicados sobre AloAc nos soros de receptores antes do transplante em protocolos de classificação de risco de rejeições aguda e crônica do enxerto (Nascimento *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2014). Além disso, outros estudos têm mostrado, também, a importância de se detectar esses AloAc no pós-transplante, como uma medida para identificar rejeições subclínicas mediada por anticorpos anti HLA do doador (DSA) e alertar os médicos a definirem as estratégias de tratamento com drogas imunossupressoras, visando aumentar a sobrevida do enxerto (Mizutani *et al.*, 2007). A presença de DSA está associada com uma significativa redução na sobrevida do enxerto, quando comparado com a sobrevida do transplante de receptores que não apresentam DSA (Lachmann *et al.*, 2009).

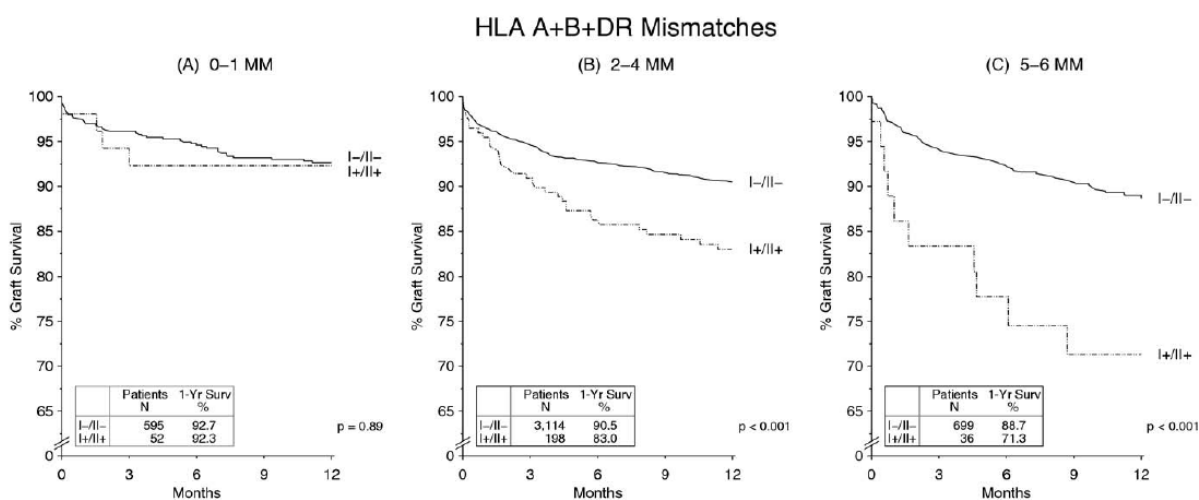


Figura 7: Influência da compatibilidade HLA na sobrevida do enxerto em pacientes com anticorpos anti HLA classe I e II (Opelz *et al.*, 2007).

Receptores que apresentam simultaneamente anticorpos contra os antígenos HLA de Classe I e II no pré-transplante apresentam alto risco imunológico de disfunção do enxerto, principalmente se esses anticorpos específicos forem DSA (Lachmann *et al.*, 2009) (Figura 8). Além da presença de DSA, os níveis desses anticorpos no soro do receptor, caracterizados pelo valor da Intensidade Média de Fluorescência (MFI - *Mean Fluorescence Intensity*) demonstrado no exame de PRA (Painel de reatividade de anticorpos contra antígenos HLA),

são parâmetros de fundamental importância na classificação de risco, antes do transplante, e da identificação de rejeição, após o transplante renal (Nascimento *et al.*, 2014). Com base na Figura 7, o impacto deletério da positividade para ambas as classes de AloAc anti HLA na sobrevida do enxerto foi quase abolida nos pacientes que receberam rins com boa compatibilidade HLA (0 a 1 incompatibilidade). Um efeito fortemente deletério do AloAc anti HLA foi observado na presença de 2-4 ou 5-6 incompatibilidades HLA, em comparação com receptores sem AloAc anti-HLA. Observa-se, portanto, que a compatibilidade HLA é relevante, principalmente para receptores com anticorpos AloAc anti HLA Classe I e II. Assim, o monitoramento da presença de DSA antes do aparecimento de anticorpos De novo após o transplante é considerado de extrema relevância na regulação da resposta imune com drogas imunossupressoras e no sucesso do transplante (Süsal *et al.*, 2009). A associação entre a presença de AloAc e o aumento do número de incompatibilidades HLA entre o par receptor-doador reduziu a taxa de sobrevida do enxerto (figura 7). Assim, o número de incompatibilidades HLA e o padrão imunológico do receptor antes do transplante desempenharam papel fundamental na sobrevida e na função do enxerto em longo prazo (Figura 8) (Lachmann *et al.*, 2009).

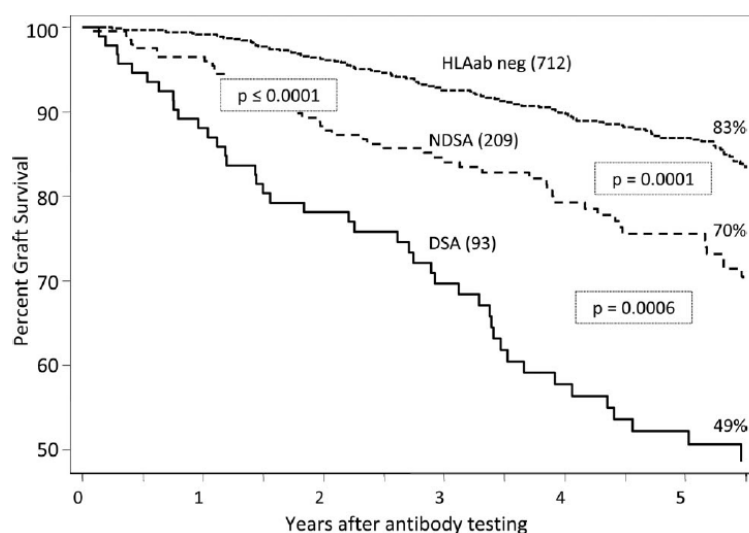


Figura 8: Sobrevida de enxerto de pacientes sem anticorpos anti-HLA, com anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA) e com anticorpos anti-HLA não DSA (NDSA) e (Lachmann *et al.*, 2009).

A ocorrência de rejeições agudas foi demonstrada como fator de risco predisponente para o desenvolvimento de rejeição crônica do enxerto (Süsal *et al.*, 2009). Assim, a RMA

interfere piorando a função dos transplantes realizados entre receptores e doadores com incompatibilidade HLA, contribuindo significativamente para o aumento das taxas de perda do enxerto (Gebel *et al.*, 2003).

Os receptores podem ser classificados com base no risco imunológico de terem rejeição aguda ou crônica em: 1) Receptor em baixo risco (BR); 2) Receptor em médio risco (MR); 3) Receptor em alto risco (AR) e 4) Receptor em muito alto risco (MAR), com base nos resultados do exame de reatividade de anticorpos contra painel de HLA, usando “Single Antigen Beads” (PRA-SAB) de classe I e II (nossos artigos no capítulo 3).

Uma análise mais detalhada da compatibilidade HLA entre o par receptor-doador pode ser feita considerando o nível estrutural da molécula HLA (Duquesnoy, 2001) utilizando, para isso as sequências de aminoácidos presentes nos alelos e agrupadas como *epiets* (uma variante do epítopo) que correspondem a uma sequência linear de três aminoácidos. Os *epiets* fornecem uma descrição dos epítomos que corresponde ao sítio onde ocorre a ligação dos ALoAc anti-HLA (Duquesnoy, 2001). Com base nessa análise, torna-se possível avaliar as incompatibilidades HLA aceitáveis nos doadores para receptores com ALoAc anti-HLA denominados de pacientes sensibilizados e com anticorpos anti-doador. O número de *epiets* diferentes nas moléculas HLA do receptor e o doador representam parâmetros imunogênicos essenciais na indução da resposta imune do receptor para a síntese de ALoAc contra os *epiets* incompatíveis nas moléculas HLA do doador (Duquesnoy *et al.*, 2002; Duquesnoy *et al.*, 2003; Duquesnoy *et al.*, 2005; Duquesnoy, 2006) (figura 9).

### **1.8.2 Transplantes de tecidos**

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) com doadores voluntários não aparentados é o tratamento alternativo mais amplamente utilizado, quando não se identifica um doador compatível na família. O principal critério para a seleção do doador permanece sendo a compatibilidade HLA. No entanto, a diversidade HLA se tornou um desafio na busca e seleção de doador para o TCTH, forçando algumas vezes a aceitação de doadores com alguma incompatibilidade HLA. Análises de sobrevida mostram alto risco de morte se incompatibilidades HLA estiverem presentes entre o par receptor-doador no TCTH (Figura 10). Riscos mais elevados foram observados para incompatibilidades HLA-A, -B e -DRB1. A presença ou ausência de qualquer incompatibilidade HLA a nível alélico deve ser considerada como clinicamente relevante na seleção do doador (Fürst *et al.*, 2013). Assim, a seleção do doador com boa compatibilidade HLA representa uma das estratégias essenciais e



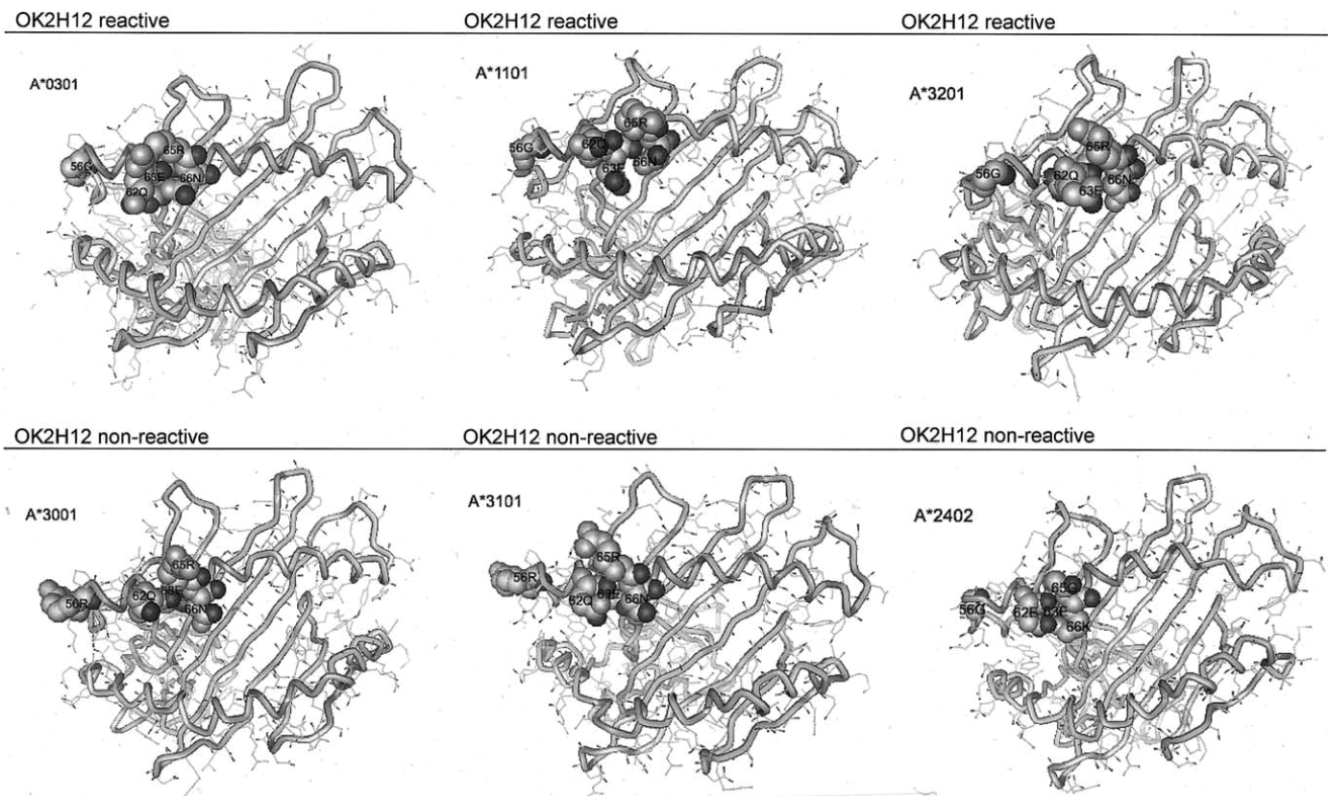


Figura 9: Sequência de resíduos de aminoácidos polimórficos da estrutura do HLA necessários para a ligação dos AloAc com os Eplets, aqui representados pelo anticorpo monoclonal OK2H12. No painel acima, os alelos A\*03:01, A\*11:01 e A\*32:01 compartilham Eplets que são críticos para a ligação do OK2H12. No painel abaixo, os alelos A\*30:01 e A\*31:01 diferem daqueles do painel acima no resíduo 56R e não são ligantes do mesmo anticorpo. O alelo A\*24:02 possui diferentes resíduos em várias posições e, também, não é ligante do anticorpo OK2H12 (Adaptado de Duquesnoy *et al.*, 2005).

diretamente relacionada à sobrevida do enxerto no TCTH, cuja preferência tem sido dada para o doador com compatibilidade 8x8 (HLA-A, -B, -C, -DRB1) (Figura 10). Na presença de incompatibilidade HLA na classe I, sugere-se a busca de doador com compatibilidade HLA-DQB1 (9x10) (Fürst *et al*, 2013).

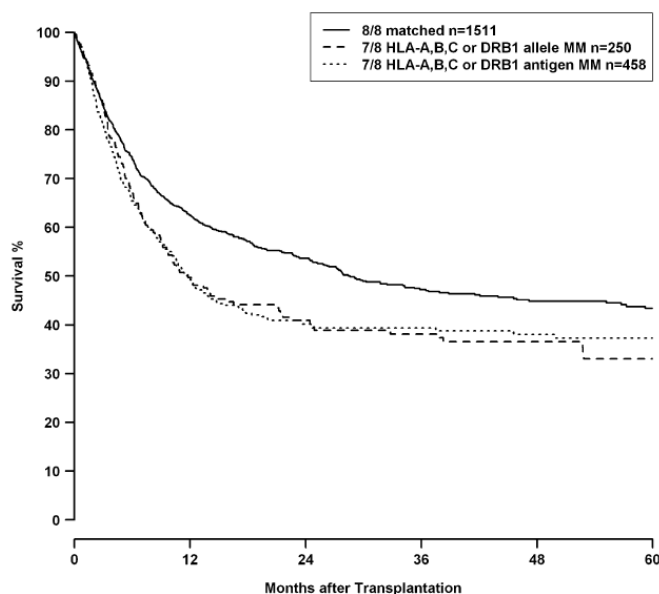


Figura 10: Sobrevida de pacientes transplantados em relação à compatibilidade alélica nos *loci* HLA-A, -B, -C, ou -DRB1. Na comparação entre incompatibilidade alélica e antigêncica ( $P=0.924$ ) e na 8/8 versus 7/8 ( $P = 0,001$ ). (Fürst *et al*, 2013).

### 1.9 Transplantes de órgãos e tecidos no Brasil

Nos últimos anos, o número de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) tem crescido de forma preocupante. No Brasil, estima-se que um milhão de pessoas tenha problemas renais, embora 70% não tenham conhecimento do fato e cerca de 100.000 pessoas encontra-se em tratamento por hemodiálise, à espera de um transplante segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) (Censo SBN-2012 <http://www.sbn.org.br/censo/2012>; Medina-Pestana *et al.*, 2011). A cada ano, cerca de 21 mil brasileiros iniciam o tratamento hemodialítico ou diálise peritoneal. São raros os casos de pacientes que apresentam recuperação parcial do funcionamento dos rins, deixando o tratamento hemodialítico, e poucos têm a chance de receberem um tratamento cirúrgico, como o transplante renal.

Na lista de espera por transplante com rim de doador falecido da CNCDO (Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos) da região Metropolitana de Belo Horizonte/MG, cerca de 40% dos receptores ativos avaliados pelo exame PRA, apresentavam AloAc específicos anti HLA e são considerados pacientes sensibilizados. Aproximadamente 10% desses pacientes são considerados altamente sensibilizados, o que significa que eles apresentaram reatividade com PRA >80%. Para esse grupo de pacientes, a probabilidade de conseguir um transplante fica reduzida, apesar do longo tempo na lista de espera.

Atualmente, mais de 70 doenças malignas e não malignas, incluindo leucemias, linfomas, anemias falciformes e aplástica, síndrome mielodisplásica, imunodeficiências e algumas doenças metabólicas são tratadas com TCTH. Em todo o mundo, mais de um milhão de TCTH já foram realizados. Cerca de 50.000 pacientes recebem TCTH por ano em todo o mundo, sendo 53% transplantes autólogos e 47% alogênicos com doadores aparentados ou não aparentados. No Brasil, mais de 20.000 TCTH já foram realizados até o ano de 2012. Desse total, cerca de 7,0% foram com doadores não aparentados (Bouzas, 2011). Entretanto, apenas 30% dos pacientes encontrarão este doador entre os seus familiares, isso levou à criação dos cadastros de doadores voluntários ao redor do mundo, totalizando mais de 20 milhões de doadores cadastrados. Apesar deste grande número de doadores, muitos pacientes no Brasil e em todo o mundo ainda encontram dificuldades para identificar um doador HLA-compatível, o que significa que algumas especificidades HLA, típicas da população brasileira, podem não estar representadas no REDOME (Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea) e, por este motivo, torna-se necessária a inclusão de novos doadores ao registro, para ter um banco que atenda à variabilidade genética da população brasileira.

Um programa para normatizar atividades de transplantes financiados SNT/Sistema Único de Saúde (SUS) do Ministério da Saúde (MS) foi desenvolvido, abrangendo as atividades hospitalares, procedimentos médicos, laboratoriais e o fornecimento de medicamentos relacionados à utilização de células, tecidos, órgãos ou partes do corpo para fins de transplante. Esse é o maior programa público de transplantes do mundo, com uma logística de alocação de órgãos justa e sem privilégios sociais ou culturais. O MS, por meio do SNT, estabeleceu as regulamentações técnicas para todas essas atividades por meio de Portarias. As Coordenações Estaduais do SNT são exercidas pelas Secretarias Estaduais de Saúde e do Distrito Federal, por intermédio das respectivas Coordenações Estaduais ou Distrital de Transplantes. As atividades da Coordenação Estadual de Transplantes poderão, também, ser delegadas à CNCDO estadual ou regional. Todos os tecidos, órgãos, células ou partes do corpo humano obtidos de doador falecido para potenciais receptores em regime de espera deverão ser distribuídos, obedecendo exclusivamente ao Sistema de Lista Única. Este é constituído pelo conjunto de potenciais receptores inscritos para recebimento de órgão, tecidos, células ou partes do corpo, obedecendo a um conjunto de critérios específicos para serem distribuídos aos potenciais receptores, constituindo assim o Cadastro Técnico Único (CTU). As CNCDOS têm a responsabilidade de coordenar todas as atividades de transplantes, no âmbito estadual ou distrital, e de manter o cadastro de potenciais receptores.

No TCTH, o SNT tem como responsabilidade o controle, a avaliação e a regulamentação das ações e atividades com a assessoria técnica e operacional do Instituto Nacional de Câncer (INCA). O INCA mantém os respectivos cadastros do REDOME, do RENACORD (Registro Nacional de Doadores de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário) e do REREME (Registro Brasileiro de Receptores de Medula Óssea) atualizados com as informações dos doadores, das unidades de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP) e da condição clínica dos receptores. Assim, quando um doador não é encontrado por meio da busca nacional, o REDOME dará andamento à busca internacional de doador não-aparentado. O gerenciamento da lista de potenciais receptores de células-tronco hematopoéticas é realizado por meio do sistema informatizado REREME.

O Laboratório de histocompatibilidade e imunogenética é o estabelecimento certificado que tem as condições exigidas em Portarias do MS, como: instalações físicas adequadas, equipamentos modernos, profissionais qualificados e metodologias adequadas à realização de exames de histocompatibilidade e imunogenética no período pré-transplante em doadores e receptores de órgãos, tecidos e células-tronco hematopoéticas, e os exames para o monitoramento imunológico de receptores no período pré e pós-transplante. O laboratório de histocompatibilidade desempenha papel fundamental nos transplantes, tendo as responsabilidades de garantir as boas práticas clínicas, padrões técnicos e de qualidade relacionados à coleta, identificação, registro, transporte, processamento, armazenamento, descarte de amostras biológicas de doadores e receptores, além da emissão de laudos de exames com os resultados das avaliações imunológicas dos pacientes.

Esse sistema organizacional de atividades de transplantes no Brasil levou o país a ocupar o terceiro lugar no mundo em números absolutos de transplantes realizados por ano. Entretanto, o número de pesquisadores especializados e a disponibilidade de literatura específica na área de histocompatibilidade, imunogenética e imunologia de transplantes não mantiveram a mesma proporção no Brasil. O ensino da Imunologia de transplantes para alunos na área de saúde ainda é deficiente pela falta de profissionais especializados e de literatura apropriada na língua portuguesa o que nos motivou a publicar o capítulo denominado Fundamentos de Imunologia de Transplante, no livro Manual de Transplantes. Nos hospitais de Belo Horizonte, principalmente no hospital de Pronto-Socorro João XXIII, várias palestras foram proferidas com o objetivo de levar aos estudantes (técnicos, biomédicos, biólogos, farmacêuticos, médicos e residentes) ou profissionais da área os conhecimentos básicos fundamentais para o entendimento da Imunologia de Transplantes de Órgãos e Tecidos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os transplantes de órgãos e tecidos representam a melhor ou a única opção terapêutica para várias doenças. O transplante de rim oferece aos pacientes em diálise a chance de uma maior independência e melhor qualidade de vida para exercer suas atividades normalmente. O transplante pode ocasionar, também, a diminuição dos riscos de mortalidade, quando comparados aos da diálise. Por outro lado, em muitos casos, o transplante de células-tronco hematopoiéticas pode ser a única opção de tratamento para algumas doenças como, a aplasia de medula óssea. Assim, os estudos sobre Histocompatibilidade nos transplantes de Órgãos e Tecidos com ênfase nas moléculas HLA são essenciais para o desenvolvimento de métodos na busca de conhecimento sobre a compatibilidade entre o par receptor-doador, com o objetivo de reduzir as intercorrências como rejeição e perdas do enxerto, aumentar a sobrevida do enxerto e do paciente. A importância dos transplantes de órgãos e tecidos para muitos pacientes, a ausência de um tratamento alternativo para algumas doenças e o impacto disso na saúde pública foram os motivos que tem nos estimulado no desenvolvimento desse trabalho de tese, que faz parte do projetos sobre “Ensaio clínico retro e prospectivo para avaliar aloanticorpos e marcadores moleculares na evolução e na sobrevida dos transplantes renais humanos com órgãos de doadores falecidos e vivos” e os que serão realizados em colaboração com a Rede Brasil de Imunogenética que está sendo desenvolvido com participação do nosso grupo de pesquisa. Os resultados desses estudos já estão sendo usadas na elaboração de protocolos para a classificação de riscos de receptores, seleção do par receptor-doador e definição de tratamentos individualizados com drogas imunossupressoras e antibióticoterapia.

Nesse sentido, uma nova metodologia empregando ferramentas da Álgebra Linear para análise de similaridades e extração de padrões em dados genéticos foi desenvolvida. Com base nesses conhecimentos, espera-se ser possível o desenvolvimento de novas ferramentas e técnicas de apoio à avaliação imunológica na escolha do melhor par receptor-doador para o transplante, reduzindo as chances de intercorrências clínicas e imunológicas no pós-transplante aumentando a sobrevida do enxerto e do paciente.

### **3. OBJETIVOS**

## **Objetivo Geral**

Determinar a diversidade e avaliar a heterogeneidade genética dos ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA) na população mineira e brasileira e avaliar imunologicamente, pela compatibilidade HLA e presença de anticorpos anti-HLA, receptor-doador para transplantes.

## **Objetivos específicos**

- 1) Identificar novos alelos HLA-A, -B e -DRB1 na população de Minas Gerais.
- 2) Determinar a distribuição de alelos e haplótipos HLA e comparar a população brasileira com outras populações mundiais.
- 3) Determinar os riscos de rejeição com base no padrão imunológico do receptor.
- 4) Determinar a taxa de sobrevida em receptores submetidos ao transplante renal com doador vivo ou falecido.
- 5) Empregar os dados obtidos para desenvolver ferramentas para a análise e predição de risco de rejeição na seleção de receptores-doadores para o transplante de órgãos e tecidos (dados preliminares e avaliações estão em andamento).



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

**DESCRIÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES NOS *LOC*/HLA EM INDIVÍDUOS  
DE MINAS GERAIS**

## Artigos 1 a 5

1. Fabreti-Oliveira RA, Santos MA, Oliveira CK, Vale EM, Vilela B, Nascimento E. Description of five novel HLA-B alleles, B\*07:184, B\*41:27, B\*42:19, B\*50:32 and B\*57:63, identified in Brazilian individuals. (2014). *Int J Immunogenet*, Feb 5. doi: 10.1111/iji.12110.
2. Fabreti-Oliveira RA, Nascimento E, Oliveira CK, Vale EM, Vilela B, Santos MA. Four novel HLA alleles, DRB1\*04:11:03, DRB1\*10:05, DRB1\*15:94 and DRB1\*16:22, identified in Brazilian individuals. (2014). *Int J Immunogenet*, 41(2):151-3.
3. Fabreti-Oliveira RA, Nascimento E, Santos MA. (2014). Description and molecular modeling of four novel HLA-B alleles identified in Brazilian individuals. *Tissue Antigens*, 83(1):55-7.
4. Fabreti-Oliveira RA, Nascimento E, Santos MA. (2013). A novel HLA allele, HLA-A\*80:03, identified in a Brazilian individual. *Tissue Antigens*, 82(5):349-50.
5. Fabreti-Oliveira RA, Santos MA, Nascimento E. (2013). Identification of a novel HLA-B allele, B\*27:102, in a Brazilian individual. *Tissue Antigens*, 82(5):350-1.

Quinze novos alelos foram identificados na população de Minas Gérias (artigos de 1 a 5) cujas sequências foram depositadas nos bancos de dados EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) e nomeados pelo Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (OMS). Novos alelos HLA, mesmo que raros na população, são importantes no contexto dos transplantes, principalmente de TCTH. As complicações relacionadas ao TCTH aumentam na proporção da disparidade de compatibilidade HLA, incluindo o risco de rejeição, desenvolvimento tardio ou incompleto do enxerto e a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Horowitz, 2004; Pereira *et al.*, 2010). Assim, a identificação dessas variantes alélicas raras no par doador-receptor tem fundamental importância no TCTH, a fim de evitar as intercorrências descritas acima.

Os dados genéticos publicados nos artigos que constituem esse capítulo poderão ser usados para ampliar e melhorar a tipificação HLA e a identificação de aloanticorpos anti-HLA, à medida que sondas, primers e peptídeos forem sendo acrescentados nos kits comerciais para essas finalidades e, conseqüentemente, melhorando a seleção do par receptor-doador.

Em conclusão, na população mineira, foram identificados e publicados 15 novos alelos HLA, assim distribuídos: um no *locus* HLA-A (HLA-A\*80:03) e 10 no *locus* HLA-B (B\*07:184, B\*27:102, B\*41:27, B\*42:19, B\*42:20, B\*50:32, B\*51:151, B\*57:63, B\*57:64, B\*58:42) para os HLA de classe I e quatro no *locus* HLA-DR1\*04:11:03, DRB1\*10:05, DRB1\*15:94 e DRB1\*16:22

para os HLA de classe II. Há grande interesse clínico na identificação de novos alelos HLA. Apesar de serem raros na população, são fundamentais para o estudo de compatibilidade HLA entre o par receptor-doador, no contexto do TCTH. A identificação de novos alelos HLA pode ser importante também em estudos de associação com doenças. Além disso, apesar desses novos alelos terem pequena probabilidade de apresentar novos epítomos, a mudança na sequência de aminoácidos pode afetar a resposta imune, por meio do aumento do repertório de peptídeos que poderão se ligar a PBR da nova molécula HLA para apresentá-lo ao sistema imune.

## A novel HLA allele, *HLA-A\*80:03*, identified in a Brazilian individual

R. A. Fabreti-Oliveira<sup>1,2,3</sup>, E. Nascimento<sup>3,4</sup> & M. A. Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

<sup>2</sup> Departamento da Ciência da Computação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

<sup>3</sup> IMUNOLAB – Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

<sup>4</sup> Instituto de Ensino, Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

**Key words:** Brazilian population; *HLA-A\*80:03*; new allele; sequencing-based typing

The *HLA-A\*80:03* allele differs from *HLA\*80:01:01:01* by two nucleotide substitutions at positions 559 and 560 in the exon 3.

Human leukocyte antigen (HLA) genes show high polymorphism and play an important role in the immune response (1). Currently, there are more than 8500 classical HLA alleles identified including 2244 HLA-A alleles according to the IMGT/HLA database 3.11.0 version (2). In this report, we describe a novel *HLA-A\*80:03* allele, which have been identified in Brazilian individual from Minas Gerais state. The sample was obtained from volunteer subject, male, self-reported ethnicity as mixed of the Brazilian Registry of Bone Marrow Donors (REDOME).

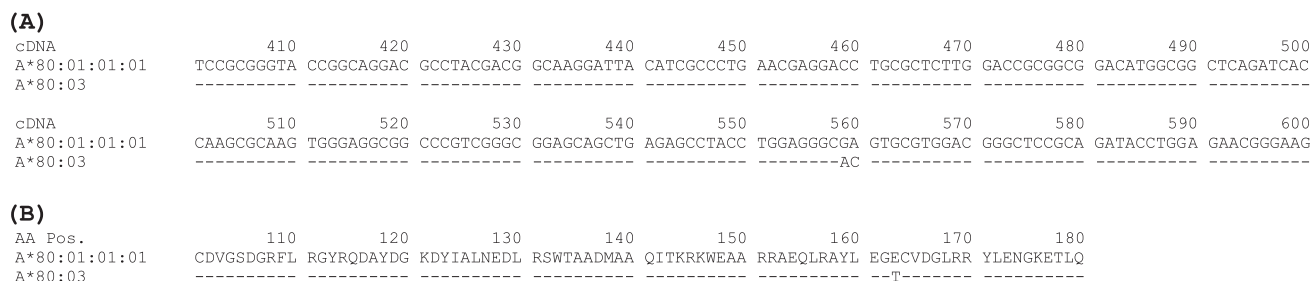
The HLA typing was first performed using LabType PCR-SSOP (polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide probe, One Lambda, Canoga Park, CA). The sample yielded unexpected probe patterns, thus was typed by sequence-based typing (SBT) with SeCore HLA sequence-based typing kits (Invitrogen, Foster City, CA, USA). No matches were found with any known HLA allelic combination, suggesting the presence of novel HLA allele. Monoallelic sequencing strategy using the group-specific Domino Stone (GSA) and locus-specific Domino Stone (LSA) single sequencing set (Protrans GmbH, Heidelberg, Germany) was also performed.

The nucleotide sequence has been submitted to the GenBank (Accession # KC433572). The name of the novel *HLA-A\*80:03* allele have been officially assigned by the World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee in January 2013. This follows the agreed policy that, subject to the

conditions stated in the most recent Nomenclature Report (3), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of new names will be published in the forthcoming WHO Nomenclature Report. The nucleotide sequences are available in the EMBL, GenBank, and DDBJ Nucleotide sequence databases. The sequence alignment between novel HLA allele sequence and its closest-related HLA allele was performed with basic local alignment search tool (BLAST) in the IMGT/HLA database (2). The similarity statistic used by BLAST was the expect value (E) parameter, which describes the number of hits one can expect to see by chance when searching a database of a particular size. A lower E-value denotes a significant match between analyzed sequences.

The HLA alleles of the donor were genotyped as *A\*30:02:01*, *A\*80:03*; *B\*15:CVPX*, *B\*82:01*; *DRB1\*08:04*, *DRB1\**. The allele codes developed by the National Marrow Donor Program (NMDP) were used to report ambiguous HLA-B typing. The most homologous sequence, obtained from the BLAST/IMGT-HLA database, was *HLA-A\*80:01:01:01* with the expect values (E) of 6.4e-119 for pair wise alignment. Compared with the most similar, the *HLA-A\*80:03* allele have two nucleotides differences at positions 559 (G to A) and 560 (A to C) in the exon 3 (Figure 1A). The nucleotide substitution results in amino acid residue changing from Glu to Thr at codon 163 (Figure 1B). Regarding the structural aspects of these new alleles, the amino acid change occurred at  $\alpha$ -helice of the  $\alpha 2$  domain within the peptide binding region and HLA-peptide T-cell recognition site.

The lineage of *HLA-A\*80* has few alleles (*A\*80:01:01:01*, *A\*80:01:01:02*, and *A\*80:02*) and low frequent in Brazilian population. The frequencies of the most closely related



**Figure 1** (A) Partial alignment of nucleotide of the exon 3 for *HLA-A\*80:01:01:01* with *HLA-A\*80:03* alleles. Numbers above the sequence correspond to nucleotide position. (B) Deduced partial amino acids from nucleotide sequences in exon 3. The number above the sequence refers to amino acid positions in the mature protein. In (A) and (B), dashes indicate nucleotides or amino acids identity with the *A\*80:01:01:01* sequence.

alleles in the Minas Gerais state mixed population was *HLA-A\*80:01:01:01* (0.0050) (4).

### Correspondence

Raquel A. Fabreti-Oliveira, BSc, MSc, CHS  
IMUNOLAB – Laboratório de Histocompatibilidade  
Genética e Imunologia de Transplantes  
Avenida Bernardo Monteiro 971, 11 andar  
Belo Horizonte 30150-281  
Minas Gerais  
Brazil  
Tel: 55 31 3274 6160  
Fax: 55 31 32746160  
e-mail: raquel@imunolabtx.com.br

doi: 10.1111/tan.12204

### Acknowledgments

This work had financial support from IMUNOLAB Laboratory and graduate course in Bioinformatics, Institute of Biological Sciences

and Institute of Exact Sciences of the Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil. We thank Protrans GmbH, Heidelberg, Germany for providing the kits used in this study.

### Conflict of Interest

The authors have declared no conflicting interests.

### References

1. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; **401**: 921–3.
2. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D1222–7.
3. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* 2010; **75**: 291–455.
4. Middleton D, Williams F, Meenagh A et al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2000; **61**: 1048–52.

## Identification of a novel HLA-B allele, *B\*27:102*, in a Brazilian individual

R. A. Fabreti-Oliveira<sup>1,2,3</sup>, M. A. Santos<sup>2</sup> & E. Nascimento<sup>3,4</sup>

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

2 Departamento da Ciência da Computação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

3 IMUNOLAB – Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

4 Instituto de Ensino, Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

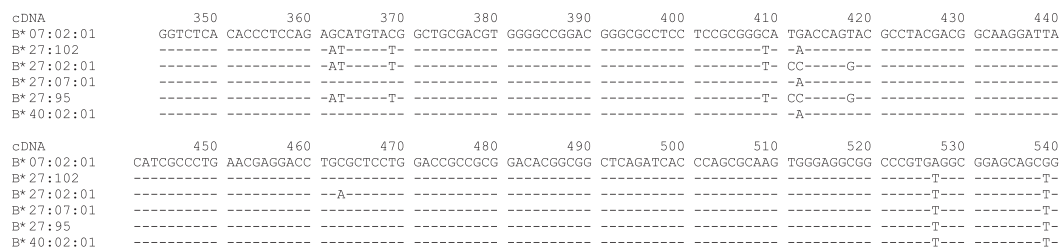
**Key words:** Brazilian population; HLA-27:102; new allele; sequence-based typing

The *HLA-B\*27:102* allele may have originated by an intralocus gene conversion event.

The human leukocyte antigen (HLA) genes are the most polymorphic in the human genome (1). They code for cell-surface molecules subdivided in HLA class I and class II functionally distinct presenting antigen-derived peptides to CD8+ and CD4+ T cells, respectively (2). Currently, there are more than 8500 classical HLA alleles identified including 3005 HLA-B alleles according to release 3.13.0 of IMGT/HLA database (3). In this report, we describe a novel *HLA-B\*27:102*

allele, which has been identified in Brazilian individual from Minas Gerais state. The sample was obtained from volunteer subject, male, self-reported ethnicity as mixed of the Brazilian Registry of Bone Marrow Donors (REDOME).

The HLA typing was first performed using LabType PCR-SSOP polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide probe (One Lambda, Canoga Park, CA). The sample yielded unexpected probe patterns that were typing by sequence-based typing (SBT) with SeCore HLA SBT Kits (Invitrogen, Foster City, CA). No matches were found with any known HLA allelic combination, suggesting the presence of novel HLA allele. Monoallelic sequencing strategy



**Figure 1** Partial exon 3 nucleotide sequence alignment of the *HLA-B\*07:02:01*, *-B\*27:102*, *-B\*27:02:01*, *-B\*27:07:01*, *-B\*27:95* and *B\*40:02:01* alleles. The numbers above the sequences correspond to nucleotide position and dashes indicate identity with the consensus sequence.

using the Group Specific Domino Stone (GSA) and Locus Specific Domino (LSA) single sequencing set (Protrans GmbH, Heidelberg, Germany) was also performed.

The nucleotide sequence has been submitted to the GenBank (Accession # KC477778). The name of the novel *HLA-B\*27:102* allele have been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (4), the names will be assigned to new sequences as they are identified. List of new names will be published in the forthcoming WHO Nomenclature Report. The nucleotide sequences are available in the EMBL, GenBank and DDBJ Nucleotide sequence databases.

The sequence alignment between novel HLA allele sequence and its closest-related HLA allele was performed with Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in the IMGT/HLA database (3). The similarity statistic used by BLAST was the Expect value (*E*) parameter, which describes the number of hits one can expect to see by chance when searching a database of a particular size. A lower *E* value denotes a significant match between analyzed sequences.

The HLA alleles of the donor were genotyped as *A\*02:GKEH*, *A\*–*; *B\*08:01:01G*, *B\*27:102*; *DRB1\*03:GMYP*, *DRB1\*11:GMYT* using NMDP and G codes for reporting of ambiguous allele typing. The *HLA-B\*27:102* allele may have originated by two different ways. One possibility is by three nucleotide substitutions at positions 411, 412 and 418 in exon 3, when compared with its most similar allele *HLA-B\*27:95* (BLAST Expect value = 3.3E–118) (Figure 1). These single-nucleotide polymorphisms (SNPs) result in amino acid changes in the codons 114 [CAC (H) to AAC (N)] and 116 [GAC (D) to TAC (Y)]. In codon 113 TAC (Y) to TAT(Y), the silent mutation did not result in an amino acid change. The other possibility for the origin of *HLA-B\*27:102* is an intralocus gene conversion event between the *HLA-B\*27:02:01* allele and one of the following HLA alleles as a donor: *B\*27:07:01* or *B\*40:02:01* (Figure 1). Regarding the structural aspects of these new allele, the amino acid changes occurred at  $\alpha$ 2 domain within the peptide-binding region and HLA-peptide T-cell recognition site.

The HLA-B27 genetic lineage consists of more than 100 distinguishable alleles (3), and it has been reported to associate with ankylosing spondylitis (AS) or related spondyloarthropathies (SpA) (5). Therefore, the discovery of new HLA allele may be of great clinical interest, because of the probable association with AS and its potential to be included in disease gene mapping studies.

#### Correspondence

Raquel A. Fabreti-Oliveira BSc, MSc, CHS  
 IMUNOLAB – Laboratório de Histocompatibilidade  
 Av Bernardo Monteiro 971, 11° andar  
 30150-281 Belo Horizonte, MG  
 Brazil  
 Tel: 55 31 3274 6160  
 Fax: 55 31 3274 6160  
 e-mail: raquel@imunolabtx.com.br

doi: 10.1111/tan.12215

#### Acknowledgments

This work had financial support from IMUNOLAB Laboratory of Histocompatibility and Graduate course in Bioinformatics, Federal University of Minas Gerais state. We thank Protrans for providing the kits used in this study.

#### Conflict of Interest

The authors have declared no conflicting interests.

#### References

1. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 2003; **425**: 805–11.
2. Neeffjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 823–36.
3. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D1222–7.
4. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010; **75**: 291–455.
5. Stewart CA, Horton R, Allcock RJ et al. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res* 2004; **14**: 1176–87.



## Description and molecular modeling of four novel HLA-B alleles identified in Brazilian individuals

R. A. Fabreti-Oliveira<sup>1,2,3</sup>, E. Nascimento<sup>3,4</sup> & M. A. Santos<sup>2</sup>

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

2 Departamento da Ciência da Computação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

3 IMUNOLAB – Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

4 Instituto de Ensino, Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil

**Key words:** HLA-B\*42:20; HLA-B\*51:151; HLA-B\*57:64; HLA-B\*58:42; sequencing-based typing

Four novel HLA-B alleles, *B\*42:20*, *B\*51:151*, *B\*57:64* and *B\*58:42* were identified in Brazilian individuals.

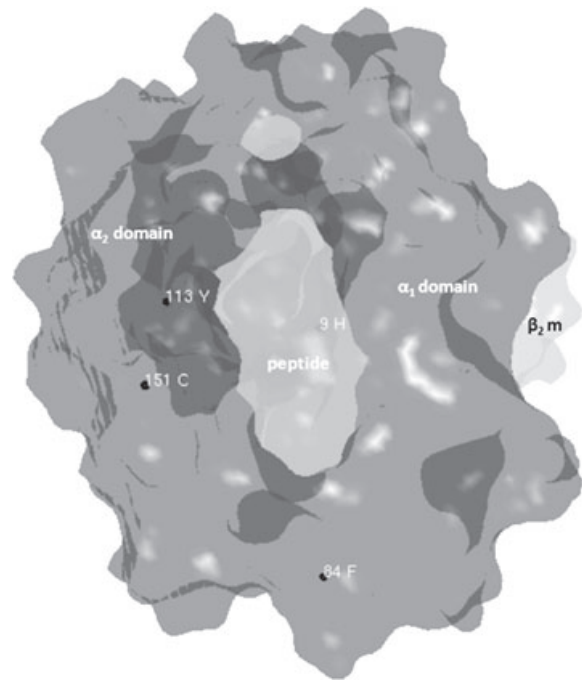
The human major histocompatibility complex (MHC) is a multi-gene ~4 Mb of DNA including the highly polymorphic human leukocyte antigen (HLA) genes that are

fundamental in effecting a healthy immune response (1). The HLA-B locus has more than 3000 alleles published according to release 3.13.0 of the IMGT/HLA (Immunogenetics Database) (2). In this study, we describe four novel HLA alleles in Brazilian individuals from Minas Gerais state. The samples were obtained from volunteer

subjects from Brazilian Registry of Bone Marrow Donors (REDOME).

The HLA typing was first performed using LabType polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe (PCR-SSOP) (One Lambda, Canoga Park, CA). The samples yielded unexpected probe patterns, thus were typing with Secore Sequence-Based Typing (SBT) Kits (Invitrogen, Foster City, CA). No matches were found with any known HLA allelic combination, suggesting the presence of novel alleles. Monoallelic sequencing strategy using the Group Specific Domino Stone (GSA) and Locus Specific Domino Stone (LSA) single sequencing set (Protrans GmbH, Heidelberg, Germany) was also performed.

The names of all novel HLA alleles have been officially assigned by the World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee in February of 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (3), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of new names will be published in the forthcoming WHO Nomenclature Report (3). A schematic representation of the molecular structure of HLA was downloaded from Protein Data Bank (PDB) in which the *HLA-B\*07:02* molecule was used to define the crystal structure (4). This figure was prepared using the MBT program (Moreland JL et al., La Jolla, CA) (5).



**Figure 1** Schematic representation of the molecular structure of the human leukocyte antigen (HLA) class I showing the locations of amino acid residue changes in the new HLA alleles (black points).  $\beta_2m = \beta_2$ -microglobulin. The protein data bank (PDB) accession number is 3VCL.

***HLA-B\*42:20* (GenBank # KC477772)**

*HLA-B\*42:20* was identified in a mixed female genotyped as *A\*30:GXZX*, *A\*30:GVKY*; *B\*45:01*, *B\*42:20*; *DRB1\*01:CZJ*, *DRB1\*13:04*. The National Marrow Donor Program (NMDP) codes were used to report ambiguous HLA typing to this description as well as the following. The *HLA-B\*42:20* differ from its most similar allele, *HLA-B\*42:06*, by one nucleotide substitution at position 409 result in amino acid change in the codon 113 (CAT (H) to TAT (Y)).

***HLA-B\*51:151* (GenBank # KC477775)**

*HLA-B\*51:151* was identified in a Caucasoid female genotyped as *A\*02:GKEP*, *A\*03:GKFU*; *B\*15:01:01G*, *B\*51:151*; *DRB1\*08:EJRJ*, *DRB1\*13:GPKJ*. The *HLA-B\*51:151* differ from its most homologous allele, *HLA-B\*51:01:01*, by one nucleotide substitution at position 97 resulting in amino acid change in the codon 9 (TAC (Y) to CAC (H)). We were unable to study the family members of the donor to determine the HLA haplotype associated with the new HLA allele. However, the novel *HLA-B\*51:151* allele was observed in three different unrelated individuals. Thus, this information was used to deduce the haplotype associated with this new allele: *HLA-A\*02-B\*51:151-DRB1\*08*.

***HLA-B\*57:64* (GenBank # KC477776)**

*HLA-B\*57:64* was identified in a Caucasoid female genotyped as *A\*01:EJTG*, *A\*03:EJTN*; *B\*35*, *B\*57:64*; *DRB1\*07:FMAN*, *DRB1\*13:BXWY*. The *HLA-B\*57:64* differ from its most closest-related allele, *HLA-B\*57:01:01*, by one nucleotide substitution at position 523 resulting in amino acid change in the codon 151 (CGT (R) to TGT (C)).

***HLA-B\*58:42* (GenBank # KC477769)**

*HLA-B\*58:42* was identified in a Caucasoid male genotyped as *A\*02:GNAS*, *A\*33:GJMC*; *B\*08:01:01G*, *B\*58:42*; *DRB1\*13:KBJE*, *DRB1\*13:KBJD*. The *HLA-B\*58:42* differ from its most homologous allele, *HLA-B\*58:01:01*, by one nucleotide substitution at position 323 resulting in amino acid change in the codon 84 (TAC (Y) to TTC (F)).

Regarding the structural aspects, the amino acid changes occurred within the peptide binding region and/or T-cell recognition site, characterized in the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  helices and  $\beta$ -pleated sheet located within the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  extracellular domains (Figure 1).

**Correspondence**

Dr Raquel A. Fabreti-Oliveira, BSc, MSc, CHS  
 IMUNOLAB – Laboratório de Imunologia de Transplantes  
 Av Bernardo Monteiro 971  
 11 andar

Belo Horizonte 30150-281  
MG  
Brazil  
Tel: 55 31 3274 6160, 55 31 8448 3398  
Fax: 55 31 3274 6160  
e-mail: raquel@imunolabtx.com.br

doi: 10.1111/tan.12245

#### Acknowledgments

This work was financially supported by IMUNOLAB Laboratory and graduate course in Bioinformatics, Institute of Biological Sciences and Institute of Exact Sciences of the Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil. We thank Protrans GmbH, Heidelberg (Germany) for providing the kits for some of the sample SBTs.

#### Conflict of Interest

The authors have declared no conflicting interests.

#### References

1. Dyer P, McGilvray R, Robertson V, Turner D. Status report from 'double agent HLA': health and disease. *Mol Immunol* 2013; **55**: 2–7.
2. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D1222–D7.
3. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010; **75**: 291–455.
4. Brennan RM, Petersen J, Neller MA et al. The impact of a large and frequent deletion in the human TCR  $\beta$  locus on antiviral immunity. *J Immunol* 2012; **188**: 2742–8.
5. Moreland JL, Gramada A, Buzko OV, Zhang Q, Bourne PE. The molecular biology toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics* 2005; **6**: 21.

## Four novel HLA alleles, DRB1\*04:11:03, DRB1\*10:05, DRB1\*15:94 and DRB1\*16:22, identified in Brazilian individuals

R. A. Fabreti-Oliveira<sup>\*†‡</sup>, E. Nascimento<sup>‡§</sup>, C. K. F. Oliveira<sup>‡</sup>, E. M. G. Vale<sup>‡</sup>, B. Vilela<sup>‡</sup> & M. A. Santos<sup>†</sup>**Summary**

Four novel human leucocyte antigen (HLA) class II alleles were identified by sequencing-based typing (SBT) and analysis of the closest-matching alleles from volunteer subjects from the Brazilian Bone Marrow Donor Register (REDOME, Brazil). The new HLA alleles discovered include DRB1\*04:11:03, DRB1\*10:05, DRB1\*15:94 and DRB1\*16:22. Three of the novel alleles had single-nucleotide substitution polymorphisms when compared to their most homologous allele. Of these, one harboured a single-nucleotide polymorphism (SNP) identified as a silent substitution.

**Introduction**

Human leucocyte antigen (HLA) genes show high polymorphism and play an important role in the immune response (The MHC sequencing consortium, 1999; Robinson *et al.*, 2013). In this report, we describe four novel HLA class II alleles identified in Brazilian individual from Minas Gerais state. Brazil is a continental country with high ethnic diversity and is one of the most heterogeneous populations in the world. The nature of the Brazilian population is the result of five centuries of miscegenation between Europeans, Africans and Amerindians (Callegari-Jacques *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2010).

\* Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, † Departamento da Ciência da Computação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, ‡ IMUNOLAB – Laboratório de Imunologia de Transplantes, Belo Horizonte, MG, Brazil and § Instituto de Ensino, Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil

Received 2 July 2013; revised 09 August 2013; accepted 25 August 2013

Correspondence: Raquel A. Fabreti-Oliveira, IMUNOLAB – Laboratório de Imunologia de Transplantes, Av Bernardo Monteiro 971, 11° andar, 30150-281 Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel: 55 31 3274 6160; Fax: 55 31 32746160; E-mail: raquel@imunolabtx.com.br

The samples used in this study were obtained from Laboratory IMUNOLAB DNA bank with around 200 000 unrelated healthy volunteer donors of the Brazilian Registry of Bone Marrow Donors (REDOME).

The HLA typing was first performed using Lab-Type<sup>®</sup> PCR-SSOP Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe (One Lambda, Canoga Park, CA, USA). All samples yielded unexpected probe patterns. Thus, the typing was performed by sequence-based typing (SBT) with SeCore<sup>®</sup> HLA Sequence-Based Typing Kits (Invitrogen, Foster City, CA, USA). Exon 2 for HLA-DRB1 locus was sequenced bidirectionally using an ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Japan). No matches were found with any known HLA allelic combination, suggesting the presence of novel HLA alleles for each sample. To separate the two HLA alleles in each sample, monoallelic sequencing strategy using the group-specific domino stone (GSA) and locus-specific domino stone (LSA) single sequencing set (Protrans GmbH, Heidelberg, Germany) was also performed. Both alleles were sequenced according to the manufacturer's protocol for exon 2 in both the forward and reverse directions.

All new HLA sequence data reported in this article have been submitted to the GenBank database and were assigned accession numbers. The names of all novel HLA alleles have been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February of 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent nomenclature report (Marsh *et al.*, 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of new names will be published in the forthcoming WHO Nomenclature Report. The nucleotide sequences are available in the EMBL, GenBank and DDBJ nucleotide sequence databases.

Data collected from the volunteer subjects included gender, self-reported ethnicity and other HLA loci typing were described in Table 1. Two new HLA alleles were observed in individuals whose ancestries were Caucasic, one in Black subject and one in subject with mixed ancestries. The new DRB1\*04:11:03, DRB1\*10:05, DRB1\*15:94 and DRB1\*16:22 alleles

received GenBank database accession shown in Table 1.

When the four novel HLA alleles were compared with the four most homologous alleles, five SNPs were observed resulting in nonsynonymous nucleotide substitutions (Fig. 1 and Table 2). One SNP observed in the HLA-DRB1\*04:11:03 allele resulted in synonymous substitutions. All the nucleotide substitutions in the new alleles were characterized within the  $\beta$ 1 domain.

In the analysis of HLA alleles and haplotypes we used the most homologous HLA alleles for each novel HLA sequence. We were unable to study the family members of the donors to determine directly the HLA haplotypes associated with the new HLA alleles. Therefore, to deduce the haplotypes we used population data information from D. Middleton's 'http://www.allele-frequencies.net' website (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011), checked by consulting the corresponding publications when available as well as other relevant publications (Tsuneto *et al.*, 2003; Pingel *et al.*, 2013;

Donadi, 2006; Maiers *et al.*, 2007; Hollenbach *et al.*, 2001).

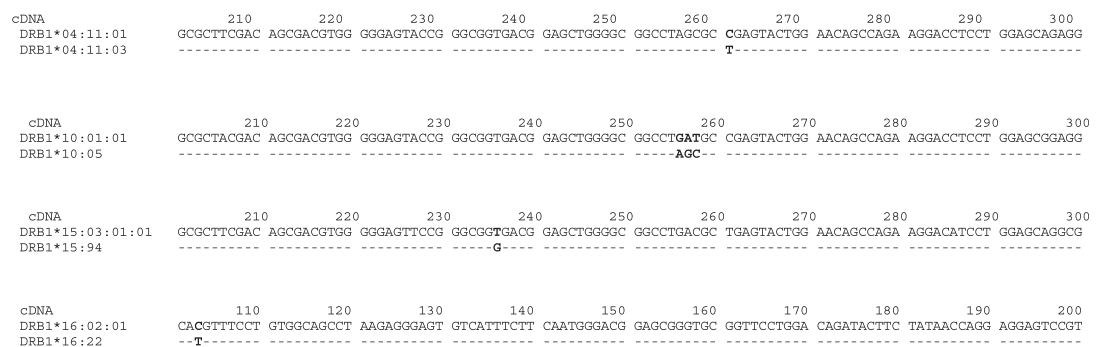
In the Brazilian population, the DRB1\*04:11 allele is more common in Amerindian with frequency higher than 63.0% in the East Amazon from Brazil (Tsuneto *et al.*, 2003). This allele was observed frequently in haplotype association with HLA-A\*02-B\*39 in Amerindian from Mexico (Mazatecan tribe) with frequency of 4.10% (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011). Thus, the haplotype in association with novel DRB1\*04:11:03 allele may be deduced as HLA-A\*02-B\*39-DRB1\*04:11:03.

The DRB1\*10:01 allele is not common in Brazilian population has low frequency in Mulatto of the south-east region (2.40%) (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011). This allele was observed in haplotype association with HLA-A\*02-B\*37 in Germany DKMS Netherlands (Pingel *et al.*, 2013). The Netherlander arrived in Brazil in the 17th century during the period of the colonization. Thus, this information was used in the analysis of the haplotype in association with novel

**Table 1.** Description of individuals from different ethnic groups carrying novel HLA alleles of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1

Sex	Ethnicity	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	GenBank accession #
Male*	Black	02:HDGK,03:JSSX	39,51:KHAS	11:01:01G, <b>04:11:03</b>	KC433573
Female*	Caucasoid	02:KDEA,26:KCTJ	37:PYP A,44:KDGB	07:01:01G; <b>10:05</b>	KC438413
Female*	Caucasoid	02:KEJF,34:GYA	44:PZYJ,44:PZUY	04:01:01, <b>15:94</b>	KC438414
Female	Mixed	02:01,02:01	35:01,35:02	14:01:01G, <b>16:22</b>	KC438412

Novel alleles are shown in bold. \*HLA typing was represented as NMDP allele code nomenclature for HLA-A and HLA-B loci.



**Figure 1.** Sequence alignment between the novel HLA alleles and their closest-related alleles. The nucleotide substitutions are shown in bold.

**Table 2.** Novel HLA alleles compared with their most similar HLA alleles

Novel allele	Most similar HLA allele(s)	Difference (number of nucleotides)	Nucleotides positions changes	Codon changes <sup>a</sup>	AAs residue changes <sup>b</sup>
DRB1*04:11:03	DRB1*04:11:01	1	261	58 <b>GCC</b> to <b>GCT</b>	58 silent (A)
DRB1*10:05	DRB1*10:01:01	3	256–258	57 <b>GAT</b> to <b>AGC</b>	57 D to S
DRB1*15:94	DRB1*15:03:01:01	1	236	50 <b>GTG</b> to <b>GGG</b>	50 V to G
DRB1*16:22	DRB1*16:02:01	1	103	6 <b>CGT</b> to <b>TGT</b>	6 R to C

<sup>a</sup>Numbering from the first codon of the mature protein. The altered codon(s) number and sequence of the most homologous alleles (listed first) are compared with the novel alleles (listed second). The nucleotide changes are shown in bold; <sup>b</sup>AAs = amino acids.

DRB1\*10:01 allele probably deduced as HLA-A\*02-B\*37-DRB1\*10:05.

The DRB1\*15:03 allele is more frequent in the Brazilian mixed population (4.50%) (Donadi, 2006). This allele was observed in haplotype association with HLA-A\*34-B\*44 in United States African American (Maiers *et al.*, 2007). Thus, the haplotype in association with novel HLA-DRB1\*15:94 allele may be deduced as HLA-A\*34-B\*44-DRB1\*15:94.

The DRB1\*16:02 allele such as the HLA-DRB1\*04:11 is more frequent in Brazilian Amerindian Guarani M'byá (37.10%) and Guarani Kaiwoá (33.90%) (Tsuneto *et al.*, 2003). This allele was observed in haplotype association with A\*02:01-B\*35:01 in Amerindian from Mexico (Oaxaca Zapotec tribe) with frequency of 4.0% (Hollenbach *et al.*, 2001). Thus, the haplotype in association with novel DRB1\*16:22 allele may be deduced as HLA-A\*02:01-B\*35:01-DRB1\*16:22.

### Acknowledgements

This work had financial support from IMUNOLAB Laboratory of Histocompatibility and Graduate course in Bioinformatics, Federal University of Minas Gerais state. We thank Protrans GmbH, Heidelberg (Germany) for providing the kits for SBT HLA typing of some DNA samples.

### References

- Callegari-Jacques, S.M., Grattapaglia, D., Salzano, F.M., Salamoni, S.P., Crossetti, S.G., Ferreira, M.E. & Hutz, M.H. (2003) Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *American Journal of Human Biology*, **15**, 824.
- The MHC sequencing consortium. (1999) Complete sequence gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, **401**, 921.
- Donadi, E.A. (2006) Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop.
- Gonzalez-Galarza, F.F., Christmas, S., Middleton, D. & Jones, A.R. (2011) Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research*, **39**, D913.
- Hollenbach, J.A., Thomson, G., Cao, K., Fernandez-Vina, M., Erlich, H.A., Bugawan, T.L., Winkler, C., Winter, M. & Klitz, W. (2001) HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mesoamerican Natives. *Human Immunology*, **62**, 378.
- Maiers, M., Gragert, L. & Klitz, W. (2007) High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Human Immunology*, **68**, 779.
- Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Dupont, B., Erlich, H.A. *et al.* (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, **75**, 291.
- Pingel, J., Solloch, U.V., Hofmann, J.A., Lange, V., Ehninger, G. & Schmidt, A.H. (2013) High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: how can they be used to improve unrelated donor searches? *Human Immunology*, **74**, 330.
- Robinson, J., Halliwell, J.A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P. & Marsh, S.G. (2013) The IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research*, **41**, D1222.
- Santos, N.P., Ribeiro-Rodrigues, E.M., Ribeiro-Dos-Santos, A.K., Pereira, R., Gusmão, L., Amorim, A. *et al.* (2010) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL)ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human Mutation*, **31**, 184.
- Tsuneto, L.T., Probst, C.M., Hutz, M.H., Salzano, F.M., Rodriguez-Delfin, L.A., Zago, M.A., Hill, K., Hurtado, A.M., Ribeiro-dos-Santos, A.K. & Petzl-Erler, M.L. (2003) HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. *Tissue Antigens*, **62**, 512.



Description of five novel HLA-B alleles, *B\*07:184*, *B\*41:27*, *B\*42:19*, *B\*50:32* and *B\*57:63*, identified in Brazilian individualsR. A. Fabreti-Oliveira<sup>\*†‡</sup>, M. A. Santos<sup>†</sup>, C. K. F. Oliveira<sup>‡</sup>, E. M. G. Vale<sup>‡</sup>, B. Vilela<sup>‡</sup> & E. Nascimento<sup>‡,§</sup>**Summary**

Five novel HLA-B alleles were identified by HLA-SBT typing in seven unrelated Brazilian individuals. The new alleles discovered include HLA-B\*07:184, B\*41:27, B\*42:19, B\*50:32 and B\*57:63 and were officially named by the World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee. All new HLA-B alleles had nonsynonymous nucleotide substitution polymorphisms when compared to their most closely related HLA-B allele.

**Introduction**

Human leucocyte antigen (HLA), the most polymorphic genetic system known in humans, maps to the short arm of chromosome 6 within the major histocompatibility complex (MHC) (Mungall *et al.*, 2003). Among HLA loci, HLA-B is the most polymorphic locus with more than 3000 alleles published according to release 3.14.0 of the IMGT/HLA (Immunogenetics Database) (Robinson *et al.*, 2013). The HLA-B has polymorphic amino acid residues located mainly in the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  domains encoded by exons 2 and 3, respectively, which form the peptide-binding region (PBR) (Bjorkman *et al.*, 1987). These polymorphic exons encode critical amino acids that bind foreign peptides which will be presented to CD8<sup>+</sup> cells (Neeffjes *et al.*, 2011).

\* Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; † Departamento da Ciência da Computação, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ‡ IMUNOLAB-Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, Belo Horizonte, Brasil and § Instituto de Ensino, Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brasil

Received 22 October 2013; revised 20 December 2013; accepted 5 January 2014

Correspondence: Raquel A. Fabreti-Oliveira, IMUNOLAB- Laboratório de Imunologia de Transplantes, Av Bernardo Monteiro 971, 11 andar, 30150-281 Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel/Fax: +55 31 3274-6160; E-mail: raquel@imunolabtx.com.br

The high level of HLA gene polymorphism has been extensively documented as the abundance of new alleles is steadily increasing (Lazaro *et al.*, 2011, 2012; Robinson *et al.*, 2013) with the distribution varying greatly within human populations (Braun-Prado *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001; Maiers *et al.*, 2007; Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011). The HLA genetic diversity makes each individual genetically unique (Buhler *et al.*, 2012). Thus, recipient/donor HLA disparity results in graft rejection in organ and haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (Buhler *et al.*, 2012). Thus, new HLA-B alleles may lead to significant functional and immunological changes with important clinical implications. In this study, we describe five novel HLA-B alleles in the Minas Gerais state population, Brazil.

**Materials and methods****Samples**

The REDOME (Brazilian Registry of Volunteer Bone Marrow Donors) is currently the third largest registry of haematopoietic stem cell donors in the Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) with over three million registered donors. The samples of seven unrelated volunteer donors aged 18–55 years old, routinely HLA typed in the IMUNOLAB Histocompatibility laboratory, were used in this study. These samples were obtained from around 300 000 samples typed and recorded in the REDOME by IMUNOLAB laboratory.

**HLA typing**

The HLA typing was performed using genomic DNA from each sample isolated using the Biopur DNA Extraction Kit according to the manufacturer's instructions. The HLA typing was first performed using Lab-Type<sup>®</sup> PCR-SSOP polymerase chain reaction–sequence-specific oligonucleotide probe (One Lambda, Canoga Park, CA, USA). All samples yielded unexpected probe patterns. Thus, the typing was performed by sequence-based typing (SBT) with SeCore<sup>®</sup> HLA sequence-based typing kits (Life Technologies, Foster

City, CA, USA). Exons 2, 3 and 4 were sequenced bidirectionally using an ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Japan). No matches were found with any known HLA allelic combination, suggesting the presence of novel HLA-B alleles for each sample. To separate the two HLA-B alleles in each sample, monoallelic sequencing strategy using the group-specific domino stone (GSA) and locus-specific domino stone (LSA) single sequencing set (Protrans GmbH, Heidelberg, Germany) was also performed. Both alleles were sequenced according to the manufacturer's protocol for exons 2, 3 and 4 in both the forward and reverse directions.

All new HLA-B sequence data reported in this article have been submitted to the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and were assigned accession numbers. The novel HLA-B alleles names have been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February of 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh *et al.*, 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. The nucleotide sequences are available in the EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), GenBank, and DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) Nucleotide sequence databases. The crystal structure of the HLA-B7 molecule (3VCL Protein Data Bank accession number) was used to show the location of the new mutations (Brennan *et al.*, 2012). This figure was prepared using the program RCSB – Protein Workshop Viewer (La Jolla, CA, USA) (Moreland *et al.*, 2005).

## Results

Five novel HLA-B alleles were identified by DNA sequencing-based typing. Data collected from the volunteer subjects included gender, self-reported ethnicity and other HLA loci typing described in Table 1. The individuals self-reported as one Black, three Caucasoïd and three Mixed. The GenBank database accession numbers for all new HLA sequences are shown in Table 1.

We were unable to study the family members of the donors to determine directly the HLA haplotypes associated with the new HLA-B alleles. Therefore, two novel HLA alleles, B\*41:27 and B\*50:32, were each observed in two different unrelated individuals. Thus, this information was used to deduce the HLA-A-B-DRB1 haplotypes associated with these new alleles: A\*26-B\*41:27-DRB1\*13 and A\*01-B\*50:32-DRB1\*07.

In the comparison between the five new HLA-B alleles with their most closely related alleles, eight SNPs were observed resulting in nonsynonymous nucleotide substitutions (Table 2). The HLA-B\*07:184, B\*41:27, B\*50:32 and B\*57:63 alleles were different from their most similar allele by one single nucleotide variant. The HLA-B\*42:19 differ from its most similar allele by four nucleotide substitutions that cause two amino acid residue changes (Table 2). One isolated nucleotide substitution was observed at codon 152 within new alleles B\*42:19 and B\*57:63 (Table 2).

To investigate the structural aspects of these new alleles, we modelled each substitution in the context of

**Table 1.** Description of individuals from different ethnic groups carrying novel HLA-B alleles

Sex	Ethnicity	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	GeneBank/EMBL/DDBJ accession #
Female	Mixed	02:GKET,23:GKGT	41:02:01, <b>07:184</b>	07:FMAN,15:GKPJ	<b>KC477770</b>
Female and male	Caucasians	26:EACW,29:CWFEX	44:03:01G, <b>41:27</b>	13:GPKJ,13:GKPC	<b>KC477771</b>
Male	Black	03:GUTK,34:GYA	44:03:01G, <b>42:19</b>	03:02,15:03	<b>KC477777</b>
Two female	Mixed/Caucasoïd	01:KAVS,11:KAXJ	35:01:01G, <b>50:32</b>	01:HNVP,07:JXKR	<b>KC477774</b>
Male	Mixed	02:EJPX,30:GSH	15:03:01G, <b>57:63</b>	07:DFYF,10:AC	<b>KC477773</b>

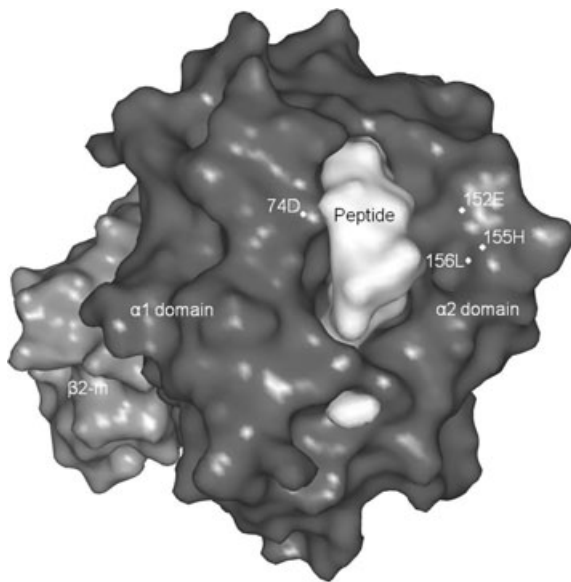
Novel alleles are shown in bold. HLA results were presented as NMDP allele code nomenclature.

**Table 2.** Novel HLA-B alleles compared with their most similar HLA alleles

Novel allele	Most similar HLA allele(s)	Difference (number of nucleotides)	Exon	Nucleotides positions changes	Codon changes <sup>a</sup>	AAs residue changes <sup>b</sup>
B*07:184	B*07:02:01	1	2	86	5 ATG to AGG	5 M to R
B*41:27	B*41:02:01	1	2	292	74 TAC to GAC	74 Y to D
B*42:19	B*42:01:01	4	3	527	152 GTG to GAG	152 V to E
			3	538, 539, 540	156 GAC to CTG	156 D to L
B*50:32	B*50:01:01	1	3	537	155 CAG to CAT	155 Q to H
B*57:63	B*57:02:01	1	3	527	152 GTG to GAG	152 V to E

<sup>a</sup>Numbering from the first codon of the mature protein. The altered codon(s) number and sequence of the most closely related alleles (listed first) are compared with the novel alleles (listed second). The nucleotide changes are shown in bold. <sup>b</sup>AAs, amino acids.





**Figure 1.** The crystal structure of the HLA-B7 molecule, showing the locations (black points) of amino acid residue changes in the new HLA alleles.  $\beta$ 2-m =  $\beta$ 2-microglobulin. The PDB accession number is 3VCL.

the crystal structure of the HLA-B7 molecule. The amino acid changes observed occurred within the PBR and/or HLA-peptide T-cell recognition site, characterized in the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 helices located within the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 extracellular domains (Fig. 1). Molecular modelling showed that these changes, occurred within PBR, may result in potentially changes in the peptide repertoire. The amino acid changes at codon 74, 152, 155 and 156 involve contact residues of the antigen recognition site or were critical for T-cell recognition. The amino acid residue change (5 M to R) in the HLA-B\*07:184 allele was identified in the  $\beta$ -pleated sheet within the  $\alpha$ 1 domain and was not shown in the Fig. 1.

In-depth analysis would reveal that the mutation that identifies one of these new alleles as unique is present on a number of other HLA alleles. For example, 152 GAG defining 57:63 is also present on many other HLA-B alleles, as HLA-B\*07:02:01 and B\*14:01. Thus, these new alleles are unlikely to present novel epitopes, and not have contributed with novel antibody recognition binding sites. However, the exchange of sequences can have an effect on the immune response by increasing the repertoire of peptides that can bind on the PBR of the HLA molecule to be presented to the immune system.

### Conflict of interests

The authors have declared no conflicting interests.

### Acknowledgements

This work was financial supported by IMUNOLAB Laboratory-Histocompatibility, Genetics and Transplant Immunology, Belo Horizonte MG and a graduate course in Bioinformatics, Institute of Biological Sciences and Institute of Exact Sciences of the Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil. We thank Protrans GmbH, Heidelberg (Germany), for providing the kits for some of the sample SBTs.

### References

- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. & Wiley, D.C. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, **329**, 506.
- Braun-Prado, K., Vieira Mion, A.L., Farah Pereira, N., Culp, L. & Petzl-Erler, M.L. (2000) HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens*, **56**, 417.
- Brennan, R.M., Petersen, J., Neller, M.A., Miles, J.J., Burrows, J.M., Smith, C. *et al.* (2012) The impact of a large and frequent deletion in the human TCR  $\beta$  locus on antiviral immunity. *Journal of Immunology*, **188**, 2742.
- Buhler, S., Nunes, J.M., Nicoloso, G., Tiercy, J.M. & Sanchez-Mazas, A. (2012) The heterogeneous HLA genetic makeup of the swiss population. *PLoS ONE*, **7**, e41400.
- Gonzalez-Galarza, F.F., Christmas, S., Middleton, D. & Jones, A.R. (2011) Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research*, **39**, D913.
- Lazaro, A.M., Xiao, Y., Masaberg, C., Tu, B., Ng, J., Hurley, C.K. *et al.* (2011) Seventy-eight novel HLA class I and II alleles identified during routine registry typing in 2008 and 2009. *Tissue Antigens*, **77**, 54.
- Lazaro, A.M., Henry, J., Ng, J., Hurley, C.K. & Posch, P.E. (2012) Increased HLA class I and II diversity as 72 novel alleles are identified in volunteers for the National Marrow Donor Program Registry in 2010. *Tissue Antigens*, **79**, 50.
- Maiers, M., Gragert, L. & Klitz, W. (2007) High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Human Immunology*, **68**, 779.
- Marsh, S.G., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Dupont, B., Erlich, H.A. *et al.* (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, **75**, 291.
- Moreland, J.L., Gramada, A., Buzko, O.V., Zhang, Q. & Bourne, P.E. (2005) The molecular biology toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics*, **6**, 6.
- Mungall, A.J., Palmer, S.A., Sims, S.K., Edwards, C.A., Ashurst, J.L., Wilming, L. *et al.* (2003) The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*, **425**, 805.
- Neeffjes, J., Jongsmma, M.L., Paul, P. & Bakke, O. (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, **11**, 823.
- Robinson, J., Halliwell, J.A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P. & Marsh, S.G. (2013) The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*, **41**, D1222.
- Williams, F., Meenagh, A., Darke, C., Acosta, A., Daar, A.S., Gorodezky, C. (2001) Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Human Immunology*, **62**, 645.

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA COM BASE NO HLA**

Fabreti-Oliveira RA, Nascimento E, Fonseca CG & Santos, MA. (2014). The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens*, Apr 12. doi: 10.1111/tan.12352.

Em 2011, foi criada a Rede Brasil de Imunogenética com vários projetos de pesquisa. Um deles refere-se ao estudo do Perfil Genômico do REDOME/REREME, que tem como um dos objetivos, o estudo da diversidade HLA dos indivíduos cadastrados no REDOME e no REREME, incluindo a detecção de alelos raros e novos. Assim, esse projeto relacionará os dados de diversidade HLA com os dados censitários e usará essas informações para subsidiar a elaboração de um mapa da distribuição nacional dos alelos e haplótipos HLA e suas respectivas frequências, para ser usado como base para o desenvolvimento de campanhas de cadastramento de novos doadores voluntários e planejamento de recursos pelo Ministério da Saúde para esse fim. Os importantes resultados parciais desse estudo publicados até o momento, contemplam os dados HLA de baixa/média resolução dos *loci* HLA-A, -B e -DRB1. Essa informação representaria melhor a diversidade da população brasileira se fosse em nível de alta resolução e estudados mais alguns *loci* HLA, como o HLA-C e HLA-DQB1. Da mesma forma, várias publicações demonstraram a diversidade genética HLA da população brasileira (Braun-Prado *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001; Louzada-Junior *et al.*, 2001; Nigam *et al.*, 2004; Bortolotto *et al.*, 2012), avaliando principalmente os *loci* HLA-A, -B e -DRB1 em baixa ou média resolução. Assim, o perfil genético da população brasileira foi estudado no artigo que compõe esse capítulo com dados mais completos de alta resolução para os *loci* HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 que demonstrou a heterogeneidade genética da população brasileira e sua relação com outras populações do mundo

A metodologia empregada nesse trabalho é oriunda da Álgebra Linear que consiste na Decomposição em Valores Singulares (SVD) de uma matriz de dados que é amplamente utilizada em tarefas de redução de dimensionalidade. A SVD estabelece relacionamentos relevantes e não-triviais entre grupos de elementos (Eldén, 2007, 2006; Berry *et al.*, 1995). A lógica por trás da SVD é que uma matriz  $A$ , composta por  $m$  linhas e  $n$  colunas, pode ser representada por um conjunto de matrizes derivadas (Berry *et al.*, 1995) que permitem uma representação numérica diferente dos dados sem perda de significado:

$$\mathbf{A} = \mathbf{TSD}^T$$

Onde  $T$  é uma matriz ortonormal de dimensões  $m \times m$ ,  $S$  é uma matriz diagonal de dimensões  $m \times n$  e  $D$  é uma matriz ortonormal de dimensões  $n \times n$ . Os valores da diagonal de  $S$  são os valores singulares de  $A$ , e eles são ordenados em ordem decrescente.

Quando um subconjunto de valores singulares de tamanho  $k < p$  é considerado, onde  $p$  é o posto de  $A$ , podemos obter  $A_k$ , uma matriz aproximada da matriz original  $A$ :  $\mathbf{A} \approx \mathbf{A}_k = \mathbf{T}_k \mathbf{S}_k \mathbf{D}_k^T$

Nesse caso, o número  $k$  de valores singulares é também o posto da matriz  $A_k$ . Uma base de dados representada por um conjunto menor de valores singulares em relação à base original tende a gerar certos agrupamentos que não seriam notados se utilizássemos os dados originais (Berry *et al.*, 1995). O problema de se encontrar o melhor valor de  $k$  para a redução de posto permanece em aberto. Usualmente, emprega-se um método visual a partir da curva de decaimento dos valores singulares. Esse método é denominado teste de *scree* (Cattell, 1966). Traçando-se o gráfico dos valores singulares obtidos com a fatoração por valores singulares, pode-se observar o decréscimo da variação de seus valores. O “teste de *scree*” consiste em interpretar este gráfico como se fosse a ilustração de uma escarpa e tentar identificar visualmente a base dessa escarpa. Esse é um teste bastante subjetivo apesar de largamente empregado. A similaridade entre dois objetos no espaço vetorial reduzido obtido pela decomposição por valores singulares pode ser definida pela distância euclidiana entre dois pontos no espaço  $V_k S_k$ :

$$sim\_dist_{ij} = \sqrt{\sum_{z=1}^k (x_{i,z} - x_{j,z})^2}$$

onde:

- $sim\_dist_{ij}$  é a distância euclidiana entre os objetos  $i$  e  $j$ ;
- $x_{i,z}$  indica a  $z$ -ésima coordenada do vetor que representa o objeto  $i$  na matriz  $V_k S_k$ .

O método de visualização usado neste trabalho foi o método de otimização proposto por Marcolino *et al.* [2010]. Este método realiza uma projeção da base de dados em um espaço tri-dimensional. Nesse método, cada objeto da base de dados é tratado como um ponto no espaço  $R^m$ , onde  $m$  é o número de descritores contidos na base (ou seja, é a dimensão do espaço original). A distância euclidiana nesse espaço multidimensional é calculada para cada par de objetos. Para representar a base de dados em um espaço reduzido (de duas ou três dimensões), o algoritmo procura ajustar um modelo onde os correspondentes valores da distância euclidiana sejam próximos dos valores no espaço original. O algoritmo de agrupamento usado nesse trabalho foi o ***k-means*** que tem como objetivo particionar  $n$  observações dentre  $k$  agrupamentos onde cada observação pertence ao agrupamento mais próximo da média.

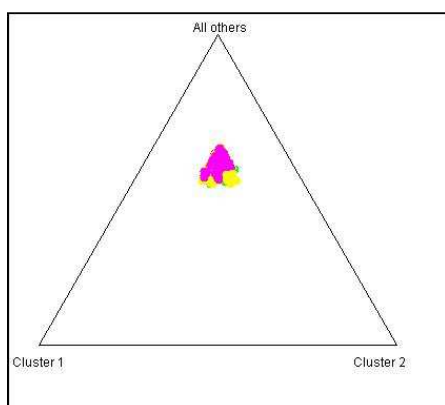
A fim de comparar os resultados do novo método para análise HLA proposto neste estudo com métodos tradicionais de agrupamentos, os dados também foram analisados no Programa Structure versão 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000a; Pritchard *et al.* 2000b ) usando o *Linkage Model* como o modelo de ancestralidade e o algoritmo Neighbor Joining (Saitou *et al.*, 1987). Na análise realizada no Programa Structure, foi utilizada uma informação a priori das populações por meio do POPINF e definido o número de  $k$  cluster de 1 a 5. Os dados foram visualizados no triângulo que é um tipo de visualização de dados em um espaço reduzido como

*output* do Structure (figura 11). O Programa Structure não foi capaz de agrupar os dados o que pode ser explicado pela pequena distância física entre *loci* HLA e o forte desequilíbrio de ligação observado entre os alelos desses *loci*.

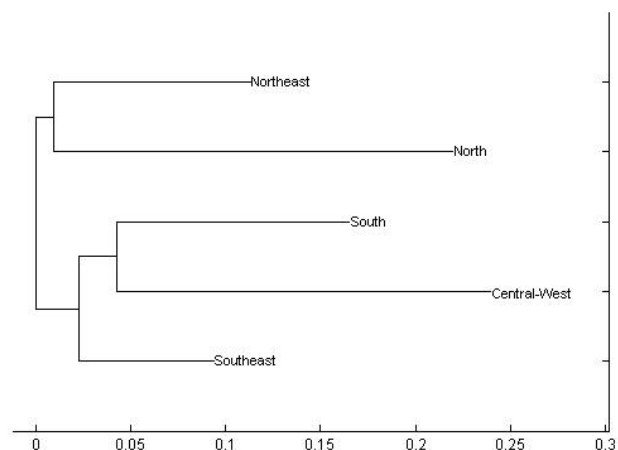
Devido à ambiguidades HLA e ao tamanho da região gênica analisada ( exons 2, 3 e 4 para HLA Classe I, exons 2 e 3 para o *locus* HLA-DQB1 e exon 2 para HLA-DRB1 ) não foi possível representar os alelos HLA como sequência de nucleotídeos para análise no Structure. Assim, outra razão possível para explicar o resultado observado na figura 11, é que os dados no *input* do Structure foram representados com o nome dos alelos HLA e não como a sequência de nucleotídeos.

A heterogeneidade genética da população é conhecida historicamente pela forma como foi a ocupação do território brasileiro e confirmada pela análise feita pelo algoritmo Neighbor Joining (figura 12) o que também contribui para demonstrar que o método de SVD foi apropriado para a análise de dados HLA. Assim, atribuímos tais resultados ao fato de que a matriz original de frequências HLA sofreu fatoração pelo método SVD antes do processo de clusterização. Além disso, com base na história de ocupação do território nacional e os resultados mostrados na Figuras 3A, 3B e 3C do artigo o esperado seria observar heterogeneidade genética através população e não um padrão homogêneo resultante da análise feita pelo programa Structure.

Em conclusão, os resultados desse estudo demonstraram a heterogeneidade genética HLA na população brasileira, o que poderá contribuir para a elaboração de estratégias de busca de doadores voluntários de medula óssea para o REDOME. O método de álgebra linear (SVD) utilizado em algumas análises foi adequado e corrobora com a história de ocupação do território brasileiro.



**Figura 11:** Representação espacial dos dados analisados pelo Programa Structure. Cada indivíduo está representado como um ponto colorido.



**Figura 12:** Árvore construída pelo algoritmo Neighbor Joining.

# The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment

R. A. Fabreti-Oliveira<sup>1,2,3</sup>, E. Nascimento<sup>3,4</sup>, C. G. Fonseca<sup>5</sup> & M. A. Santos<sup>2</sup>

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

2 Departamento da Ciência da Computação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

3 IMUNOLAB – Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, Belo Horizonte, MG, Brazil

4 Instituto de Ensino, Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil

5 Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

## Key words

Brazilian population; computational biology; genetic distances; human leukocyte antigen allele and haplotype frequencies; linear algebra; sequence-based typing

## Correspondence

Raquel Aparecida Fabreti-Oliveira  
IMUNOLAB – Laboratório de  
Histocompatibilidade  
Genética e Imunologia de Transplantes  
Av Bernardo Monteiro 971  
11° andar  
30150-281 Belo Horizonte  
MG  
Brazil  
Tel: +55 31 3274 6160  
Fax: +55 31 3274 6160  
e-mail: raquel@imunolabtx.com.br

Received 26 August 2013; revised 20  
February 2014; accepted 17 March 2014

doi: 10.1111/tan.12352

## Abstract

The aim of this study was to investigate the human leukocyte antigen (HLA) molecular variation across the Brazilian population in order to determine possible regional differences, which would be highly relevant to optimizing donor recruitment strategies in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and understanding the population genetic background of this heterogeneous country. HLA data of 551 HSCT donors from five Brazilian regions were characterized by high-resolution DNA alleles at the HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 loci and compared with other populations in Brazil and worldwide populations. Allele and haplotype frequencies were estimated. The analysis was performed to assess Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) among different loci in each recruitment center. Genetic variation was explored through genetic distance analyzed by using a new algorithm based on linear algebra, taking into account geographic regions of Brazil. The results indicated a heterogeneous genetic composition of the Brazilian population, such that HLA allele and haplotype frequencies exhibit different distributions among Brazilian regions, which has important implications for donor matching. In addition, a pronounced differentiation was observed by the absence of clustering of the regional populations in the reduced-dimension space. These data may be useful for increasing donor recruitment with more genetic representativeness in the Brazilian Volunteer Bone Marrow Donors Registry (REDOME).

## Introduction

The human leukocyte antigen (HLA) complex in humans maps to the short arm of chromosome 6 within the major histocompatibility complex (MHC) (1). The HLA genes are the most polymorphic genes in the human genome (2). They code for cell-surface molecules subdivided into HLA classes I and II, which are functionally distinct and present antigen-derived peptides to CD8+ and CD4+ T cells, respectively (3). More than 8500 classical HLA class I (HLA-A, -B and -C) and II (HLA-DRB1 and -DQB1) alleles have been published according to release 3.13.0 of the IMGT/HLA database (4). The high level of HLA gene variability makes each individual genetically unique and results in graft rejection in organ and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (5). The notably high level of polymorphism and the pattern of distribution of HLA alleles and haplotypes in the human populations worldwide also make the search for compatible organ and stem cell donors more

difficult, which implies that strategies need to be developed to optimize the search for highly compatible donors for HSCT (5). Thus, the knowledge of HLA diversity patterns, including HLA allele and haplotype frequency distributions, linkage disequilibrium and the presence of rare HLA variants in human populations, is crucial to recipient–donor matching in HSCT and solid organ transplantation programs. Knowledge of the HLA allele distribution is also crucial to evaluate the genetic risk for susceptibility for autoimmunity and infectious human diseases. Additionally, the HLA genes have particular interest as genetic markers in anthropological and demographic studies to establish relationships among human populations in various regions of the world and allow us to identify the genetic influence of human population migrations (6, 7).

Significant linkage disequilibrium and low recombination rates are observed between HLA loci because of physical linkage and other mechanisms, including natural selection (8).

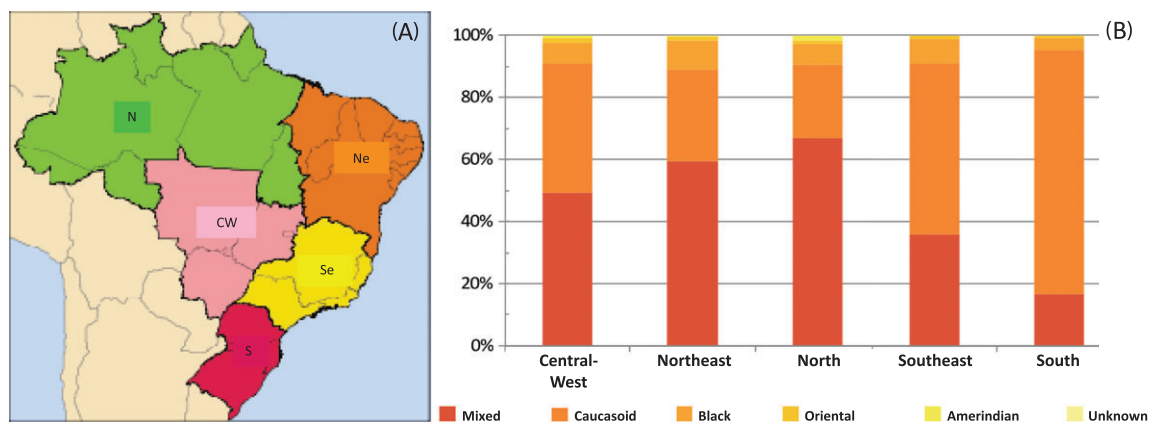


This extensive linkage disequilibrium has a clinical application in organ and tissue transplantation. Patients with haplotypes in linkage disequilibrium are more probably to find a compatible donor (9).

In this study, the Brazilian Volunteer Bone Marrow Donors Registry (REDOME) was used to explore the genetic diversity of HLA loci in Brazilian populations; five loci, HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1, were previously poorly documented at the high-resolution level (9–12). Brazil is the fifth largest country in the world by area and has a population of almost 200 million individuals. Brazil is politically divided into 26 states and a Federal District (with the capital Brasilia) and grouped into five geographic regions (Figure 1A). Among these regions, the Southeast region is the most populous, followed by the Northeast, South, North and Central-West regions. The North region, which includes a large portion of the Amazon rainforest, is the largest region of Brazil, and the South region, which has a great European influence, is the smallest region. The Southeast region is the most economically, industrially and agriculturally developed region. Moreover, Brazil is characterized by the migration of ethnic groups among regions; this migration forms one of the most heterogeneous populations in the world, as a result of five centuries of inter-ethnic crosses between peoples from three major ancestral roots: the European colonizers (mainly represented by the Portuguese), the African slaves (mainly from West Africa) and the Amerindians (13) (Figure 1B). Briefly, the Portuguese (the first group of Europeans) arrived in the 16th century and began the process of colonization and exploration of Brazilian territory. With the Iberian Union later in the 16th century, Portugal and its colonies, including Brazil, fell under the domain of Spain. In the early 17th century, French and Dutch forces invaded the Brazilian Northeastern coast. In the same period, settlers carried out expeditions into the interior of Brazil, including in the Amazon region, in search of natural wealth and indigenous labor. In the late 16th and early 17th centuries, the consolidation of slave labor in Brazil.

In the late 17th century and early 18th century, the exploration of Brazil for precious minerals (primarily gold) began in the Southeast and Central-West by the Portuguese. In the mid-18th century, the Portuguese colonization of southern Brazil began. Other immigrants came to Brazil beginning in the mid-19th century as Italians, Spanish and Germans (14). The immigration of the individuals from middle orient to Brazil began late 19th century. Currently, around 15 million Brazilians have Arab ancestry. The majority is Lebanese, while the remainder is predominantly Syrian and Palestinian. The presence of Egyptians, Moroccans, Jordanians and Iraqis is also observed (14). In the early 20th century, the Japanese immigrants had as main destinations Southeast region (São Paulo state) and South region (Paraná state) to work in the coffee crops (14). The Japanese community in Brazil is one of the largest in the world, composed around 1.5 million of individuals (14) (Figure 1B). The internal mobility in Brazil is mainly because of economic issues, following predominantly two paths: the expansion of agricultural borders and to the Southeast region, the most economically developed. The migration to the Southeast region, mainly of individuals from the Northeast, is quite a significant demographic phenomenon. The factors that contribute to the increased flow of internal migrants are the constructions of large cities such as Brasilia, expansion of the agricultural frontier in the Central West and North regions and hydroelectric power plants (15). Owing to this territorial expansion and thus admixture, the Brazilian people formed as a large heterogeneous social and cultural population that was regionalized by arts, music, literature, architecture, oral traditions, folklore, food and more.

In this study, HLA data were analyzed using several algorithms; certain of these algorithms used information retrieval based on linear algebra and were developed for this analysis. The purpose of this study was to estimate the HLA-A, -B, -C, DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies at high resolution level in order to identify regional differences



**Figure 1** (A) Map of the Brazil establishing the considered regions and (B) different percentages of the contributing ethnicity for each region. Instituto Nacional do Semiárido (INSA) (13).

within the Brazilian population, and compare these data with worldwide population groups.

## Material and methods

### Subject

The REDOME is currently the third-largest registry of hematopoietic stem cells donors in the international network. This register was activated in 1993 and today contains more than three million registered donors. The participants used in this study included 551 healthy and unrelated donor volunteer subjects between 18 and 55 years of age. To eliminate bias, they consisted of non-related donors already on the registry who were compatible at low or medium resolution to recipients on the waiting list. They were grouped according to which geographic region of Brazil they belonged: North (N), 24 (4.36%); Northeast (Ne), 81 (14.70%); Central West (CW), 36 (6.53%); South (S), 88 (15.97%); and Southeast (Se), 322 (58.44%). All the subjects used in this study were typed for HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 at high resolution level. This study was approved by the Research Ethics Committees for human research at the Federal University of Minas Gerais, MG (#675/2008).

### HLA typing

All HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 high-resolution typing was performed using genomic DNA from each sample isolated using the Biopur DNA Extraction Kit according to the manufacturer's instructions (SR Produtos para Laboratório, PR, Brazil). HLA typing was performed by sequence-based typing (SBT) using Secore Kits according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Foster City, CA). Exons 2, 3 and 4 of HLA class I; exons 2 and 3 of the HLA-DQB1 locus; and exon 2 of HLA-DRB1 were bidirectionally sequenced using an ABI 3130 and 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the sequences were analyzed by uTYPE 6.0 RUO software (Life Technologies). To resolve ambiguities across the exons encoding the peptide binding region (PBR), the complementary polymerase chain reactions using sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP) (One Lambda, Canoga Park, CA), polymerase chain reaction sequence specific primers (PCR-SSP) (One Lambda) and group-specific sequencing primers (GSSP) (Life Technologies) were also performed. HLA alleles that have identical nucleotide sequences across the exons encoding the PBR were designated by an upper case 'G' defined in the World Health Organization (WHO) HLA nomenclature (16).

### Data analysis

Allele frequencies were obtained by direct counting. For each locus, the observed genotype counts were compared to those expected under Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The exact test for deviations from HWE was performed using the

method of Guo and Thompson, 1992 (17). A *P*-value lower than 0.05 was interpreted as evidence that the sample was not under HWE. The haplotype frequencies were estimated using the iterative expectation maximization (EM) algorithm (18). Linkage disequilibrium (LD) between alleles at each pair of loci, and overall (locus pair-level) normalized to values between 0 and 1, was calculated. All genetic population analyses were performed by PYPOP version 32-0.7.0 (Lancaster *et al.*, 2003) (19).

The HLA-A, -C, -B, -DRB1 and -DQB1 alleles were examined by the rare alleles detector (RAD) tool available via the allele frequency website (<http://www.allelefrequencies.net>, Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011) (20). The RAD tool provides a summary of those alleles that are considered very rare, rare and frequent (20, 21).

### Population comparisons

The HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele frequencies from the European, African, Asian and Amerindian populations were genetically compared to the Brazilian population. The HLA data used for inter-population comparisons were taken from 'http://www.allelefrequencies.net' website (20) and other publications according to Table 1; this analysis was performed by taking into account the worldwide number (*n*) of different populations with data about HLA frequencies observed as classes I and II (*n* = 21) class I (*n* = 34) and class II (*n* = 38) (Table 1).

The method used to generate the genetic distances matrix was based on linear algebra to perform information retrieval (IR) and classification. This is the same tool used by search engines, such as Google. In these matrices, the elements were the frequencies of the HLA alleles in each population represented as a vector in a high-dimensional Euclidean space. These matrices underwent factorization by the singular value decomposition (SVD) method that (a) captures most of the important underlying structure in the association among elements of the data set, (b) reduces rank allowing the graphical analysis and data visualization and (c) removes the noise that plagues IR methods (22–24). To visualize the populations in the reduced-dimension space, the algorithm described by Marcolino *et al.*, 2010 (25) was used. As a result of the factorization, the singular values were obtained. The number of singular values representing the *k*-groups present in a data set was used as 'a priori' information for *k*-means clustering algorithm (26).

The neighbor-joining method was used to reconstruct the dendrograms from the factored matrices. This analysis and the generation of plots and dendrograms were performed in MATLAB programming language version 7.8.0 (The MathWorks, Inc., 2009) (26).

## Results

### Gene diversity and HWE tests

Among the five Brazilian population regions, 42 HLA-A distinct alleles, 77 HLA-B alleles, 28 HLA-C alleles, 41



**Table 1** Brazilian and worldwide human populations for which HLA alleles were analyzed in this study

POP #	Population	<i>n</i>	HLA data	Reference	POP #	Population	<i>n</i>	HLA data	Reference
1	Argentina-Gran Chaco Eastern Toba	135	Class II	(20)	24	Kenya-Nandi	241	Class I	(32)
2	Bolivia-Aymaras	102	Class II	(20)	25	Libya	426	Classes I and II	(39)
3	Brazil-Guarani-Kaiowá	155	Class II	(20)	26	Mali	138	Class I	(32)
4	Brazil-Terena	60	Classes I and II	(20)	27	Marocos-Settat Chaouya	98	Classes I and II	(20)
5	Brazil-Ticuna	50	Classes II	(20)	28	Mexico-Mayan	163	Class II	(20)
6	Cameroon	126	Class I	(20)	29	Mexico-Oaxaca Mixe	55	Class I	(20)
7	Cameroon-Beti	174	Class II	(20)	30	Mexico-Oaxaca Mixtec	103	Class I	(20)
8	Carib-Perija Range Yuçpa	73	Classes I and II	(40)	31	Mexico-Oaxaca Zapotec	90	Class I	(20)
9	Central African Republic-Aka Pygmy	93	Class II	(20)	32	Mexico-Tarahumara	44	Classes I and II	(35)
10	Chile-Easter Island	21	Class I	(20)	33	Paraguay-Aché	87	Class II	(20)
11	China-Han	3296	Classes I and II	(41)	34	Peru-Lamas City Lama	83	Class II	(20)
12	Congo-Kinshasa Bantu	90	Class II	(20)	35	Portugal-Azores	102	Classes I and II	(42)
13	Ecuador-Cayapa	183	Class II	(20)	36	Rwanda-Kigali Hutu and Tutsi	281	Class II	(20)
14	England-North West	298	Classes I and II	(20)	37	South Africa-Natal Zulu	100	Class I	(20)
15	Equatorial Guinea-Bioko Island Bubi	100	Class II	(20)	38	Spain	253	Classes I and II	(43)
16	Ethiopia-Amhara	98	Class II	(20)	39	Tunisia	104	Class II	(20)
17	Ethiopia-Oromo	83	Class II	(20)	40	Uganda	163	Class I	(32)
18	France-Southeast	130	Classes I and II	(20)	41	Uganda-Kampala	175	Class I	(20)
19	Germany	8862	Classes I and II	(20)	42	Peru-Uros	105	Class II	(20)
20	Ireland-South	250	Classes I and II	(20)	43	Venezuela-Perja Mountain Bari	55	Class I	(20)
21	Italy-IBMDR	~16289	Classes I and II	(33)	44	Venezuela-Sierra de Perija Yuçpa	73	Classes I and II	(20)
22	Japan-Central	371	Classes I and II	(20)	45	Zambia	45	Class I	(32)
23	Kenya-Luo	265	Class I	(32)	46	Zimbabwe-Harare Shona	230	Classes I and II	(20)

HLA, human leukocyte antigen; *n*: number of individuals.

HLA-DRB1 alleles and 16 HLA-DQB1 alleles were observed. The allelic HLA lineages showed greater allelic diversity, with nine different alleles observed in the *HLA-A\*02* lineage, twelve in the *B\*15*, five in the *C\*07* and nine in the *DRB1\*04* (Table S1, Supporting Information). In the HLA-DQB1 locus, the greatest diversity of allelic lineages was observed in both *DQB1\*03* and *DQB1\*06*, with five different alleles in each one (Table S1). As expected for highly polymorphic genes, the HLA diversity measured by the estimated heterozygosity was very high, with small differences between the Brazilian regions, indicating large intra-population diversity. The estimated heterozygosity was 0.889–0.938 for HLA-A, 0.889–1.000 for HLA-B, 0.861–0.958 for HLA-C, 0.928–0.972 for HLA-DRB1 and 0.852–0.958 for HLA-DQB1.

In analyzing the Brazilian population by region, deviations from HWE were not observed in the N and S regions ( $P > 0.05$ ). However, there were observed deviations from HWE for HLA-A ( $P = 0.0492$ ) and HLA-DRB1 ( $P = 0.0125$ ) in the Ne region, HLA-B ( $P = 0.0322$ ) and HLA-C ( $P = 0.0215$ ) in the CW region, and HLA-A ( $P = 0.0169$ ) and HLA-B ( $P = 0.0004$ ) in the Se region. In all regions, the number of homozygotes observed did not differ significantly from the number expected under HWE, even in the three Brazilian regions which deviated from HWE: HLA-A ( $P = 0.7807$ ), HLA-DRB1 ( $P = 0.9842$ ) in the Ne region, HLA-B ( $P = 0.6871$ ), HLA-C ( $P = 0.8845$ ) in CW region and HLA-A ( $P = 0.6994$ ), HLA-B ( $P = 0.8023$ ) in Se region. Migration between the Brazilian regions may explain the HWE deviations in the Ne, CW and Se regions.

These deviations from HWE suggest the existence of a population structure in Brazil with significant heterogeneity among regions, based on the allele and haplotype frequencies as described below.

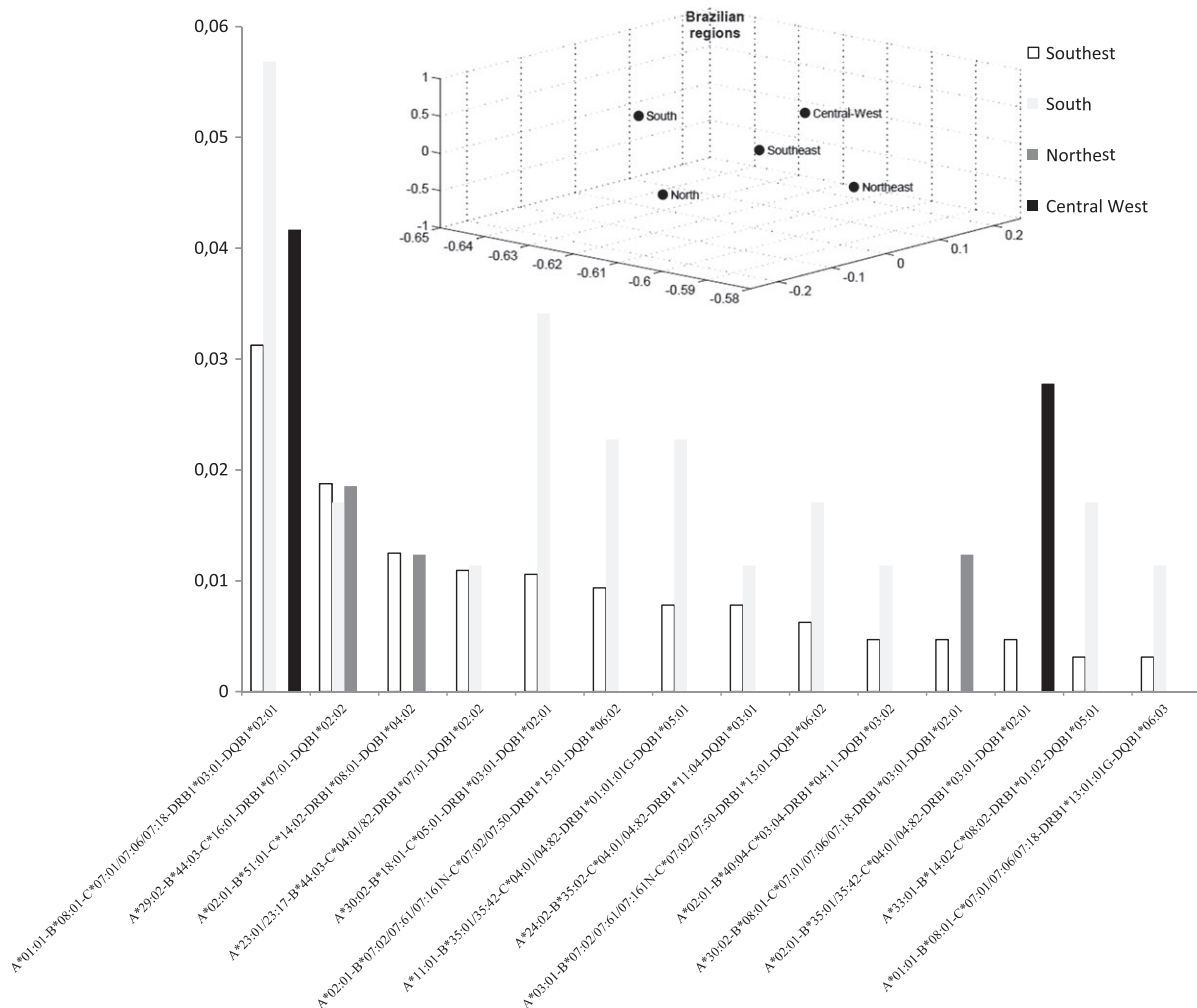
#### HLA allele and haplotype frequencies

The HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele frequencies estimated in each Brazilian region and in the whole Brazilian Registry are shown in Table S1. For the HLA-A locus, the *HLA-A\*02:01* allele was the most frequent in the five Brazilian regions, ranging from 19.75% to 27.08% (Table S1). The *HLA-A\*01:01* and *A\*03:01* alleles were also among the five most frequently observed HLA alleles. For the HLA-B locus, the *HLA-B\*51:01* allele was the most frequent in the Ne, Se and S regions, with frequencies of 7.66%, 10.49% and 13.64%, respectively (Table S1). The *HLA-B\*35:01/35:42* (12.50%) and *B\*40:02* (8.33%) were observed most frequently in the CW and N regions, respectively. The *HLA-B\*07:02/07:61/07:161N* and *B\*18:01* alleles were among the 10 alleles most frequent in the five Brazilian regions. For the HLA-C locus, the *HLA-C\*04:01/04:82* was the most frequent allele in all five regions, followed by *HLA-C\*07:01/07:06/07:18* in the Ne, Se and CW regions. In the S region, the second most frequent allele was *HLA-C\*05:01* (Table S1). For the HLA-DRB1 locus, the most frequent allele was *HLA-DRB1\*03:01* in the CW and S regions (Table S1). The *HLA-DRB1\*07:01* allele was the most frequent allele in the N and Se regions, and the *HLA-DRB1\*13:01:01G* was the most frequent allele in the

Ne region, but in the regions where the *HLA-DRB1\*03:01* and *DRB1\*07:01* alleles were not the most frequent allele, they were present within the three most frequent HLA alleles observed. The *HLA-DQB1\*03:01* allele was the most frequent HLA-DQB1 allele in all the Brazilian regions except the CW region, with a frequency ranging from 17.03% to 19.31%; the most frequent allele in the CW region was *HLA-DQB1\*02:01* (16.67%) (Table S1).

The HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 haplotype exhibiting the highest frequency in the CW, S and Se regions was *HLA-A\*01:01-B\*08:01-C\*07:01/07:06/07:18-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01*, with observed frequencies of 0.04167, 0.05682 and 0.03125, respectively (Table S2). In the Ne region, four haplotypes had a frequency of 0.01852 as estimated by the EM algorithm: *A\*02:01-B\*08:01-C\*07:01/07:06/07:18-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01*; *A\*68:01-B\*40:04-C\*03:04-DRB1\*04:11-DQB1\*03:02*; *A\*29:02-B\*44:03-C\*16:01-DRB1\*07:01-DQB1\*02:02* and *A\*32:01-B\*15:20-C\*02:02-DRB1*

*\*13:01:01G-DQB1\*04:02* (Table S2). In the N region, only the *A\*32:01-B\*40:02-C\*02:02-DRB1\*13:01:01G-DQB1\*06:03* haplotype was observed in two copies and a frequency of 0.04167 (Table S2). Other HLA haplotypes that were observed at the highest frequency in at least one of the regions were *HLA-A\*30:02-B\*18:01-C\*05:01-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01* (0–3.41%), *A\*02:01-B\*35:01/35:42-C\*04:01/04:82-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01* (0–2.78%), *A\*30:02-B\*15:03:01G-C\*02:10-DRB1\*13:02-DQB1\*06:04* (0–2.78%) and *A\*34:02-B\*13:02-C\*08:04-DRB1\*08:04-DQB1\*04:02* (0–2.78%). The south and southeast regions shared five loci HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 haplotypes that were observed with frequencies greater than or equal to 1% (Figure 2). In this figure, heterogeneity of haplotype frequency distributions between the different Brazilian regions was observed, with some haplotypes being 3–5 times more frequent in some regions than in others, such as *A\*30:02-B\*18:01-C\*05:01-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01*, *A\*01:01-B\*08:01-C\*07:*



**Figure 2** The frequencies of the five-locus HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 haplotypes observed with frequencies greater than or equal to 1% across the Brazilian regions.

01:07:06/07:18-DRB1\*13:01:01G-DQB1\*06:03, A\*33:01-B\*14:02-C\*08:02-DRB1\*01:02-DQB1\*05:01 and A\*02:01-B\*35:01/35:42-C\*04:01/04:82-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01. This result is consistent with the *k*-means clustering of the Brazilian population projection (Figure 2) that suggests the absence of clusters, and therefore genetic heterogeneity. Additional data regarding 2-locus HLA haplotypes are available in the Table S2.

### Global linkage disequilibrium (LD) and gamete association between HLA alleles

For LD analysis, the Brazilian population was considered by region. The strength of the associations between pairwise HLA loci was shown in Table 2. In general, the global associations between the HLA-DQB1 locus and the HLA-A and HLA-C alleles were the weakest two loci associations (Table 2). On the other hand, the A-B, B-C, B-DRB1 and DRB1-DQB1 loci had the strongest association (Table 2), all of them were statistically significant, except the association between B-DRB1 in the North region (Table 2). The relative LD ( $D'_{ij}$ ) values of the HLA pairwise haplotypes of the four major global LD loci pairs (A-B, B-C, B-DRB1, DRB1-DQB1) with statistically significant associations ( $P < 0.05$ ) in the regions population are shown in Table S3.

### Rare alleles

*HLA-A\*31:15* and *HLA-A\*31:48* alleles were observed in our cross-section of the Brazilian population. According to RAD classification, these are rare alleles. The *HLA-A\*31:15* allele was observed once in the S region and twice in Ne region, and the *HLA-A\*31:48* was observed once in Se region.

### The genetic relationships between Brazilian and worldwide human populations

The Brazilian population was compared to other World populations typed at the high-resolution level. On the basis of number

of singular values obtained by SVD analysis, the data were divided into five, six and four groups for class I and class II, respectively (Figure S1). The 3D visualization of the clustering performed by the *k*-means algorithm confirms the 'a priori' information of the number of singular values (Figure S2).

In the dendrogram shown in Figure 3A, it was observed that the five Brazilian regions were grouped in the same cluster with the European and African populations. However, the South region was closer to the European populations from Spain, Germany, England and Ireland than the other Brazilian regions. The other four well-defined groups observed were composed of Asians from China and Japan and two other by Amerindians. On the basis of this dendrogram with more genetic markers (HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1), greater genetic proximity between the Brazilian population and the European populations was observed.

The dendrogram of the Figure 3B, shows that the Brazilian population is more genetically similar to Europeans than Africans (mainly South region supported) by a cluster formed exclusively by an African population. The other clusters observed were composed of Amerindian and Asians or only Amerindians. Here, the relationship between the Amerindian and Asian populations was more evident.

In the dendrogram of the Figure 3C, all Brazilians were included in a cluster composed of Europeans, and populations from north and sub-Saharan Africa. As mentioned before, greater genetic proximity to Europeans than to Africans was observed for the Brazilian population. The other three well-defined groups observed were composed of one Asian and two Amerindian, which were the most distant from all populations.

### Discussion

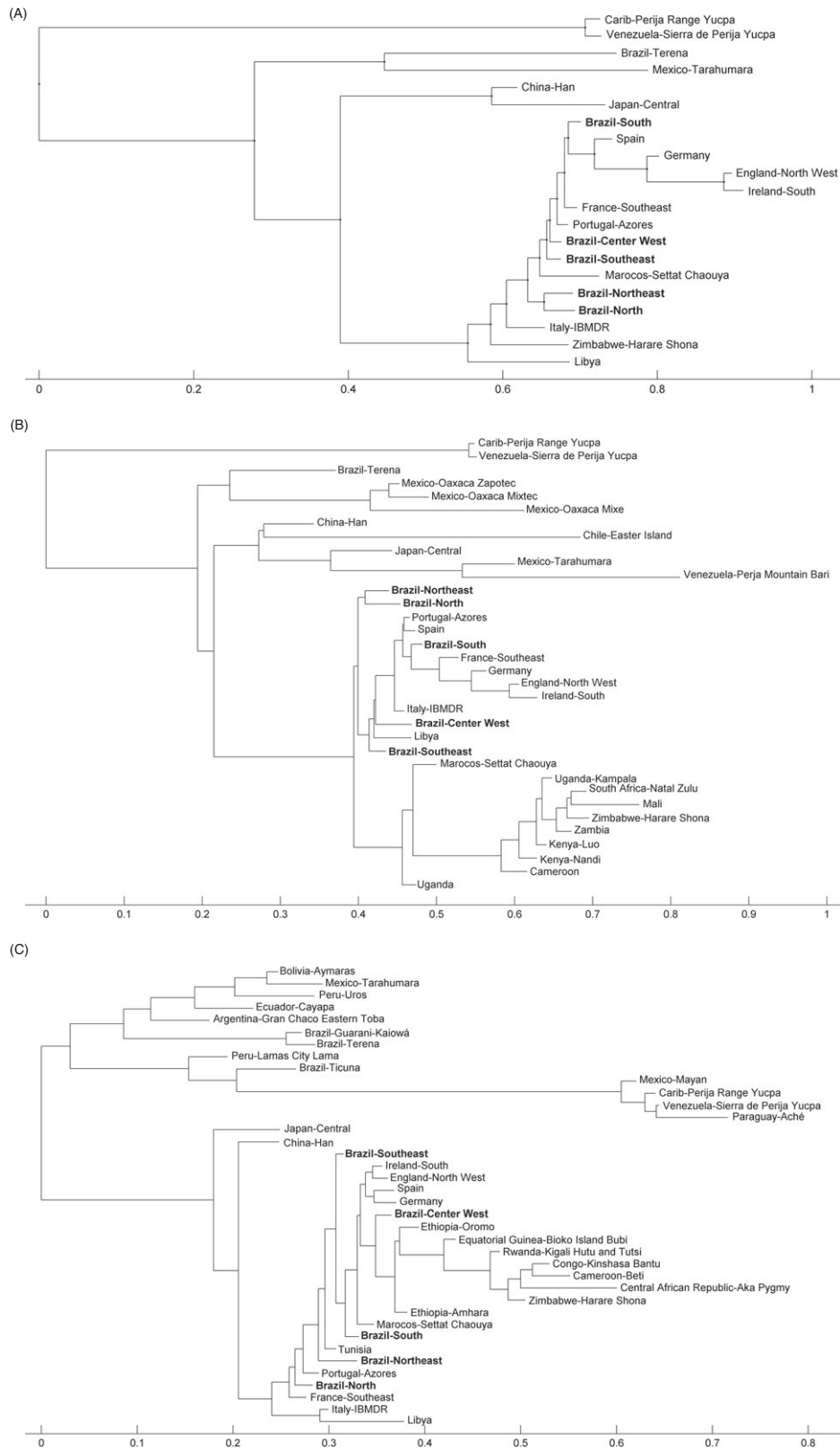
This study represents the first in-depth analysis of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 typing of the genetic landscape of the Brazilian population. The analysis of

**Table 2** Global linkage disequilibrium between pairwise HLA loci found in the Brazilian population

Locus pair	CW		Ne		N		Se		S	
	D'	P-value	D'	P-value	D'	P-value	D'	P-value	D'	P-value
A:B	0.90700	0.0000 <sup>a</sup>	0.83553	0.0000 <sup>a</sup>	0.94901	0.0180 <sup>a</sup>	0.66834	0.0000 <sup>a</sup>	0.74200	0.0000 <sup>a</sup>
A:C	0.82799	0.0000 <sup>a</sup>	0.68919	0.0000 <sup>a</sup>	0.85932	0.0320 <sup>a</sup>	0.51829	0.0000 <sup>a</sup>	0.66656	0.0000 <sup>a</sup>
A:DQB1	0.73453	0.2132	0.60279	0.0370 <sup>a</sup>	0.82279	0.4565	0.45705	0.0000 <sup>a</sup>	0.64364	0.0000 <sup>a</sup>
A:DRB1	0.79796	0.1231	0.71201	0.1011	0.87262	0.6927	0.56013	0.0000 <sup>a</sup>	0.68551	0.0000 <sup>a</sup>
B:C	0.97759	0.0000 <sup>a</sup>	0.94156	0.0000 <sup>a</sup>	0.97330	0.0000 <sup>a</sup>	0.92236	0.0000 <sup>a</sup>	0.94336	0.0000 <sup>a</sup>
B:DQB1	0.86856	0.2763	0.79679	0.0000 <sup>a</sup>	0.93798	0.1191	0.65194	0.0000 <sup>a</sup>	0.75504	0.0000 <sup>a</sup>
B:DRB1	0.90211	0.0080 <sup>a</sup>	0.86821	0.0000 <sup>a</sup>	0.93669	0.1612	0.76621	0.0000 <sup>a</sup>	0.81533	0.0000 <sup>a</sup>
C:DQB1	0.71735	0.5205	0.61072	0.0831	0.79065	0.6246	0.46710	0.0000 <sup>a</sup>	0.62805	0.0000 <sup>a</sup>
C:DRB1	0.80213	0.1722	0.74322	0.0330 <sup>a</sup>	0.85572	0.1822	0.60784	0.0000 <sup>a</sup>	0.73252	0.0000 <sup>a</sup>
DRB1:DQB1	0.98037	0.0000 <sup>a</sup>	0.96447	0.0000 <sup>a</sup>	0.94744	0.0000 <sup>a</sup>	0.94706	0.0000 <sup>a</sup>	0.97353	0.0000 <sup>a</sup>

CW, Central West; Ne, North East; N, North, Se, Southeast; S, South.

<sup>a</sup>Statistically significant at the 5%.



**Figure 3** Dendrograms based on high-resolution typing. (A) HLA class I (HLA-A, -B, and -C loci) and II (HLA-DRB1 and -DQB1 loci). (B) HLA class I (HLA-A, -B, and -C loci). (C) HLA class II (HLA-DRB1 and -DQB1 loci).



the HLA-A, B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies reveals high levels of diversity based on number of HLA alleles for each HLA loci, as well as high heterozygosity (more than 85%) for all HLA loci. The distribution of certain HLA alleles in the populations of specific regions of Brazil did not fit HWE for distributions of HLA genotypes. Deviation from HWE was not observed in the S and N regions, possibly because of lower rates of population admixture in this region compared to the other Brazilian regions. However, the main cause of these observed deviations from HWE was not because of an excess of homozygotes, but was most probably the result of other conditions, such as a distribution of heterozygous genotypes that included certain rare alleles, recent population admixture and natural selection (27). We observed similar results compared to those published by Brazil Network of Immunogenetics ([www.imunogenetica.org](http://www.imunogenetica.org)) of HLA population typing in two digits. Thus, this comparison is important to reinforce the absence of bias selection in our study.

Our results reveal regional heterogeneity across Brazil, both by absence of clusters in the Brazilian population (Figure 2) and by some of the most common alleles and haplotypes exhibiting a significant difference in at least one of the regions compared with the rest of Brazil (*HLA-A\*24:02*, *B\*44:03* and *DRB1\*15:01*). The HLA loci sampled in the Northeast, Central West and Southeast regions were not in HWE. Nevertheless, the formation of two groups was observed; this may be consistent with the pattern of isolation by distance. Thus, the size of the Brazilian territory may be acting as a genetic barrier to gene flow. This study reveals the very complex pattern of linkage disequilibrium between the HLA loci only relates to the Brazilian population, as shown in Table S3.

The rare alleles identified in this study were also observed in other populations; for example, the *HLA-A\*31:15* allele has been previously reported in Argentinean Caucasoids (20). The *HLA-A\*31:48* allele was reported three times in the Italian Caucasoid population and once in the United States Caucasoid population (20); this is consistent with approximately 25 million people of Italian descent living in Brazil (as estimated by the Italian embassy), spread mainly in the S and Se regions of Brazil. According to Common and Well Document (CWD) catalogue CWD 2.0.0 (28), the following HLA alleles, despite being classified as common, showed low frequency in the Brazilian population (<0.001): *A\*02:04*, *A\*02:09*, *A\*02:20*, *A\*03:02*, *A\*24:07*, *A\*26:08*, *A\*29:01*, *A\*69:01*, *A\*74:03*, *B\*15:16*, *B\*18:03*, *B\*27:08*, *B\*40:16*, *B\*44:10*, *B\*47:01*, *B\*51:02*, *B\*51:08*, *C\*15:06*, *DRB1\*08:06*, *DRB1\*13:05*, *DQB1\*03:04*. The *HLA-B\*07:14*, *-B\*15:37*, *-B\*35:11*, *-B\*39:13*, *-B\*51:04*, *-C\*07:05* and *-DRB1\*11:18* observed in the Se region of Brazil at low frequencies, were classified in the well-documented category according to CWD catalogue. The following HLA alleles were also observed with frequency less than 0.001, but were not described in the CWD catalogue: *A\*31:48*, *A\*33:04*, *B\*15:146*, *B\*37:04*, *C\*07:93*.

## European continent

The high observed frequencies of *HLA-A\*01:01*, *B\*08:01* and *B\*44:02* are a feature of European populations from Ireland, England, Germany and France; the frequencies of these alleles can vary from 10% to 25% in these European populations (20, 29–31). These alleles were observed in all five Brazilian regions, but are generally more frequent in the Southeast region, being observed in up to 14% of the population. For the *HLA-A\*68* lineage, the *A\*68:01* allele, which is prevalent in European populations, was also observed in all regions of Brazil but was more frequent in the populations from the S and Ne regions, which show a great influence of German and Italian immigration and Dutch immigration, respectively. The *HLA-A\*68:02* allele is more prevalent in sub-Saharan populations (20, 32) and was also observed in the Ne, Se and CW Brazilian regions. In the CW region, the allele was twice as frequent as the *A\*68:01* allele. An interesting observation was that the *HLA-A\*68:02* allele was not found in the S, nor the N region, suggesting both similarities as well as differences in these two regions.

The *A\*01:01-B\*08:01-C\*07:01/07:06/07:18-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01* haplotype, frequent in European populations, was observed in all regions of Brazil and was the most frequent haplotype in the CW, S and Se regions. The *A\*03:01-B\*07:02/07:61/07:161N-C\*07:02/07:50-DRB1\*15:01-DQB1\*06:02* haplotype, frequent in European populations (4.20% in the English population), was observed in the S and Se regions of Brazil. The *A\*02:01-B\*44:02-C\*05:01-DRB1\*04:01-DQB1\*03:01* haplotype, also frequent in Europeans, was observed only in the Se region (5, 20, 33). The classical *A\*30:02-B\*18:01-C\*05:01-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01* haplotype belonging to Mediterranean populations from Europe and North Africa (31, 34) was observed in the S and Se regions of Brazil (Table S2).

## African continent

The *A\*23:01* allele is a frequent allele in Zimbabwe (approximately 13%) (20, 32). In our study, the *A\*23:01/23:17* was observed in all regions, except the S region. In the Ne and Se regions, it was observed at a greater frequency than in the other Brazilian regions, 0.0679 and 0.05156, respectively. The *A\*30:01* and *A\*30:02* alleles are also common in the Zambian population, with frequencies of 13.95% and 23.26%, respectively (20, 32). In Brazil, these two alleles were observed in all regions, but, together, the frequencies of these two alleles were highest in the Ne region and lowest in the S region. Other alleles that are common in the African populations (such as *A\*02:02*, *B\*15:16*, *B\*27:03*) were found only in the Se region of Brazil, with frequencies of 0.00781, 0.00156 and 0.00313, respectively. The *HLA-B\*42:02* allele was also observed in the S, Se and Ne region. The *A\*74:01:01G* allele was observed in all regions of Brazil, except the S region. The *DRB1\*15:03* allele, which occurs at a frequency of 26.60% in Cameroonian

populations (20), was found in all Brazilian regions, except the N region.

The *A\*30:01-B\*42:01-C\*17:01-DRB1\*15:03-DQB1\*06:02* haplotype, which is frequent in African populations, was observed in the Se region. Other two loci haplotypes that are prevalent in African were also found in the Brazilian population, such as *A\*36:01-B\*53:01* in the S region and *A\*23:01/23:17-B\*44:03-C\*04:01/04:82* in the S and Se regions. The *A\*30:02-DRB1\*15:03-DQB1\*06:02* and *A\*30:02-B\*15:03:01G* haplotypes were observed in the CW and Se regions, respectively.

### Amerindian

Despite having been observed in American Indians, Caucasoid, Mixed and Oriental populations, the *HLA-A\*31:01* allele is more frequent in Amerindian populations, such as the Brazil-Terenas, Mexico-Oaxaca Zapotec and Mexico-Oaxaca Mixtec; the frequency of this allele ranges from 6.7% to 18.33% in Brazil (20), and this allele was more frequent in the S (6.25%) and Ne (6.79%) regions. The *A\*24:03*, *B\*15:04*, *B\*40:04* and *C\*03:04* alleles, which are found at high frequencies in Amerindians, (20, 35) were also found in the Brazilian population, especially in the S region. The *B\*35:06* and *B\*39:03* alleles, which also occur at a high frequency in Amerindians (20), were found in the Ne, S and Se regions of Brazil. The HLA class II alleles observed in high frequency in Amerindians, such as *DRB1\*04:11* (>31% in Brazil-Ticunas, Yucpa from Venezuela and Carib, Mexico-Mayan and Paraguay-Aché), *DRB1\*16:02* (24.5–33.4% in three Amerindian groups from Brazil: Ticuna, Terena and Guarani-Kaiowá), *DRB1\*08:07* (11.6–22.4% in Yucpa from Venezuela and Carib, Brazil-Terena and Brazil-Ticuna), *DRB1\*8:02* (20.3–35.22% in Argentina-Gran Chaco Eastern Toba, Peru-Uros, Bolivia-Aymara, Mexico-Tarahumara and Brazil-Terena), *DRB1\*14:02* (16.7–31.81% in Brazil-Guarani Kaiowá, Bolivia-Aymara, Mexico-Tarahumara and Brazil-Terena) were also observed in the Brazilian population, but at frequencies lower than in the Amerindian populations.

The *A\*02:01-B\*40:04-C\*03:04-DRB1\*04:11-DQB1\*03:02* haplotype, observed in S and Se regions, is characteristic of Hispanic populations, historically people of mixed Mediterranean Caucasoid and American Indian groups. The HLA alleles common in the Amerindian populations were observed in the Brazilian population as mosaics in the haplotypes formed by alleles from European and African origins; the *A\*31:01*, *B\*40:04*, *C\*03:04* *DRB1\*04:11*, *DRB1\*08:07*, *DRB1\*14:02* and *DRB1\*16:02* alleles are present in the following haplotypes: *A\*68:01-B\*40:04-C\*03:04-DRB1\*04:11-DQB1\*03:02*, *A\*68:01-B\*35:02-C\*03:04-DRB1\*08:07-DQB1\*04:02*, *A\*02:01-B\*35:06-C\*04:01/04:82-DRB1\*08:02-DQB1\*4:02*, *A31:01-B\*40:02-C\*04:01/04:82-DRB1\*08:02-DQB1\*06:03*, *A\*31:01-B\*35:20-C\*04:01/04:82-DRB1\*16:02-DQB1\*03:01*, *A\*31:01-*

*B\*35:04-C\*04:01/04:82-DRB1\*14:02-DQB1\*03:01* and *A\*31:01-B\*52:01-C\*15:02-DRB1\*14:02-DQB1\*03:01* in the Se and Ne regions (Table S2).

This observation is related to the history of the colonization of Brazil, which includes the exploitation of slave labor in the Brazilian territory and the expropriation of Amerindians after the arrival of Europeans. The results obtained from the analysis of HLA, a genetic autosomal marker, give scientific support to the observation that there is a greater genetic distance between the Brazilian population and the Amerindian than between the Brazilian population and Europeans and Africans.

In this study, genetic similarity between the Brazilian population and the populations of North Africa and the Mediterranean was showed according to dendrograms shown in Figure 3A–C. This similarity can be historically attributed to the invasion of the Iberian Peninsula by the Moors from the north of Africa over the course of seven centuries in the middle ages. During that time period, there were additional genetic mixtures as a result of many invasions and migrations involving the Arabic, Greek, Roman, Jewish and other populations. The similarity between Brazilians and peoples from North Africa and the Mediterranean are possibly via the Portuguese colonization because there are no records about significant numbers of individuals from North Africa coming to Brazil. Other immigrants came to Brazil beginning in the mid-19th century, especially Italians, Spanish, Germans, Japanese and Syrian-Lebanese. The presence of large numbers of Germans and Dutch in the S and Ne regions, respectively, differentiate the populations of these two regions from those in North Africa, the Mediterranean countries, and the remainder of Brazil, as observed in Figure 3B. On the other hand, the N and S regions were more genetically differentiated and had less admixture with African populations, although its population differs significantly in the relative proportions of European and Amerindian influence. The similarity of the Brazilian population with populations from various regions of Africa is consistent with the fact that slaves were brought to Brazil from many regions of the African continent, particularly the Central-West (Angola, Cabinda, Congo), West (Senegambia, Bight of Benin, Bight of Biafra, Windward Coast, Gold Coast and Sierra Leone) and Southeast regions of Africa (Mozambique) to constitute the AfroBrazilian population. In Brazil, the migrations of AfroBrazilians that occurred between countryside provinces, mainly from the Ne and Se regions in the 19th century, homogenized the distribution of the group in the Brazil. One consequence of this was haplotypes sharing between the Ne and Se regions of Brazil (Figure 2). The Brazilian population is very genetically diverse, and even with the high rate of migration within the Brazilian territory, some differentiation has been preserved. The Brazilian population from the S and N regions is more differentiated from the others. The S region is more similar to the European populations than the population of other Brazilian regions. The Se is more mixed and many of its haplotypes are shared with the populations from other regions (Figure 2).

These results have three main implications. First, the HLA data from REDOME may be used only under certain conditions as reference for epidemiological and population studies because different Brazilian regions deviate from HWE. Thus, the regions at equilibrium may be considered as representative of the local population. Second, these results also show the feasibility of using linear algebra-based methodology for analysis of the HLA data; this method showed good consistency in comparison to published history of the region and other published studies. The possibility of extracting information with less data is part of the success of the method and may explain how this method exposed some of the nontrivial relationships between the original dataset items; reducing the space dimensionality of the data which makes this method important because it benefits both the performance of and the quality of analysis (36). Finally, to conclude, another crucial implication of this study addresses the optimization of recruitment strategies for unrelated HSCT donors and suggests long-term recommendations and strategies to improve the ethnic representativeness and hence the HLA diversity of the bone marrow registry. Solutions include increasing the donor pool size (37) or refining donor recruitment using information on the patterns of HLA diversity (38). To this end, our future goal is to develop strategies for optimizing unrelated donor search using bioinformatics tools.

### Acknowledgments

This work was financially supported by Laboratory IMUNOLAB – Histocompatibility, Genetics and Transplant Immunology, Belo Horizonte, MG, Brazil. We thank the post-graduate course in Bioinformatics of the Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil and REDOME for providing the data for analysis.

### Conflicts of interests

The authors have declared no conflicting interests.

### References

1. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; **401**: 921–3.
2. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK *et al.* The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 2003; **425**: 805–11.
3. Neeffjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 823–36.
4. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D1222–7.
5. Buhler S, Nunes JM, Nicoloso G, Tiercy J-M, Sanchez-Mazas A. The heterogeneous HLA genetic makeup of the Swiss population. *PLoS One* 2012; **7**: e41400.
6. Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D *et al.* Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* 2011; **133**: 143–64.
7. Buhler S, Sanchez-Mazas A. HLA DNA sequence variation among human populations: molecular signatures of demographic and selective events. *PLoS One* 2011; **6**: e14643.
8. Sanchez-Mazas A, Djoulah S, Busson M *et al.* A linkage disequilibrium map of the MHC region based on the analysis of 14 loci haplotypes in 50 French families. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**: 33–41.
9. Bortolotto AS, Petry MG, 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**: 180–5.
10. Braun-Prado K, Mion ALV, Pereira NF, Culpi L, Petzl-Erler ML. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* 2000; **56**: 417–27.
11. 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**: 204–9.
12. 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.
13. Medeiros SS, Cavalcante AMB, Marin AMP, Tinôco LBM, Salcedo IH, Pinto TF. Sinopse do Censo Demográfico para o Semiárido Brasileiro. Campina Grande: INSA 2012.
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Brasil: 500 anos de povoamento*. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.
15. Oliveira LAP, Oliveira ATR. *Reflexões sobre os deslocamentos populacionais no Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.
16. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010; **75**: 291–455.
17. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; **48**: 361–72.
18. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995; **12**: 921–7.
19. Lancaster A, Nelson MP, Single RM, Meyer D, Thomson G. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing largescale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput* 2003; **8**: 514–25.
20. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: D913–9.
21. Gonzalez-Galarza FF, Mack SJ, Hollenbach J *et al.* 16th IHIW: extending the number of resources and bioinformatics analysis for the investigation of HLA rare alleles. *Int J Immunogenet* 2013; **40**: 60–5.
22. Eldén L. Numerical linear algebra in data mining. *Acta Numer* 2006; 327–84.
23. Eldén L. *Matrix Methods in Data Mining and Pattern Recognition (Fundamentals of Algorithms)*. Philadelphia: SIAM, 2007.



24. Berry MW, Dumais ST, O'Brien GW. Using linear algebra for intelligent information retrieval. *SIAM Rev* 1995; **37**: 573–95.
25. Marcolino LS, Couto BRGM, Santos MA. Genome visualization in space. *Adv Soft Comput* 2010; **74**: 225–32.
26. Mathworks Inc.. *MATLAB Version 7.8.0 for Windows*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2009.
27. Chen JJ, Hollenbach JA, Trachtenberg EA, Just JJ, Carrington M, Rønningen KS. Hardy-Weinberg testing for HLA class II (DRB1, DQA1, DQB1, AND DPB1) loci in 26 human ethnic groups. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 533–42.
28. Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA *et al.* Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens* 2013; **81**: 194–203.
29. Williams F, Meenagh A, Maxwell AP, Middleton D. Allele resolution of HLA-A using oligonucleotide probes in a two-stage typing strategy. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 59–68.
30. Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol* 2011; **62**: 1009–30.
31. Pingel J, Solloch UV, Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, Schmidt AH. High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: how can they be used to improve unrelated donor searches? *Hum Immunol* 2013; **74**: 330–40.
32. Cao K, Moormann AM, Lyke KE *et al.* Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. *Tissue Antigens* 2004; **63**: 293–325.
33. Rendine S, Ferrero NM, Sacchi N, Costa C, Pollichieni S, Amoroso A. Estimation of human leukocyte antigen class I and class II high-resolution allele and haplotype frequencies in the Italian population and comparison with other European populations. *Hum Immunol* 2012; **73**: 399–404.
34. Arnaiz-Villena A, Martínez-Laso J, Alonso-García J. Iberia: population genetics, anthropology, and linguistics. *Hum Biol* 1999; **71**: 725–43.
35. García-Ortiz JE, Sandoval-Ramírez L, Rangel-Villalobos H *et al.* High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population. *Tissue Antigens* 2006; **68**: 135–46.
36. del Castillo-Negrete D, Hirshman SP, Spong DA, D'Azevedo EF. Compression of magnetohydrodynamic simulation data using singular value decomposition. *J Comput Phys* 2007; **222**: 265–86.
37. Kollman C, Abella E, Baitty RL *et al.* Assessment of optimal size and composition of the U.S. National Registry of hematopoietic stem cell donors. *Transplantation* 2004; **78**: 89–95.
38. Schmidt AH, Solloch UV, Baier D *et al.* Regional differences in HLA antigen and haplotype frequency distributions in Germany and their relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens* 2010; **76**: 362–79.
39. Cano P, Testi M, Andreani M *et al.* HLA population genetics: a Lebanese population. *Tissue Antigens* 2012; **80**: 341–55.
40. Layrisse Z, Guedez Y, Dominguez E *et al.* Extended HLA haplotypes in a Carib Amerindian population: the Yucpa of the Perija Range. *Hum Immunol* 2001; **62**: 992–1000.
41. He J, Li Y, Bao X *et al.* Common and well-documented (CWD) alleles of human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 loci for the Chinese Han population do not quite correlate with the ASHI CWD alleles. *Hum Immunol* 2012; **73**: 61–6.
42. Spínola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J. HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens* 2005; **66**: 217–30.
43. Balas A, García-Sánchez F, Vicario JL. Allelic and haplotypic HLA frequency distribution in Spanish hematopoietic patients. Implications for unrelated donor searching. *Tissue Antigens* 2011; **77**: 45–53.

## Supporting Information

The following supporting information is available for this article:

**Table S1.** Human leukocyte antigen (HLA) classes I and II allele frequencies observed in the Brazilian population

**Table S2.** Human leukocyte antigen (HLA) haplotypes frequencies observed in the Brazilian population

**Table S3.** Relative linkage disequilibrium (LD) ( $D'_{ij}$ ) of the human leukocyte antigen (HLA) pairwise haplotypes found in the Brazilian population

**Figure S1.** Visualization of singular values from SVD. Note the sudden drop in the singular values denotes the cutoff point for dimension reduction.

**Figure S2.** Data visualization of human leukocyte antigen (HLA) high-resolution typing in the R3 Euclidean space. (A) Class I (HLA-A, -B and -C loci) and II (HLA-DRB1 and -DQB1 loci). (B) Class I (HLA-A, -B and -C loci). (C) Class II (HLA-DRB1 and -DQB1 loci). The population numbers were based on Table 1. The Brazilian regions whose data comprise this study are numbered as North (47) Northeast (48), Central West (49), South (50) and Southeast (51).





B*37:04	0	0	0	0.0057	0	0.0009	DRB1*14:01:01G	0.0417	0.0247	0.0417	0.0455	0.0203	0.0272
B*38:01	0	0	0.0139	0.0227	0.0188	0.0154	DRB1*14:02	0	0.0185	0.0139	0.0114	0.0156	0.0154
B*39:01	0.0208	0.0062	0.0139	0.0057	0.0094	0.0091	DRB1*14:06	0	0	0	0	0.0047	0.0027
B*39:02	0.0208	0	0	0	0.0047	0.0036	DRB1*15:01	0.0833	0.0494	0.0278	0.0796	0.0531	0.0563
B*39:03	0	0	0	0.0114	0.0016	0.0027	DRB1*15:02	0	0.0062	0.0139	0	0.0078	0.0064
B*39:05	0.0208	0	0	0	0.0047	0.0036	DRB1*15:03	0	0.0247	0.0139	0.0114	0.0469	0.0336
B*39:06	0	0.0124	0.0139	0.0057	0.0047	0.0064	DRB1*16:01	0.0208	0	0.0139	0.0284	0.0125	0.0136
B*39:09	0	0	0.0139	0.0114	0.0047	0.0054	DRB1*16:02	0.0625	0.0124	0.0278	0	0.0172	0.0163
B*39:13	0	0	0	0	0.0016	0.0009	DQB1*02:01	0.1042	0.0926	0.1667	0.1307	0.1109	0.1153
B*40:01	0	0	0.0139	0.0114	0.0094	0.0082	DQB1*02:02	0.125	0.0988	0.125	0.0909	0.1453	0.128
B*40:02	0.0833	0.037	0.0139	0	0.0172	0.02	DQB1*03:01	0.1875	0.179	0.0972	0.1932	0.1703	0.1715
B*40:04	0.0417	0.0309	0	0.0171	0.0094	0.0145	DQB1*03:02	0.0417	0.1111	0.0972	0.0455	0.0938	0.0862
B*40:16	0	0.0062	0	0	0	0.0009	DQB1*03:03	0.0833	0.0124	0.0139	0.0568	0.0266	0.0309
B*41:01	0	0.0062	0.0139	0	0.0063	0.0054	DQB1*03:04	0	0	0	0	0.0016	0.0009
B*41:02	0	0.0062	0	0	0.0063	0.0045	DQB1*03:19	0.0208	0.0185	0.0417	0.0114	0.0109	0.0145
B*42:01	0.0417	0.0185	0	0.0114	0.0094	0.0118	DQB1*04:02	0.125	0.0926	0.0694	0.0511	0.0641	0.069
B*42:02	0	0.0062	0	0.0057	0.0031	0.0036	DQB1*05:01	0.0208	0.0803	0.1528	0.1534	0.1063	0.1089
B*44:02	0.0625	0.0432	0.0278	0.0455	0.0469	0.0454	DQB1*05:02	0.0417	0.0185	0.0139	0.0284	0.025	0.0245
B*44:03	0.0625	0.0494	0.0278	0.0455	0.0656	0.0572	DQB1*05:03	0.0417	0.0247	0.0417	0.0455	0.0188	0.0263
B*44:10	0	0	0	0	0.0016	0.0009	DQB1*06:01	0	0.0062	0.0139	0	0.0078	0.0064
B*44:27	0	0	0	0.0057	0.0016	0.0018	DQB1*06:02	0.0833	0.0864	0.0556	0.1023	0.1109	0.1007
B*45:01	0	0.0062	0	0	0.0219	0.0136	DQB1*06:03	0.125	0.1173	0.0556	0.0682	0.0688	0.078
B*47:01	0	0	0	0	0.0016	0.0009	DQB1*06:04	0	0.0556	0.0417	0.0114	0.0266	0.0281
B*48:02	0.0208	0.0124	0	0.0114	0.0078	0.0091	DQB1*06:09	0	0.0062	0.0139	0.0114	0.0125	0.0109

Note: List of abbreviations used in the below tables: North (N), Northeast (Ne), Central West (CW), South (S), Southeast (Se).

## Supporting Information

**Table S2:** HLA haplotypes frequencies observed in the Brazilian population.

Only haplotypes with a frequency  $\geq 1\%$  (for 5 loci) or  $\geq 2\%$  (for 2 loci) in at least one Brazilian region are listed. The haplotypes for 2 loci was reported only to the four major global LD between pairs of HLA loci (A-B, B-C, B-DRB1 and DRB1-DQB1).

HLA alleles that have identical nucleotide sequences across the exons encoding the Peptide binding region were designated by an upper case 'G' defined in the WHO HLA nomenclature or alternative allele separated by a bar.

List of abbreviations used in the below tables: North (N), Northeast (Ne), Central West (CW), South (S), Southeast (Se).

## HLA-A-B-C-DRB1-DQB1

Haplotypes	N (n=24)	Ne (n=81)	CW (n=36)	S (n=88)	Se (n=322)	All (n=551)
A*01:01-B*08:01-C*03:03-DRB1*13:01:01G-DQB1*02:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*01:01-B*08:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0	0.04167	0.05682	0.03125	0.03267
A*01:01-B*08:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	0	0	0	0.01136	0.00313	0.00454
A*01:01-B*15:146-C*06:02/06:83-DRB1*04:02-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*01:01-B*15:17-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*13:02-DQB1*06:04	0	0.01235	0	0	0	0.00272
A*01:01-B*27:02-C*05:01-DRB1*08:01-DQB1*06:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*01:01-B*35:02-C*04:01/04:82-DRB1*16:01-DQB1*06:03	0	0	0.01389	0	0	0.00091
A*01:01-B*35:03-C*04:01/04:82-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*01:01-B*37:01-C*06:02/06:83-DRB1*01:02-DQB1*05:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*01:01-B*40:02-C*03:04-DRB1*07:01-DQB1*04:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*01:01-B*44:03-C*02:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*01:01-B*51:01-C*15:02-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:01	0	0.01235	0	0	0	0
A*01:01-B*57:01-C*04:01/04:82-DRB1*07:01-DQB1*03:03	0	0	0.01389	0	0	0
A*01:01-B*58:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*07:01-DQB1*04:02	0	0	0.01389	0	0	0.00091
A*01:01-B*58:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*08:04-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0.00091
A*01:02-B*49:01-C*03:04-DRB1*04:05-DQB1*03:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*04:01/04:82-DRB1*15:01-DQB1*03:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50-DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0	0	0	0.02273	0.00937	0.00953
A*02:01-B*08:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0.01852	0	0	0	0.00272
A*02:01-B*15:01/15:01:01:02N-C*03:03-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0	0.01389	0	0.00313	0.00181
A*02:01-B*15:01/15:01:01:02N-C*18:01:01G-DRB1*13:01:01G-DQB1*03:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*15:04-C*07:02/07:50-DRB1*16:02-DQB1*04:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*15:17-C*14:02-DRB1*16:02-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*18:01-C*05:01-DRB1*13:02-DQB1*02:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*27:02-C*02:02-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*02:01-B*27:05:02G-C*01:02-DRB1*14:01:01G:01G-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0

A*02:01-B*27:05:02G-C*06:02/06:83-DRB1*11:01:01G-DQB1*02:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*35:01/35:42/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0	0.02778	0	0.00469	0.00635
A*02:01-B*35:01/35:42/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*14:01:01G-DQB1*05:03	0	0	0.01389	0	0.00313	0.00635
A*02:01-B*35:01/35:42-C*04:01/04:82/04:82-DRB1*16:02-DQB1*05:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*35:05-C*04:01/04:82/04:82-DRB1*04:05-DQB1*03:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*35:05-C*04:01/04:82-DRB1*14:01:01G-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*35:05-C*04:01/04:82-DRB1*16:02-DQB1*03:01	0	0	0.01389	0	0	0.00272
A*02:01-B*35:06-C*04:01/04:82-DRB1*08:02-DQB1*04:02	0	0.01235	0	0	0.00156	0.00181
A*02:01-B*35:08-C*04:01/04:82-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:01	0	0	0	0.01705	0	0.00091
A*02:01-B*39:01-C*04:01/04:82-DRB1*03:01-DQB1*05:03	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*39:06-C*07:02/07:50-DRB1*01:01:01G-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*40:01-C*03:04-DRB1*03:01-DQB1*06:04	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*40:04-C*03:04-DRB1*04:11-DQB1*03:02	0	0	0	0.01136	0.00469	0.00272
A*02:01-B*42:01-C*17:01-DRB1*08:04-DQB1*03:01	0	0	0	0.01136	0	0.00091
A*02:01-B*42:01-C*17:01-DRB1*11:02-DQB1*03:19	0	0.01235	0	0	0	0
A*02:01-B*44:02-C*02:02-DRB1*15:01-DQB1*04:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0.02083	0	0	0	0	0.00272
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*04:01-DQB1*03:01	0.02083	0.00617	0	0	0.00625	0.00635
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*11:01:01G-DQB1*06:02	0	0	0	0.01136	0	0
A*02:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*11:04-DQB1*03:01	0	0	0	0.01136	0	0.00091
A*02:01-B*44:02-C*08:02-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0.01235	0	0	0	0
A*02:01-B*51:01-C*02:02-DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	0	0.01235	0	0	0	0
A*02:01-B*51:01-C*03:03-DRB1*13:01:01G-DQB1*04:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*51:01-C*03:04-DRB1*13:01:01G-DQB1*03:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*51:01-C*14:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0.01235	0	0	0	0.00272
A*02:01-B*51:01-C*14:02-DRB1*08:01-DQB1*04:02	0	0.01235	0	0	0.01250	0.00998
A*02:01-B*51:01-C*15:02-DRB1*04:08-DQB1*03:01	0	0	0.01389	0	0	0.00181
A*02:01-B*57:01-C*07:01/07:06/07:18/07:06/07:18-DRB1*08:02-DQB1*03:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:01-B*58:01-C*03:04-DRB1*16:02-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:01-B*58:02-C*06:02/06:83-DRB1*13:01:01G-DQB1*02:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:05-B*50:01-C*05:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0.02083	0	0	0	0	0

A*02:05-B*50:01-C*06:02/06:83-DRB1*04:02-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*02:11-B*48:02-C*04:01/04:82-DRB1*09:01-DQB1*03:03	0.02083	0	0	0	0.00469	0.00544
A*02:11-B*51:01-C*04:01/04:82-DRB1*09:01-DQB1*03:03	0	0	0	0.01136	0	0
A*02:20-B*44:02-C*14:02-DRB1*13:01:01G-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*03:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50-DRB1*04:05-DQB1*03:02	0	0.01235	0	0	0.00156	0.00363
A*03:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0.00313	0.00096
A*03:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50-DRB1*08:02-DQB1*04:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*03:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0	0	0	0.01705	0.00625	0.00726
A*03:01-B*07:02/07:61/07:161N-C*12:03-DRB1*15:01-DQB1*05:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*03:01-B*07:05-C*01:02-DRB1*04:05-DQB1*03:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*03:01-B*15:03:01:G-C*02:10-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:19	0	0	0.01389	0	0	0.00091
A*03:01-B*35:01/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*15:01-DQB1*03:01	0	0	0	0.01136	0	0
A*03:01-B*35:01/35:42-C*07:01/07:06/07:18/07:06/07:18-DRB1*01:01:01G-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*03:01-B*35:08-C*04:01/04:82-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0.01235	0	0	0	0.00181
A*03:01-B*38:01-C*12:03-DRB1*13:01:01G-DQB1*03:01	0	0	0	0.01136	0	0.00272
A*03:01-B*39:01-C*07:02/07:50-DRB1*16:01-DQB1*06:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*03:01-B*44:03-C*02:10-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:19	0.02083	0	0	0	0	0
A*03:01-B*44:03-C*05:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*03:01-B*44:03-C*15:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*03:01-B*51:01-C*14:02-DRB1*07:01-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*03:01-B*57:01-C*03:03-DRB1*07:01-DQB1*03:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*14:01-C*08:02-DRB1*07:01-DQB1*03:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*15:10-C*12:02-DRB1*03:01-DQB1*06:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*27:05:02G-C*15:05:01G:01G:01G-DRB1*01:01:01G-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*35:01/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*01:01:01G-DQB1*05:01	0	0	0	0.02273	0.00781	0.01051
A*11:01-B*35:01/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*35:01/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*11:04-DQB1*05:02	0	0	0.01389	0	0	0.00091
A*11:01-B*35:01/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*13:02-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*35:01/35:42-C*07:02/07:50-DRB1*04:04-DQB1*03:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*35:03-C*04:01/04:82-DRB1*01:03-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*11:01-B*51:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*16:01-DQB1*03:01	0	0	0	0.01136	0	0

A*23:01/23:17-B*41:01-C*04:01/04:82-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*23:01/23:17-B*44:03-C*04:01/04:82-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0	0	0.01136	0.01094	0.00907
A*24:02-B*18:01-C*06:02/06:83-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0.02083	0	0	0.01136	0	0
A*24:02-B*35:01/35:42-C*04:01/04:82-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*24:02-B*35:02-C*04:01/04:82-DRB1*11:04-DQB1*03:01	0	0	0	0.01136	0.00781	0.00726
A*24:02-B*35:03-C*04:01/04:82-DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	0	0	0.01389	0	0	0
A*24:02-B*35:03-C*12:03-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:01	0	0	0.01389	0	0.00156	0.00091
A*24:02-B*44:03-C*08:02-DRB1*11:01:01G-DQB1*06:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*24:02-B*44:03-C*16:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0.01235	0	0	0	0.00181
A*24:02-B*51:01-C*01:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0	0	0.01705	0	0
A*24:03-B*35:04-C*04:01/04:82-DRB1*08:04-DQB1*03:03	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*24:03-B*39:09-C*04:01/04:82-DRB1*01:01:01G-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*24:03-B*40:02-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*07:01-DQB1*03:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*24:03-B*40:04-C*03:04-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*25:01-B*51:01-C*14:02-DRB1*08:01-DQB1*06:03	0	0	0.01389	0	0	0
A*26:01-B*38:01-C*05:01-DRB1*01:01:01G-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*26:01-B*51:07-C*05:01-DRB1*01:01:01G-DQB1*06:03	0	0	0.01389	0	0	0
A*29:01-B*51:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*29:02-B*15:03:01:G-C*16:01-DRB1*12:01:01G-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*29:02-B*18:01-C*05:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*29:02-B*44:03-C*16:01-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0	0.01852	0	0.01705	0.01875	0.01719
A*29:02-B*51:01-C*16:01-DRB1*14:01:01G-DQB1*05:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*30:01-B*15:17-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*15:01-DQB1*04:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*30:01-B*42:01-C*08:02-DRB1*08:04-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*30:01-B*53:01-C*04:01/04:82-DRB1*08:04-DQB1*03:19	0	0	0.01389	0	0	0.00091
A*30:02-B*08:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0.01235	0	0	0.00469	0.00363
A*30:02-B*14:02-C*08:02-DRB1*11:03-DQB1*03:01	0	0	0.01389	0	0	0.00091
A*30:02-B*15:03:01:G-C*02:10-DRB1*13:02-DQB1*06:04	0	0	0.02778	0	0	0
A*30:02-B*18:01-C*04:01/04:82-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*30:02-B*18:01-C*05:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0	0	0.03409	0.01059	0.01543
A*30:02-B*18:01-C*12:03-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:01	0	0	0.01389	0	0	0

A*30:02-B*57:03-C*03:04-DRB1*04:01-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*31:01-B*35:02-C*12:03-DRB1*14:01:01G-DQB1*02:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*31:01-B*35:05-C*07:02/07:50/07:50-DRB1*14:02-DQB1*06:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*31:01-B*39:02-C*07:02/07:50/07:50-DRB1*03:01-DQB1*04:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*31:01-B*39:05-C*03:03-DRB1*08:04-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*31:01-B*40:02-C*04:01/04:82-DRB1*08:02-DQB1*06:03	0	0.01235	0	0	0	0
A*31:01-B*40:04-C*03:04-DRB1*04:11-DQB1*03:02	0.02083	0	0	0	0.00156	0.00181
A*31:15-B*15:05-C*01:02-DRB1*09:01-DQB1*04:02	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*32:01-B*15:20-C*02:02-DRB1*13:01:01G-DQB1*04:02	0	0.01852	0	0	0	0
A*32:01-B*40:02-C*02:02-DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	0.04167	0	0	0	0	0.00817
A*32:01-B*50:01-C*01:02-DRB1*07:01-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQB1*05:01	0	0	0	0.01705	0.00313	0.00726
A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*11:04-DQB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*33:01-B*14:02-C*17:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*33:01-B*37:01-C*06:02/06:83-DRB1*01:03-DQB1*05:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*33:03-B*53:01-C*04:01/04:82-DRB1*08:04-DQB1*02:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*34:02-B*08:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0	0	0.01389	0	0.00313	0.00272
A*34:02-B*13:02-C*08:04-DRB1*08:04-DQB1*04:02	0	0	0.02778	0	0	0.00181
A*34:02-B*15:01/15:01:01:02N-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*07:01-DQB1*06:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*36:01-B*53:01-C*07:02/07:50-DRB1*08:02-DQB1*04:02	0	0	0	0.01136	0	0
A*66:01-B*15:03:01:G-C*02:10-DRB1*07:01-DQB1*03:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*68:01-B*35:02-C*03:04-DRB1*08:07-DQB1*04:02	0	0.01235	0	0	0	0.00091
A*68:01-B*40:02-C*14:02-DRB1*04:11-DQB1*06:03	0.02083	0	0	0	0	0
A*68:01-B*40:04-C*03:04-DRB1*04:11-DQB1*03:02	0	0.01852	0	0.00568	0	0.00726
A*68:01-B*42:01-C*17:01-DRB1*03:02-DQB1*06:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*68:01-B*44:02-C*07:04:01G:01G-DRB1*07:01-DQB1*05:03	0	0	0.01389	0	0	0
A*68:02-B*49:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*15:03-DQB1*06:02	0	0	0.01389	0	0	0
A*68:02-B*52:01-C*03:04-DRB1*15:02-DQB1*02:01	0	0	0.01389	0	0	0
A*74:01:01G-B*15:03:01:G-C*02:10-DRB1*01:01:01G-DQB1*06:09	0	0	0.01389	0	0	0
A*74:01:01G-B*18:01-C*02:10-DRB1*11:01:01G-DQB1*05:02	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*74:01:01G-B*49:01-C*07:01/07:06/07:18-DRB1*11:01:01G-DQB1*03:19	0	0	0.01389	0	0	0



**HLA-A-B**

<b>Haplotypes</b>	<b>N (n=24)</b>	<b>Ne (n=81)</b>	<b>CW (n=36)</b>	<b>S (n=88)</b>	<b>Se (n=322)</b>	<b>All (n=551)</b>
A*01:01-B*08:01	0.02083	0.01803	0.04167	0.07933	0.03850	0.04088
A*01:01-B*37:01	0.02083	0	0.01389	0	0.00156	0.00272
A*01:01-B*44:02	0.02083	0	0	0	0.00165	0.00130
A*01:01-B*57:01	0.02083	0	0.02778	0.01023	0.00458	0.00709
A*01:01-B*58:01	0	0	0.02778	0	0	0.00181
A*02:01-B*15:01/15:01:01:02N	0	0	0.02778	0	0.01481	0.01384
A*02:01-B*15:03:01:G	0.02083	0	0	0	0	0.00272
A*02:01-B*15:04	0.02083	0	0	0	0.00156	0.00272
A*02:01-B*27:02	0.04167	0	0	0	0	0.00095
A*02:01-B*27:05:02G	0.02083	0.01235	0.01389	0	0.00752	0.00623
A*02:01-B*35:01/35:42	0.02083	0.01235	0.04167	0.01136	0.02020	0.01957
A*02:01-B*35:05	0.02083	0	0.04167	0	0.00156	0.00363
A*02:01-B*40:02	0.06250	0	0.01389	0	0.00324	0.00310
A*02:01-B*40:04	0.04167	0	0	0.00790	0.00162	0.00354
A*02:01-B*44:02	0	0.02469	0	0.02841	0.03113	0.02886
A*02:01-B*51:01	0.02083	0.05507	0.04167	0.06865	0.03148	0.04051
A*02:05-B*18:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*02:11-B*48:02	0.02083	0.00617	0	0.01136	0.00781	0.00817
A*03:01-B*07:02/07:61/07:161N	0.02083	0.02469	0.02778	0.02841	0.01711	0.01989
A*03:01-B*39:01	0.02083	0	0	0.00568	0	0.00357
A*03:01-B*44:03	0.06250	0	0	0	0.00074	0.00225
A*11:01-B*35:01/35:42	0	0.01235	0.06944	0.03409	0.01094	0.01801
A*23:01/23:17-B*07:02/07:61/07:161N	0	0.02469	0	0.00852	0.00521	0.00645
A*24:02-B*35:02	0	0.02469	0	0.02273	0.00662	0.01223
A*24:02-B*35:03	0	0	0.04167	0.00568	0.00313	0.00537
A*24:02-B*50:01	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*24:03-B*15:05	0.02083	0	0	0	0	0
A*24:03-B*15:17	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*29:01-B*07:02/07:61/07:161N	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*29:02-B*15:03:01:G	0.02083	0	0.01389	0	0.00156	0.00189
A*29:02-B*44:03	0	0.03086	0	0.02273	0.02969	0.02715
A*29:02-B*51:01	0.02083	0	0	0	0	0
A*30:01-B*42:01	0.04167	0.01852	0	0	0.00781	0.00998
A*30:02-B*18:01	0.02083	0.00617	0.02778	0.03409	0.01444	0.01865
A*31:01-B*39:02	0.02083	0	0	0	0	0.00181
A*31:01-B*39:05	0.02083	0	0	0	0.00313	0.00272
A*31:01-B*44:02	0.02083	0	0	0	0	0
A*31:15-B*35:04	0.02083	0	0	0	0	0
A*32:01-B*40:02	0.02083	0.02469	0	0	0.00613	0.00901
A*32:01-B*44:02	0.02083	0	0	0.00568	0.00481	0.00309
A*32:01-B*50:01	0.02083	0	0	0	0	0.00035
A*33:01-B*14:02	0.04167	0	0	0.02273	0.01250	0.01267
A*33:03-B*53:01	0.02083	0	0	0	0	0.00160
A*34:02-B*13:02	0	0	0.02778	0	0	0.00181
A*34:02-B*15:01/15:01:01:02N	0.02083	0	0	0	0	0.00040

A*66:01-B*58:02	0.02083	0.00617	0	0	0.00156	0.00272
A*68:01-B*15:17	0.02083	0	0	0	0	0.00091
A*68:01-B*51:01	0.02083	0.02469	0	0.01926	0.00475	0.00763
A*74:01:01G-B*15:03:01:G	0	0.00617	0.02778	0	0.00313	0.00454
A*74:01:01G-B*18:01	0.02083	0	0	0	0	0.00091

---

## HLA-B-C

Haplotypes	N (n=24)	Ne (n=81)	CW (n=36)	S (n=88)	Se (n=322)	All (n=551)
B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50	0.04167	0.06790	0.04167	0.06818	0.05781	0.05898
B*08:01-C*03:03	0.02083	0.00617	0	0	0	0
B*08:01-C*07:01/07:06/07:18	0	0.03086	0.05556	0.09659	0.05625	0.05717
B*13:02-C*08:04	0	0	0.02778	0	0	0.00181
B*14:02-C*08:02	0.04167	0.03086	0.01389	0.06250	0.05625	0.04991
B*15:01/15:01:01:02N-C*07:01/07:06/07:18	0.02083	0.00617	0	0	0	0
B*15:03:01:G-C*02:10	0.04167	0.01852	0.05556	0	0.01250	0.01543
B*15:04-C*03:03	0.02083	0	0	0	0.00313	0.00363
B*15:05-C*01:02	0.02083	0.00617	0	0	0	0.00181
B*15:17-C*07:01/07:06/07:18	0.02083	0.01235	0	0.00568	0.00469	0.00635
B*15:17-C*14:02	0.02083	0	0	0	0	0.00091
B*18:01-C*02:10	0.02083	0.01235	0	0	0.00156	0.00363
B*18:01-C*05:01	0.04167	0.01235	0.04167	0.03409	0.01875	0.02337
B*27:02-C*02:02	0.04167	0	0	0.01136	0.00313	0.00544
B*27:05:02G-C*01:02	0.02083	0.00617	0.02778	0.00568	0.00313	0.00635
B*35:01/35:42-C*04:01/04:82	0.02083	0.03704	0.12500	0.06818	0.05154	0.05534
B*35:02-C*04:01/04:82	0	0.02469	0.02778	0.02273	0.02187	0.02269
B*35:03-C*04:01/04:82	0	0	0.04167	0	0.02031	0.01543
B*35:04-C*04:01/04:82	0.02083	0.00617	0	0.00568	0.00781	0.00817
B*35:05-C*04:01/04:82	0.02083	0.01235	0.04167	0.00568	0.00313	0.00817
B*35:08-C*04:01/04:82	0.01852	0	0	0.02273	0.01406	0.01452
B*37:01-C*06:02/06:83/06:83	0.02083	0.00617	0.01389	0	0.00313	0.00454
B*38:01-C*12:03	0	0	0.01389	0.02273	0.01875	0.01543
B*39:01-C*12:03	0.02083	0.00617	0.01389	0.00568	0.00937	0.00907
B*39:02-C*04:01/04:82	0.02083	0	0	0	0	0
B*39:05-C*07:02/07:50	0.02083	0	0	0	0.00313	0.00272
B*40:02-C*02:02	0.04167	0.02469	0	0	0.00937	0.01089
B*40:02-C*03:04	0.04167	0.00617	0.01389	0	0.00781	0.00817
B*40:04-C*03:04	0.04167	0.03086	0	0.01705	0.00937	0.01452
B*42:01-C*17:01	0.04167	0.01852	0	0.01136	0.00937	0.01180
B*44:02-C*05:01	0.06250	0.04321	0	0.04545	0.03594	0.03811
B*44:03-C*04:01/04:82	0.02083	0.00617	0.01389	0.01705	0.01562	0.01452
B*44:03-C*16:01	0.04167	0.04321	0	0.02841	0.03905	0.03538
B*48:02-C*04:01/04:82	0.02083	0.01235	0	0.01136	0.00781	0.00907
B*49:01-C*07:01/07:06/07:18	0	0.03086	0.02778	0.00568	0.03594	0.02813
B*50:01-C*06:02/06:83	0.04167	0.01852	0.01389	0.00568	0.02031	0.01815
B*51:01-C*01:02	0.00617	0	0	0.03409	0.00625	0.00998
B*51:01-C*05:01	0.00617	0	0	0.02841	0	0.00476
B*51:01-C*07:01/07:06/07:18	0.02083	0	0	0	0.00313	0.00356
B*51:01-C*14:02	0.02083	0.03086	0.02778	0.01705	0.02344	0.02336
B*51:01-C*15:02	0.02083	0.04321	0.01389	0.03409	0.02187	0.02631
B*53:01-C*07:02/07:50	0.02083	0	0	0	0	0
B*55:01-C*03:03	0.00617	0	0	0.02273	0.00781	0.00907
B*57:01-C*06:02/06:83	0	0	0	0.03409	0.01094	0.01270
B*57:01-C*07:01/07:06/07:18	0.02083	0	0.01389	0	0.00313	0.00363

B*58:01-C*07:01/07:06/07:18	0	0.01852	0.04167	0.01136	0.01250	0.01452
B*58:02-C*06:02/06:83	0.02083	0.01235	0	0	0.00781	0.00726

---

**HLA-B-DRB1**

<b>Haplotypes</b>	<b>N (n=24)</b>	<b>Ne (n=81)</b>	<b>CW (n=36)</b>	<b>S (n=88)</b>	<b>Se (n=322)</b>	<b>All (n=551)</b>
B*07:02/07:61/07:161N-DRB1*13:01:01G	0.02083	0	0	0	0	0.00121
B*07:02/07:61/07:161N-DRB1*15:01	0.02083	0.01235	0.01389	0.03977	0.02593	0.02483
B*08:01-DRB1*03:01	0	0.03086	0.05556	0.07386	0.04839	0.04784
B*08:01-DRB1*07:01	0.02083	0	0	0	0	0.00151
B*13:02-DRB1*08:04	0	0	0.02778	0	0	0.00181
B*14:02-DRB1*01:02	0	0.00617	0	0.02841	0.01875	0.01717
B*14:02-DRB1*08:04	0.02083	0	0	0	0.00156	0
B*14:02-DRB1*11:04	0.02083	0	0	0	0	0
B*15:01/15:01:01:02N-DRB1*13:01:01G	0.02083	0.01235	0.02778	0.00568	0	0.00871
B*15:03:01:G-DRB1*07:01	0.02083	0	0	0	0.00625	0.00544
B*15:03:01:G-DRB1*11:01:01G	0.02083	0	0.01389	0	0	0.00136
B*15:03:01:G-DRB1*13:02	0	0.00617	0.04167	0	0.00156	0.00405
B*15:04-DRB1*16:02	0.02083	0.00617	0	0	0.00313	0.00363
B*15:05-DRB1*09:01	0.02083	0	0	0	0	0
B*15:17-DRB1*15:01	0.04167	0	0		0	0.00181
B*18:01-DRB1*03:01	0.04167	0.01235	0.02778	0.03354	0.01324	0.01807
B*18:01-DRB1*11:01:01G	0.02083	0.01235	0	0	0	0.00221
B*27:02-DRB1*11:01:01G	0.02083	0	0	0.01136	0.00156	0.00363
B*27:02-DRB1*15:01	0.02083	0	0	0	0.00313	0.00272
B*27:05:02G-DRB1*11:01:01G	0.02083	0.00617	0	0	0	0.00181
B*35:01/35:42-DRB1*01:01:01G	0	0.01852	0.04167	0.02841	0.01940	0.02065
B*35:01/35:42-DRB1*03:01	0	0	0.04167	0	0.00393	0.00448
B*35:01/35:42-DRB1*16:02	0.02083	0	0.01389	0	0	0
B*35:04-DRB1*08:04	0.02083	0	0	0	0	0
B*35:05-DRB1*14:01:01G	0.02083	0	0.01389	0	0	0
B*37:01-DRB1*01:02	0.02083	0	0	0	0	0
B*39:01-DRB1*16:01	0.02083	0	0	0	0.00156	0.00181
B*39:02-DRB1*08:04	0.02083	0	0	0	0.00156	0.00091
B*39:05-DRB1*08:04	0.02083	0	0	0	0	0.00091
B*40:02-DRB1*07:01	0.02083	0	0	0	0	0
B*40:02-DRB1*13:01:01G	0.06250	0.00617	0	0	0.00625	0.00907
B*40:04-DRB1*04:01	0.02083	0	0	0	0	0
B*40:04-DRB1*04:11	0	0.02469	0	0.01705	0.00781	0.01180
B*40:04-DRB1*16:02	0.02083	0	0	0	0	0.00091
B*42:01-DRB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
B*42:01-DRB1*03:02	0.02083	0	0	0	0.00313	0.00272
B*44:02-DRB1*03:01	0.02083	0	0	0.00568	0	0
B*44:02-DRB1*04:11	0.02083	0.00617	0	0	0.00156	0.00181
B*44:02-DRB1*08:01	0.02083	0.00617	0	0	0	0.00099
B*44:03-DRB1*07:01	0.04167	0.01852	0	0.02273	0.04880	0.03804
B*44:03-DRB1*12:01:01G	0.02083	0	0	0	0	0
B*48:02-DRB1*09:01	0.02083	0.00617	0	0.01136	0.00469	0.00635
B*50:01-DRB1*07:01	0.04167		0.01389	0	0.00926	0.00891
B*51:01-DRB1*04:11	0.02083	0.01235	0	0	0	0.00615
B*51:01-DRB1*07:01	0	0.01852	0.01389	0.05114	0.00591	0.00889

B*51:01-DRB1*13:01:01G	0.02083	0.03086	0.01389	0.00705	0.01958	0.01706
B*51:01-DRB1*14:01:01G	0.02083	0.00617	0	0	0.00313	0.00362
B*53:01-DRB1*03:01	0.02083	0	0	0	0	0
B*57:01-DRB1*07:01	0	0	0.02778	0.02273	0.01222	0.01270
B*57:01-DRB1*08:02	0.02083	0	0	0	0	0
B*58:01-DRB1*07:01	0	0.01235	0.02778	0	0.00806	0.00801
B*58:02-DRB1*13:01:01G	0.02083	0	0	0	0	0.00181

---

**HLA-DRB1-DQB1**

<b>Haplotypes</b>	<b>N (n=24)</b>	<b>Ne (n=81)</b>	<b>CW (n=36)</b>	<b>S (n=88)</b>	<b>Se (n=322)</b>	<b>All (n=551)</b>
DRB1*01:01:01G-DQB1*05:01	0	0.03086	0.09722	0.07955	0.05156	0.05354
DRB1*01:02-DQB1*05:01	0	0.02469	0.01389	0.05114	0.03125	0.03176
DRB1*01:03-DQB1*05:01	0	0	0.02778	0.00568	0.00313	0.00454
DRB1*03:01-DQB1*02:01	0.10417	0.09259	0.16667	0.13068	0.11094	0.11525
DRB1*03:02-DQB1*04:02	0.02083	0	0	0	0.00781	0.00544
DRB1*04:01-DQB1*03:01	0.02083	0.02469	0	0.01705	0.00625	0.01089
DRB1*04:02-DQB1*03:02	0	0.01235	0.02778	0.01136	0.00937	0.01089
DRB1*04:05-DQB1*03:02	0	0.03704	0.04167	0.00568	0.02656	0.02450
DRB1*04:11-DQB1*03:02	0.04167	0.04321	0	0.02273	0.01875	0.02269
DRB1*07:01-DQB1*02:02	0.12500	0.09259	0.12500	0.08523	0.13419	0.11973
DRB1*07:01-DQB1*03:03	0	0	0.01389	0.03409	0.01738	0.01730
DRB1*08:01-DQB1*04:02	0.02083	0.02469	0.01389	0.00568	0.03281	0.02541
DRB1*08:02-DQB1*04:02	0	0.02469	0.01389	0.01705	0.00781	0.01270
DRB1*08:04-DQB1*03:01	0.02083	0.00617	0	0.01136	0.00156	0.00454
DRB1*08:04-DQB1*04:02	0.06250	0	0.04167	0	0.00469	0.00817
DRB1*08:07-DQB1*04:02	0	0.02469	0	0.00568	0.00625	0.00817
DRB1*09:01-DQB1*03:03	0.04167	0.00617	0	0.02273	0.00606	0.00992
DRB1*11:01:01G-DQB1*03:01	0.06250	0.04938	0.01389	0.07955	0.05938	0.05886
DRB1*11:01:01G-DQB1*03:19	0	0	0.02778	0	0.00156	0.00284
DRB1*11:01:01G-DQB1*05:02	0.02083	0.00617	0	0	0.00469	0.00454
DRB1*11:01-DQB1*06:02	0	0.02469	0.02778	0.01136	0.01406	0.01452
DRB1*11:04-DQB1*03:01	0	0.03086	0	0.05114	0.02813	0.02995
DRB1*12:01:01G-DQB1*03:19	0.02083	0	0	0	0	0.00082
DRB1*13:01:01G-DQB1*03:03	0.02083	0.00617	0	0	0.00313	0.00363
DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	0.12500	0.11728	0.04167	0.06818	0.06563	0.07532
DRB1*13:02-DQB1*06:04	0	0.05556	0.04167	0.01136	0.02656	0.02813
DRB1*14:01:01G-DQB1*05:03	0.04167	0.02469	0.04167	0.04545	0.01875	0.02632
DRB1*15:01-DQB1*06:02	0.08333	0.03704	0	0.07955	0.04844	0.05172
DRB1*15:03-DQB1*06:02	0	0.02469	0.01389	0.01136	0.04688	0.03358
DRB1*16:01-DQB1*05:02	0.02083	0	0.01389	0.02841	0.01250	0.01361
DRB1*16:02-DQB1*03:01	0.06250	0.01235	0.02778	0	0.01562	0.01543

## Supporting Information

**Table S3:** Relative LD ( $D'_{ij}$ ) of the HLA pairwise haplotypes found in the Brazilian population.

HLA Haplotypes	Relative LD ( $D'_{ij}$ )				
	CW	Ne	N	Se	S
A*01:01-B*07:05		1			
A*01:01-B*08:01	0,71		1		0,74
A*01:01-B*15:17		1			
A*01:01-B*37:01	1		1		
A*01:01-B*37:04					1
A*01:01-B*39:01		1			
A*01:01-B*57:01	1		1		
A*01:01-B*58:01	0,613				
A*01:02-B*15:37				1	
A*01:02-B*49:01	1				
A*01:02-B*57:01					1
A*02:01-B*13:01		1			
A*02:01-B*15:01/15:01:01:02N	1				
A*02:01-B*15:04			1		
A*02:01-B*27:02			1		
A*02:01-B*27:05:02G		1	1		
A*02:01-B*35:01/35:42			1		
A*02:01-B*35:05	1		1		
A*02:01-B*35:06		1			
A*02:01-B*37:01		1			
A*02:01-B*40:01	1				1
A*02:01-B*40:02	1		0,657		
A*02:01-B*40:04			1		
A*02:01-B*41:01		1			
A*02:01-B*42:01					1
A*02:01-B*44:02					0,511
A*02:01-B*44:27					1
A*02:01-B*51:01	0,679				
A*02:01-B*57:03					1
A*02:02-B*15:16				1	
A*02:04-B*18:01					1
A*02:05-B*18:01			1		
A*02:05-B*49:01					1
A*02:05-B*50:01	1				1
A*02:06-B*08:01					1
A*02:06-B*27:03				1	
A*02:09-B*14:01				1	
A*02:11-B*48:02		1	1		
A*02:11-B*48:02					1
A*02:17-B*15:17					1



A*02:17-B*27:02				1
A*02:20-B*51:07	1			
A*03:01-B*07:02/07:61/07:161N	0,631			
A*03:01-B*07:05	1			
A*03:01-B*15:146	1			
A*03:01-B*27:05:02G				1
A*03:01-B*35:08		0,628		
A*03:01-B*39:01			1	1
A*03:01-B*39:06	1			
A*03:01-B*44:03			1	
A*03:01-B*56:01		1		
A*03:01-B*81:01/81:02		1		
A*03:02-B*27:03				1
A*11:01-B*14:01	1			
A*11:01-B*35:01/35:42	0,571			0,512
A*11:01-B*45:01		1		
A*11:01-B*52:01	1	1		
A*23:01/23:17-B*15:04		1		
A*23:01/23:17-B*15:18		1		
A*23:01/23:17-B*35:03		1		
A*23:01/23:17-B*44:03	1			
A*24:02-B*13:01				1
A*24:02-B*15:05		1		
A*24:02-B*35:02		1		1
A*24:02-B*35:03	0,735			
A*24:02-B*39:06				1
A*24:02-B*41:01	1			
A*24:02-B*41:02		1		
A*24:02-B*50:01			1	
A*24:02-B*52:01				1
A*24:03-B*15:05			1	
A*24:03-B*39:09	1			
A*24:07-B*35:08				1
A*25:01-B*13:02				1
A*25:01-B*18:01				0,792
A*25:01-B*51:01	1			
A*26:01-B*18:03				1
A*26:01-B*38:01	1			
A*26:01-B*51:07				0,657
A*26:08-B*15:01/15:01:01:02N				1
A*29:01-B*07:02/07:61/07:161N			1	
A*29:02-B*15:03:01G	1			
A*29:02-B*44:03		1		1
A*30:01-B*13:02		1		
A*30:01-B*42:01		1	1	
A*30:01-B*42:02		1		1

A*30:01-B*53:01	1				
A*30:01-B*57:02					1
A*30:02-B*14:02	1				
A*30:02-B*15:10		1			
A*30:02-B*18:01	0,642		1		0,515
A*30:02-B*57:03	1	1			
A*30:04-B*14:01		1			
A*30:04-B*58:02				1	
A*31:01-B*15:20		1			
A*31:01-B*35:04					1
A*31:01-B*35:05		1			
A*31:01-B*39:01	1				
A*31:01-B*39:02			1		
A*31:01-B*39:03					1
A*31:01-B*39:05			1		
A*31:15-B*35:04			1		
A*31:48-B*35:01/35:42				1	
A*32:01-B*27:08				1	
A*32:01-B*40:02		0,792			
A*32:01-B*51:04				1	
A*33:01-B*14:02			1	0,592	1
A*33:01-B*44:03	1				
A*33:03-B*35:01/35:42				0,647	
A*33:03-B*53:01			1		
A*33:03-B*58:01		1			
A*33:04-B*35:01/35:42					1
A*34:02-B*08:01				0,788	
A*34:02-B*13:02	1				
A*34:02-B*15:01/15:01:01:02N			1		
A*34:02-B*53:01		1			
A*36:01-B*53:01				1	1
A*66:01-B*58:02		1	1		
A*66:02-B*58:01		1		1	
A*68:01-B*40:04		0,562			
A*68:01-B*40:16		1			
A*68:01-B*44:02	1				
A*68:01-B*51:08					1
A*68:02-B*14:02		1			
A*68:02-B*15:10	1				
A*69:01-B*35:08		1			
A*74:01:01G-B*15:03:01G	1	1			
A*74:01:01G-B*18:01			1		
A*74:03-B*41:01				1	
B*07:02/07:61/07:161N-C*07:02/07:50	1	0,908	1	0,944	1
B*07:05-C*15:05:01G	1	1		1	
B*07:14-C*07:02/07:50				1	

B*08:01-C*03:03			1		
B*08:01-C*07:01/07:06/07/18	1	0,815		0,969	0,935
B*08:01-C*07:93					1
B*13:01-C*01:02		1			
B*13:01-C*06:02/06:83					1
B*13:02-C*06:02/06:83		1		1	1
B*13:02-C*08:04	1				
B*14:01-C*08:02	1	1		1	
B*14:02-C*08:02	1	0,825	1	0,971	1
B*15:01/15:01:01:02N-C*03:03				0,564	0,583
B*15:01/15:01:01:02N-C*07:01/07:06/07/18			1		
B*15:03:01G-C*02:10	1	1	1	1	
B*15:04-C*03:03			1	1	
B*15:04-C*07:02/07:50		1			
B*15:05-C*01:02		1	1		
B*15:08-C*03:03		1		1	
B*15:10-C*03:02				0,663	
B*15:10-C*03:04	1	1		0,546	
B*15:10-C*08:04				1	
B*15:146-C*06:02/06:83	1				
B*15:16-C*14:02				1	
B*15:17-C*07:01/07:06/07/18		1		1	1
B*15:18-C*07:04		1		1	
B*15:20-C*03:04				0,647	
B*15:20-C*04:01/04:82		0,606			
B*15:37-C*03:04				1	
B*18:01-C*05:01	1		0,628		
B*18:03-C*07:01/07:06/07/18					1
B*27:02-C*02:02			1	0,65	1
B*27:03-C*02:02				1	
B*27:05:02G-C*01:02	1		1		1
B*27:05:02G-C*02:02				0,825	
B*27:08-C*06:02/06:83				1	
B*35:01/35:42-C*04:01/04:82	1	1	1	0,899	1
B*35:01/35:42-C*07:05				1	
B*35:02-C*04:01/04:82	1	1		1	1
B*35:03-C*03:04		1			
B*35:03-C*04:01/04:82	0,66			0,839	
B*35:03-C*12:03					1
B*35:04-C*04:01/04:82			1	1	1
B*35:05-C*04:01/04:82	1	1	1	1	
B*35:06-C*04:01/04:82		1		1	
B*35:08-C*04:01/04:82		1		1	1
B*35:11-C*03:04				1	
B*35:20-C*04:01/04:82				1	
B*37:01-C*06:02/06:83	1	1	1	1	

B*37:04-C*06:02/06:83					1
B*38:01-C*12:03	1			1	1
B*39:01-C*12:03	1	1	1	1	1
B*39:02-C*03:04				1	
B*39:02-C*04:01/04:82			1		
B*39:03-C*07:02/07:50				1	1
B*39:05-C*07:02/07:50			1	0,639	
B*39:06-C*07:02/07:50	1	1		1	1
B*39:09-C*07:02/07:50	1			1	1
B*39:13-C*07:02/07:50				1	
B*40:01-C*03:04	1			1	1
B*40:02-C*02:02		0,642		0,522	
B*40:02-C*03:04	1				
B*40:02-C*15:13		1			
B*40:04-C*03:04		1	1	1	1
B*40:16-C*08:02		1			
B*41:01-C*08:02	1				
B*41:01-C*17:01		1		1	
B*41:02-C*17:01		1		1	
B*42:01-C*17:01		1	1	1	1
B*42:02-C*17:01		1		1	1
B*44:02-C*05:01		1	1	0,753	1
B*44:02-C*07:04	1				
B*44:02-C*16:04				1	
B*44:03-C*02:02	1				
B*44:03-C*16:01		0,869	1	0,634	0,825
B*44:10-C*04:01/04:82				1	
B*44:27-C*07:04				1	1
B*45:01-C*16:01		1		0,544	
B*47:01-C*07:01/07:06/07/18				1	
B*48:02-C*04:01/04:82		1	1	1	1
B*49:01-C*07:01/07:06/07/18	0,613	1		1	1
B*50:01-C*06:02/06:83	1	0,735	1	0,798	1
B*51:01-C*01:02					0,835
B*51:01-C*14:02	0,647	0,814		0,772	0,711
B*51:01-C*15:02	1	1	1	0,606	0,711
B*51:01-C*15:06				1	
B*51:01-C*15:13				1	
B*51:01-C*16:02					1
B*51:02-C*04:01/04:82				1	
B*51:04-C*15:02				1	
B*51:07-C*05:01	1				
B*51:07-C*14:02				1	
B*51:08-C*15:02					1
B*52:01-C*12:02	1	1		1	
B*52:01-C*15:02					1

B*53:01-C*04:01/04:82	1			0,721	1
B*53:01-C*07:02/07:50			1		
B*55:01-C*03:03				0,705	1
B*56:01-C*01:02				1	
B*56:01-C*06:02/06:83		1			
B*57:01-C*06:02/06:83				0,761	1
B*57:01-C*07:01/07:06/07/18			1		
B*57:02-C*14:02					1
B*57:02-C*18:01				1	
B*57:03-C*18:01	1	1		1	1
B*58:01-C*03:02		1			1
B*58:01-C*07:01/07:06/07/18	1	0,556		0,618	0,611
B*58:02-C*06:02/06:83		1	1	1	
B*81:01/81:02-C*18:01		1		1	
B*07:02/07:61/07:161N-DRB1*15:01					0,547
B*07:02/07:61/07:161N-DRB1*01:03					1
B*07:05-DRB1*01:01:01G	1				
B*07:05-DRB1*04:05		1			
B*08:01-DRB1*03:01	1	0,816			0,68
B*08:01-DRB1*07:01			1		
B*13:01-DRB1*11:03		1			
B*13:02-DRB1*08:04	1				
B*14:01-DRB1*04:02	1				
B*14:01-DRB1*04:04		1			
B*14:02-DRB*15:03:01G					1
B*14:02-DRB1*01:02					0,526
B*14:02-DRB1*11:03	1				
B*14:02-DRB1*11:04			1		
B*15:01/15:01:01:02N-DRB1*13:01:01G	1		1		
B*15:03:01G-DRB1*13:02	0,735				
B*15:04-DRB1*16:02		1	1		
B*15:05-DRB1*09:01			1		
B*15:05-DRB1*14:02		1			
B*15:10-DRB1*03:01	1	1			
B*15:146-DRB1*04:02	1				
B*15:17-DRB1*15:01			1		
B*15:17-DRB1*13:02		1			
B*15:17-DRB1*13:02					1
B*15:18-DRB1*13:01:01G		1			
B*15:20-DRB1*13:01:01G		1			
B*18:01-DRB1*03:01	0,6		0,628		
B*18:03-DRB1*16:01					1
B*27:02-DRB1*11:01:01G					1
B*27:05:02G-DRB1*01:01:01G					1
B*27:05:02G-DRB1*11:01:01G			1		
B*35:01/35:42-DRB1*01:01:01G		0,585			

B*35:01/35:42-DRB1*04:07				1
B*35:01/35:42-DRB1*04:08		1		
B*35:01/35:42-DRB1*11:04	1			
B*35:01/35:42-DRB1*13:03				1
B*35:01/35:42-DRB1*16:02			1	
B*35:02-DRB1*16:01	1			
B*35:03-DRB1*15:01		1		
B*35:04-DRB1*08:04			1	
B*35:04-DRB1*14:02				1
B*35:05-DRB1*08:02	1			
B*35:05-DRB1*14:01:01G			1	
B*35:05-DRB1*14:02	1			
B*35:06-DRB1*08:02		1		
B*35:08-DRB1*04:04				1
B*35:08-DRB1*13:02		0,645		
B*37:01-DRB1*01:02			1	
B*37:01-DRB1*03:01	1			
B*37:01-DRB1*04:02		1		
B*37:04-DRB1*11:04				1
B*38:01-DRB1*11:01:01G	1			
B*38:01-DRB1*13:01:01G				0,73
B*39:01-DRB1*01:01:01G				1
B*39:01-DRB1*03:01	1			
B*39:01-DRB1*11:01:01G		1		
B*39:01-DRB1*16:01			1	
B*39:02-DRB1*08:04			1	
B*39:05-DRB1*08:04			1	
B*39:06-DRB1*01:01:01G	1			
B*39:06-DRB1*08:01		1		1
B*39:09-DRB1*04:04	1			
B*39:09-DRB1*08:02				1
B*40:01-DRB1*10:01				1
B*40:01-DRB1*13:02	1			
B*40:02-DRB1*13:01:01G			0,707	
B*40:02-DRB1*16:02	1			
B*40:04-DRB1*04:01			1	
B*40:04-DRB1*04:11		0,79		1
B*40:16-DRB1*07:01		1		
B*41:01-DRB1*03:01		1		
B*41:01-DRB1*07:01	1			
B*41:02-DRB1*13:03		1		
B*42:01-DRB1*03:02			1	
B*42:01-DRB1*08:04		1		1
B*42:01-DRB1*11:02		0,66		
B*42:02-DRB1*12:01:01G		1		1
B*44:02-DRB1*08:01			1	

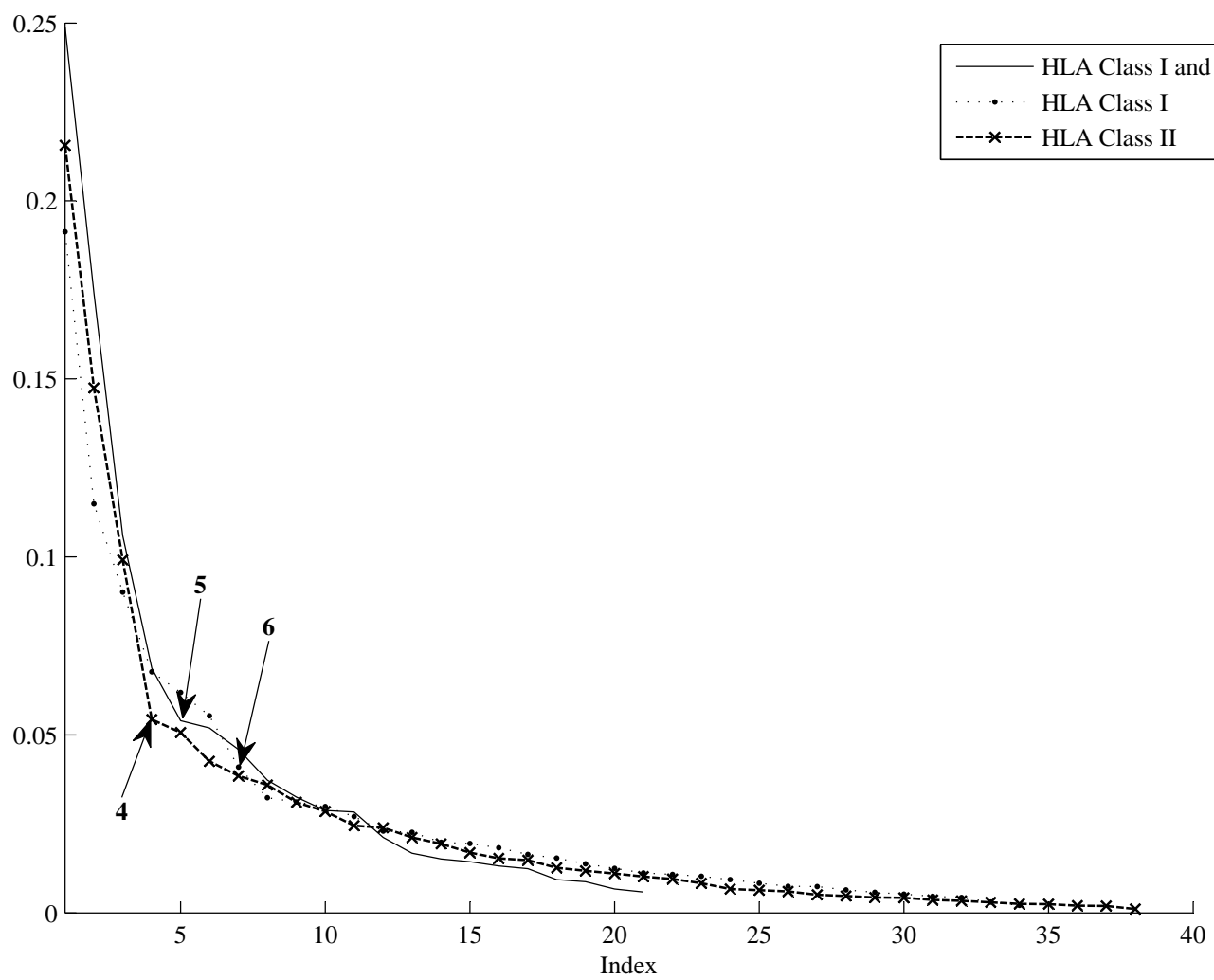
B*44:03-DRB1*01:02	1			
B*44:03-DRB1*07:01			0,61	
B*44:03-DRB1*12:01:01G			1	
B*44:27-DRB1*16:01				1
B*45:01-DRB1*10:01	1			
B*48:02-DRB1*09:01			1	1
B*49:01-DRB*15:03:01G	1			
B*49:01-DRB1*04:06				1
B*50:01-DRB1*03:01				1
B*50:01-DRB1*07:01	1		1	
B*50:01-DRB1*15:02		1		
B*51:01-DRB1*04:08	1			
B*51:01-DRB1*08:01	1			
B*51:01-DRB1*11:03				1
B*51:07-DRB1*08:03		1		
B*51:07-DRB1*13:01:01G	1			
B*51:08-DRB1*13:01:01G				1
B*52:01-DRB1*08:07				1
B*52:01-DRB1*15:02	1			
B*53:01-DRB1*03:01			1	
B*53:01-DRB1*08:04	1			
B*53:01-DRB1*11:01:01G				1
B*56:01-DRB1*11:04		1		
B*57:01-DRB1*07:01	1			0,622
B*57:01-DRB1*08:02			1	
B*57:02-DRB1*07:01				1
B*57:03-DRB1*04:01	1			1
B*58:01-DRB1*07:01	0,613			
B*58:02-DRB1*07:01		1		
B*58:02-DRB1*13:01:01G			1	
B*81:01/81:02-DRB1*11:01:01G		1		
DRB1*01:01:01G-DQB1*05:01	1	1		1
DRB1*01:02-DQB1*03:01	1	1	1	1
DRB1*01:03-DQB1*05:01	1			1
DRB1*03:01-DQB1*02:01	1	1	1	1
DRB1*03:02-DQB1*04:02			1	
DRB1*04:01-DQB1*03:01		0,594	1	0,69
DRB1*04:01-DQB1*03:02	1			
DRB1*04:02-DQB1*03:02	1	1		1
DRB1*04:04-DQB1*03:02	1			
DRB1*04:04-DQB1*04:02		0,633		1
DRB1*04:05-DQB1*03:02	1	1		
DRB1*04:06-DQB1*03:01				1
DRB1*04:07-DQB1*03:01				1
DRB1*04:08-DQB1*03:01	1	1		
DRB1*04:11-DQB1*03:02		0,859	1	0,651

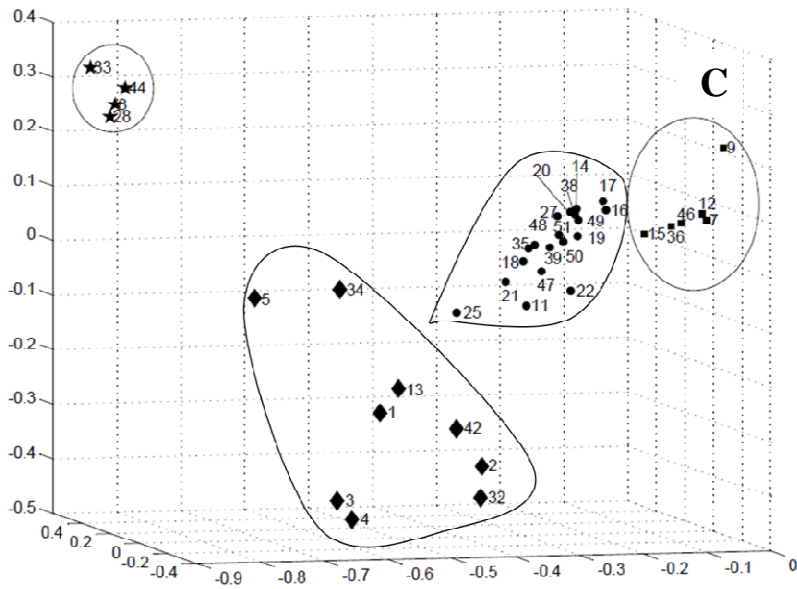
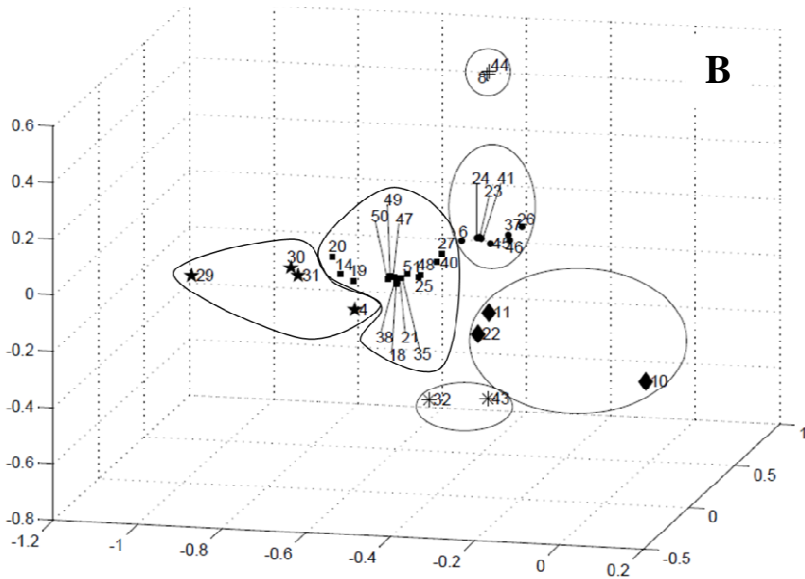
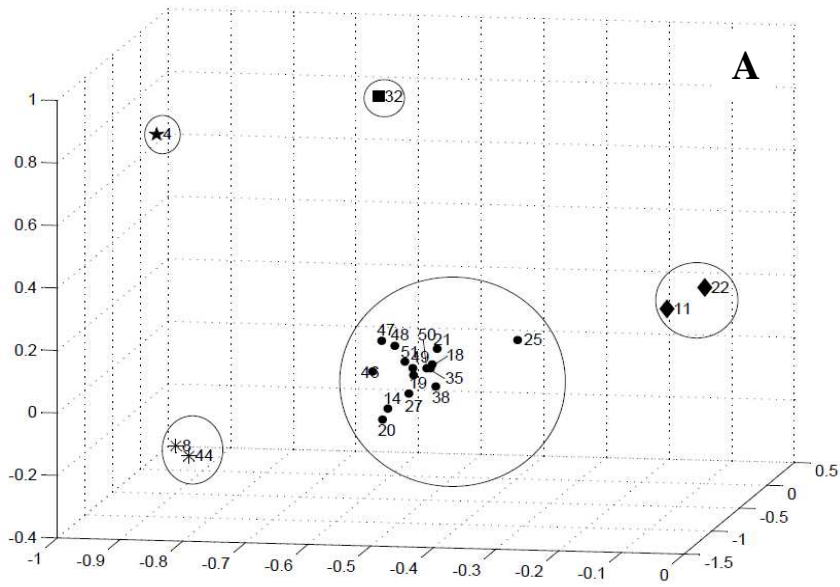
DRB1*07:01-DQB1*02:02	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,929</b>
DRB1*07:01-DQB1*03:03	<b>1</b>			<b>0,546</b>
DRB1*08:01-DQB1*04:02	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
DRB1*08:02-DQB1*03:03			<b>1</b>	
DRB1*08:02-DQB1*04:02	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*08:03-DQB1*03:01		<b>1</b>		
DRB1*08:04-DQB1*03:01		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*08:04-DQB1*04:02	<b>0,731</b>		<b>0,714</b>	
DRB1*08:07-DQB1*04:02		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*09:01-DQB1*03:03			<b>1</b>	<b>1</b>
DRB1*10:01-DQB1*05:01		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*11:01:01G-DQB1*03:01		<b>0,532</b>	<b>0,692</b>	<b>0,845</b>
DRB1*11:01:01G-DQB1*03:19	<b>0,642</b>			
DRB1*11:02-DQB1*03:19		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*11:03-DQB1*03:01	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*11:04-DQB1*03:01		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*11:04-DQB1*05:01			<b>1</b>	
DRB1*11:04-DQB1*06:03	<b>1</b>			
DRB1*12:01:01G-DQB1*03:19			<b>1</b>	
DRB1*12:01:01G-DQB1*05:01		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*13:01:01G-DQB1*06:03	<b>0,735</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
DRB1*13:02-DQB1*06:04	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*13:02-DQB1*06:09	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*13:03-DQB1*03:01		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*14:01:01G-DQB1*05:03	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
DRB1*14:02-DQB1*03:01		<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*14:02-DQB1*06:02	<b>1</b>			
DRB1*15:01-DQB1*03:01	<b>1</b>			
DRB1*15:01-DQB1*05:02		<b>0,649</b>		
DRB1*15:01-DQB1*06:02		<b>0,726</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
DRB1*15:02-DQB1*06:01	<b>1</b>	<b>1</b>		
DRB1*15:03-DQB1*06:02	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
DRB1*16:01-DQB1*05:02	<b>1</b>		<b>1</b>	<b>1</b>
DRB1*16:02-DQB1*03:01	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	

In bold are the statistically significant relative LD ( $D'_{ij}$ ) (P-value < 0.05). Note: List of abbreviations: Central West (CW), Northeast (Ne), North (N), Southeast (Se), South (S).



Supporting Information: Figure S1





**TRANSPLANTE RENAL: AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, CLÍNICA  
E SOBREVIVÊNCIA**

## Artigos 7 e 8

7. Nascimento E, Fabreti de Oliveira RA, Maciel MD, Pereira AB, das Mercêz de Lucas F Jr, Salomão-Filho A, Pereira WA, Moreira JB, Vilaça SS, de Castro Gontijo R, Lasmar MF, Vianna HR, Magalhaes A, Calazans CA, Simão-Filho C, Vilela B. (2014). Kidney transplantation: evaluation and clinical outcome of 237 recipients at low, medium, high, or strong immunological risk of rejection. *Transplant Proc*, 46(1):101-107.
8. Nascimento E, Fabreti-Oliveira, RA, Delgado M , Pereira AB, Lasmar M , Vilela B, Pereira WA, Salomão Filho A, das Mercês de Lucas F Jr. (2013). Estudo prospectivo para avaliar clínica e imunologicamente receptores em baixo, médio, alta e muito alto risco de rejeição humoral com rins de doadores falecidos. *RBM. Revista Brasileira de Medicina*, 70: 2-11.

Nesses dois artigos, o objetivo foi demonstrar a eficácia de um novo protocolo de avaliação imunológica pré-transplante após um ano de sobrevida do enxerto renal, quando os pacientes são classificados no pré-transplante pelo risco de terem episódios de rejeições após o transplante. Como a maioria das rejeições foi mediada por anticorpos anti-HLA, que se ligam a epítomos bem definidos (complementares), a identificação desses epítomos na molécula HLA pode determinar o risco de rejeição, evitando que pacientes sejam transplantados com riscos, além de orientar o médico quanto à conduta clínica e a definição do tratamento com drogas imunossupressoras, visando aumentar a sobrevida do órgão transplantado.

Em relação ao transplante renal, foi demonstrado nos artigos 7 e 8 que a sobrevida do órgão transplantado foi diretamente proporcional ao risco imunológico do receptor previamente determinado, sendo esse protocolo benéfico na seleção, acompanhamento e na conduta clínica das equipes transplantadoras para a definição do tratamento com drogas imunossupressoras.

Em conclusão:

- 1) Nos 129 receptores transplantados com rins de DV, houve duas perdas dos enxertos por causas imunológicas somente para os receptores em MR: uma perda por RMTc e uma por RMA (sDSA MFI = 632).
- 2) Nos 108 receptores transplantados com rins de DF ocorreram 14 perdas dos enxertos, sendo para os receptores em a) BR com duas perdas por RMTc e duas por RMA (DSA MFI=1223 a 2341), b) MR com uma perda por RMTc e duas por RMA (DSA MFI = 530 a 870), c) AR com três perdas por RMA (DSA MFI = 3493 a 6078) e, d) MAR com quatro perdas por RMA (sDSA MFI = 7226 a 12591).

3) De todos transplantados, 51 (21,52%) tiveram episódios de rejeições. 20 (8,44%) perderam os enxertos, sendo quatro devidos a CNI, quatro por RMTc e 12 por RMA.

4) Dos 237 receptores transplantados 219 (92,41%), cada um está com boa função renal após um ano de sobrevida e com valores de Creatinina entre 0.9 e 1.6 mg/dL.

1) O protocolo utilizado foi eficaz na agilização dos transplantes e permitiu aos profissionais dos centros de transplantes avaliar ao padrão imunológico dos receptores antes e após os transplantes, direcionando o tratamento individualizado aos pacientes.



## Kidney Transplantation: Evaluation and Clinical Outcome of 237 Recipients at Low, Medium, High, or Strong Immunological Risk of Rejection

E. Nascimento, R.A. Fabreti de Oliveira, M.D. Maciel, A.B. Pereira, F. das Mercêz de Lucas, Jr., A. Salomão-Filho, W.A. Pereira, J.B. Moreira, S.S. Vilaça, R. de Castro Gontijo, M.F. Lasmar, H.R. Vianna, A. Magalhães, C.A.C. Calazans, C. Simão-Filho, and B. Vilela

### ABSTRACT

**Background.** Donor-specific antibodies (DSAs) play a fundamental role in kidney transplantation. The identification of DSAs is an essential rejection parameter.

**Patients and Methods.** We evaluated a protocol in 237 patients receiving kidneys from living (LDs) and deceased donors (DDs). Recipients were classified as being at low (LR), medium (MR), high (HR), or strong (SR) risk of rejection based on Luminex panel reactive antibody (PRA)-single antigen beads (SABs). Grafts that survived for 1 year were evaluated.

**Results.** Of the 237 transplanted patients, 129 (54.43%) received a kidney from an LD and 108 (45.57%) from a DD. Of 95 LR recipients receiving kidneys from LDs, 2 patients lost the graft due to non-immunological causes. Of 34 MR recipients, 13 had rejection episodes, and 2 lost the graft by AMR and one by cellular rejection (CR). Of 108 recipients receiving a kidney from a DD, 59 (54.63%) were LR, 31 (28.70%) MR, 11 (10.19%) HR, and 7 (6.48%) SR. Twenty of all transplanted recipients lost their grafts; 4 were due to clinical causes, 4 by cellular rejection, and 12 by antibody-mediated rejection (AMR) with PRA-SAB mean fluorescent intensity of 530 to 12,591. One-year graft survival for LD transplanted LR and MR patients was 97.6% and 94.1%, respectively ( $P = .004$ ). In DD recipients, the LR vs MR SD was  $P = .011$ , and for LR vs HR + SR it was  $P = .001$ . For MR vs HR+SR no SD was found ( $P = .323$ ).

**Conclusion.** Rejections were detected in 51 patients (21.52%). Graft failure occurred in 16 patients (6.75%). A total of 218 (91.98%) recipients maintained good kidney function after 1 year. This protocol based on fluxogram risk assessment of AMR provided fast and precise immunological evaluation of recipients and donors and stratification by immunological risk of AMR.

**T**HE first successful kidney transplantation was performed in 1954 in Boston, Massachusetts, in the United States between identical twins, emphasizing the

important role of histocompatibility in the clinical course of transplantation [1]. Since that pioneering procedure, major histocompatibility complex-human leukocyte antigen

From the Instituto de Ensino e Pesquisas, Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte (E.N., A.B.P., W.A.P.); the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ICEx/ICB Bioinformática, Belo Horizonte (R.A.F.); IMUNOLABTx-Laboratório de Histocompatibilidade, B. Horizonte (E.N., R.A.F., B.V.); the Grupo de Transplante renal, Hospital de Clínicas da UFMG, Belo Horizonte (E.N., M.D.M., F.M.L., A.S.-F.); the Hospital Felício Rocho, Grupo de Transplantes, B. Horizonte (J.B.M., S.S.V., R.C.G.); the Hospital Universitário São José, Belo

Horizonte (M.F.L., H.R.V.); the Hospital Evangelico, Belo Horizonte (A.M.); the Hospital Márcio Cunha, Ipatinga (C.A.C.C.); and MG-Transplantes/CNCDO, FHEMIG, B. Horizonte (C.S.-F.); MG, Brasil.

Supported by IMUNOLAB-Imunologia de Transplantes Ltda. Address reprint requests to Dr. Evaldo Nascimento, MD, CHS, PhD, Laboratorio IMUNOLAB - Imunologia de Transplantes Ltda, Av Bernardo Monteiro 971, 11° andar, 30150-281 Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: [evaldo@imunolabtx.com.br](mailto:evaldo@imunolabtx.com.br)

(MHC-HLA) compatibility between recipient and donor has been used in the presurgical evaluation. The genes encoding HLA alleles and MHC class I and class II have been used for genetic compatibility studies in kidney transplantation to increase survival, and alloantibodies have been found to be detrimental to transplant survival [2,3].

In the 1960s, Patel and Terasaki demonstrated the role played by the humoral immune response, which enabled the development of tests to predict antibody-mediated rejection (AMR) of the allograft using complement-dependent cytotoxicity crossmatching (CDCXM) [4]. Currently, this method still represents the gold standard test. Studies have shown an association of anti-HLA alloantibodies (AlloAbs) with AMR in 96% of renal transplants. Pretransplantation evaluation of anti-HLA AlloAbs is essential to avoid hyperacute, acute, and chronic graft rejection [3,5–8].

Compatibility between recipient and donor can also be measured by HLA typing and by donor-specific antibody (DSA) testing for HLA mismatch strength using a panel of reactive antibody single antigen beads (PRA-SAB) and crossmatching. Levels of HLA-DSA are associated with clinical outcomes ranging from acute AMR with subsequent allograft failure to a rejection-free follow-up. Recipients with high DSA levels, as detected by the mean fluorescent intensity (MFI) in PRA class I and II during the pretransplantation evaluation, are considered to be at high risk for AMR. High DSA levels are thought to interfere with the clinical course of transplants between mismatched recipients and donors, possibly contributing to an unfavorable outcome and graft failure [3,9–12].

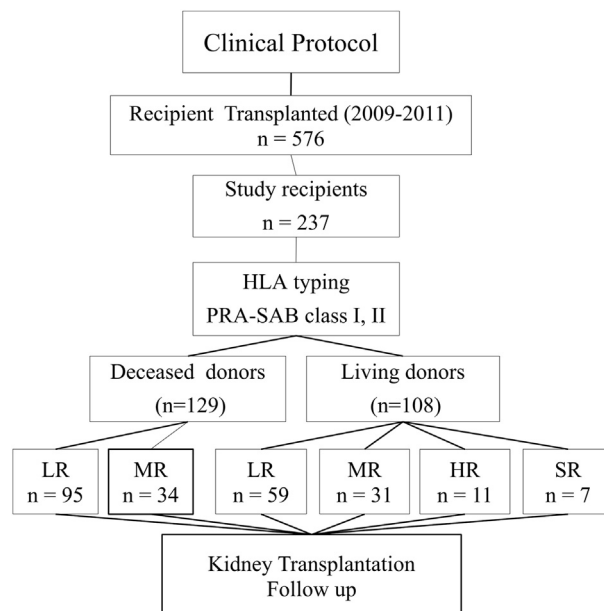
The time on the waitlist for kidney transplantations continues to increase, especially for patients classified as sensitized. Currently, approximately 10% of 1823 patients on the waiting list for a renal transplantation in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, are highly sensitized, as revealed by PRA-SAB. For these patients, a median wait time of 2 to 4 years has been observed.

The importance of AlloAb monitoring post-transplantation has also been shown. AlloAb evaluation is an effective means of assessing immune response upregulation, estimating the risk for rejection, and tailoring drug therapy to avoid dysfunction and graft failure [13–20].

In this study, a protocol for immunological evaluation of renal transplant recipients from living (LDs) and deceased (DDs) donors was used. We evaluated the HLA frequency for recipients who were detected by AlloAb on the waitlist, outcomes of recipients who were at risk of AMR, the potential of HLA to cause AMR, and 1-year graft survival.

## METHODS

We conducted a prospective study of 237 first-time kidney transplant recipients who were randomly selected from 576 patients who were transplanted between January 2009 and January 2011. In the clinical protocol design, 129 patients were transplanted with kidneys from LDs and 108 were transplanted with kidneys from DDs (Fig 1). Surgery was performed at the following transplantation centers: Hospital de Clínicas da Universidade Federal Minas



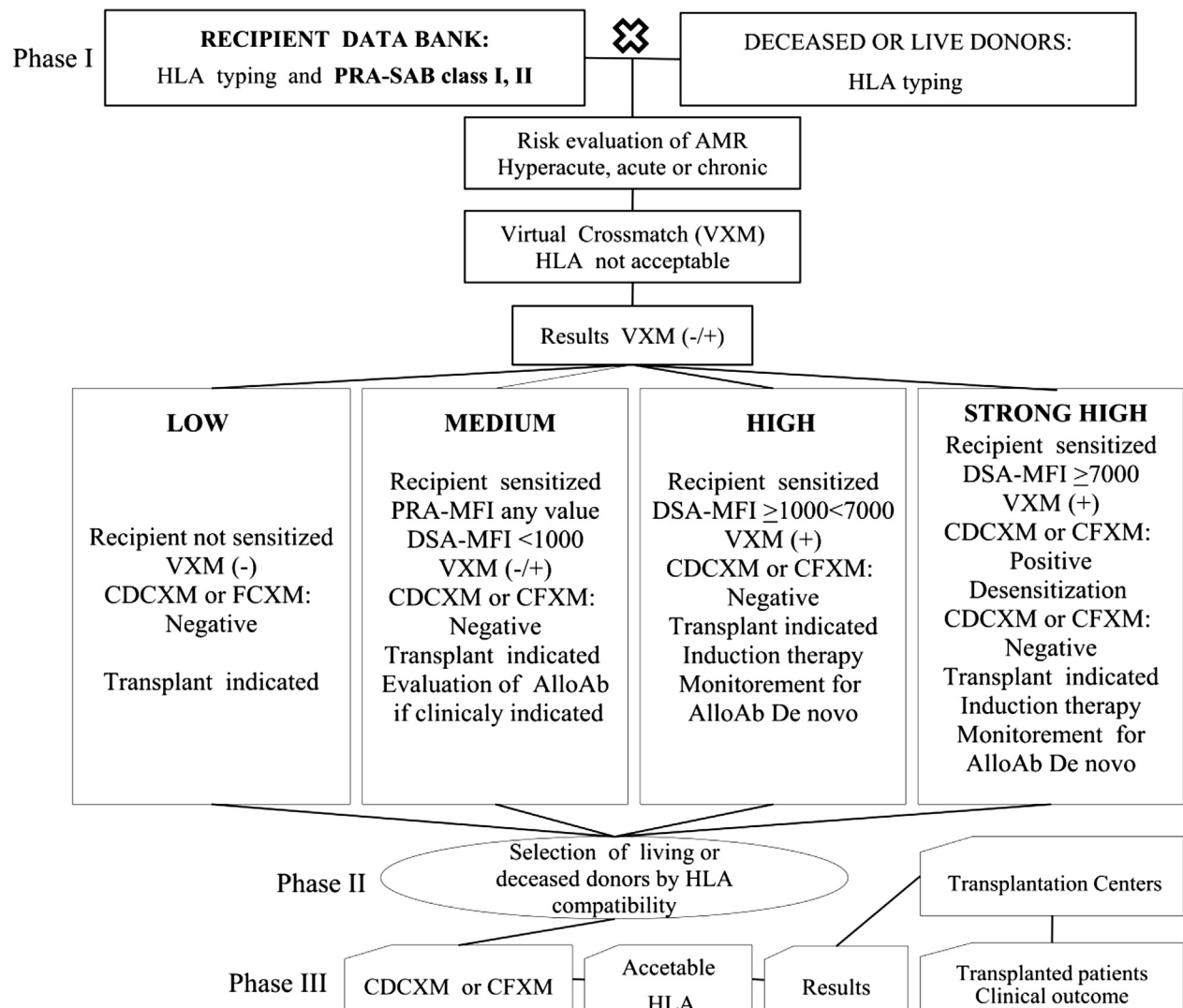
**Fig 1.** Study design with 237 recipients transplanted divided by living and deceased donors and risk of RMA. Abbreviations: PRA-SAB, panel reactive antibody single antigen bead; LR, low risk; MR, medium risk; HR, high risk; SR, strong risk.

Gerais; Hospital Felício Rocho; Hospital Universitário São José; Hospital Santa Casa de Misericórdia, Belo Horizonte; and Hospital Márcio Cunha de Ipatinga—all of which are in Minas Gerais state, Brazil. All immunological tests were performed at IMUNOLAB in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Among the transplant recipients, 57.5% were male, and 42.5% were female. The mean age was 47 years. The most frequent ABO blood group was type O at 49%, and the rarest was AB at 3%. This study was approved by the ethics committee of the Hospital Santa Casa de Misericórdia of Belo Horizonte under permit #073/2007.

The protocol used in this research was prepared based on consensus guidelines [21] and consisted of recipient and donor HLA typing along with evaluation of recipient immunological status based on solid-phase immunoassay using panel reactivity antibody single antigen beads (PRA-SAB; Luminex Platform–One Lambda, Canoga Park, Calif, United States) to detect AlloAbs to HLA-A, B, C, DR, DQ, and DP following fluxogram (Fig 2). Recipients were categorized according to immunological risk of AMR as low risk (LR; non-sensitized), medium risk (MR; sensitized recipients who were PRA-SAB-positive with DSAs where the DSA-MFI < 1000), high risk (HR; hypersensitized with DSA MFI  $\geq 1000$  < 7000), or strong risk (SR; hypersensitized with DSA MFI  $\geq 7000$ ) (Fig 2). A virtual crossmatch (VXM) based on PRA-SAB to detect unacceptable HLA was performed as a complementary method before an actual CDCXM was performed using current and historic sera. However, these results were not released because we do not have a local regulatory agreement with the Brazilian Ministry of Health supporting this technique as a routine method. In the clinical and immunological evaluations during the first year after transplantation, all parameters such as clinical evaluation, kidney function by sera creatinine detection test, AlloAb, presence of DSA pre- and post-transplantation, and graft survival were analyzed in all hypersensitized recipients received

## FLUXOGRAM TO RENAL TRANSPLANTATION



**Fig 2.** Protocol of kidney transplantation based on fluxogram of classification of recipients by immunological risk of AMR and donor selection. Abbreviations: AMR, antibody-mediated rejection; VXM, virtual crossmatch; PRA, panel reactivity antibody; CDCXM, complement-dependent cytotoxicity; FCXM, flow cytometry crossmatch; MFI, mean fluorescent intensity; SAB, single antigen bead; DSA, donor-specific antibody.

pretransplantation treatment with thymoglobulin – anti-thymocyte globulin (Genzyme, Mississauga, Canada) at 1.5–2.0 mg/kg body weight daily for 4 to 7 days presurgery, adjusted for leucopenia and thrombocytopenia [22,23]. The rejection episodes were identified by clinical evaluation, plasmatic creatinine level, proteinuria, biopsy, Cd4, and by strong increase of DSA detected by Luminex PRA-SAB.

Immunosuppressive maintenance treatments consisted of a combination of immunosuppressant drugs such as tacrolimus (Laboratório Libbs, São Paulo, Brazil), cyclosporine (Biosintética, São Paulo, Brazil), mycophenolate mofetil (Roche, Rio de Janeiro, Brazil), mycophenolate sodium and everolimus (Novartis, Basileia, Swiss), sirolimus (Pfizer, São Paulo, Brazil), prednisone (Eurofarma, São Paulo, Brazil), and azathioprine (Nuremberg, Germany).

During the first year post-transplantation, parameters such as clinical condition, kidney function as assessed by serum creatinine levels, proteinuria, presence of DSA, and graft survival were recorded and analyzed for all transplant patients. Treatment of rejections with immunosuppressive drugs was based on the Banff classification and the type of rejection (ie, cellular, AMR, acute, or chronic).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes (PBLs) using the Biopur DNA extraction kit (Biometrix, Curitiba, Brazil) or by standard salting-out techniques described by Miller et al [24]. The final concentration of DNA was adjusted to 20–30 ng/ $\mu$ L, and HLA-A, -B, -DRB1 genotyping was performed for all donors and recipients using the commercial kit Labtype™ SSO/Luminex following the manufacturer's protocol (One Lambda).



HLA typing results were analyzed by HLA Fusion 3.0 software (One Lambda). Results were converted to serologically defined HLA antigens. PRA-SAB pre- and post-transplantation was performed using actual sera. Sera were first tested for anti-HLA antibodies using LABScreen-Mixed screening to select all true positives or negatives. Positive sera were tested by PRA-SAB Luminex for class I and II according to the manufacturer's instructions (One Lambda). The cut-off used in the PRA-SAB to define DSA was >500 MFI according to the manufacturer's recommendation. PRA-SAB was also performed post-transplantation for all patients.

CDCXM assays were performed using T and B lymphocytes from donor blood instead of lymph nodes or spleen, which provided pretransplantation HLA typing in 2.5 hours and CDCXM in at least 3.0 hours. Cells were taken shortly before testing and combined with the anticoagulant citrate dextrose acid (Becton Dickinson, SP, Brazil). Cells were isolated by the FluoroBead T or B method with the final concentration of cells adjusted to  $2 \times 10^6$ /mL or 2000 cells/ $\mu$ L (One Lambda). Anti-human gamma globulin (AHG) at the appropriate dilution was used in the tests. The reactions were evaluated by an expert technician using an inverted microscope, and the results were expressed as percent cell mortality and as either positive or negative. All transplant recipients underwent CDCXM with their donors, and transplantations were performed on those patients with a negative CDCXM [4,5].

### Statistical Analysis

The Kaplan-Meier method was used to analyze 1-year graft survival rates relative to pretransplantation immunological status (low, medium, and high risk of AMR based on PRA-SAB). The program SigmaPlot version 12 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) was used, with the significance value being set at  $P < .05$ . The assignment of HLA frequencies detected by AlloAbs in sensitized recipient sera was obtained by directly counting HLA specificities.

### RESULTS

Of 237 transplanted patients, 129 (54.43%) received kidneys from LDs. Of these, 95 (73.64%) were low risk (LR), 10 had rejection episodes, 8 had retained kidney function, and 2 patients lost their grafts due to non-immunological causes. Of 34 (26.36%) medium-risk (MR) recipients, 13 had rejections episodes, 12 retained kidney function, and 1 lost the graft due to cellular rejection (Table 1).

Of the 108 recipients who received a kidney from a DD, 59 (54.63%) were LR, and 8 had rejection episodes. Of the 8 who experienced rejection episodes, 1 lost the graft due to non-immunological causes, and 2 had grafts that were lost by AMR with DSA post-transplantation and 2 recipients by CR. In 31 (28.70%) MR recipients, there were 10 patients who experienced rejection episodes, among whom 7 regained graft function and 3 lost their organs, 1 by non-immunological causes and 2 by AMR with DSA post-transplantation. In 11 (10.19%) high-risk (HR) recipients, there were 4 who experienced rejection episodes and 3 whose graft was lost by AMR. In 7 (6.48%) strong-risk (SR) recipients, there 6 patients experienced rejection episodes, and 4 lost their grafts by severe AMR (Table 1).

Twenty patients (8.44%) of all transplanted recipients lost their grafts; 4 were due to non-immunological causes, 4 to cellular rejections, and 12 to AMR (Table 1). Rejections episodes were detected in 51 (21.52%) patients. A total of 218 (91.98%) recipients maintained good kidney function after 1 year, with serum creatinine levels between 0.9 and 1.6 mg/dL.

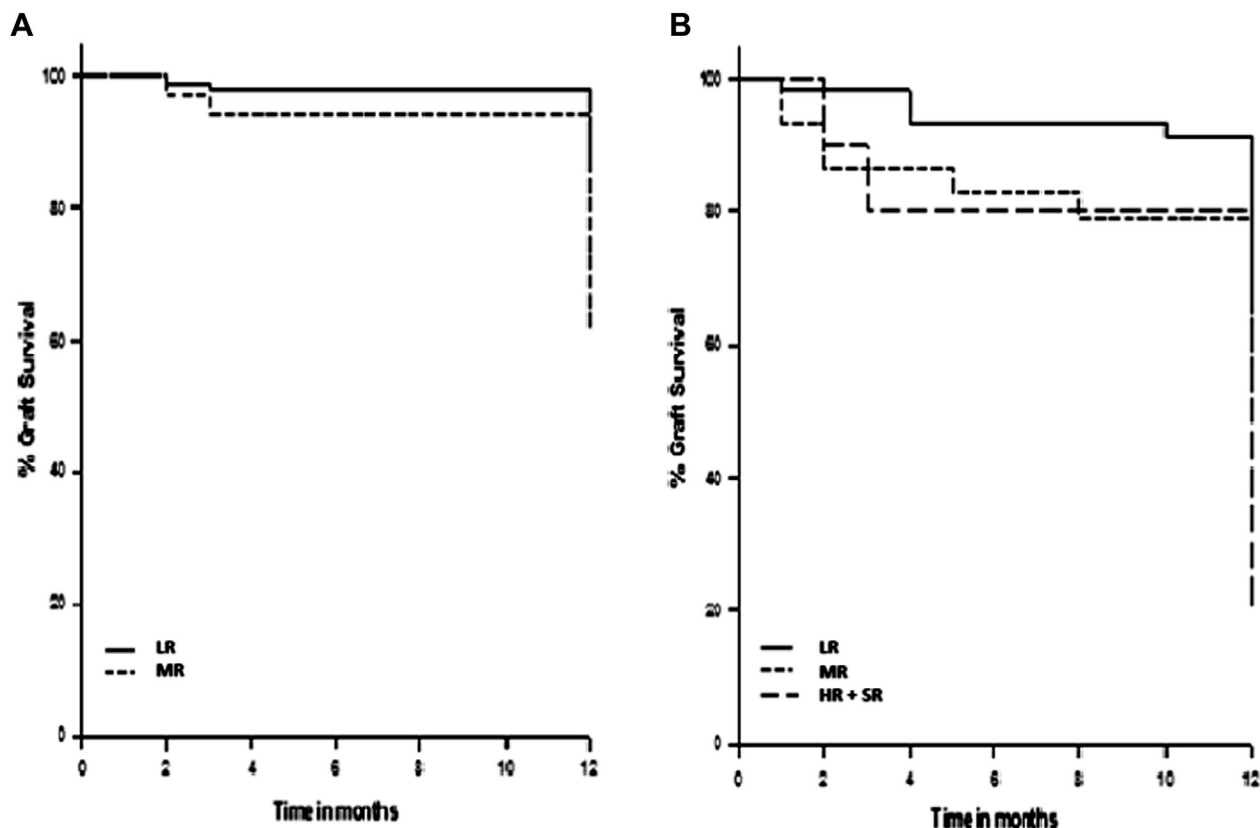
The 1-year graft survival rates for LD transplanted patients were 97.6% for LR and 94.1% for MR patients. Significant graft differences were found for LR vs MR ( $P = .004$ ; Fig 3A). The survival rates for patients receiving DD kidneys classified as LR, MR, and HR were 91.2%, 78.8%, and 80.3%, respectively (Fig 3B). A significant difference was observed for LR vs MR ( $P = .011$ ) and for LR vs HR + SR patients ( $P = .001$ ). Conversely, no significant survival difference was observed for MR vs HR + SR ( $P = .323$ ; Fig 2B).

On the other hand, we evaluated the frequency of HLA class I and II recognized by specific AlloAbs from sensitized patients showing the following: HLA-A 68 (32.89%), 24 (31.14%), 25 (30.92%), 32 (30.04%), 23 (29.39%), 1 (26.32%), 2 (25.44%), 34 (21.93%), 69 (21.49%), and 33 (21.27%); HLA-B 51 (29.82%), 49 (29.61%), 52 (27.19%), 57 (25.88%), 27 (25.44%), 58 (25.44%), 44 (23.90%), 53 (22.81%), 7 (20.61%), and 50 (20.61%); HLA-C 13 (3.29%), 12 (2.85%), 11 (2.63%), 18 (2.41%), 9 (2.19%), 1

**Table 1. One-year Outcome of Kidney Transplanted Patients With LD and DD According to Immunological Risk of Rejection.**

Recipient Immunological Status and Clinical Outcome	LD (n = 129)		DD (n = 108)			
	Stratification of Recipient by Risk of AMR		Recipient Stratification by Risk of AMR			
	LR 95(73.64%)	MR 34(26.36%)	LR 59(54.63%)	MR 31(28.70%)	HR 11(10.19%)	SR 7(6.48%)
DSA pre-Tx	–	–	–	–	11	7
DSA post-Tx	10	13	7	9	–	–
Rejection	10	13	8	10	4	6
Cellular rejection	–	1	2	1	–	–
Antibody-mediated rejection (AMR)	–	1 (DSA-MFI = 632)	2 (DSA-MFI = 1223, 2341)	2 (DSA-MFI = 530, 870)	3 (DSA-MFI = 3493 to 6068)	4 (DSA-MFI = 7226 to 12591)
Functioning	91	33	56	27	8	3
Graft loss	2	1	2	3	3	4
Lost by other causes	2	–	1	1	–	–

Abbreviations: LD, living donor; DD, deceased donor; LR, low risk; MR, medium risk; HR, high risk; SR, strong risk; DSA, donor specific antibody; Tx, transplant; MFI, median fluorescent intensity.



**Fig 3.** Kaplan-Meier graft survival in non-sensitized low-risk patients (LR), sensitized without DSA (MR), and sensitized with DSA after 1 year. Living donors **(A)** LR vs. MR:  $P < .004$ . Deceased donors **(B)** LR  $\times$  MR:  $P < .011$ , LR  $\times$  HR + SR:  $P < 0.001$ , MR  $\times$  HR + SR:  $P < .232$ .

(1.97%), 15 (1.97%), 16 (1.97%), 4 (1.75%), and 8 (1.75%); HLA-DR 13 (3.29%), 12 (2.85%), 11 (2.63%), 18 (2.41%), 9 (2.19%), 1 (1.97%), 15 (1.97%), 16 (1.97%), 4 (1.75%), and 8 (1.75%).

## DISCUSSION

Hypersensitized patients have a reduced probability of receiving a kidney transplant and tend to spend extended periods on the waiting list in Belo Horizonte, MG, Brazil. For these patients, transplant success rates are lower, exacerbated by a median wait time of 3 years.

The implementation of the proposed protocol resulted in a precise immunological evaluation of potential transplant recipients pre- and post-surgery. The protocol could be an important tool to decrease ischemia time and avoid AMR (which is found by Mizutani et al in 96% of patients with kidney rejection [5]), and could help to increase graft survival. In the protocol, the following considerations were strongly recommended: Monitor DSA between months 3 and 12 post-transplantation for LR recipients. Monitor AlloAb DSA de novo for MR recipients. Perform induction therapy and monitor DSA de novo for HR recipients. Desensitize the CDCXM-positive cases. Perform induction

therapy and monitor DSA de novo for SR recipients after the transplant to avoid AMR [25]. In addition, there should be post-surgical monitoring of DSA when obtaining an investigative kidney biopsy to define drug treatment [26]. The presence of DSA should not contra-indicate kidney transplant [27]. CDCXM is essential to detect clinically relevant DSA [5]. VXM must be used in Brazilian histocompatibility laboratories as an auxiliary tool to predict crossmatch results [28,29].

VXM is a theoretical method of lymphocyte cross-matching with an important role in predicting crossmatch results during immunological evaluation of recipients of solid organ transplants [30]. The method is based on comparing donor and recipient HLA and PRA-SAB results to select the best donor. The method can be used to identify patients who require an organ with less than 4 hours cold ischemia and should be used in Brazil when standard crossmatching can be omitted and to decrease the cold ischemia time. This approach provides the transplantation center with the option of omitting the standard pre-transplantation crossmatch in recipients who are classified as priority.

In the post-transplantation period, PRA-SAB was indicated in sensitized patients at HR or SH of AMR, including

recipients with any MFI-DSA in preparation for a second transplant or in transplant patients showing evidence of subclinical rejection. A clear correlation between anti-HLA AlloAb DSA titer and risk of rejection has been demonstrated in kidney transplantation [31]. An anti-HLA antibody count performed before transplantation represents the most important step in avoiding hyperacute, acute, and chronic rejection [32]. Using blood cells instead of lymph nodes or spleen in this protocol provided pre-transplantation HLA typing in 2 hours and crossmatching in 3.0 hours. The maximum time for emergency immunological evaluation was less than 6 hours, and the CDCXM results can be released before the organ is removed. The CDCXM, despite limited sensitivity (84%), has been the traditional method of anti-HLA clinical relevant AlloAb detection for the past 40 years [4]. AGH is sometimes used with CDCXM to increase sensitivity, and Diethiotreitol (DTT) (Invitrogen/Life Technologies, CA, USA) was used to identify antibody isotopes immunoglobulin M (IgM), IgG, or both. The advantage of the assay described here is that the *in vitro* procedure corresponds to *in vivo* immunological reactivity and a positive result contraindicates transplantation [33].

Our graft survival rates for LD and DD kidneys using this immunological evaluation protocol were similar to those reported by other authors [7,25,33]. These methods are recommended as standard in solid organ transplants from DD or LD, to streamline the pretransplantation evaluation and to decrease the time of cold ischemia. The stratification of recipients was undertaken before transplantation to advise clinicians regarding the immunological status of recipients, to prescribe immunosuppressive drugs and other treatments to avoid rejection, and to maintain the patients in good clinical condition post-transplantation.

Rejections were detected in 51 (21.52%), and graft failure occurred in 15 (6.33%) of the transplanted patients. A total of 218 (91.98%) recipients maintained good kidney function after 1 year with serum creatinine levels between 0.9 and 1.6 mg/dL. This protocol based on fluxogram risk assessment of AMR provided fast and precise immunological evaluation of recipients and donors, and stratification by immunological risk of AMR.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work received support from IMUNOLAB, the Brazilian System of Transplantation of the Health Ministry (SNT/MS), and the hospitals involved. We thank the medical staff and nurses for providing facilities and clinical assistance during the course of the study.

#### REFERENCES

- [1] Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg* 1985;148:343.
- [2] Kerman RH. Relevance of histocompatibility testing in clinical transplantation. *Surg Clin North Am* 1994;74:1015.
- [3] Opelz G, Döhler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 2007;84:137.

- [4] Patel RN, Terasaki PI. Significance of the positive cross match test in kidney transplantation. *New Engl J Med* 1969;280:735.
- [5] Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, et al. The Importance of anti-HLA-specific antibody strength in monitoring kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2007;7:1027.
- [6] Kraus ES, Parekh RS, Oberai P, et al. Subclinical rejection in stable positive cross-match kidney transplant patients: incidence and correlations. *Am J Transplant* 2009;9:1826.
- [7] Böhmis GA, Bartel G, Regele H, et al. Prospects and limitations of post-transplant alloantibody detection in renal transplantation. *Hum Immunol* 2009;70:640.
- [8] Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1046.
- [9] Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1398.
- [10] Cai J, Terasaki PI. Human leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients. *Surg Today* 2005;35:605.
- [11] Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, et al. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transpl* 2006;6:2316.
- [12] Lefaucheur C, Suberlielle-Boissel C, Hill GS, et al. Clinical relevance of performed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:324.
- [13] Süsal Caner, Bernd Döhler, Gerhard Opelz. Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a Collaborative Transplant study report. *Hum Immunol* 2009;70:569.
- [14] Opelz G, Döhler B, Süsal C. Analysis of positive kidney, heart, and liver transplant cross-matches report to the Collaborative Transplant study. *Hum Immunol* 2009;70:627.
- [15] Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003;3:1488.
- [16] Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant* 2007;7:2124.
- [17] Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:665.
- [18] Halloran PF. The clinical importance of alloantibody mediated rejection. *Am J Transpl* 2003;3:639.
- [19] Zachary AA, Montgomery RA, Jordan SC, et al. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on understanding antibodies in transplantation. *Tissue Antigens* 2007;69:160.
- [20] Mauyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11(6):609.
- [21] Tait BD, Süsal C, Gebel HM, et al. Consensus guideline on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013;95(1):19-45.
- [22] Agha IA, Rueda J, Alvarez A, et al. Short course induction immunosuppression with thymoglobulin for renal transplant recipients. *Transplantation* 2002;73:473.
- [23] Stevens RB, Mercer DF, Grant WJ, et al. Randomized trial of single-dose versus divided-dose rabbit anti-thymocyte globulin induction in renal transplantation: an interim report. *Transplantation* 2008;85:1391.
- [24] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- [25] Lachmann N, Terasaki PI, Buddle K, et al. Human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by Luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Clin Transl Res* 2009;87:1505.
- [26] Van den berg-loonen EM, Billen EV, Voorter CE, et al. Clinical relevance of pretransplant donor-specific antibodies detected

by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients. *Transplantation* 2008;85:1086.

[27] Reinsmoen NL, Ch Lai, Vo A, et al. Acceptable donor-specific antibody level allowing for successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitized therapy. *Transplantation* 2008;86:820.

[28] Bingaman AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F. A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation. *Transplantation* 2008;86:1864.

[29] Morris GP, Phelan DL, Jendrisak MD, et al. Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: a 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Human Immunol* 2010;71:268.

[30] Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012;12:388.

[31] Kosmoliaptsis V, O'Rourke C, Bradley JA, Taylor CJ. Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum Immunol* 2010;71:45.

[32] Thammanichnon D, Ingsathit A, Mongkolsuk T, et al. Pre-transplant donor specific antibody and its clinical significance in kidney transplantation. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012;30:48.

[33] Taylor JC, Kosmoliaptsis V, Sharples LD, et al. Ten-years experience of selective omission of the pre-transplant crossmatch test in deceased donor kidney transplantation. *Clin Transplant Res* 2010;89:185.



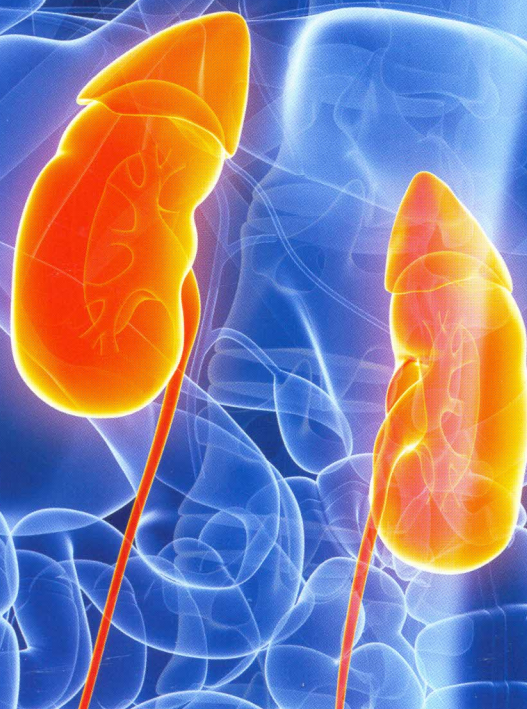
**rbm**

# Revista Brasileira de Medicina

VOLUME 70 - EDIÇÃO ESPECIAL - DEZEMBRO DE 2013

Transplantes

Edição  
Especial





Evaldo Nascimento<sup>1,3,4</sup>

Raquel Aparecida  
Fabreti-Oliveira<sup>2,3</sup>

Mônica Delgado  
Maciel<sup>4</sup>

André Barreto  
Pereira<sup>1</sup>

Marcus Farias Lasmar<sup>5</sup>

Bernardo Vilela<sup>1</sup>

Walter Antônio  
Pereira<sup>1</sup>

Abrahão Salomão-  
Filho<sup>4</sup>

Fernando das Mercês  
de Lucas-Júnior<sup>4</sup>

1. Instituto de Ensino, Pesquisas e  
Clínica de Transplantes do Hospital  
Santa Casa de Belo Horizonte.

2. ICEx/ICB Bioinformática,  
Universidade Federal de Minas Gerais.

3. IMUNOLABTx – Laboratório de  
Histocompatibilidade, Imunogenética  
e Imunologia de Transplantes.

4. Grupo de Transplante Renal,  
Hospital de Clínicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais.

5. Hospital Universitário São José, Belo  
Horizonte, Minas Gerais.

#### Correspondência:

Dr. Evaldo Nascimento.

IMUNOLAB - Laboratório de  
Histocompatibilidade e Imunologia de  
Transplantes.

Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11º andar  
CEP 30150-281

Belo Horizonte - MG - Brasil

E-mail: evaldo@imunolabtx.com.br

# Estudo prospectivo para avaliar clínica e imunologicamente receptores em baixo, médio, alto e muito alto risco de rejeição humoral com rins de doadores falecidos

Prospective study to clinical and immunological evaluation of recipients in low, medium, high and strong risk of humoral rejection with kidney of deceased donors

Unitermos: Transplante renal, protocolo, paciente sensibilizado, condutas pré e pós-transplante.  
Uniterms: kidney transplantation, protocol, alloantibody, clinical outcome.

## Resumo

**Introdução:** Os anticorpos específicos contra o doador (DSA) representam uma das principais barreiras para o sucesso do transplante renal. **Material e métodos:** Os cem receptores, classificados em baixo risco (BR), médio risco (MR), alto risco (AR) e muito alto risco (MAR) de terem rejeição mediada por anticorpos (RMA) foram transplantados com rins de doadores falecidos (DF). A sobrevida dos enxertos foi avaliada após um ano. **Resultados:** Dos 100 receptores que receberam rins de DF, 54 (54,0%) foram classificados como BR. Destes, oito rejeitaram (14,8%), três perderam os enxertos, sendo duas perdas por RMA (DSA MFI 1223 a 2341) e uma por causa não imunológica (CNI). Entre os 30 (30,0%) classificados em MR, 10 (33,3%) rejeitaram, desses quatro perderam os enxertos, sendo duas perdas por RMA (DSA MFI 530 e 870), uma por rejeição celular (RC) e uma por CNI. Entre os 10 (10,0%) classificados em AR, três rejeitaram, sendo observadas três perdas por RMA (DSA MFI de 3493 a 6068). Entre os 6 (6,0%) classificados como MAR, cinco tiveram episódios de rejeições, quatro perderam os enxertos, sendo três perdas por RMA (DSA MFI 7226 a 12591) e uma por RC. A sobrevida dos enxertos no primeiro ano para os pacientes em BR, MR, AR+MAR foi de 91,22%, 78,75% e 80,28%, respectivamente. **Conclusão:** Esse protocolo demonstrou ser eficiente e permitiu uma avaliação imunológica precisa de receptores classificados de acordo com o risco de RMA. Do total de pacientes, 26 (26%) tiveram episódios de rejeições, 12 (46%) pacientes





>> perderam os enxertos devido a causas imunológicas, sendo duas perdas por RC e 10 por RMA, o que evidencia a gravidade das rejeições. Além disso, tivemos duas perdas por CNI. Após um ano, 87 (87%) dos pacientes mantiveram boa função renal, com creatinina variando de 0,9 a 1,6 mg/dL.

## Introdução

Com o sucesso do primeiro transplante renal entre irmãos gêmeos geneticamente idênticos<sup>(1)</sup> na década de 50, maior atenção foi dada a histocompatibilidade (MHC) determinada pelos genes do sistema HLA (*Human Leucocyte Antigens*) localizados no cromossomo 6, que codificam as moléculas HLA-A, -B, -C do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) de Classe I e as moléculas HLA-DRB1, DQB1, DPB1 do MHC de Classe II<sup>(2)</sup>. A compatibilidade HLA interfere na sobrevida dos transplantes em longo prazo e a incompatibilidade HLA está envolvida diretamente na reatividade imunológica receptor antidoador que pode levar a processos de rejeição celular ou humoral<sup>(3)</sup>.

Na década de 60, Patel e Terasaki<sup>(4)</sup> demonstraram a importância dos anticorpos anti-HLA (AloAc) na associação com a rejeição mediada por anticorpos (RMA) em 96% dos transplantes renais<sup>5</sup>. Assim, tornou-se essencial a detecção desses AloAc no pré-transplante para evitar as rejeições hiperaguda, aguda e crônica do enxerto, que são as principais barreiras para o sucesso do transplante<sup>(3,5-11)</sup>. Receptores com AloAc anti-HLA do doador (DSA) no pré-transplante em níveis altos detectados pelo exame de painel de antígenos HLA de Classe I e II *Single Antigen Beads* (PRA-SAB) determinados pelo valor de MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) apresentaram risco imunológico de desenvolverem RMA, piora da evolução do rim transplantado, diminuição da sobrevida e aumento das taxas de perda do enxerto devido a disfunção renal<sup>(11,12)</sup>. Além disso, outros estudos têm demonstrado a importância do monitoramento dos AloAc anti-HLA como parâmetro importante na avaliação da evolução<sup>(13,14)</sup>, sendo usado como medida de extrema relevância nos casos de rejeição subclínica, na conduta médica e no tratamento das rejeições com as drogas imunossupressoras para evitar a perda do órgão transplantado<sup>(5,15-19)</sup>.

Várias publicações têm recomendado classificar no pré-transplante o risco imunológico de receptores terem RMA, visando fazer uma abordagem clínica com protocolos específicos para cada grupo de risco<sup>(9,11-20)</sup>.

O método Prova Cruzada Virtual (PCV) tem sido usado visando diminuir o tempo de isquemia fria nos trans-

Esse estudo clínico teve como objetivo avaliar o protocolo para o transplante renal com doador falecido para receptores da lista de espera visando aperfeiçoar a avaliação imunológica no pré-transplante, evitar as RMA e aumentar a sobrevida do enxerto.

plantes de coração, pulmão, pâncreas-rim, rim em alguns casos ou quando as células do sangue do doador falecido tinham baixa viabilidade impossibilitando a realização da Prova Cruzada por Citotoxicidade Dependente de Complemento (PC-CDC) em tempo real. Na PCV são usados os resultados obtidos pelo exame PRA-SAB do receptor e o resultado de tipificação HLA do doador. Assim, basicamente, o procedimento consistiu em comparar os dados de tipificação HLA do doador com os do receptor para obter o número de compatibilidades (Matching = M) e de incompatibilidades (Mismatching = MM), além da pesquisa de DSA usando o PRA-SAB.

Os HLA aceitáveis determinam a PCV negativa, que tem um valor preditivo de uma PC-CDC, também negativa, pois para um receptor que não apresenta AloAc anti-HLA no soro atual espera-se um resultado negativo para a PC-CDC. Nesse caso, o exame de PC-CDC real poderá ser omitido antes do transplante. Diante desses dados, a equipe de médicos transplantadores poderá decidir pela realização ou não do transplante e do protocolo a ser usado no tratamento com drogas imunossupressoras<sup>(21,22)</sup>.

Esse estudo clínico teve como objetivo avaliar o protocolo para o transplante renal com doador falecido para receptores da lista de espera visando aperfeiçoar a avaliação imunológica no pré-transplante, evitar as RMA e aumentar a sobrevida do enxerto.

## Métodos

### Pacientes

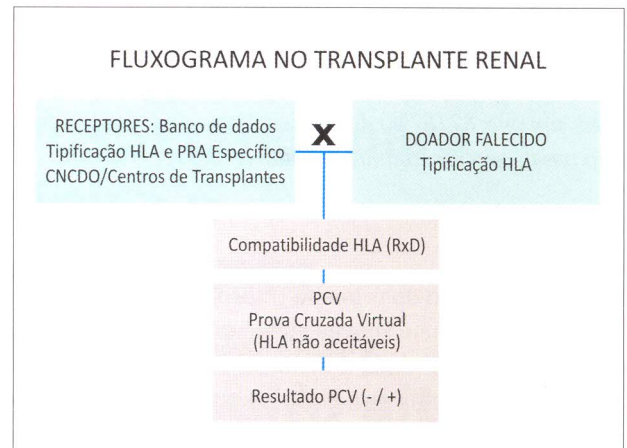
Os cem receptores foram selecionados aleatoriamente de 276 transplantados com rins de doadores falecidos fornecidos pela Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos (CNCDO) de Belo Horizonte, MG – Trans-



>> plantes. Os transplantes foram realizados no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2011 nas seguintes instituições: Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Hospital Universitário São José, Belo Horizonte. Todas as avaliações imunológicas foram realizadas pelo IMUNOLAB - Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, Belo Horizonte, MG. Este estudo faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte sob o nº 073/2007.

### Protocolo

O protocolo usado neste estudo consistiu em determinar o *status* imunológico de cada receptor antes do transplante, baseando-se na tipificação HLA para determinar a compatibilidade receptor-doador e no exame PRA-SAB específico para selecionar o melhor doador falecido. Para a análise e cruzamento de dados imunológicos foi usada, também, a PCV que, apesar de não estar regulamentada pelo Sistema Nacional de Transplantes do Ministério da Saúde (SNT/MS), vem sendo usada como metodologia complementar para identificar os HLA não aceitáveis e prever o resultado da PC-CDC real (Figura 1). Todos esses dados da lista de espera da CNCDO/MG-Transplantes foram usados para classificar os receptores em grupos (G), de acordo com o risco de terem RMA, em: G1) Receptor em baixo risco (BR); G2) Receptor em médio risco (MR); G3) Receptor em alto risco (AR); G4) Receptor em muito alto risco (MAR), baseando-se nos resultados do exame PRA-SAB de classe I e II (Figuras 2 e 3A). Para os pacientes do G1 foram seguidas as condutas: 1) Monitoramento do aparecimento de DSA no primeiro ano após o transplante em paralelo a biópsia não protocolar do enxerto renal por indicação clínica e aumento do DSA, devido à associação entre DSA e RMA clínica ou subclínica; 2) Nos pacientes com biópsia positiva para RMA foi realizado tratamento imunossupressor, sendo sua eficácia avaliada pela função renal e redução dos valores de MFI dos DSA; 3) Para biópsia positiva sem RMA o monitoramento de DSA foi feito no primeiro ano após o transplante e a ISS mantida nesse período. Para os receptores do G2 foram usadas as mesmas condutas do G1, sendo que para os pacientes com DSA positivo e biópsia do enxerto renal negativa foi mantida a ISS. Para o G3 foi feita terapia de indução com timoglobulina (Thymo) administrada em dose máxima de 6 mg/kg, sendo dividida em quatro doses de 1,5 mg/kg/dia, sendo a primeira administrada endovenosamente durante seis horas durante o intraoperatório diluída em



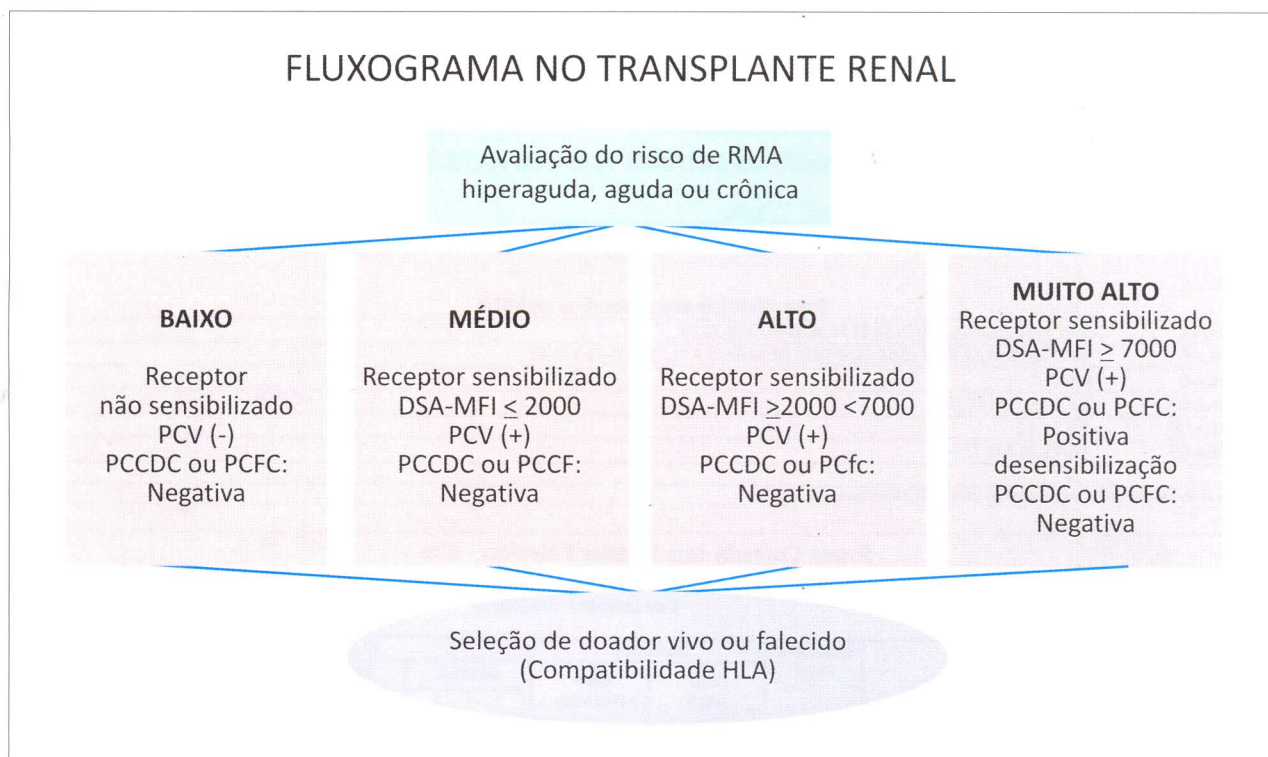
**Figura 1** - Fluxograma para a seleção de doador para o Transplante Renal. Comparação de dados entre doador e receptor na Prova Cruzada Virtual (PCV). HLA: "Human Leukocyte Antigen", CNCDO: Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos.

500 mL soro fisiológico ou soro glicosado. Como medicação, antes da infusão, foram usados metilprednisolona 500 mg e, na indução anestésica, dipirona e prometazina via endovenosa uma hora antes da Thymo. As três doses posteriores tiveram, também, como medicação prévia a dipirona e prometazina endovenosa uma hora antes da administração da Thymo e corticoide (prednisona) via oral. As três doses subsequentes foram ajustadas de acordo com a evolução clínico-laboratorial do paciente, como: redução de contagem de leucócitos  $\leq 3.000/\text{mm}^3$  e plaquetas  $\leq 75.000$  a dose de Thymo foi reduzida para 50% da dose padrão; se com leucócitos de  $< 2.000$  com  $< 50.000$  plaquetas o tratamento foi suspenso<sup>(23,24)</sup>. As outras condutas foram similares as do G1, mas quando ocorreu aumento rápido do DSA de novo, com resultado de biópsia negativa para rejeição o tratamento foi iniciado para diminuir os níveis de DSA e quando a positividade do DSA foi persistente com biópsia negativa foi mantida a ISS. Para os pacientes do G4 foram usadas as mesmas condutas para G1 e G3<sup>(14)</sup> (Figura 2).

Os receptores selecionados pela compatibilidade HLA na CNCDO foram submetidos ao exame de PC-CDC ou Prova Cruzada por Citometria de Fluxo (PC-CF) para a detecção de AloAc anti-HLA clinicamente relevantes. O laudo foi liberado à CNCDO com os resultados das provas cruzadas e as indicações da presença de DSA com MFI (Figura 3B), que em seguida foi encaminhado pela CNCDO aos centros de transplantes.

Durante o primeiro ano após o transplante foram avaliados os parâmetros clínicos e laboratoriais como níveis de creatinina, proteinúria e nível de DSA. A sobrevida do





**Figura 2** - Fluxograma para a seleção de doador para Transplante Renal baseado no risco imunológico de RMA. DSA: Donor Specific Antibody, MFI: Intensidade Média de Fluorescência, PCV: Prova Cruzada Virtual, PC-CDC: Prova Cruzada por Citotoxicidade Dependente de Complemento, PC-CF: Prova Cruzada por Citometria de Fluxo, RMA: Rejeição mediada por anticorpos.

enxerto foi determinada para todos os grupos de risco. O tratamento com imunossuppressores de manutenção consistiu de Tacrolimus (Laboratório Libbs, São Paulo, Brazil), Ciclosporina A (Biosintética, São Paulo, Brazil), Mico-fenolato de sódio e Everolimus (Novartis, Basileia, Swiss), Sirolimus (Pfizer, São Paulo, Brazil), Prednisona (Eurofarma, São Paulo, Brazil), Azatioprina, (Nuremberg, Germany). O tratamento das rejeições foi feito com base na classificação Banff<sup>(25)</sup> para o tipo de rejeição celular ou RMA aguda e crônica. Os pacientes que na avaliação clínica apresentaram sinais e/ou sintomas de rejeição foram submetidos à biópsia do enxerto renal nos Centros Transplantadores e paralelamente submetidos ao exame de PRA específico. Esse exame foi também realizado após o transplante nos pacientes com suspeita clínica de rejeição.

#### Avaliação imunológica pré-transplante

##### Tipificação HLA

A tipificação HLA foi realizada antes do transplante em receptores e doadores (Figura 1), usando o DNA genômico extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método de Salting-out<sup>(26)</sup> ou usando kit de extração BioPur (SR Produtos para Laboratórios/PR, Brasil). Em ambos os

O tratamento das rejeições foi feito com base na classificação Banff para o tipo de rejeição celular ou RMA aguda e crônica. Os pacientes que na avaliação clínica apresentaram sinais e/ou sintomas de rejeição foram submetidos à biópsia do enxerto renal nos Centros Transplantadores e paralelamente submetidos ao exame de PRA específico. Esse exame foi, também, realizado após o transplante nos pacientes com suspeita clínica de rejeição.





Estudo prospectivo para avaliar clínica e imunologicamente receptores em baixo, médio, alto e muito alto risco de rejeição humoral com rins de doadores falecidos

>>

Nome receptor [redacted] DN: [redacted] Idade: 34 anos  
 Sexo [redacted] Nº CNS: [redacted] Data do protocolo: [redacted] Material: [redacted]  
 Médico solicitante: [redacted] Data do soro: [redacted] Nº do registro IMUNOLAB: [redacted]  
 Hospital: [redacted] Data da liberação: [redacted] Nº do protocolo: [redacted]

**A**

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS CONTRA PAINEL DE ANTÍGENOS HLA E MIC-A**

PRA - CLASSE I: Positivo %: 80  
 PRA - CLASSE II: Positivo %: 92

**Especificidade dos anticorpos anti-HLA**

Locus HLA-A	1,11,23,24,25,26,29,3,30,31,32,33,34,36,43,66,68,69,74,80
Locus HLA-B	18,27,35,39,41,42,45,48,50,54,55,56,60,61,62,64,65,67,7,71,72,73,75,76,8,81,82
Locus HLA-C	18,4,6,7
Locus HLA-DR	9,7,4,16,15,14,11,10,1
Locus HLA-DQ	9,8,7,5,4,2
Locus HLA-DP	9,6,4,3,28,2,18,17,14,1

(DN: Data de Nascimento; CNS: Cartão Nacional de Saúde; MFI: Mean Fluorescent Intensity)

**Prova Cruzada com Doador Falecido - Rim**

Doador: [redacted] Data: [redacted] Nº do Registro IMUNOLAB: [redacted]  
 Grupo ABO/ Fator RH: [redacted] Data Liberação: [redacted] Nº de protocolo: [redacted]  
 Convênio: [redacted]

**B**

Ranking	Receptores	Data Soro Atual	Resultado		HLA DOADOR/DSA*(MFI**)									
			Soro Atual	Soro Histórico	Locus A		Locus B		Locus DR		Locus DQ			
					1	2	27	57	07	08	02	04		
3	[redacted]	R1	05/06/2013	Negativa	-									
5	[redacted]	R2	15/06/2013	Positiva	Positiva	6448		13812			16509	8762	12044	
6	[redacted]	R3	08/05/2013	Negativa	Negativa									
7	[redacted]	R4	17/06/2013	Negativa	-									
8	[redacted]	R5	13/06/2013	Negativa	Negativa									
9	[redacted]	R6	23/05/2013	Negativa	Negativa									
10	[redacted]	R7	15/05/2013	Negativa	-									
15	[redacted]	R8	11/06/2013	Positiva	Positiva							2428		
18	[redacted]	R9	05/06/2013	Positiva	Positiva							5421	8700	
19	[redacted]	R10	14/06/2013	Negativa	-									

Figura 3 - Laudos de PRA (A) e Prova Cruzada por citotoxicidade (CDC) (B) com as notificações de DSA com os valores de MFI anti-loci HLA-A, B, DR e resultados das positivities dos anticorpos com os percentuais de reatividade para os HLA de Classe I e II.

métodos o DNA extraído foi solubilizado em água Milli-Q e a concentração final ajustada para 20 ng/μL na razão de pureza entre 1,65 e 1,80 a A260/A280 DO. As regiões polimórficas dos genes HLA de classe I (exons 2 e 3) e II (exon 2) foram amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) empregando o método LABType® SSOP/Luminex® por meio dos kits comerciais RSS01A, RSS01B, RSS02B1, de acordo com o fabricante (One Lambda, Canoga Park, CA-USA). As análises das tipificações foram realizadas empregando-se o programa HLA Fusion (One Lambda, Canoga Park, CA-USA).

### Detecção de anticorpos ANTI-HLA

#### PRA

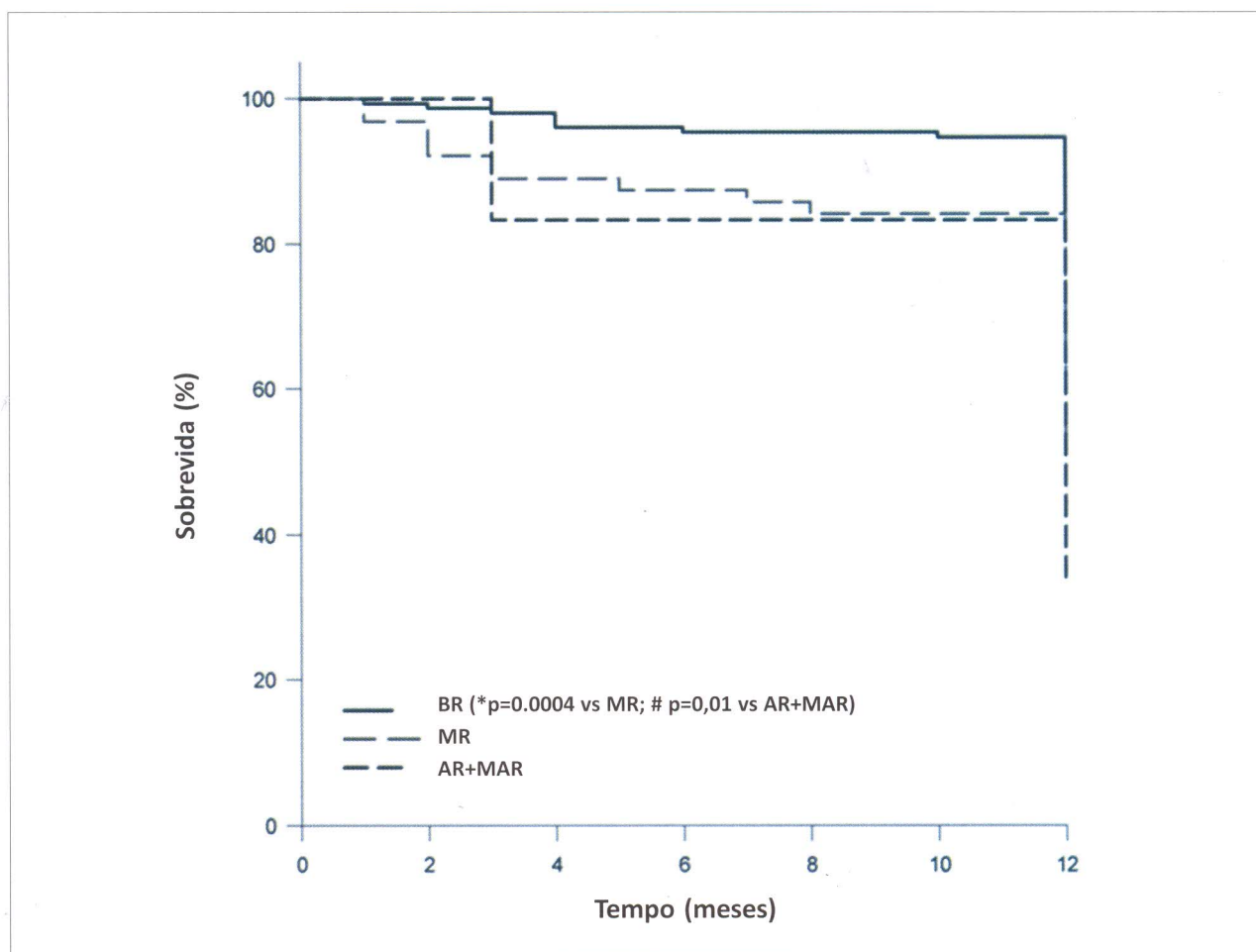
Os AloAc anti-HLA foram avaliados em amostras de soros dos receptores coletadas antes e após o transplante,

empregando-se o método PRA-SAB classe I e II usando os kits LS1A04 e LS2A01 (Luminex, LABScreen® *Mixed* e o *Single Antigen Bead* (SAB) One Lambda Canoga Park, CA-USA). Os anticorpos anti-HLA foram revelados usando um anticorpo secundário anti-IgG humana marcada com R-Phycoerythrin (PE). A intensidade média de fluorescência (MFI) foi determinada para cada DSA no Citometro de fluxo Luminex LABScan™ 100. A análise dos dados foi realizada usando o software HLA Fusion (One Lambda, Canoga Park, CA-USA). Os laudos foram emitidos eletronicamente com as especificidades dos AloAc específicos para as moléculas HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1.

#### Provas cruzadas

O exame de PC-CDC<sup>(4,5)</sup> para detecção de aloAc contra as moléculas HLA incompatíveis do doador foi realizado

>>



**Figura 4** - Curvas de sobrevivência dos enxertos de receptores em BR (91,22%), MR (78,75%), AR+MAR (80,28%) com doadores falecidos. BR vs. MR:  $p \leq 0,0004$ , BR vs. AR+MAR:  $p \leq 0,0111$ , MR vs. AR+MAR:  $p \leq 0,232$ .

empregando-se linfócitos T e B de doador e amostras de soros históricos e atuais do receptor. A leitura da PC-CDC foi feita em microscópio invertido com luz fluorescente para determinar a porcentagem de mortalidade das células. A sensibilidade do teste foi aumentada pela adição de anti-imunoglobulina humana (AGH) ao teste<sup>(2)</sup>. Para identificação do isotipo IgM ou IgG dos AloAc foi usado o tratamento do soro com Dietiltreitol (DTT) que hidrolisa a molécula de IgM transformando-a em fragmentos sem atividade biológica. Assim, a positividade da PC-CDC foi atribuída à presença de anticorpos do tipo IgG anti-HLA e não a IgM, que pode ser devido a autoanticorpos relacionados com doenças autoimunes dos receptores.

A Prova Cruzada por Citometria de Fluxo (PC-CF)<sup>(21,22)</sup> foi indicada antes do transplante para alguns receptores, como: 1) candidatos a pré-transplante; 2) em alto risco imunológico de rejeição; ou 3) receptor com DSA e PC-CDC negativa. O protocolo da PC-CF consistiu no isola-

mento de linfócitos com Ficoll/hypaque na densidade de 1.077 (GE, Uppsala, Suécia) por centrifugação a 2000 rpm por 20 min a 23°C usando 10 mL de sangue do doador coletado em tubo *Vacutainer* com o anticoagulante ACD. A suspensão de células foi ajustada para a concentração de  $2 \times 10^6$  células por mL de RPMI. Para cada teste 20  $\mu$ L de soro do receptor e 20  $\mu$ L de linfócitos do doador foram adicionados em orifícios predeterminados da placa de 96 orifícios com fundo em U e incubada a 23°C por 30 minutos. Após a incubação, 180  $\mu$ L de solução salina de fosfato (PBS) 1x a 5°C foi adicionado, sendo centrifugado a 2500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e em cada orifício foram adicionados 20  $\mu$ L do anticorpo anti-IgG humana marcada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) na diluição de 1:3. A placa foi agitada, sendo em seguida adicionados 5  $\mu$ L de anticorpos monoclonais antilinfócitos T (anti-CD3) e 5  $\mu$ L de anticorpos antilinfócitos B (anti-CD19) conjugados com PercP e R-Phyco-



**Tabela 1. Avaliação clínica em um ano de sobrevida do transplante renal com doadores falecidos em pacientes de acordo com o risco de rejeição**

RECEPTORES	Doador falecido (n = 100)			
	Classificação de receptores pelo risco imunológico de RMA			
	Baixo 54 (54%)	Médio 30 (30%)	Alto risco 10 (10%)	Muito alto risco 6 (6%)
DSA pré-Tx	–	–	10	6
DSA pós-transplante	7	9	–	–
Episódio de rejeição	8	10	3	5
Perda por RC	–	1	–	1
Perda do enxerto por RMA	2 (DSA-MFI = 1213, 2320)	2 (DSA-MFI = 530, 870)	3 (DSA-MFI = 3641 a 6815)	3 (DSA-MFI = 7511 a 11333)
Perda por CNI	1	1	–	–
Rins funcionantes	51	26	7	2

Tx: Transplante, DSA: Anticorpo doador específico, RMA: Rejeição mediada por anticorpo, MFI: Intensidade Média de Fluorescência, CNI: Perda por causa não imunológica, RC: Rejeição celular.

erythrin (PE), respectivamente. A placa foi incubada a 4°C por 30 minutos. Após essa etapa de incubação, 180 µL de PBS 1x foi adicionado e centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado. Finalmente, foram adicionados às células 200 µL do fixador paraformaldeído a 1% diluído em PBS. Os dados foram adquiridos pelo citômetro de fluxo GUAVA (GE, São Paulo), sendo considerada positiva a PC-CF com reação de fluorescência superior a duas vezes ao valor de fluorescência observado no controle negativo (CN) para LT CD3<sup>+</sup> e três vezes para LB CD19<sup>+</sup>.

## Análise de dados

A análise de sobrevida foi feita pelo método Kaplan-Meyer para análise de um ano de sobrevida relativo a cada grupo de receptores transplantados em BR, MR, AR, MAR de RMA e com valor de significância de 5%. A análise de dados foi realizada utilizando o programa SigmaPlot versão 12.0.

## Resultados

A seleção desses receptores foi feita pela compatibilidade HLA na CNCDO usando o programa de seleção de doadores falecidos do SNT/MS. Após essa seleção foram

Na evolução clínica e imunológica no primeiro ano após os 100 transplantes foram observadas perdas dos enxertos em 14 (14%) pacientes, sendo 10 (10%) devido a RMA, 2 (2%) por RC e 2 (2%) por CNI.

feitas as análises para verificar o *status* imunológico de cada receptor antes do transplante (Figura 1). Dos 100 receptores transplantados, 56% eram do sexo masculino e 44% do sexo feminino. A idade média foi de 48 anos. Entre os grupos sanguíneos ABO, o mais frequente foi o tipo O (49%) e o menos o AB (3%).

A análise dos dados com base na PCV ajudou na seleção dos melhores receptores pelo cruzamento de dados imunológicos com o possível doador, assim como na compatibilidade e na identificação dos DSA e dos níveis qualitativos de AloAc representados pelo MFI usando o banco de dados imunológicos (Figura 2).

Na evolução clínica e imunológica no primeiro ano



>> após os 100 transplantes foram observadas perdas dos enxertos em 14 (14%) pacientes, sendo 10 (10%) devido a RMA, 2 (2%) por RC e 2(2%) por CNI. Óbitos não ocorreram durante o primeiro ano após os transplantes. Dos 100 receptores, 54 (54%) foram classificados com BR, desses oito rejeitaram, desses três perderam os enxertos, sendo duas perdas por RMA (DSA MFI 1223 a 2341) e uma por causa não imunológica (CNI). De 30 (30%) que estavam em MR, 10 rejeitaram, destes quatro perderam os enxertos, sendo duas perdas por RMA (DSA MFI 530 e 870), uma por rejeição celular (RC) e uma por CNI. De 10 (10%) em AR, três rejeitaram, sendo observadas três perdas por RMA (DSA MFI 3493 a 6068). De 6 (6%) em MAR, cinco tiveram episódios de rejeições e destes quatro perderam os enxertos, sendo uma por RC e três perdas por RMA (DSA MFI 7226 a 12591) (Tabela 1). Do total de pacientes transplantados, 26 (26%) tiveram episódios de rejeições, 12 perderam os enxertos devido à causa imunológica, sendo duas perdas por RC, 10 por RMA e duas por CNI (Tabela 1). A sobrevida dos enxertos no primeiro ano para os pacientes em BR, MR, AR+MAR foi de 91,22%, 78,75% e 80,28%, respectivamente. Os dados de sobrevidas foram estatisticamente significativos na comparação BR versus MR ( $p=0,0004$ ), BR versus AR+MAR ( $p=0,0111$ ) e quando comparados MR versus AR+MAR, o resultado não foi estatisticamente significativo ( $p=0,2320$ ) (Figura 4). Dos pacientes transplantados, 87 (87%) mantiveram boa função renal no primeiro ano de sobrevida mantendo creatinina sérica entre 0,9 e 1,6 mg/dL.

## Discussão

Pacientes sensibilizados têm menor probabilidade de serem transplantados, permanecendo longos períodos na lista de espera com estimativa de sete anos para hipersensibilizados como os em AR e MAR e de dois anos e quatro meses para os receptores em BR e MR<sup>(9,15)</sup>.

Com esse protocolo foi possível reduzir, no pré-transplante, o tempo de execução dos exames de tipificação HLA do doador falecido de três para duas horas para tipificação HLA e para PC-CDC cinco para duas horas e trinta minutos. Então, o tempo máximo usado nas avaliações imunológicas de urgência no pré-transplante foi bastante reduzido, refletindo em significativa diminuição do tempo de isquemia fria do órgão a ser transplantado.

A organização e o cumprimento de condutas rígidas que definem e suportam uma eficiente avaliação imunológica de receptores nos períodos pré e após o transplante são fundamentais para diminuir e detectar os episódios

Pacientes sensibilizados têm menor probabilidade de serem transplantados, permanecendo longos períodos na lista de espera com estimativa de sete anos para hipersensibilizados como os em AR e MAR e de dois anos e quatro meses para os receptores em BR e MR.

Com esse protocolo foi possível reduzir, no pré-transplante, o tempo de execução dos exames de tipificação HLA do doador falecido de três para duas horas para tipificação HLA e para PC-CDC cinco para duas horas e trinta minutos.

de RMA e aumentar o tempo de sobrevida do órgão transplantado. É de fundamental importância ressaltar que: 1) o monitoramento dos níveis dos AloAc anti-HLA específicos deve ser obrigatório na interpretação dos resultados do transplante e dos eventos de RMA; 2) durante a evolução após o transplante, a determinação do PRA específico deve ser protocolar ou acompanhado da biópsia renal investigativa e/ou protocolar; 3) o valor do percentual de sensibilização detectado no PRA é pouco informativo sobre o status imunológico do receptor, sendo essencial a identificação de DSA com o valor do MFI, que em alguns casos pode não contraindicar o transplante; 4) a PCV foi definida como a habilidade de prever o resultado da PC real omitida<sup>(14,26,27)</sup>; 5) a PC-CDC ou a PC-CF continuam sendo fundamentais na identificação dos DSA clinicamente relevantes para contraindicar o transplante de risco.

A PCV é um método teórico de grande valor na avaliação imunológica de receptores para o transplante de órgãos sólidos, baseada no cruzamento de dados de tipificação HLA do doador com os dos receptores com o objetivo de selecionar melhores receptores pela identificação dos HLA não aceitáveis devido à presença de DSA



>> (Figura 3B). Esse método deve ser usado para grupos de pacientes que requeiram tempo menor de isquemia fria, cabendo aos Centros Transplantadores selecionar grupos de receptores classificados como prioritários em que a PC-CDC real pré-transplante poderá ser omitida<sup>(28)</sup>.

Apesar dos avanços com o emprego da AGH que aumentou a sensibilidade e da adição de DTT que aumentou a especificidade do método<sup>(29)</sup>, a PC-CDC ainda apresenta baixa sensibilidade (84%), mas tem sido a metodologia clássica utilizada há mais de 40 anos para a detecção de anticorpos anti-HLA clinicamente relevantes<sup>(4,5)</sup>, com a vantagem desse método representar *in vitro* a reatividade imunológica que acontece *in vivo*.

A prova cruzada por citometria de fluxo apresenta alta sensibilidade detectando baixos títulos de anticorpos anti-HLA que podem ser DSA clinicamente relevantes, podendo ser indicada no pré-transplante para pacientes com risco imunológico de RMA e em receptores com DSA, e PC-CDC negativa. O uso dessa metodologia na rotina pré-transplante tem sido uma prioridade dos laboratórios de histocompatibilidade, mas sua implantação tem sido um obstáculo devido ao seu alto custo.

O uso desse protocolo facilitou a análise, liberação de laudo com os resultados da PC-CDC e de DSA com MFI contribuindo para que os médicos dos centros transplantadores possam tomar decisões em relação ao tratamento imunossupressor no pré-transplante (Figuras 1, 2 e 3).

A presença de DSA detectada antes do transplante contribuiu na evolução dos órgãos transplantados demonstrando que dos 16 pacientes transplantados com DSA, oito tiveram episódios de rejeições e sete perderam o enxerto. Nos 18 pacientes transplantados que desenvolveram DSA no período após transplante, cinco perderam o enxerto (Tabela 1). Neste estudo, como previsto foi demonstrado uma pior evolução após o transplante com receptores em MAR, sendo seguido pelos grupos em AR, MR e BR.

As taxas de sobrevividas para os grupos de risco demonstraram que, usando critérios bem definidos e protocolo detalhado de avaliação imunológica, os nossos resultados foram similares aos observados por outros autores<sup>(9,15)</sup>, sendo, então, recomendado como protocolo para transplantes com órgãos sólidos de doadores falecidos visando aperfeiçoar as avaliações no pré-transplante, diminuir o tempo de isquemia fria e orientar as equipes médicas transplantadoras quanto ao melhor protocolo a ser usado para a imunossupressão do paciente.

Em conclusão, esse protocolo demonstrou ser possível uma avaliação imunológica rápida e precisa de receptores pela estratificação de risco de RMA. Permitiu ao clínico

aperfeiçoar o tratamento, sendo então recomendado aos centros transplantadores.

## Summary

**Introduction.** Donor-specific antibodies (DSA) play a fundamental role in kidney transplant as a main barrier outcome and survival. **Material and Methods.** We evaluated a protocol in 100 patients receiving kidneys from deceased donors (DD). Recipients were classified as being at low risk (LR), medium (MR), high (HR) or strong (SR) of rejection based on Luminex PRA-Single Antigen Beads (SAB). Grafts that survived for one year were evaluated. **Results.** Of 100 recipients, 54(54%) were at LR, eight rejected, but four being with grafts lost, two by AMR, and one by non-immunological cause (NIC). Of 30(30%) at MR, 10(10%) had rejection episodes, of these four lost the grafts. Of them two lost by AMR (DSA MFI 530 and 870), one by CR and one by NIC. Of 10(10%) at HR, three had rejection episodes with three lost by AMR (DSA MFI 3493 to 6068). Of 6(6%) at SR, rejection episodes were observed in five recipients, of these four lost the grafts, three by AMR (DSA MFI 7226 to 12591), and one by CR. One-year graft survival for LR was 91.22%, 78.75% for MR, and 80.28% for HR+SH. **Conclusion.** This protocol based on fluxogram risk assessment of AMR provided fast and precise immunological evaluation and stratification of the recipients by immunological risk of AMR. Rejections were detected in 26(26%) patients of which 12(46%) patients lost the grafts by immunological causes, two by CR, and 10 patients by AMR. These finding can be ascribed the severity of the rejections. Furthermore, two patients lost the graft by NIC. 87(87%) patients maintained at good kidney function with sera Creatinine value of 0.9 to 1.6 mg/dL after one year graft survival.

## Referências bibliográficas

1. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg* 148:343, 1958.
2. Kerman, RH. Relevance of histocompatibility testing in clinical transplantation. *Surg Clin North Am* 74: 1015, 1994.
3. Opelz G, Döhler B. Effect of Human Leukocyte Antigen Compatibility on Kidney Graft Survival: Comparative Analysis of Two Decades. *Transplantation* 84: 137, 2007.
4. Patel RN, and Terasaki PI. Significance of the positive cross match test in kidney transplantation. *New Engl J Med* 280: 735, 1969.
5. Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, Esquenazi V, Rosen A, Miller J and Ozawa, M. The Importance of Anti-HLA-Specific Antibody Strength in Monitoring Kidney Transplant Patients. *Am J Transplant* 7: 1027, 2007.
6. Kraus ES, Parekh RS, Oberai P, Lepley D, Segev DL, Bagnasco S et al. Subclinical rejection in stable positive cross-match kidney transplant



- patients: incidence and correlations. *Am J Transplant* 9: 1826, 2009.
7. Böhms GA, Bartel G, Regele H, Warrmann M. Prospects and limitations of pos-transplant alloantibody detection in renal transplantation. *Hum Immunol* 70: 640, 2009.
  8. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18: 1046, 2007.
  9. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 21: 1398, 2010.
  10. Cai J, Terasaki PI. Human Leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients. *Surg Today* 35: 605, 2005.
  11. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-deLima M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transpl* 6: 2316, 2006.
  12. Lefaucheur C, Suberlielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, et al. Clinical relevance of performed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 8: 324, 2008.
  13. Caner Süsal, Bernd Döhler, Gerhard Opelz. Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: A Collaborative Transplant Study report. *Hum Immunol* 70: 569, 2009.
  14. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FJJ, et al. Consensus Guideline on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in Transplantation. *Transplantation* 95(1):19-45. 2013.
  15. Gebel HM, Bray RA and Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. risk. *Am Journal Transplant* 3: 1488, 2003.
  16. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant* 7: 2124, 2007.
  17. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 3: 665, 2003.
  18. Halloran PE. The clinical importance of alloantibody mediated rejection. *Am J Transpl* 3: 639, 2003.
  19. Zachary AA, Montgomery RA, Jordan SC, Reinsmoen NL, Claas FH, Reed EF. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on understanding antibodies in transplantation. *Tissue Antigens* 69: 160, 2007.
  20. Mauyyedi S, Colsvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11(6): 609, 2002.
  21. Tambor, AR, Ramon DS, Kaufman DB, Friedewald J, Luo X, Ho B, et al. Perception Versus Reality?: Virtual Crossmatch-How to overcome some of the technical and logistic limitations. *Am J Transplan*; 9: 1886-1893, 2009.
  22. Bingaman AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F. A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation. *Transplantation* 86: 1864, 2008.
  23. Agha IA, Rueda J, Alvarez A, Singer GG, Miller BW, Flavin K, et al. Short course induction immunosuppression with thymoglobulin for renal transplant recipients. *Transplantation* 73: 473, 2002.
  24. Stevens RB, Mercer DF, Grant WJ, Freifeld AG, Lane JT, Groggel GC, et al. Randomized trial of single-dose versus divided-dose rabbit anti-thymocyte globulin induction in renal transplantation: an interim report. *Transplantation* 85: 1391, 2008.
  25. Mengela M., B. Sisa, M. Haasc, R. B. Colvind, P.F. Halloranb, L. C. Racusene, et al. Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation* 2012; 12: 563-570.
  26. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by Luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Clin Transl Res* 87: 1505, 2009.
  27. Van den berg-loonen E, Billen EV, Voorter CEM, Van Haeurn, Glass FHJ, Van Hooff, JB, et al. Clinical relevance of pretransplant donor-specific antibodies detected by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients. *Transplantation* 85: 1086, 2008.
  28. Reinsmoen NL, Lai Ch, Vo A, Cao K, Ong G, Naim M, at al. Acceptable donor-specific antibody level allowing of successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitized therapy. *Transplantation* 86: 820, 2008.
  29. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and non adherence. *Am J Transplant* 12: 388, 2012.

## **4. CONCLUSÕES GERAIS E CONTRIBUIÇÕES**



Este trabalho de tese está inserido no projeto sobre “Ensaio clínico retro e prospectivo para avaliar aloanticorpos e marcadores moleculares na evolução e na sobrevivência dos transplantes renais humano com órgãos de doadores falecidos e vivos” e também relacionado à Rede Brasil de Imunogenética.

Uma das contribuições dessa tese, além da publicação de novas mutações humanas nos *loci* HLA, foi a inclusão de sondas nos kits comerciais LabType PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe*) da empresa One Lambda (Canoga Park, CA, USA) para a caracterização desses novos alelos na população mundial. Isso certamente contribuirá para uma melhor seleção do par receptor-doador para transplantes. Outra contribuição original dessa tese foi o artigo científico mostrando a viabilidade na utilização de técnicas de álgebra linear para melhorar a qualidade de agrupamentos de dados e dendogramas e revelar relações não triviais em dados HLA. Além disso, contribuir para estratégias de busca de doadores voluntários de medula ósea não relacionados para o REDOME.

Os dados de frequências HLA foram submetidos ao banco de dados allelefreqencies.net (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011) (conforme solicitação desse banco) como contribuição no projeto de frequências de epítomos HLA. Os resultados desse projeto poderão, futuramente, serem usados por médicos e laboratórios para aprimorar o estudo de compatibilidade HLA entre o par receptor-doador, sobretudo na avaliação de incompatibilidades HLA aceitáveis nos doadores para receptores altamente sensibilizados.

O receptor candidato a transplante de órgão sólido foi amplamente beneficiado pela descrição do padrão imunológico de pacientes, permitindo uma avaliação de risco de rejeição antes e após o transplante.

## **5. PERSPECTIVAS**

Como perspectiva futura, a identificação de 15 novas variantes alélicas HLA, permitiu a elaboração de um protocolo operacional padrão que já está sendo empregado pelo Laboratório IMUNOLAB no estudo de outras 30 novas mutações gênicas nos *loci* HLA de indivíduos da população do estado de Minas Gerais.

O protocolo para a avaliação imunológica de receptores candidatos ao transplante renal, aqui mostrado, também poderá ser usado em outros tipos de transplante, como o de coração e o de rim-pâncreas como uma ferramenta importante para reduzir o tempo de isquemia fria, individualizar o tratamento imunossupressor, evitar a rejeição mediada por anticorpos, e, portanto, aumentar a sobrevida do enxerto.

Com base em todo o conhecimento adquirido durante a elaboração dessa tese, foi possível incluímos dados preliminares para o desenvolvimento de uma nova ferramenta, cujo objetivo é o de prever antes do transplante, com acurácia, as chances de risco de um receptor apresentar rejeição do enxerto. Além de prever potenciais riscos, esta ferramenta também poderá indicar similaridades e/ou correlações entre os grupos de pacientes da base de dados, que dificilmente poderiam ser detectadas pelas metodologias tradicionais. Para este estudo, estão sendo avaliados 389 pacientes transplantados, categorizados de acordo com os tipos de doadores, se vivo ou falecido. A metodologia utilizada até o momento, consistiu nas mesmas ferramentas de álgebra linear aplicadas em algumas análises desse trabalho de tese e que também é usada pela Google como mecanismo de busca e aplicada na análise de dados de microarranjos. A Álgebra linear permite recuperar informações não triviais com ênfase na redução de posto como método de extrair padrões a partir de matrizes de dados utilizando a técnica de Decomposição por Valores Singulares (SVD). O uso do SVD contribui na identificação dos principais componentes e processos escondidos em banco de dados.

Adicionalmente, o método de regressão logística, também, está sendo usado para desenvolver modelos. Na nossa base de dados, as variáveis explicativas analisadas nos dois grupos de receptores, até o momento, foram: a) padrão imunológico do receptor com relação à presença de AloAc anti HLA, b) número de incompatibilidades HLA, c) uso do tratamento de indução pré-transplante com anticorpos anti timócito humano (ATG) e d) esquemas de imunossupressão de manutenção. A variável resposta dicotômica na base de dados é a presença ou ausência de intercorrência (rejeição, perda ou óbito) no primeiro ano pós-transplante. O modelo em elaboração será capaz de correlacionar cada variável explicativa à variável resposta e assim, prever a chance de intercorrência em candidatos ao transplante renal.

Essa nova ferramenta poderá ser usada como apoio na avaliação imunológica na escolha do melhor par receptor-doador para o transplante, reduzindo as chances de intercorrências clínicas e imunológicas no pós-transplante e aumentando a sobrevida do enxerto.

Como resultado preliminar, foi apresentado um resumo dessa trabalho no congresso da Associação Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional (Anexo I).

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Amos DB. (1965). Summary. In: Amos DB, ed. *Histocompatibility Testing*, Publication 1229. Washington DC: *National Academy of Science – National Research Council*, 187–9.

Arnaiz-Villena A, Dimitroski K, Pacho A, Moscoso J, Gómez-Casado E, Silvera-Redondo C, Varela P, Blagoevska M, Zdravkovska V, Martínez-Laso J. (2001). HLA genes in Macedonians and the sub-Saharan origin of Greeks. *Tissue Antigens*, 57: 118-127.

Ayed K, Ayed-Jendoubi S, Sfar I, Labonne MP, Gebuhrer L. (2004). HLA class-I and HLA class-II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data. *Tissue Antigens*, 64: 520-532.

Bergholtz BO, Thorsby E. (1977). Macrophage-dependent response of immune human T lymphocytes to PPD in vitro. *Scand J Immunol*, 6: 779–86.

Berry, MW; Dumais, ST; O'Brien, GW. (1995). Using linear algebra for intelligent information retrieval. *SIAM review*, 37(4):573–595.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329: 506–12.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. (1987b). The foreign antigen binding site and Tcell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512–8.

Bodmer JG, Marsh SGE, Albert E, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasasuki T, Schreuder GMT, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. (1991). Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 37: 97–104.

Bortolotto AS, Petry MG, da Silveira JG, Raya AR, Fernandes SR, Neumann J, Bonorino C. (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(2):180-185.

Bouzas, LFS. (2011). Análise da capacidade do REDOME/RENACORD em suprir as necessidades dos pacientes registrados no REREME. Instituto Nacional do Câncer, Pós-Graduação em Oncologia. Rio de Janeiro.

Braun-Prado K, Mion ALV, Pereira NF, Culpi L, Petzl-Erler, ML. (2000). HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens*, 56:417-427.

Buhler S, Nunes JM, Nicoloso G, Tiercy J-M, Sanchez-Mazas A. (2012). The Heterogeneous HLA Genetic Makeup of the Swiss Population. *PLoS One*, 7(7): e41400.

Cao K, Moormann AM, Lyke KE, Masaberg C, Sumba OP, Doumbo OK, Koeh D, Lancaster A, Nelson M, Meyer D, Single R, Hartzman RJ, Plowe CV, Kazura J, Mann DL, Sztejn MB, Thomson G, Fernández-Vina MA. (2004). Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. *Tissue Antigens*, 63: 293-325.

Carrington M. (1999). Recombination within the human MHC. *Immunol Rev*, 167:245-256.

Cattell, R. B. (1966). The Scree Test For The Number Of Factors. *Multivariate Behavioral Research*, 1(2):245–276.

Chen MJ, Yang TC, Chu CC, Shyr MH, Lin CL, Lin PY, Yang KL. (2009). Detection of a novel HLA-B27 allele, B\*2740, in Taiwanese volunteer bone marrow donors by sequence-based typing: curiosity rewarded. *Int J Immunogenet*, 36(4):207-211.

Dausset J. (1958). Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*, 20: 156–66.

Dawson E, Abecasis GR, Bumpstead S, Chen Y, Hunt S, Beare DM, Pabial J, Dibling T, Tinsley E, Kirby S, Carter D, Papaspyridonos M, Livingstone S, Ganske R, Lõhmussaar E, Zernant J, Tõnisson N, Remm M, Mägi R, Puurand T, Vilo J, Kurg A, Rice K, Deloukas P, Mott R, Metspalu A, Bentley DR, Cardon LR, Dunham I. (2002). A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. *Nature*, 418(6897):544-548.

Duquesnoy RJ, Marrari M. (2002). HLAMatchmaker: A molecular based algorithm for histocompatibility determination. II: verification of the algorithm and determination of the relative immunogenicity of amino acid triplet-defined epitopes. *Hum Immunol*, 63: 353-363.

Duquesnoy RJ, Howe J, Takemoto S. (2003). HLAMatchmaker: A molecular based algorithm for histocompatibility determination. IV: An alternative strategy to increase the number of compatible donor for highly sensitized patients. *Transplantation*, 75(6): 889-897.

Duquesnoy RJ, Mulder A, Askar M, Fernandez-Vina M, Claas FH. (2005). HLAMatchmaker-based analysis of human monoclonal antibody reactivity demonstrates the importance of an additional contact site for specific recognition of triplet-defined epitopes. *Hum Immunol*, 66(7):749-61.

Duquesnoy RJ. (2006). A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. *Hum Immunol*, 67: 847- 62.

Eldén, L. (2006). Numerical linear algebra in data mining. *Acta Numerica*, 15:327–384.

Eldén, L. (2007). Matrix Methods in Data Mining and Pattern Recognition Fundamentals of Algorithms). *Society for Industrial and Applied Mathematics*.

Ellis JM, Mack SJ, Leke RFG, Quakyi I, Johnson AH, Hurley CK. (2000). Diversity is demonstrated in class I HLA-A and HLA-B alleles in Cameroon, Africa: description of HLA-A\*03012, \*2612, \*3006 and HLAB1403, \*4016, \*4703. *Tissue Antigens*, 56: 291-302.

Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J. (2013). High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood*, 122(18):3220-3229.

Gatti E, Pierre P. (2003). Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Current Opinion in Cell Biology*, 15:468–473.

Gebel HM, Bray RA and Nickerson P. (2003). Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. risk. *Am J Transplant*, 3(12):1488-1500.

Gómez-Casado E, del Moral P, Martínez-Laso J, García-Gómez A, Allende L, Silvera-Redondo C, Longas J, González-Hevilla M, Kandil M, Zamora J, Arnaiz-Villena A. (2001). HLA genes in Arabic speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians. *Tissue Antigens*, 55: 239-249.

Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. (2011). Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res*, 39: D913–919.

Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ. (1977). Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA. *Nature*, 266: 544–5.

Hedrick, P W. (2000). Genetics of Populations: Jones & Bartlett Pub.

- Horowitz MM. (2004). Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, eds. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rded. Malden: Blackwell Publishing: 9-15.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene map of the extended human MHC. (2004). *Nat Rev Genet*, 5(12):889-899.
- Hughes AL, Nei M. (1988). Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I *loci* reveals overdominant selection. *Nature*, 335: 167-170.
- Huttley GA, Smith MW, Carrington M, O'Brien SJ. (1999). A scan for linkage disequilibrium across the human genome. *Genetics*, 152: 1711-1722.
- Kasahara M, Hayashi M, Tanaka K, Inoko H, Sugaya K, Ikemura T, Ishibashi T. (1996). Chromosomal localization of the proteasome Z subunit gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 9096-9101.
- Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, Takahata N. (1997). Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends in Genetics*, 13: 90-92.
- Kindred B, Shreffler DC. (1972). H-2 dependence of co-operation between T and B cells in vivo. *J Immunol*, 109: 940-3.
- Kissmeyer-Nielsen F, Svejgaard A, Hauge M. (1968). Genetics of the human HL-A transplantation system. *Nature*, 219: 1116-9.
- Klein J. (1977). *The Major Histocompatibility System in Man and Animals*. Berlin: Springer-Verlag.
- Klein J. (1986). *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. New York: John Wiley and Sons: New York. 775 páginas.
- Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, Pratschke J, Rudolph B, Schmidt D, Salama A, Schönemann C. (2009). Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*, 87(10):1505-1513.
- Li WH, Sadler LA. (1991). Low nucleotide diversity in man. *Genetics*, 129(2):513-523.
- Louzada-Junior P, Smith AG, Hansen JA, Donadi EA. (2001). HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. *Tissue Antigens*, 57:158-162.
- Luo M, Embree J, Ramdahin S, Ndinya-Achola J, Njenga S, Bwayo JB, Pan S, Mao X, Cheang M, Stuart T, Brunham RC, Plummer FA. (2002). HLA-A and HLA-B in Kenya, Africa: Allele frequencies and identification of HLAB\*1567 and HLA-B\*4426. *Tissue Antigens*, 59: 370-380.
- Mack SJ, Bugawan TL, Moonsamy PV, Erlich JA, Trachtenberg EA, Paik YK, Begovich AB, Saha N, Beck HP, Stoneking M, Erlich HA. (2000). Evolution of Pacific/Asian populations inferred from HLA class II allele frequency distributions. *Tissue Antigens*, 55: 383-400.
- Mack SJ, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK, Cao K, Ng J, Hurley CK. (2009). HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. *Tissue Antigens*, 73(1):17-32.
- Malissen M, Malissen B, Jordan BR. (1982). Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(3):893-897.

Marsh, S., Parham P, Barber L. (2000). The HLA Facts Book: London, Academic Press, p.73-83.

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez-Vinã M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurlley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Muller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, 75: 291-455.

McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM; International HapMap Consortium. (2006). Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet*, 38(1):86-92.

Medina-Pestana JO, Galante NZ, Tedesco-Silva H, Harada KM, Garcia VD, Abbud-Filho M, Campos HH, Sabbaga E. (2011). O contexto do transplante renal no Brasil e sua disparidade geográfica. *J Bras Nefrol*, 33(4):472-484.

Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, Nascimento E, Briceno I, Perez MP. (2000). Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol*, 61(10):1048-1052.

Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, Esquenazi V, Rosen A, Miller J and Ozawa, M. (2007). The Importance of Anti-HLA-Specific Antibody Strength in Monitoring Kidney Transplant Patients. *Am J Transplant*, 7(4):1027-1031.

Muro M, Marín L, Torío A, Moya-Quiles M, Minguela A, Rosique-Roman J, Sanchis M, Garcia-Calatayud M, Garcia-Alonso A, Ivarz-López M. (2001). HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): in the cradle of the archeological Iberians. *Hum. Immunology*, 62:910-921.

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH (1958). Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg*, 148:343-59.

Myers S, Bottolo L, Freeman C, McVean G, Donnelly P. (2005). A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science*, 310(5746):321-324.

Nascimento E, Fabreti de Oliveira RA, Maciel MD, Pereira AB, das Mercês de Lucas F Jr, Salomão-Filho A, Pereira WA, Moreira JB5, Vilaça SS, de Castro Gontijo R, Lasmar MF, Vianna HR, Magalhães A, Calazans CA, Simão-Filho C, Vilela B. (2014). Kidney transplantation: evaluation and clinical outcome of 237 recipients at low, medium, high, or strong immunological risk of rejection. *Transplant Proc*, 46(1):101-107.

Nascimento E, Fabreti-Oliveira, RA, Delgado M, Pereira AB, Lasmar M, Vilela B, Pereira WA, Salomão Filho A, das Mercês de Lucas F Jr. (2013). Estudo prospectivo para avaliar clínica e imunologicamente receptores em baixo, médio, alta e muito alto risco de rejeição humoral com rins de doadores falecidos.. *RBM. Revista Brasileira de Medicina*, 70, 2-11.

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: 204-209.

Opelz G, Döhler B. (2007). Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation*, 84(2):137-143.

Parham P, Lomen CE, Lawlor DA, Ways JP, Holmes N, Coppin HL, Salter RD, Wan AM, Ennis PD. (1988). Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 4005-4009.

Park I, Terasaki P. (1970). Origins of the first HLA specificities. *Hum Immunol*, 61: 185–9.



Patel R, Terasaki PI. (1969). Significance of the positive cross match test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, 280(14):735-739.

Pereira NF, Moraes ME, Lima MG (2009). Imunogenética no Transplante de Células-tronco Hematopoéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT. Transplante de Células-tronco Hematopoéticas. 1a ed. São Paulo: Editora Atheneu, pg 93-113.

Pereira, NF, Oliveira, DCM, Torres, M, Rodrigues, CA, Alencar, ISB, Salomão, I, Mauad, MA, Colturato, VAR, Bouzas LFS, Moraes, ME. (2010). Seleção de doador de medula óssea ou sangue periférico. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 32(Supl. 1):3-5.

Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-Revenga L, Tran CW, Scheffer A, Steinfeld I, Tsang P, Yamada NA, Park HS, Kim JI, Seo JS, Yakhini Z, Laderman S, Bruhn L, Lee C. (2008). The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am J Hum Genet*, 82(3):685-695.

Piancatelli D, Canossi A, Aureli A, Oumhani K, Del Beato T, Di Rocco M, Liberatore G, Tessitore A, Witter K, El Aouad R, Adorno D. (2004). Human leukocyte antigen-A, -B, and -Cw polymorphism in a Berber population from North Morocco using sequence-based typing. *Tissue Antigens*, 63: 158-172.

Pimthanohai N, Hurley CK, Leke R, Klitz W, Johnson AH. (2001). HLA-DR and -DQ polymorphism in Cameroon. *Tissue Antigens*, 58: 1-8.

Portaria n.º 2600/GM, publicada em 21 de outubro de 2009, que dispõe sobre a regulamentação técnica do Sistema Nacional de Transplantes (SNT).

Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000a). Inference of population structure using multi/locus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.

Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A., and Donnelly, P. (2000b). Association mapping in structured populations. *Am. J Hum Genet*, 67:170–181.

Resolução RDC ANVISA n.º 61, de 1 de dezembro de 2009. Regulamentação técnica para o funcionamento dos Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética com atividades para fins de transplantes.

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG (2013). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res*: 41:D1222-7.

Saitou, N, Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4):406-425.

Sanchez-Mazas A, Djoulah S, Busson M, Le Monnier de Gouville I, Poirier JC, Dehay C, Charron D, Excoffier L, Schneider S, Langaney A, Dausset J, Hors J. (2000). A linkage disequilibrium map of the MHC region based on the analysis of 14 *loci* haplotypes in 50 French families. *Eur J Hum Genet*, 8(1):33-41.

Sanchez-Velasco P, Gomez-Casado E, Martinez-Lazo J, Moscoso J, Zamora J, Lowy E, Silvera C, Cemborain A, Leyva-Cobián F, Arnaiz-Villena A. (2003). HLA alleles in isolated populations from North Spain: origin of the Basques and ancient Iberians. *Tissue Antigens*, 61:384-392.

Satta, Y. (1992). Balancing selection at HLA *loci*. In: N. Takahata, Clark, AG (Ed.). *Mechanisms of Molecular Evolution*. Tokyo: Springer, p.129-150.

Shiina T, Inoko H, Kulski JK. (2004). An update of the HLA genomic region, *locus* information and disease associations. *Tissue Antigens*, 6: 631-649.

- Shiina T., Hasomichi K., Inoko H., Kulski J.K. (2009). The HLA genomic *loci* map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet*, 54(1):15-39.
- Simon-Sanchez J, Scholz S, Fung HC, Matarin M, Hernandez D, Gibbs JR, Britton A, de Vriese FW, Peckham E, Gwinn-Hardy K, Crawley A, Keen JC, Nash J, Borgaonkar D, Hardy J, Singleton (2007). A Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum Mol Genet*, 16(1):1-14.
- Solheim BG, Bratlie A, Sandberg A, Staub-Nielsen L, Thorsby E. (1973). Further evidence of a third HL-A locus. *Tissue Antigens*, 3: 439–53.
- Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. (2004). Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res*, 14(6):1176-1187.
- Street J, Johnson J, Hammond L, Pepperall J, Darke C. (2011). A novel HLA-B\*40 sequence B\*40:92. *Int J Immunogenet*, 38(2):161-166.
- Süsal C, Opelz G. (2013). Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 18(4):438-444.
- Süsal C, Döhler B, Opelz G. (2009). Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a Collaborative Transplant Study report. *Hum Immunol*, 70(8):569-573.
- Su X, Zenios SA, Chakkera H, Milford EL, Chertow GM. (2004). Diminishing significance of HLA matching in kidney transplantation. *Am J Transplant*, 4(9):1501-1508.
- Takahata N. (1993). Allelic genealogy and human evolution. *Mol Biol Evol*, 10(1):2-22.
- Takahata N, Satta Y. (1998). Selection, convergence, and intragenic recombination in HLA diversity. *Genetica*, 102-103(1-6):157-169
- The MHC sequencing consortium. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401: 921-923.
- Thorsby E. (2009). A short history of HLA. *Tissue Antigens*, 74(2):101-16.
- Thorsby E, Piazza A. (1975). Joint report from the sixth international histocompatibility workshop conference. II. Typing for HLA-D (LD-1 or MLC) determinants. In: Kissmeyer-Nielsen F, ed. *Histocompatibility Testing 1975. Copenhagen: Munksgaard*, 414–58.
- Tiercy JM, Sanchez-Mazas A, Excoffier L, Shi-Isaac X, Jeannet M, Mach B, Langaney A. (1992). HLA-DR polymorphism in a Senegalese Mandenka population: DNA oligotyping and population genetics of DRB1 specificities. *Am J Hum Genet*, 51: 592-608.
- Trachtenberg E, Vinson M, Hayes E, Hsu YM, Houtchens K, Erlich H, Klitz W, Hsia Y, Hollenbach J. (2007). HLA class I (A, B, C) and class II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1) alleles and haplotypes in the Han from southern China. *Tissue Antigens*, 70(6):455-463
- Trowsdale J, Knight JC. (2013). Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, 14:301-323.
- Tu B, Mack SJ, Lazaro A, Lancaster A, Thomson G, Cao K, Chen M, Ling G, Hartzman R, Ng J, Hurley CK. (2007). HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies in an African American population. *Tissue Antigens*, 69(1):73-85.

Valdes AM, McWeeney SK, Meyer D, Nelson MP, Thomson G. (1999). *Locus* and population specific evolution in HLA class II genes. *Annals of Human Genetics*, 63(Pt 1):27-43.

WHO-Nomenclature Committee. (1968). Nomenclature for factors of the HL-A system. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39: 483–486.

Williams, TM. (2001). Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J J Mol Diagn.*, 3(3):98-104.

Williams, F, F. W., Dark, A., Acosta, A. S., Daar, A. S., Gorodezky, C., Hammond, M., Nascimento, E., Middleton, D. (2001). Analysis of the distribution of HLA-B alleles in population from five continents. *Hum Immunol*, 62(6):645-650.

Zinkernagel RM, Doherty PC. (1974). Restriction of in vitro T cellmediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248: 701–2.

**Sites acessados:**

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk>

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

[www.pypop.org/popdata](http://www.pypop.org/popdata)

<http://www.sbn.org.br/censo/2012>

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>

## **7. ANEXOS**

## **ANEXO I: RESUMOS APRESENTADOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS DURANTE O PERÍODO DE PREPARAÇÃO DA TESE:**

### **1.1. Resumo publicado nos Anais do X-Meeting da Associação Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional (Florianópolis, outubro/2011)**

#### **An algorithm to predict the risk of rejection mediated by alloantibodies anti-HLA before kidney transplant**

Oliveira, RAF<sup>1,2,\*</sup>, Santos, MA<sup>1</sup>, Nascimento, E<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioinformática - Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG) e Departamento de Ciência da Computação (DCC-ICEX/UFMG), <sup>2</sup>Laboratório IMUNOLAB - Imunologia de Transplantes Ltda, MG, <sup>3</sup>Núcleo de Pesquisas e Ensino do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, MG. \*Author contact: raquelfabreti@gmail.com

**Introduction:** Donor specific alloantibodies (DSA) represented major risk for poor function, early kidney acute rejection and a decrease in the graft survival. The characterization of the alloantibody (AlloAb) specificities anti-HLA is essential to study the immunological status of transplant candidate patients. Then, the accurate knowledge of the immunological status of recipients and HLA genotype of the recipient/donor can predict the risk of AlloAb mediated rejection (AMR) before transplantation. For this study, algorithms from numerical linear algebra are important by used data mining with information retrieval such as used on web search engines as Google, Yahoo etc. The aim of this study was to obtain clusters semantically indexed that allow application of the techniques of data mining and use statistics methods to predict the risk of AMR in transplant with organs of living and deceased donors.

**Material and Methods:** Five hundred transplanted patients were evaluated. AlloAb screening was done using sera of patients during the period of time of 2009 to 2010 from four different hospitals of Belo Horizonte, Minas Gerais. The specificity of the AlloAb from recipient was identified by fluorescent HLA single antigen beads (SAB) using LabScreen Luminex method according to manufactory One Lambda (Canoga, CA, USA). The database with patients, donors, immunological and clinical data were structured by means of the vector representation and analyzed. The Singular Value Decomposition method was used to eliminate noise and reduced of the dimensionality of the space. The grouping of the patients based on the specified AlloAb and genetic status of the donor and recipient was done by k-means algorithm. In each cluster formed, was identified patients with and without DSA. The transplanted patients were divided in two subgroups based on clinical rejection processes.

**Results and Conclusion:** In the analyses of this prospective database were obtained groups of patient that will allow the application of the data mining techniques and statistical methods to predict the clinical evolution of kidney transplant. The preliminary results also allowed verify that the groups have different characteristics that can be define using logistic regression and Latent Semantic Indexing.

1.2. Resumo publicado no Anais do XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (São Paulo, agosto/2013)

C11

Quinze novos alelos HLA identificados em indivíduos do estado de Minas Gerais, Brasil

Raquel Aparecida Fabreti de Oliveira - aDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil. bDepartamento da Ciência da Computação, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil; cIMUNOLAB ? Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Bernardo Vilela Nascimento - cIMUNOLAB ? Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, MG, Brazil  
Cíntia Keila Fabreti de Oliveira - cIMUNOLAB ? Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, MG, Brazil  
Eliane Maria Gaspar Vale - cIMUNOLAB ? Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, MG, Brazil  
Evaldo Nascimento - cIMUNOLAB ? Laboratório de Histocompatibilidade, Imunogenética e Imunologia de Transplantes, MG, Brazil; dInstituto de Ensino, Pesquisas e Clínica de Transplantes do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, MG, Brazil  
Marcos Augusto dos Santos - bDepartamento da Ciência da Computação, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil

**Introduction:** The Human Leukocyte Antigen (HLA) genes are highly polymorphic. More than 8,500 classical HLA class I and II alleles have been published. **Objectives:** Fifteen novel HLA alleles were identified in the Minas Gerais state volunteer subjects from the Brazilian Bone Marrow Donor Register (REDOME). **Methods:** The genomic DNA was isolated using Biopur DNA extraction Kit (Biometrix, Curitiba/PR, Brazil). The HLA typing was first performed using LabType® PCR-SSOP (One Lambda, Canoga Park, USA), followed by Sequence-Based-Typing (SBT) with SeCore® HLA Sequence-Based Typing Kits (Invitrogen, USA). No matches were found with any known HLA allelic combination, suggesting the presence of novel HLA alleles for each sample. In order to separate the two HLA alleles

24

in each sample and to determine which alleles were novel was amplified using the Group Specific Domino Stone (GSA) and Locus Specific Domino Stone (LSA) single sequencing set (Protrans GmbH, Heidelberg, Germany) for single allele-specific sequencing. All new HLA sequence data were submitted to the GenBank database and were assigned accession numbers. The names of all novel HLA alleles were officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in January and February of 2013. **Results:** The new alleles discovered separated by a slash its GeneBank accession number include: one HLA-A (A\*80:03/KC433572), ten HLA-B (B\*07:184/KC477770, B\*27:102/KC477778, B\*41:27/KC477771, B\*42:19/KC477777, B\*42:20/KC477772, B\*50:32/KC477774, B\*51:151/KC477775, B\*57:63/KC477773, B\*57:64/KC477776, and B\*58:42/KC477769), and four HLA-DRB1\* (DRB1\*04:11:03/KC433573, DRB1\*10:05/KC438413, DRB1\*15:94/KC438414, and DRB1\*16:22/KC438412). The HLA-B\*27:102 probably originated by an intralocus gene conversion event between the HLA-B\*27:02:01 allele and one of the following HLA alleles as a donor: B\*27:07:01 or B\*40:02:01. Novel HLA alleles compared with their most similar HLA alleles were observed as A\*80:03 (163 GAG to ACG - E to T), B\*07:184 (5 ATG to AGG - M to R), B\*41:27 (74 TAC to GAC - Y to D), B\*42:19 (152 GTG to GAG - V to E and 156 GAC to CTG - D to L), B\*42:20 (113 CAT to TAT - H to Y), B\*50:32 (155 CAG to CAT - Q to H), B\*51:151 (9 TAC to CAC - Y to H), B\*57:63 (152 GTG to GAG - V to E), B\*57:64 (151 CGT to TGT - R to C), B\*58:42 (84 TAC to TTC - Y to F), DRB1\*04:11:03 (58 GCC to GCT (silent), DRB1\*10:05 (57 GAT to AGC - D to S), DRB1\*15:94 (50 GTG to GGG - V to G), DRB1\*16:22 (6 CGT to TGT - R to C). Fourteen of the novel alleles had single nucleotide polymorphisms (SNP) when compared to their most homologous allele. Of these, one harbored a SNP identified as a silent substitution. The remaining novel alleles differ from their most similar allele by one to four nucleotide substitutions. **Conclusion:** The Knowledge of new mutations in the population may have clinical relevance both in organ, tissue transplantation, and in the immune system regulation of autoimmune or infectious diseases.

### **1.3. Resumo publicado no Anais do XIII Congresso Brasileiro de Transplantes - ABTO (Rio de Janeiro, outubro/2013)**

Transplante Renal: Avaliação Imunológica e clínica de 237 receptores em baixo, médio, alto e muito alto risco de rejeição hiperaguda, aguda e crônica mediada por anticorpos

#### **Introdução**

Os anticorpos específicos contra o doador (DSA) representam uma das principais barreiras para o sucesso do transplante renal devido ao desenvolvimento de rejeições hiperaguda, aguda e crônica.

#### **Material e Método**

237 receptores classificados em baixo risco de rejeição mediada por anticorpos (RMA) (BR), médio risco (MR), alto risco (AR) e muito alto risco (MAR) foram transplantados com rins de doadores vivos (DV) e falecidos (DF). A sobrevida dos transplantes foi avaliada nos primeiros 12 meses após o transplante.

#### **Resultados**

Dos 237 receptores transplantados, 129(54,43%) receberam rins de DV, desses 95(73,64%) foram classificados com BR, sendo observados 10 episódios de rejeições e duas perdas por causas não imunológicas (CNI). 34 receptores foram classificados em MR, 13 rejeitaram, um perdeu o rim devido à rejeição celular (RC) e outro por RMA (DSA MFI=632). Dos 108 receptores que receberam rins de doadores falecidos (DF), 59(54,43%) foram classificados com LR, oito rejeitaram, sendo uma perda por RC, duas por RMA (DSA MFI = 1223 a 2341) e uma perda por CNI. De 31(28,70%) estavam em MR, 10 rejeitaram, sendo duas perdas por RMA (DSA MFI 530 e 870), uma por RC e uma por CNI. De 11(10,70%) em AR, quatro rejeitaram, sendo observadas três perdas por RMA (DSA MFI = 3493 a 6068). De 7(6,48%) em MAR, seis tiveram episódios de rejeições e quatro perdas por RMA (DSA MFI = 7226 a 12591). A sobrevida após um ano foi de 97,6% pra BR e 94,1% para MR para pacientes com rins de DV. Para os receptores de DF a sobrevida foi de 91,22%, 78,75% e 80,28% para os pacientes em BR, MR, AR+MAR, respectivamente.

#### **Discussão e Conclusões**

Rejeições foram detectadas em 51(21,52%) e perdas do enxerto em 15(6,33%) dos pacientes. 218(91,98%) dos pacientes mantiveram boa função renal no primeiro ano de sobrevida.

#### **Palavras Chaves**

Transplante renal, protocolo, classificação de receptores pelo risco imunológico, sobrevida



#### 1.4. Resumo publicado no Anais do I Congresso do Sistema Brasileiro de Transplantes (Brasília, dezembro/2013)

##### Poster (Painel)

##### 614-1 Transplante de Medula Óssea: recrutamento de doadores para o REDOME no contexto da heterogeneidade genética da população brasileira

Autores: Fabreti-Oliveira, RA (IMUNOLAB - Laboratório IMUNOLAB Transplantes / UFMG - Universidade Federal de Minas) ; Nascimento, E (IMUNOLAB - Laboratório IMUNOLAB Transplantes / SC-BH - Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte) ; Fonseca, CG (UFMG - Universidade Federal de Minas) ; Santos, MA (UFMG - Universidade Federal de Minas)

##### Resumo

##### Introdução

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em humanos é mapeado no braço curto do cromossomo 6. Nesta região, localizam-se os genes que codificam os antígenos leucócitos humanos (HLA). Os genes HLA são os mais polimórficos do genoma humano tornando cada indivíduo geneticamente único. As diferenças no HLA de receptores e doadores podem resultar em rejeição de órgãos e tecidos. O alto polimorfismo e o padrão de distribuição de alelos e haplótipos HLA nas populações humanas em todo o mundo, torna a busca por doadores não relacionados com boa compatibilidade HLA mais difícil, o que implica no desenvolvimento de estratégias para otimizar essa busca. Assim, o conhecimento dos padrões de diversidade HLA é crucial para os programas de recrutamento de doadores.

##### Objetivo

O objetivo deste estudo foi investigar a variabilidade genética nos loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 na população brasileira, a fim de determinar possíveis diferenças regionais, o que seria altamente relevante para aperfeiçoar as estratégias de recrutamento de doadores para o Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME) e compreender a base genética da população deste país heterogêneo.

##### Metodologia

Foram tipificados os loci HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 por sequenciamento de DNA (alta resolução) de 551 doadores do REDOME das cinco regiões brasileiras. Esses dados foram comparados com outras populações em todo o mundo. O programa PyPop v.0.7.0 foi usado para estimar as frequências dos alelos e haplótipos, para a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação entre os diferentes loci de cada região. A distância genética entre as populações foi analisada usando um novo algoritmo com base em Álgebra Linear.

##### Resultado

Os resultados indicaram uma composição genética heterogênea da população brasileira, verificada pelas diferentes distribuições nas frequências alélicas e haplotípicas estimadas entre as regiões brasileiras. Uma diferenciação acentuada foi observada por dois clusters estruturando os dados: um formado pelas regiões Norte e Nordeste e outro por Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Com base na análise HLA, a população das regiões Sul e Norte são mais diferenciadas das outras. A população da região Sul é mais parecida com as populações europeias do que com própria população brasileira. A população da região Sudeste é mais miscigenada e muitos dos haplótipos observados nessa região são também observados em outras regiões.

##### Conclusão

Os resultados desse estudo poderão auxiliar na elaboração de estratégias para o recrutamento de doadores para o REDOME garantindo a representatividade genética da heterogênea população brasileira nesse banco.

**Palavras-chave:** HLA, População brasileira, Biologia computacional, SBT, frequências alélicas e haplotípicas



**ANEXO II:**

Nascimento E, Oliveira RAF. Fundamentos de Imunologia de Transplantes. **In: Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos.** Ed. CoopMed – Cooperativa Médica. 4º edição, Cap 3. 68-84, 2012.

Walter Antonio Pereira

**MANUAL DE**  
**TRANSPLANTES**  
**DE ÓRGÃOS**  
**E TECIDOS**

4ª Edição

**COOPMED**  
COOPERATIVA MÉDICA



50 anos

**Walter Antonio Pereira**

**Dr. Evaldo Nascimento**<sup>MD, CHS, MSc, PhD</sup>  
**CRMMG 33.132**  
Médico Imunologista de Transplantes  
Responsável Técnico

MANUAL DE

**TRANSPLANTES**

**DE ÓRGÃOS**

**E TECIDOS**

**COOPMED**   
COOPERATIVA MÉDICA  
*50 anos*

**Belo Horizonte**  
**2012**

# Fundamentos de imunologia de transplantes

EVALDO NASCIMENTO

RAQUEL APARECIDA FABRETI DE OLIVEIRA

A imunologia de transplante estuda a compatibilidade imunogenética entre doadores e receptores de órgãos ou tecidos e a presença de aloanticorpos anti-HLA (antígenos leucocitários humanos) e MIC-A (*MHC classe I Chain Related gene A*), que são antígenos específicos expressos nas células endoteliais, macrófagos e fibroblastos do doador. O entendimento dos mecanismos envolvidos no reconhecimento celular e por anticorpos na rejeição pode sugerir ao médico condutas de tratamento das agressões sofridas pelo enxerto na resposta imunológica do receptor contra os antígenos HLA codificados pelo complexo principal de histocompatibilidade (CPH) do doador.

A resposta imunológica se estabelece pela intervenção dos elementos clássicos da resposta imune envolvendo anticorpos, células, moléculas HLA e as citocinas. Tudo isso contribui para modular a intensidade da resposta imune, que é o reflexo de uma sofisticada cooperação entre diferentes células imunocompetentes. A rejeição é a expressão indesejada da resposta imunológica, envolvendo, na maioria das vezes, as moléculas HLA do órgão transplantado.

Os transplantes de órgãos ou tecidos são classificados como:

- a) Autotransplante: transplante de órgão, tecidos ou células do mesmo indivíduo;
- b) Isotransplante: transplante entre in-



divíduos com a mesma constituição genética;

c) Alotransplante: transplante feito com órgãos de indivíduos da mesma espécie. Este é o tipo de transplante mais comum;

d) Xenotransplante: transplante entre indivíduos de espécies diferentes.

A semelhança genética entre receptor-doador contribuirá para evitar episódios de rejeição no pós-transplante e aumentar a sobrevida do órgão transplantado. A falência dos órgãos transplantados se deve às disparidades alo gênicas entre doadores e receptores, levando às rejeições mediadas por anticorpos e/ou por células. Baseando-se nessas intercorrências pós-transplantes, duas estratégias foram desenvolvidas:

a) Selecionar o par receptor-doador pela compatibilidade no sistema HLA;

b) Realizar o estudo imunológico pré-transplante para identificar aloanticorpos pré-formados de anti-HLA pelos exames de provas cruzadas entre doadores e receptores de reatividade de anticorpos contra painel (PRA) de antígenos HLA e MIC-A.

As compatibilidades dos sistemas ABO e HLA, as provas cruzadas negativas e os antígenos aceitáveis detectados pelo PRA são parâmetros essenciais ao transplante renal para manter a função e aumentar a sobrevida do órgão transplantado. Atualmente, o uso desse pro-

ocolo constitui-se na rotina obrigatória nos Laboratórios de Imunogenética vinculados aos centros transplantadores e às Centrais Nacionais de Captação e Distribuição de Órgãos (CNCDO).

## COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH)

O CPH é uma região poligênica e polimórfica que está localizada, em humanos, no cromossomo 6 (posição 6 p21.31) e cerca de 40% de seus genes codificam proteínas envolvidas na resposta imune. No homem, é denominado sistema. Essa região gênica codifica elevado número de glicoproteínas (antígenos) na superfície de todas as células nucleadas, principalmente linfócitos e células dendríticas, que, na maioria das vezes, estão envolvidas nas rejeições dos transplantes. Nessa região, são codificadas moléculas diretamente envolvidas na compatibilidade entre receptor-doador no transplante: classe I (HLA-A, -B, -C), classe II (HLA-DR, -DQ, -DP), (Fig. 3.1) e também moléculas de classe III indiretamente envolvidas no transplante.

As moléculas de classe I e II são glicoproteínas expressas na superfície da maioria das células. As moléculas de classe III são fatores humorais (proteínas do sistema complemento, enzima 21-hidroxilase, HSP70 e fatores de ne-

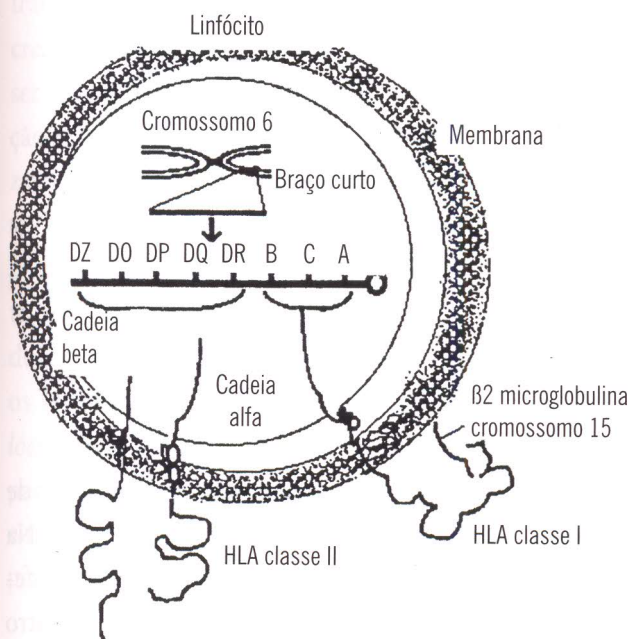


Figura 3.1. Organização da expressão de antígenos HLA de classe I e II. As moléculas são sintetizadas e transportadas para a membrana do linfócito.

crose tumoral). Os antígenos de classe I codificados nos *loci* HLA-A, -B e -C e os de classe II codificados nos *loci* HLA-DR, -DQ e -DP estão bem definidos como as principais moléculas de histocompatibilidade envolvidas nos transplantes de órgãos e tecidos. Os genes que codificam as moléculas HLA de classe I e II apresentam o mais alto grau de polimorfismo entre os genes humanos, sendo que os genes de classe I são os mais polimórficos. Somente para o HLA-B, o *locus* mais polimórfico do genoma humano, já foram publicados e depositados mais de 2.000 alelos no banco de dados internacional *IMGT/HLA Sequence Database*. Para o *locus* HLA-A e HLA-DR, mais de 1.500 e 850 novos alelos, respectivamente, já foram descritos na população mundial.

Atualmente, vários estudos têm mostrado que moléculas não HLA denominadas MIC-A, também codificadas no CPH e relacionadas com a cadeia  $\alpha$  do MHC de classe I, também têm relevância e exercem impacto na sobrevivência e exercem impacto na sobrevivência do transplante renal, em longo prazo. As moléculas MIC-A são antigênicas e podem ser alvo da resposta imune com produção de aloanticorpos que têm importante papel na rejeição do enxerto. Esses antígenos são expressos na superfície das células endoteliais, células dendríticas, fibroblastos e macrófagos, mas não nos linfócitos do sangue periférico. Os genes que codificam os antígenos MIC-A são polimórficos e mais de 70 alelos já foram descritos. Os produtos gênicos têm participação na vigilância imunológica do organismo e na indu-

Tabela 3.1. Transmissão haplotípica dos genes HLA em uma família.

Pai	Haplótipos	Mãe	Haplótipos
A3, B7, DRB <sub>1</sub> *15	a	A2, B44, DRB <sub>1</sub> *07	c
A1, B8, DRB <sub>1</sub> *04	b	A29, B53, DRB <sub>1</sub> *09	d
Genótipos dos Filhos			
F1 – A3, 2; B7, 44; DRB <sub>1</sub> *15, 07		a/c	
F2 – A3, 29; B7, 53; DRB <sub>1</sub> *15, 09		a/d	
F3 – A1, 2; B8, 44; DRB <sub>1</sub> *04, 07		b/c	
F4 – A1, 29; B8, 53; DRB <sub>1</sub> *04, 09		b/d	
F5 – A1, 29; B8, 44; DRB <sub>1</sub> *04, 07		b/d,c*	

\*Recombinação gênica.

ção de ampla resposta imune do tipo Th2, com grande produção de anticorpos detectados no pré-operatório e após o transplante renal. Os aloanticorpos antiMIC-A fixam complemento e matam as células do enxerto. Eles foram associados à diminuição da sobrevida, a longo prazo, do enxerto renal, com a patogênese da rejeição e consequente falha do enxerto (Mizutani, 2006; Opelz, 2007).

## HERANÇA GÊNICA

A constituição alélica de um cromossomo é denominada haplótipo. Cada indivíduo diploide (2n) possui, portanto, dois haplótipos do CPH recebidos, via gameta, de cada um dos genitores. Os dois haplótipos definirão a especificidade dos dois alelos HLA para cada *locus*, portanto, o genótipo HLA dos indivíduos. Devido à proximidade dos *loci* HLA no CPH, os haplótipos são trans-

mitidos quase sempre inalterados de uma geração para outra (Tab. 3.1). Na recombinação gênica, haverá transferência de parte de um haplótipo a outro nos eventos de *crossing over*, explicando a maior ou a menor semelhança, do que os habituais 50%, entre irmãos ou gêmeos não univitelinos.

## SOLICITAÇÃO DE EXAMES PARA TRANSPLANTE

Alguns testes específicos devem ser realizados tanto para o doador quanto para o receptor na avaliação imunológica pré-transplante. Assim, são essenciais os seguintes exames:

- Tipificação do grupo sanguíneo ABO;
- Tipificação HLA do par doador receptor;
- Prova cruzada ou *crossmatch*;
- PRA.

Todos os pacientes em preparo para



transplante de órgãos sólidos (rim, pâncreas, fígado, pulmão e coração) devem ser avaliados pelo PRA e pela tipificação HLA-A, -B e -DRB1. A prova cruzada é realizada quando os receptores ao transplante encontram um doador compatível, vivo ou falecido. Os pacientes em preparo para transplante de medula óssea também são tipificados para os *loci* HLA-A, -B e -DRB1, além do *locus* HLA-DQB1. A tipificação HLA para o par receptor-doador é realizada em média e alta resolução (nível alélico) para esse tipo de transplante.

Nas avaliações para transplante renal com doador vivo são solicitados a tipificação dos *loci* HLA-A, -B e -DRB1 dos receptores e respectivos doadores e o PRA dos receptores. Após a seleção do doador, realiza-se a prova cruzada. No transplante de medula óssea, o receptor e os doadores são tipificados, inicialmente, para os *loci* HLA-A, -B, -DRB1 e -DQB1 em média resolução. Quando um doador compatível é encontrado para o receptor de medula óssea, os *loci*

de classe II (DRB1 e DQB1) são tipificados em alta resolução.

## TIPIFICAÇÃO HLA

Os antígenos HLA de classe I expressam-se nas membranas de todas as células nucleadas do organismo. As células utilizadas nos exames pré-transplantes são os linfócitos T e B. Os antígenos HLA classe II são expressos, em níveis elevados, na superfície de células apresentadoras de antígenos (linfócitos B, macrófagos e células dendríticas) (Tab. 3.2).

Para a tipificação HLA, podem ser utilizados o método sorológico, que emprega anticorpos monoclonais para o reconhecimento de cada antígeno, e o método de biologia molecular, que usa o DNA genômico extraído dos leucócitos. A sorologia tem sido tradicionalmente utilizada para a tipificação HLA pela técnica de microlinfocitotoxicidade, pois os antígenos expressos

Tabela 3.2. Distribuição dos antígenos HLA nos linfócitos T, B e plaquetas e líquidos do corpo.

Antígenos	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup>	Linfócitos B CD25 <sup>+</sup>	Plaquetas	Plasma, saliva e lágrima
Classe I				
HLA-A, -B, -C	++	+++	+++	+
Classe II				
HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1	+*	++++	-	+

\* Os LTs podem expressar HLA de classe II quando estão ativados (JANEWAY; TRAVERS, 2006).

na superfície dos linfócitos são reconhecidos por anticorpos monoclonais específicos para cada molécula HLA. Esse método tem sido gradativamente substituído devido à dificuldade de padronização de anticorpos anti-HLA e reagentes para os testes, além de resultados duvidosos e pouco específicos. Estudos comparados entre os dois métodos têm demonstrado a superioridade do método molecular sobre o sorológico. A compatibilidade HLA entre receptor-doador aumenta o sucesso dos

transplantes em geral e, principalmente, os de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). O TCTH com doador não relacionado está associado a aumento das taxas de complicações pós-transplante. Tem-se mostrado que os métodos de tipificação utilizando DNA genômico fornecem melhor resolução da compatibilidade HLA e tem melhorado os resultados dos transplantes. As especificidades HLA detectadas pela sorologia estão representadas na Tabela 3.3.

A utilização da biologia molecular

Tabela 3.3. Especificidades HLA estabelecidas pelo método sorológico.

A	B	B	C	DR	DQ	DP
A1	B5	B50(21)	Cw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B51(5)	Cw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B5102	Cw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B5103	Cw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B52(5)	Cw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B53	Cw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B54(22)	Cw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B55(22)	Cw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B56(22)	Cw9(w3)	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B57(17)	Cw10(w3)	DR9		
A24(9)	B18	B58(17)	Cw11	DR10		
A2403	B21	B59		DR11(5)		
A25(10)	B22	B60(40)		DR12(5)		
A26 (10)	B27	B61(40)		DR13(6)		
A28	B2708	B62(15)		DR14(6)		
A29(19)	B35	B63(15)		DR1403		
A30(19)	B37	B64(14)		DR1404		
A31(19)	B38(16)	B65(14)		DR15(2)		
A32(19)	B39(16)	B67		DR16(2)		
A33(19)	B3901	B70		DR17(3)		
A34(10)	B3902	B71(70)		DR18(3)		
A36	B40	B72(70)		DR51		
A43	B4005	B73		DR52		
A66(10)	B41	B75(15)		DR53		
A68(28)	B42	B76(15)				
A69(28)	B44(12)	B77(15)				
A74(19)	B45(12)	B7801				
A80	B46	B81				
	B47	Bw4				
	B48	Bw6				
	B49(21)					

para tipificação dos *loci* HLA foi descrita inicialmente na década de 80 utilizando a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Opelz *et al.* (1993) referiram que a sobrevida do enxerto em transplante renal com compatibilidade HLA-DR, -DQ, analisada pela técnica RFLP, aumentava em relação à compatibilidade estabelecida por sorologia. Nos últimos 10 anos, várias técnicas têm sido desenvolvidas e amplamente utilizadas, como:

- a) PCR-SSP (reação em cadeia da polimerase por iniciadores com sequências específicas);
- b) PCR-SSOP (reação em cadeia da polimerase por iniciadores e a utilização de sondas de oligonucleotídeos com sequências específicas);
- c) PCR-SBT (tipificação por sequenciamento de nucleotídeos na fita de DNA);
- d) PCR-RSCA (*Reference Strand-mediated Conformational Analysis*).

As regiões polimórficas dos genes HLA de classe I e II são amplificadas a partir do DNA genômico por meio da técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), usando *primers* que anelam nas terminações 5' e 3' das regiões flanqueadoras do DNA que são conservadas entre os indivíduos.

Por ser um método mais robusto, o PCR-SSOP é mais utilizado na rotina dos laboratórios de histocompatibilidade. Trata-se de hibridização em fase

sólida do produto amplificado com sondas de alelos HLA. Estas sondas são fixadas na superfície de microesferas codificadas por cores. Após as reações de hibridização, segue a etapa final de marcação com estreptavidina conjugada com ficoeritrina. Os dados das reações de fluorescência são adquiridos pelo citômetro de fluxo LABScan 100™, o qual emprega a tecnologia conhecida como Luminex. As análises dos dados brutos de fluorescência são realizadas por um *software* específico que determina os genótipos. A tipificação HLA pela técnica PCR-SSOP baseia-se na detecção simultânea de múltiplos polimorfismos HLA. Este método não envolve o sequenciamento de genes HLA, mas, em vez disso, baseia-se na genotipagem de diversas regiões polimórficas dentro dos genes HLA. Cada variante dentro de uma região polimórfica é definida pela combinação de nucleotídeos e é referida como uma sequência motivo. A combinação de sequências motivos presentes é usada para determinar o par de alelos de um indivíduo.

O método SBT fornece uma tipificação HLA de mais resolução comparada com os outros métodos. Além disso, é importante para o descobrimento de alelos novos e tem contribuído para melhorar os resultados dos transplantes de órgãos, principalmente o de medula óssea. O SBT constitui-se de um método potente para definir alelos novos e,



portanto, dados fornecidos por esta técnica são extremamente confiáveis, reprodutíveis e fidedignos.

Em resumida abordagem da técnica SBT, pode-se relatar que ela consiste nos seguintes passos:

- a) Isolamento do DNA – deve-se usar um protocolo que forneça DNA de boa qualidade e permita eficiente e robusta amplificação;
- b) Amplificação específica do *locus* HLA;
- c) Amplificação das fitas de DNA em duas direções *forward* e *reverse*;
- d) Purificação do amplicon;
- e) Purificação do produto de sequenciamento;
- f) Sequenciamento automático do fragmento amplificado no sequenciador automatizado;
- g) Análise da sequência de bases.

A coleta de dados é feita no sequenciador automático operado por um *software* específico. Na etapa seguinte, outro *software* compara a sequência HLA observada na amostra com todas as combinações alélicas teóricas possíveis previamente estabelecidas, garantindo alta precisão na identificação dos genótipos. Além disso, a identificação de uma sequência completa de DNA incluindo tanto regiões conservadas quanto polimórficas permite a identificação direta de novos alelos.

O termo “baixa resolução” define os antígenos codificados por determinado

*locus* e equivale ao método sorológico; e o termo “alta resolução” define os alelos de determinado grupo de antígenos. A tipificação HLA de alta resolução é imprescindível no transplante de medula óssea.

O grande polimorfismo genético observado nos *loci* HLA é consequência das variações nas sequências de nucleotídeos dos alelos e tem sido intensamente estudado com o advento da biologia molecular (Tab. 3.4).

Tabela 3.4. Quantidade de alelos HLA de acordo com *IMGT/HLA Sequence Database*.

2011	
Locus	Quantidade de Alelos
HLA-A	1.519
HLA-B	2.069
HLA-C	1.016
HLA-DRB1	873
HLA-DQB1	144
MIC-A	73

IMGT: IMunoGeneTic. Banco de dados das sequências HLA.

Em 1987, foi implantada a nomenclatura que convencionou usar quatro dígitos para definir alelos (Tab. 3.5). Os dois primeiros dígitos correspondem à sorologia (antígeno) e os dois posteriores definem o alelo. Em 1990, um quinto dígito foi adicionado nas sequências para representar uma substituição silenciosa que não modifica a sequência das proteínas. O sufixo N indica a não expressão do alelo (alelo nulo).

Os laboratórios utilizam mais de um método para tipificação HLA e a sua

Tabela 3.5. Nomenclatura dos alelos HLA.

Nomenclatura	Descrição
HLA	Região HLA
HLA-DRB1*	Lócus HLA-DRB1
HLA-DRB1*13	Grupo de alelos que codificam o antígeno DR13
HLA-DRB1*13:01	Um alelo HLA específico
HLA-DRB1*13:01:02	Um alelo que difere por uma mutação sinônima
HLA-DRB1*13:01N	Alelo nulo

escolha depende de custo, complexidade dos aparelhos, automação, precisão, demanda de exames e da urgência de resultados.

## EFEITO DO HLA NO TRANSPLANTE

O primeiro transplante renal com êxito foi realizado entre gêmeos univitelinos em 1958, demonstrando a importância dos estudos de histocompatibilidade na evolução e sobrevida do enxerto. Subsequentemente, com o avanço no tratamento imunossupressor e nos testes de histocompatibilidade, aumentou-se a taxa de sucesso nos transplantes. No transplante renal, quanto mais compatibilidade HLA entre receptor-doador, melhor a sobrevida do enxerto, especialmente no primeiro ano de transplante.

Os alelos HLA são expressos codominantemente e, por isso, na tipificação dos *lóci* HLA-A, -B e -DRB1 podem-se observar zero a seis similaridades (*matches* HLA) no CPH entre o doador e o receptor. Seis *matches* são preditivos de

melhor sobrevida do enxerto e quanto mais baixo o número de *matches*, mais drasticamente a taxa de sobrevida pode cair. Speiser *et al.* (1990) concluíram que incompatibilidade alélica de classe I e/ou II entre receptor e doador não aparentado de transplantes de medula óssea aumenta as complicações e a morbidade pós-transplante.

Os métodos de tipificação HLA de classe I e II baseados no DNA são relativamente simples, rápidos, altamente informativos e automatizados e podem ser realizados em níveis de resolução intermediária ou alelo específico. Para transplantes de órgãos sólidos, estudos indicam que o grau de compatibilidade HLA, em termos de número de incompatibilidade de antígenos HLA-A, -B e -DRB1, afeta significativamente a sobrevida do enxerto renal, tanto com doador vivo, relacionado ou não, quanto com doador falecido, mesmo utilizando os mais recentes protocolos de imunossupressão. Para o transplante de medula óssea, no qual a tipificação HLA é feita no nível alélico, a compatibilidade HLA entre o par receptor-doador é decisiva



para o transplante. É provável que o efeito da incompatibilidade nestes vários resultados clínicos dependerá de alelos HLA específicos que diferem entre o doador e o receptor. O aumento da utilização da tipificação HLA baseada no DNA auxiliará na definição das “regras” que governam os resultados clínicos das incompatibilidades HLA transplantadas e permitirá a identificação de incompatibilidades “aceitáveis” ou toleradas no transplante renal.

No Brasil, o Sistema Nacional de Transplantes (SNT) representa o setor do Ministério da Saúde responsável pela regulamentação da captação e distribuição de órgãos de doadores falecidos nos estados federativos por listas ativas de receptores. No transplante renal, por exemplo, o melhor receptor é selecionado automaticamente pela compatibilidade HLA utilizando-se o critério de pontuação, que valoriza os *loci* HLA-DRB1, -B, -A, respectivamente. Em seguida, os receptores selecionados são submetidos aos exames de provas cruzadas.

## PROVA CRUZADA

Os aloanticorpos são sintetizados após estímulos por aloantígenos HLA durante a gestação, transfusões sanguíneas, pelo órgão transplantado ou por ativação policlonal inespecífica. A produção de anticorpos anti-HLA dependerá do tempo de exposição, da carga

antigênica do estímulo, da disparidade ou incompatibilidade HLA e do estado imunológico do paciente. Os efeitos deletérios desses anticorpos causadores de rejeições estão demonstrados nos transplantes renais, pancreáticos e cardíacos. Para esses transplantes, o PRA constitui-se em procedimento obrigatório pré-transplante. No transplante de coração e pulmão, a prova cruzada pode ser feita no pré-transplante para receptores com PRA positivo.

A linfocitotoxicidade dependente de complemento (CDC) é a técnica empregada nos exames de provas cruzadas, que usa na sua execução linfócitos vivos de doadores e soros de receptores para detectar aloanticorpos anti-HLA clinicamente relevantes (Patel & Terasaki, 1968). Esses autores há mais de 40 anos demonstraram que pacientes transplantados com aloanticorpos anti-HLA pré-formados apresentavam elevados riscos de rejeição. Assim, a prova cruzada detecta a presença de aloanticorpos anti-HLA pré-formados que podem se ligar ao órgão transplantado e causar danos imediatos e irreversíveis às células do enxerto. Esse exame pré-transplante fornece dados altamente relevantes sobre o padrão e o risco imunológico dos receptores. Portanto, podem ajudar a direcionar o tratamento imunossupressor visando prevenir a perda do enxerto pela rejeição hiperaguda.

Nesse procedimento empregam-se linfócitos isolados do sangue periférico

do doador vivo, do baço ou do linfonodo do doador falecido. O isolamento é feito usando marcadores de superfície celular específicos para anticorpos monoclonais ligados covalentemente às esferas magnéticas para a separação de linfócitos T e B. A técnica requer linfócitos viáveis para análise, tendo como fundamento a incubação do soro do receptor com os linfócitos do doador, seguido de adição de complemento de coelho. A prova cruzada será considerada positiva naqueles pacientes portadores anti-HLA, sendo visualizados ao microscópio de fluorescência os linfócitos mortos com citoplasmas corados. A prova cruzada tem sido modificada ao longo do tempo com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade.

A especificidade do exame foi aumentada significativamente por duas modificações na técnica: a) tratamento do soro com ditiotreitól (DTT) – nesse caso os anticorpos do isotipo IgM são inativados por esse agente redutor pela

clivagem das pontes de dissulfeto presentes entre a subunidades da molécula. Com o uso do DTT é possível determinar qual isotipo, IgG ou IgM, está envolvido na reação HLA-anticorpo; b) a separação dos linfócitos T e B discrimina a especificidade do anticorpo envolvido na positividade da prova cruzada, ou seja, se o anticorpo é contra HLA de classe I (LT) ou de classe II (LB) ou classe I/II. Dessa forma prática, é possível definir se a prova cruzada é positiva para linfócito T, B ou ambos.

Os aloanticorpos IgG anti-HLA geralmente são mais frequentes e os autoanticorpos são do isotipo IgM. Os autoanticorpos estão presentes principalmente em pacientes portadores de doenças autoimunes, tais como: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, etc. Eles são citotóxicos para linfócitos do próprio paciente quando incubados *in vitro* na presença de complemento (Tab. 3.6).

Tabela 3.6. Característica dos anticorpos linfocitotóxicos.

Anticorpos antiLB	Autoanticorpos
Alta afinidade para antígenos de classe II (HLA-DR ou DQ)	Predominante IgM (IgG raro) Reconhece LB e LT ou somente LB
Baixa afinidade para classe I (HLA A ou B)	Reage positivamente com todos doadores. Mais reativo a 4°C Não reage com linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica
Podem ser Ac anti-HLA ou autoAc (linfocitotóxico). Podem não ser autoAc ou não reagirem com antígeno HLA	Não está envolvido com rejeição Não é conhecida a especificidade

Ac: Anticorpo; LB: Linfócito B; LT: Linfócito T.



Estima-se que estes autoanticorpos estejam presentes em pelo menos 10% dos pacientes renais crônicos à espera de transplante. A identificação desses pacientes tem grande valor, evitando resultado falso-positivo. Portanto, a autoprova cruzada estará indicada para todos os pacientes com prova cruzada positiva, a qual se torna negativa no soro tratado com DTT. Se confirmada a existência de apenas autoanticorpo, o transplante estará indicado, pois esses autoanticorpos não são deletérios ao enxerto.

A sensibilidade do exame pode ser aumentada por algumas modificações na técnica, tais como:

- a) Prolongando o tempo de incubação dos linfócitos do doador com soro do receptor ou na etapa de incubação com as proteínas do sistema complemento;
- b) Utilização da anti-imunoglobulina humana (AGH) – é um anticorpo secundário que se liga a um anticorpo previamente fixado ao antígeno do linfócito e fornece ao complemento maior número de sítios de ligação e pode, portanto, aumentar a força da reação. A AGH aumenta a sensibilidade da prova cruzada, porque permite detectar baixos títulos de aloanticorpos anti-HLA e, com isso, reduzir os resultados falso-negativos;
- c) Uso de soro histórico com anti-

corpos anti-HLA caracterizados e que sejam criopreservados em até 18 meses.

A prova cruzada com resultado negativo com soro atual e positivo com soro histórico constitui-se contraindicação para o transplante devido à memória imunológica e subsequente rejeição mediada pelos anticorpos.

A prova cruzada por CDC tem baixa sensibilidade (84%) (Limaye S, 2009). Assim, a prova cruzada pelo método de citometria de fluxo (CF) é mais sensível (94%). Ela foi introduzida há pelo menos 20 anos e tem sido indicada para pacientes sensibilizados com risco imunológico médio e alto para rejeição, por apresentarem aloanticorpos anti-HLA do doador (DSA). Resultado positivo de prova cruzada por CF está associado à evolução ruim no pós-transplante, incluindo aumento no risco de rejeições e diminuição da função do enxerto. Além disso, a utilização, no pré-transplante da CF nos grupos de pacientes descritos, tem levado à melhor evolução do enxerto em longo prazo. Vários estudos estão sendo conduzidos visando melhor padronização da CF nas avaliações imunológicas de rotina nos transplantes de órgãos e tecidos.

A grande vantagem dessas inovações para aumentar a sensibilidade do teste visa a evitar as rejeições hiperaguda e aguda no pós-transplante. Essas rejeições, quando acontecem, geralmente

estão relacionadas a antígenos não pertencentes ao sistema HLA. O principal deles é o MIC-A, que será abordado mais adiante neste capítulo. Os anticorpos pré-formados ou a serem formados após o transplante reagem com os antígenos do endotélio renal, causando as rejeições hiperagudas HLA independentes. Alguns aspectos clínicos relevantes envolvendo a prova cruzada são apresentados na Tabela 3.7.

## PROVA CRUZADA VIRTUAL

A prova cruzada virtual (PCV) tem como objetivo detectar AloAc pré-formados no receptor contra os antígenos HLA de determinado doador. Assim, pode-se teoricamente dizer que se o receptor não tem anticorpos anti-HLA ele não apresentará PCV positiva. Os pré-requisitos para a PCV virtual são fazer:

Tabela 3.7. Interpretação dos aloanticorpos anti-HLA clinicamente relevantes detectados na prova cruzada pré-transplante renal.

Microinfocitotoxicidade		Citometria de fluxo		Interpretação	Risco
Linfócito T	Linfócito B	Linfócito T	Linfócito B		
Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	IgG anticlasse I. Também pode conter IgG anticlasse II	Alto risco de rejeição hiperaguda – Tx contraindicado
Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Anticorpos anticlasse I. Ausência de anticorpos anticlasse II	Rejeição hiperaguda Tx contraindicado
Negativa	Positiva	Positiva	Positiva	Anticorpos anticlasse I. Anticorpos anticlasse II. Grupo de risco Receptores sensibilizados ou em retransplante	Rejeição hiperaguda, aguda acelerada e rejeição aguda Tx contraindicado
Negativa	Negativa	Positiva	Positiva	Baixo título de Ac anticlasse I. Também pode conter IgG anticlasse II	Rejeição aguda acelerada e rejeição aguda – Tx contraindicado
Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Anticorpo anticlasse II e/ou baixíssimo título de classe I Risco aumentado de rejeição-aguda em candidatos sensibilizados ou em retransplantes	Rejeição hiperaguda. Risco aumentado de rejeição aguda em candidatos sensibilizados ou em retransplantes Tx contraindicado
Negativa ou positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Anticorpo IgM. Possível baixo título de IgM anticlasse I detectado no início de um evento de sensibilização antes da troca de classe para IgG	Baixo risco. Possível aumento da incidência de episódios de rejeição aguda – Tx contraindicado
Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Nenhum anticorpo anti-HLA detectado	Possível ausência de risco para o transplante – Tx indicado

Tx: Transplante.



- a) Tipificação HLA do receptor;
- b) PRA específico atualizado do receptor (MG-Tx);
- c) Tipificação HLA do doador;
- d) Comparar a especificidade dos AloAc do receptor com os HLAs do doador.

Entretanto, seria muito difícil conhecer por completo os eventos prévios de sensibilizações de um paciente, pois as informações podem ser falsas, principalmente se ele foi referenciado com a documentação incompleta para um centro transplantador.

A PCV pode, também, ser definida como a habilidade de prever o resultado da PC com base na comparação das especificidades dos anticorpos anti-HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP do receptor detectadas pelo PRA específico com os resultados das tipificações HLA do doador. Para tirar proveito da PCV, os Centros Transplantadores devem selecionar grupos de receptores bem estudados imunologicamente e com alto risco imunológico de desenvolver rejeição para se praticar a PCV e omitir a PC no pré-transplante. Assim, essa metodologia é recomendada para os transplantes de pâncreas, pulmão, coração e para receptores de órgãos de doadores falecidos com critérios expandidos, por apresentar forte impacto no aumento do número desses transplantes devido à redução do tempo de isquemia fria do enxerto e contribuir para a boa evolução (*follow up*) na sobrevida dos transplantes.

## PRA – REATIVIDADE DE ANTICORPOS CONTRA PAINEL DE ANTÍGENOS HLA

Nos Laboratórios de Imunologia de Transplantes, o PRA é um exame obrigatório realizado no soro de todos os receptores de transplante com órgãos sólidos, principalmente no transplante renal. Ele avalia os níveis de aloanticorpos anti-HLA no sangue do receptor, demonstrando seu grau de sensibilização e a especificidade desses anticorpos, cujos resultados são fundamentais na conduta clínica para evitar as rejeições hiperaguda e aguda do enxerto.

Historicamente, o PRA era realizado usando-se o teste de linfocitotoxicidade dependente de complemento (CDC). O soro do receptor era analisado contra um painel de linfócitos T e/ou B com amplo repertório de antígenos HLA. Sua sensibilidade era aumentada pela adição de anti-imunoglobulina humana (AGH) e a especificidade do anticorpo era determinada pelo tratamento do soro com DTT. O resultado era representado em porcentagem calculada pelo número de reações positivas em relação ao total de células do painel. Entretanto, esse método apresentava algumas desvantagens:

- a) Uso de linfócitos viáveis;
- b) Número mínimo de 50 células de indivíduos não aparentados com HLA diferentes;
- c) Longo tempo para liberação dos resultados;

- d) Dificuldade de padronização de reagentes;
- e) Baixa reprodutibilidade e dificuldade para manter um repertório de antígenos que pudesse representar a composição étnica da população da região.

Assim, devido a todas essas dificuldades relatadas, duas técnicas foram introduzidas para substituir o teste de PRA por CDC. O primeiro método, denominado ELISA (“*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”), utiliza antígenos HLA purificados para substituir os linfócitos vivos. Os antígenos HLA são fixados a uma superfície sólida como alvos para a ligação dos anticorpos presentes no soro dos receptores. A leitura dos resultados é feita em leitor óptico. O segundo método denominado *LabScreen* é usado atualmente na rotina dos laboratórios. Emprega a citometria de fluxo no aparelho LABScan100™ (Luminex, USA) para coleta de dados, que são analisados no programa de computador *HLA-Fusion* (OneLambda, USA). Essa tecnologia utiliza microesferas fluorescentes cobertas com epítomos de antígenos HLA classe I e II e MIC-A purificados (OneLambda, USA). Em resumo, as microesferas são incubadas com o soro do receptor, sendo usado um anticorpo secundário anti-IgG humana fluorescente para detecção da reação. Os soros são pesquisados inicial-

mente para determinar a presença de anticorpos anti-HLA de classe I, classe II e MIC-A. Posteriormente, os anticorpos dos soros positivos são caracterizados para se obter a especificidade dos antígenos HLA. Empregando essa metodologia, tornou-se possível, também, identificar antígenos não HLA, como o MIC-A. Usando esse método demonstrou-se que pacientes que desenvolvem anticorpos anti-HLA de classe I, II e MIC-A têm risco bastante aumentado de rejeitar o enxerto em relação aos pacientes que não desenvolvem esses anticorpos. Então, o monitoramento pré e pós-transplante desses anticorpos podem não somente ser preditivos de falha no transplante renal, mas também funcionar como um importante marcador prognóstico de boa evolução e sobrevida do enxerto (Arundhati Panigrahi, 2007).

Esses métodos são mais sensíveis e específicos para detectar o isotipo IgG e o IgM e diferenciar anticorpos anti-HLA de classe I e II. Eles apresentam inúmeras vantagens em relação ao PRA por microlinfocitoxidade, tais como:

- a) Fácil execução;
- b) Boa reprodutibilidade de resultados;
- c) Liberação rápida de resultados;
- d) Não requerem o uso de linfócitos vivos.

A metodologia de *LabScreen* tem sido rotineiramente usada para *scree-*



ning rápido dos soros dos pacientes à espera de transplantes.

A importância dos anticorpos anti-HLA foi demonstrada por centenas de publicações nas quais os anticorpos sempre apareceram antes das rejeições. Eles causam rejeições renais hiperagudas e permitem o depósito de C4d no tecido renal com rejeição precoce, sendo usado como indicador de rejeição aguda. Os aloanticorpos estavam presentes em 96% de 926 pacientes com rejeição renal (Mizutani *et al.*, 2006). Em 33 estudos eles estavam associados às rejeições crônicas do rim, coração, pulmão e fígado (Terasaki, 2003).

A avaliação semestral dos anticorpos anti-HLA para os pacientes de lista de espera ao transplante renal nas CNCDOs estatuais é regulamentada pela Portaria 1.314 do SUS/Ministério da Saúde. O PRA, rotineiramente realizado duas vezes por ano, poderá ser, também, feito por meio de pedido médico com justificativa, um mês após o receptor ter sido submetido à transfusão sanguínea. Este monitoramento tem sido de grande utilidade às equipes médicas transplantadoras, pois o protocolo de tratamento com drogas imunossupressoras pode ser alterado de acordo com os resultados do PRA dos pacientes. Com base nos resultados de PRA, provisoriamente, os pacientes são classificados em baixo (< 10%), médio-baixo (< 30%), médio (< 50%),

médio-alto (< 80%) e alto respondedor (> 80%). Em geral, o PRA do receptor pode aumentar devido a qualquer estímulo antigênico por transfusões recebidas durante o período de espera na lista para transplante.

Os receptores podem ser classificados de acordo com o risco imunológico de apresentar rejeição, como:

- a) Baixo risco: não sensibilizados;
- b) Médio risco: sensibilizados, retransplante, sem DAS;
- c) Alto risco: sensibilizados com DAS (Gebel *et al.*, 2003).

Entre as importâncias clínicas do PRA podem ser citadas:

- a) Como indicador para individualizar a prescrição de imunossupressão;
- b) Indicador de aumento da resposta imune do receptor antes do transplante;
- c) PRA elevado prediz alto risco de rejeição aguda precoce;
- d) Monitoramento eficiente da resposta imune por anticorpos do receptor;
- e) Caracterização prévia dos anticorpos no soro do receptor pode evitar PC falso-positiva;
- f) Determina a especificidade dos anticorpos aos antígenos HLA;
- g) Indica quais antígenos HLA devem ser evitados no doador;
- h) Positividade para antígenos HLA de classe I e II indica risco de re-

jeição para o transplante, mesmo com PC negativa pré-transplante;

i) Positividade para HLA de classe I, II e MIC-A indica alto risco de rejeição, mesmo com PC negativa no pré-transplante.

Atualmente, o PRA tem sido realizado, também, no pós-transplante. O objetivo dessa prática é o monitoramento subclínico da rejeição do enxerto e consequente orientação da conduta médica quanto ao protocolo de imunossupressão utilizado em pacientes nos quais são verificados aumento da positividade do PRA pós-transplante. Os resultados do PRA no pós-transplante também poderão prevenir o emprego de método evasivo, como a biópsia, que é o método padrão-ouro para o diagnóstico de rejeição.

## RESPOSTA IMUNE

Os anticorpos reconhecem os antígenos em suas mais variadas formas, como nas estruturas primárias, secundárias ou terciárias. O reconhecimento pelos linfócitos ocorre somente se o antígeno for apresentado na forma linear e associado ao CPH na superfície de células apresentadoras de antígenos (CAA). Esse fenômeno foi denominado restrição imunológica.

A ativação de linfócitos se faz pela interação química de receptores de

membranas, a partir dos quais são gerados sinais que são decodificados pela célula imunocompetente. O primeiro sinal na ativação de LT é iniciado pela interação entre o TcR (receptor de LT) e o antígeno específico ligado ao CPH da CAA. Em geral, os peptídeos que são apresentados associados ao CPH de classe I são derivados de moléculas endógenas produzidas dentro da CAA, proteínas da própria célula ou moléculas de vírus que infectam as CAA. Em contraste, o CPH de classe II apresenta peptídeos derivados de proteínas endocitadas, processadas e apresentadas pelas CAA.

Nessa interação, o complexo CPH-antígeno-TcR é estabilizado pela interação adicional de outras moléculas. Para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a molécula CD4 liga-se em um sítio não polimórfico sobre o domínio beta2 do HLA de classe II envolvido no complexo CPH-antígeno-TcR. Para o LT CD8<sup>+</sup> a molécula CD8 interage de modo similar, mas com o domínio  $\alpha$ 3 do CPH de classe I da célula-alvo.

Na interação entre LT e as células-alvo, as moléculas CD4 e CD8 são envolvidas no sinal de transdução (leitura da informação), como descrito a seguir: as ligações do LT e célula-alvo ficam aumentadas pela interação do CD2 com molécula LFA-1 (CD58/fator de aderência de linfócito) sobre a célula-alvo, pela aderência de outro LFA-1 (CD11a/



CD18) ao ICAM-1 (CD54/molécula de adesão intercelular) e ICAM-2. Essa interação é bidirecional, desde que LFA-1, ICAM-1 e ICAM-2 estejam presentes em ambos, ou seja, no LT e na sua célula-alvo.

A interação entre o LT e a CAA é aumentada pela ligação do CD28 sobre o LT com antígeno B7 (ex. restrito para LB). O mais interessante é que estas moléculas (CD2, CD4, CD8, CD28, CPH de classe I, CPH de classe II, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2) são membros da superfamília das imunoglobulinas e tal diversidade molecular, provavelmente, apresenta adaptações evolutivas, que permitem ampliar a resposta imune. A expressão da maioria dessas moléculas de adesão sobre o LT e suas células-alvo é regulada pela ativação dos LTs. O contato do complexo CD3/TcR com o CPH-antígeno é necessário, mas não suficiente para ativar uma resposta imune. Todos os LTs requerem um segundo sinal, embora a natureza exata desse sinal difira de acordo com a função do LT respondedor.

Os linfócitos podem ser divididos em duas populações funcionais:

- LT CD4<sup>+</sup> – esses linfócitos respondem a antígenos (Ag) exógenos associado ao CPH de classe II pelas CAA, como células dendríticas, macrófagos ou LB. Os linfócitos CD4<sup>+</sup> foram divididos nas seguintes subpopulações:

- a) Th1 – secreta IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF (fator de estimulação de células – granulócitos e monócitos), TNF- $\alpha$  e IL-3, sendo o INF- $\gamma$  a citocina marcadora molecular específica. Esse linfócito é responsável pela imunidade celular e hipersensibilidade tardia;
  - b) Th2 – secreta as IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31, IL-33, GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-3. A IL-4 ou IL-5 é o marcador molecular específico. Ele está envolvido na imunidade humoral, nas alergias e na resposta imune à infecção por parasitas;
  - c) LTreg – secreta IL-10, TGF- $\beta$  e FoxP3 (“*Factor forkhead box P3*”). O marcador específico é o FoxP3. Tem atividade imunorreguladora da resposta imune, na tolerância, na imunossupressão e na prevenção de doenças autoimune;
  - d) Th17 – célula descoberta recentemente que secreta IL-17, IL17A, IL17<sup>a</sup>/F, IL-10, IL-21, IL-22 e IL-26. Tem como molécula marcadora específica a IL-17. Esse linfócito está envolvido na resposta pró-inflamatória, na promoção das doenças autoimunes, na proteção contra bactérias, fungos e possivelmente contra parasitas.
- LT CD8<sup>+</sup> – secreta as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , além de perforina, granzima e granulisina. Essas

moléculas atuam nas células-alvo. Esse linfócito tem atividade efetora por se ligar e lisar células-alvo, como nas células do enxerto. A maioria dos linfócitos CD8<sup>+</sup> reconhece antígenos endógenos associados ao CPH de classe I presentes nas células nucleadas (Tab. 3.8).

Em qualquer das funções do LT, o segundo sinal é dado por uma ou mais interleucina (IL). Os efeitos combinados do sinal 1 (via TcR/CD3) e do sinal 2 (via IL-1, a qual é secretada pela CAA) permitem a ativação do Th, resultando em duas respostas principais:

a) Proliferação para gerar clones de Th com especificidade dada pelo complexo Ag/CPH e/ou maturação dos clones Th;

b) Geração de clones Th de memória para iniciar uma resposta imune secundária contra um antígeno específico.

Outras citocinas, como: IL-6 e TNF, podem, também, atuar como segundo sinal e afetar qualitativamente a evolução da ativação de linfócitos.

O LTCD8<sup>+</sup>, também, requer dois sinais principais. O sinal 1 compreende a interação entre TcR e Ag/CPH sobre a célula-alvo, o sinal 2 é dado pela IL-2 produzida pelo ThCD4<sup>+</sup> ou pela associação de outras citocinas, como: IL-4; IL-6 e IFN- $\gamma$ . Isso permite sua proliferação e maturação.

As citocinas não somente regulam a amplitude da resposta imunológica, como também influenciam a sua evolu-

Tabela 3.8. Populações e subpopulações de linfócitos envolvidos na resposta imune celular.

População	Subpopulação	Citocinas	Citocina marcadora	Funções
CD4+	Th1	IL-2, IL-3, INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF, TNF- $\gamma$	INF- $\gamma$	Imunidade celular, hipersensibilidade tardia.
	Th2	IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31, IL-33, GM-CSF, TNF- $\gamma$ , IL-3	IL-4 ou IL-5	Imunidade humoral, alergia, resposta imune à infecção por parasitas.
	Treg	IL-10, TGF- $\beta$ , FOX P3	FOXP3	Atividade imunorreguladora, tolerância, imunossupressão, prevenção de doença autoimune.
	Th17	IL-17, IL-10, IL-21, IL-21, IL-22, IL-26.	IL-17	Resposta pro-inflamatória, promoção doença autoimune, proteção contra bactéria e fungos.
CD8+		IFN- $\gamma$ , TNF-, TNF- $\beta$	Granzima	Lise celular
		Perforina, granzima, granulísina.	Perforina	

ção para resistência ou susceptibilidade a infecções. Isto tem sido demonstrado claramente em modelos experimentais com doenças autoimunes, provando que a estimulação crônica na doença GvH (*Graft versus Host*) ou na HvG (*Host versus Graft*) leva a sintomas típicos de lúpus eritematoso sistêmico com envolvimento marcante de IL-4 e IL-5 e reduzida produção de IL-2 e IFN-g. Isso levou os pesquisadores a suspeitarem da existência de duas subpopulações de células, ou seja, os linfócitos Th1 e Th2 citadas. Todos esses mecanismos de ativação e regulação da resposta imune podem estar envolvidos na rejeição de

um órgão ou tecido transplantado com dois mecanismos de interações entre receptores de linfócitos e aloantígenos por duas vias:

- a) Pela via direta;
- b) Pela via indireta.

Ambas levando ao alorreconhecimento, ou seja, na primeira os LTs do receptor reconhecem diretamente os antígenos HLA incompatíveis do doador e na segunda os LTs do receptor reconhecem os antígenos do doador processados pelas CAAs e os apresentam durante a ativação celular levando à expansão clonal e à rejeição do enxerto.

## REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lightman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3a ed. Boston: Saunders; 2000.
2. Allen RDM, Chapman JR. A Manual of Renal Transplantation. Londres: Edward Arnold; 1994. 331p.
3. Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, Margoob A, Bhowmik D, Guleria S, et al Mehra. Post Transplant Development of MIC-A and Anti-HLA Antibodies is Associated with Acute Rejection Episodes and Renal Allograft Loss. Human Immunology. 2007; 68(5):362-7.
4. Benjamini E, Leskowitz, S. Immunology – A Short Course. New York: Alan R. Liss; 1988. 390p.
5. Bidwell JL, Navarrete C. Histocompatibility Testing. 2a ed. London: Imperial College Press; 2000. 481p.
6. Cruz J, Barros RT, Sesso RCC, Neto ED, Suassuma JHR, Heilberg IP, et al. Atualidades em Nefrologia. São Paulo: Sarvier; 1994. 320p.
7. Dale MM, Foreman JC, Fan TD. Textbook of Immunopharmacology. 3a ed. Londres: Blackwell Scientific Publications; 1994. 370p.



8. Donaldson PT, Williams R. Cross-matching in liver transplantation. *Transplantation*. 1997; 63:789-794.
9. The Clinical Affairs Committee of The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Guidelines for Clinical histocompatibility practice. February. New Jersey: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics;1999.
10. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-reactive, HLA-Specific Antibodies in renal transplantation: Contraindication vs. Risk. *Am J Transplantation*. 2003; 3:1488-1500.
11. Limaye S, O’Kelly P, Harmon G, O’Neill D, Dorman AM, Walshe J, et al. Improved graft survival in highly sensitized patients undergoing renal transplantation after the introduction of a clinically validated flow cytometry crossmatch. *Transplantation* 2009; 87:1052-1056.
12. Male D, Champion B, Cooke A. *Advanced Immunology*. London: J.B. Lippincott Co; 1987. 201p.
13. Marsh SG. WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for Factors of the HLA System, Update March 2006. *Human Immunology*. 2006; 67:557.
14. Mizutani K, Terasaki PI, Remi NJ, Shih, RP, Ozawa M, Lee J. Frequency of MIC Antibody in Rejected Renal Transplant Patients without HLA Antibody. *Human Immunology*. 2006; 67:223–229.
15. Phelan DL, Mohanakumar T. New Methods for the Detection of Antibodies (Sensitization) to Human Leucocyte Antigens (HLA). *Ashi Quartely*. Fourth Quarter, 2001; 25(4):147-148.
16. Neuberger J, Adams D. *Immunology of Liver Transplantation*. London: Edward Arnold; 1993. 301p.
17. Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, Margoob A, Bhowmik D, Guleria S, et al. Post Transplant Development of MIC-A and Anti-HLA Antibodies is Associated with Acute Rejection Episodes and Renal Allograft Loss. *Human Immunology* 2007; 68:362-367.
18. Paul WE. *Fundamental Immunology*. 3a ed. New York: Raven Press; 1993. 1.381p.
19. Pidwell DJ. Interpretation of Crossmatch results. *ASHI Laboratory Manual*. New Jersey: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2000.
20. Pleszezynski MR. *Immunopharmacology of Lymphocytes*. London: Academic Press; 1994. 284p.
21. Ray JG. *NIAIO – Manual of Tissue Typing Techniques*. Maryland: NIN Publication; 1980. 251p.

22. Robinson J, Waller MJ, Parham P. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:311-4.
23. Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grunsdoschober C, Grawohl A. High resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated boné marrow transplantation. *Blood.* 1996; 87:4455-4462.
24. Thonson AW, Catto GRD. *Immunology of Renal Transplantation.* London: Edward Arnold; 1993. 284p.
25. Terasaki PI. *Clinical Transplants.* Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory; 1990. 148p.
26. Terasaki PI. Humoral Theory of transplantation. *Am J Transpl.* 2003;3:665-73.
27. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MIC-A Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *NEJM.* 2007; 357(13); 1293-1300.
28. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, et al. Detection of anti-MIC-A antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol.* 2006 Mar; 67(3):230-7.

### ANEXO III: Dados complementares sobre Sequências HLA submetidas aos bancos de dados EMBL, GenBank, e DDBJ.

Homo sapiens isolate 93334 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-A) gene, HLA-A\*80 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC433572.1

FASTA Graphics Item in clipboard

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC433572 646 bp DNA linear PRI 21-FEB-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 93334 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-A) gene, HLA-A\*80 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC433572

VERSION KC433572.1 GI:451344613

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-A allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-JAN-2013) Laboratorio IMUNOLAB Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="genomic DNA"

/isolate="93334"

/db\_xref="taxon:9606"

/sex="male"

/tissue\_type="peripheral blood"

gene <1..>646

/gene="HLA-A"

/allele="HLA-A\*80 new"

mRNA join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-A"

/allele="HLA-A\*80 new"

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

CDS join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-A"

/allele="HLA-A\*80 new"

/function="antigen presenting molecule"

/codon\_start=3

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

/protein\_id="AGF39092.1"

/db\_xref="GI:451344614"

/translation="SHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAIVGYVDDSQFVQFSDAASQRM

EPRAPWIEQEEPEYWDEETRNKHAHSQTNRANLGTLRGYYNQSEDGSHTIQIMYGCDV

GSDGRFLRGYRQDAYDGDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAARRAEQLRAYLE



```

GTCVDGLRRYLENGKETLQRT"
  exon      <1..270
            /gene="HLA-A"
            /allele="HLA-A*80 new"
            /number=2
  gap       271..370
            /estimated_length=unknown
  exon      371..>646
            /gene="HLA-A"
            /allele="HLA-A*80 new"
            /number=3
ORIGIN
  1 gctcccactc catgaggtat ttctcacat ccgtgtcccg gcccgccgc ggggagcccc
  61 gcttcatcgc agtgggctac gtggacgact cgcagttcgt gcagttcgac agcgacgccg
  121 cgagccagag gatggagccg cggcgccgt ggatagagca ggaggagccg gagtattggg
  181 acgaggagac acggaatgtg aaggcccact cacagactaa ccgagcgaac ctggggacc
  241 tgcgcggcta ctacaaccag agcgaggacg
      [gap 100 bp]   Expand Ns
  371      gttctcacac catccagata atgtatggct gcgacgtggg gtcggacggg
  421 cgcttctcc gcgggtaccg gcaggacgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
  481 gaggacctgc gctctggac cgcggcggac atggcggctc agatcaccaa gcgcaagtgg
  541 gaggcggccc gtcgggcgga gcagctgaga gcctacctgg agggcacgtg cgtggacggg
  601 ctccgcagat acctggagaa cggaaggag acgctgcagc gcacgg
//

```

Homo sapiens isolate 125904 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*07 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477770.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477770 646 bp DNA linear PRI 30-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 125904 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*07 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477770

VERSION KC477770.1 GI:443609322

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A., Vilela,B. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A., Vilela,B. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratorio IMUNOLAB Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646

/organism="Homo sapiens"

```

        /mol_type="genomic DNA"
        /isolate="125904"
        /db_xref="taxon:9606"
gene     <1..>646
        /gene="HLA-B"
        /allele="HLA-B*07 new"
mRNA     join(<1..270,371..>646)
        /gene="HLA-B"
        /allele="HLA-B*07 new"
        /product="MHC class I human leukocyte antigen"
CDS      join(<1..270,371..>646)
        /gene="HLA-B"
        /allele="HLA-B*07 new"
        /function="antigen presenting molecule"
        /codon_start=3
        /product="MHC class I human leukocyte antigen"
        /protein_id="AGC95094.1"
        /db_xref="GI:443609323"
        /translation="SHSRRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFSDAASPRE
EPRAPWIEQEGPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQSMYGCDV
GPDGRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLE
GECVEWLRRYLENGKDKLERA"
exon     <1..270
        /gene="HLA-B"
        /allele="HLA-B*07 new"
        /number=2
gap      271..370
        /estimated_length=unknown
exon     371..>646
        /gene="HLA-B"
        /allele="HLA-B*07 new"
        /number=3
ORIGIN
1 gctcccactc caggaggtat ttctacacct ccgtgtcccg gcccgccgc ggggagcccc
61 gcttcctctc agtgggctac gtgacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgacgccc
121 cgagtccgag agaggagccg cggcgcccg ggatagagca ggaggggccc gagtattggg
181 accggaacac acagatctac aaggcccagg cacagactga ccgagagagc ctgcggaacc
241 tgcgcggtca ctacaaccag agcgaggccg
   [gap 100 bp]   Expand Ns
371      ggtctcacac cctccagagc atgtacggct gcgacgtggg gccggacggg
421 cgctcctcc gcgggcatga ccagtacgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
481 gaggacctgc gctcctggac cgccgaggac acggcggctc agatcaccca gcgcaagtgg
541 gaggcggccc gtgaggcgga gcagcggaga gcctacctgg agggcgagtg cgtggagtgg
601 ctccgagat acctggagaa cggaaggac aagctggagc gcgctg
//

```

Homo sapiens isolate 202610 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*27 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477778.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477778 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 202610 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*27 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477778  
 VERSION KC477778.1 GI:443609338  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Homo sapiens (human)  
 ORGANISM Homo sapiens  
     Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
     Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
     Catarrhini; Hominidae; Homo.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 646)  
     AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.  
     TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing  
     JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 646)  
     AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.  
     TITLE Direct Submission  
     JOURNAL Submitted (07-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratorio IMUNOLAB  
         Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11  
         andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil  
 FEATURES Location/Qualifiers  
     source 1..646  
         /organism="Homo sapiens"  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /isolate="202610"  
         /db\_xref="taxon:9606"  
     gene <1..>646  
         /gene="HLA-B"  
         /allele="HLA-B\*27 new"  
     mRNA join(<1..270,371..>646)  
         /gene="HLA-B"  
         /allele="HLA-B\*27 new"  
         /product="MHC class I human leukocyte antigen"  
     CDS join(<1..270,371..>646)  
         /gene="HLA-B"  
         /allele="HLA-B\*27 new"  
         /function="antigen presenting molecule"  
         /codon\_start=3  
         /product="MHC class I human leukocyte antigen"  
         /protein\_id="AGC95102.1"  
         /db\_xref="GI:443609339"  
         /translation="SHSMRYFHTSVSRPGRGEPFITVGYVDDTLFVRFSDAASPRE  
 EPRAPWIEQEGPEYWDRETQICKAKAQTDRNLRIALRYYNQSEAGSHTLQNMYGCDV  
 GPDGRLLRGYNQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEARVAEQLRAYLE  
 GECVEWLRRYLENGKETLQRA"  
     exon <1..270  
         /gene="HLA-B"  
         /allele="HLA-B\*27 new"  
         /number=2  
     gap 271..370  
         /estimated\_length=unknown  
     exon 371..>646  
         /gene="HLA-B"  
         /allele="HLA-B\*27 new"  
         /number=3  
 ORIGIN  
     1 gctcccactc catgaggtat ttccacacct ccgtgtcccg gcccgccgc ggggagcccc  
     61 gcttcatcac cgtgggctac gtggacgaca cgctgttcgt gaggttcgac agcgacgccg

```

121 cgagtccgag agaggagccg cgggcgccgt ggatagagca ggaggggccc gagtattggg
181 accgggagac acagatctgc aaggccaagg cacagactga ccgagagaac ctgcggatcg
241 cgctccgcta ctacaaccag agcgaggccc
   [gap 100 bp]   Expand Ns
371      ggtctcacac cctccagaat atgtatggct gcgacgtggg gccggacggg
421 cgctcctcc gcgggtataa ccagtacgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
481 gaggacctgc gctcctggac cgccgaggac acggcggctc agatcaccca gcgcaagtgg
541 gaggcggccc gtgtggcggg gcagctgaga gcctacctgg agggcgagtg cgtggagtgg
601 ctccgcagat acctggagaa cgggaaggag acgctgcagc gcgcgg

```

//

Homo sapiens isolate 109476 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*41 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477771.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477771 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 109476 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*41 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477771

VERSION KC477771.1 GI:443609324

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;

Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratoro IMUNOLAB

Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11

andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="genomic DNA"

/isolate="109476"

/db\_xref="taxon:9606"

gene <1..>646

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*41 new"

mRNA join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*41 new"

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

CDS join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*41 new"

/function="antigen presenting molecule"

```
    /codon_start=3
    /product="MHC class I human leukocyte antigen"
    /protein_id="AGC95095.1"
    /db_xref="GI:443609325"
    /translation="SHSMRYFHTAMSRPGRGEPFRFITVGYVDDTLFVRFSDATSPRK
EPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQSMYGCDV
GPDGRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQDRAYLE
GTCVEWLRRYLENGKDTLERA"
```

```
exon      <1..270
           /gene="HLA-B"
           /allele="HLA-B*41 new"
           /number=2
gap        271..370
           /estimated_length=unknown
exon      371..>646
           /gene="HLA-B"
           /allele="HLA-B*41 new"
           /number=3
```

#### ORIGIN

```
1 gctcccactc catgaggtat ttccacaccg ccatgtcccg gcccgccgc ggggagcccc
61 gcttcatcac cgtgggtac gtggacgaca cgctgtcgt gaggtcgcac agcgacgcca
121 cgagtccgag gaaggagccg cggcgccat ggatagagca ggaggggccc gagtattggg
181 accgggagac acagatctcc aagaccaaca cacagactga ccgagagagc ctgcggaacc
241 tgcgcggtc ctacaaccag agcgaggccg
   [gap 100 bp]   Expand Ns
371      ggtctcacac cctccagagc atgtacggct gcgacgtggg gccggacggg
421 cgctcctcc gcgggcataa ccagtacgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
481 gaggacctgc gctcctggac cgcggcggac acccgggctc agatcaccca gcgcaagtgg
541 gaggcggccc gtgtggcggg gcaggacaga gcttacctgg agggcacgtg cgtggagtgg
601 ctccgagat acctggagaa cgggaaggac acgctggagc gcgcgg
```

//

Homo sapiens isolate 125981 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*42 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477777.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477777 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 125981 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*42 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477777

VERSION KC477777.1 GI:443609336

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (07-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratorio IMUNOLAB  
 Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11  
 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646  
 /organism="Homo sapiens"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /isolate="125981"  
 /db\_xref="taxon:9606"

gene <1..>646  
 /gene="HLA-B"  
 /allele="HLA-B\*42 new"

mRNA join(<1..270,371..>646)  
 /gene="HLA-B"  
 /allele="HLA-B\*42 new"  
 /product="MHC class I human leukocyte antigen"

CDS join(<1..270,371..>646)  
 /gene="HLA-B"  
 /allele="HLA-B\*42 new"  
 /function="antigen presenting molecule"  
 /codon\_start=3  
 /product="MHC class I human leukocyte antigen"  
 /protein\_id="AGC95101.1"  
 /db\_xref="GI:443609337"  
 /translation="SHSMRYFYTSVSRPGRGEPFRFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRE  
 EPRAPWIEQEGPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQSMYGC DV  
 GPDGRLLRGHNQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQLRAYLE  
 GTCVEWLRRYLENGKDTLERA"

exon <1..270  
 /gene="HLA-B"  
 /allele="HLA-B\*42 new"  
 /number=2

gap 271..370  
 /estimated\_length=unknown

exon 371..>646  
 /gene="HLA-B"  
 /allele="HLA-B\*42 new"  
 /number=3

ORIGIN

1 gctcccactc catgaggtat ttctacacct ccgtgtcccg gcccgccgc ggggagcccc  
 61 gcttcatctc agtgggctac gtggacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgacgccc  
 121 cgagtccgag agaggagccg cgggcgccgt ggatagagca ggaggggccc gagtattggg  
 181 accggaacac acagatctac aaggcccagg cacagactga ccgagagagc ctgcggaacc  
 241 tgcgcggtc ctacaaccag agcgaggccg  
 [gap 100 bp] Expand Ns

371 ggtctcacac cctccagagc atgtacggct gcgacgtggg gccggacggg  
 421 cgctcctcc cggggcataa ccagtacgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac  
 481 gaggacctgc gctcctggac cgcggcggac accgcggctc agatcaccca gcgcaagtgg  
 541 gaggcggccc gtgaggcgga gcagctgaga gcctactgg agggcacgtg cgtggagtgg  
 601 ctccgcagat acctggagaa cgggaaggac acgctggagc gcgcgg

//

Homo sapiens isolate 215033 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*42 new allele, exons 2, 3 and partial cds



GenBank: KC477772.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface control Go to:

LOCUS KC477772 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 215033 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*42 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477772

VERSION KC477772.1 GI:443609326

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti, R.A. and Nascimento, E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti, R.A. and Nascimento, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratório IMUNOLAB Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="genomic DNA"

/isolate="215033"

/db\_xref="taxon:9606"

gene <1..>646

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*42 new"

mRNA join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*42 new"

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

CDS join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*42 new"

/function="antigen presenting molecule"

/codon\_start=3

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

/protein\_id="AGC95096.1"

/db\_xref="GI:443609327"

/translation="SHSMRYFYTSVSRPGRGEPFRFISVGYVDDTQFVRFSDAASPRE

EPRAPWIEQEGPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQSMYGCDV

GPDGRLLRGYNQFAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQDRAYLE

GTCVEWLRRYLENGKDTLERA"

exon <1..270

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*42 new"

/number=2

gap 271..370

/estimated\_length=unknown

exon 371..>646  
/gene="HLA-B"  
/allele="HLA-B\*42 new"  
/number=3

ORIGIN

```
1 gctcccactc catgaggtat ttctacacct cCGTgtcccG gcccggccgc ggggagcccc
61 gcttcacctc agtgggctac gtggacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgacgccg
121 cgagtccgag agaggagccg cggcgcccgT ggatagagca ggaggggccc gagtattggg
181 accggaacac acagatctac aaggcccagg cacagactga ccgagagagc ctgcggaacc
241 tgcgcggtcta ctacaaccag agcgaggccg
   [gap 100 bp]   Expand Ns
371      ggtctcacac cctccagagc atgtacggct gcgacgtggg gccggacggg
421 cgctcctcc gCGgtataa ccagttcgc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
481 gaggacctgc gctcctggac cgcggcggac acccgggctc agatcaccca gcgcaagtgg
541 gaggcggccc gtgtggcggg gcaggacaga gcttacctgg agggcacgtg cgtggagtgg
601 ctccgcagat acctggagaa cgggaaggac acgctggagc gcgcgg
```

//

Homo sapiens isolate 218326 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*50 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477774.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477774 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 218326 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*50 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477774

VERSION KC477774.1 GI:443609330

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratorio IMUNOLAB  
Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11  
andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

```
source 1..646
      /organism="Homo sapiens"
      /mol_type="genomic DNA"
      /isolate="218326"
      /db_xref="taxon:9606"
gene <1..>646
      /gene="HLA-B"
      /allele="HLA-B*50 new"
mRNA join(<1..270,371..>646)
```

```

        /gene="HLA-B"
        /allele="HLA-B*50 new"
        /product="MHC class I human leukocyte antigen"
CDS     join(<1..270,371..>646)
        /gene="HLA-B"
        /allele="HLA-B*50 new"
        /function="antigen presenting molecule"
        /codon_start=3
        /product="MHC class I human leukocyte antigen"
        /protein_id="AGC95098.1"
        /db_xref="GI:443609331"
        /translation="SHSMRYFHTAMSRPGRGEPFRFITVGYVDDTLFVRFSDATSPRK
EPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHTWQRMYGCDL
GPDGRLLRGYNQLAYDGDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAHLRAYLE
GLCVEWLRRYLENGKETLQRA"
    exon     <1..270
            /gene="HLA-B"
            /allele="HLA-B*50 new"
            /number=2
    gap      271..370
            /estimated_length=unknown
    exon     371..>646
            /gene="HLA-B"
            /allele="HLA-B*50 new"
            /number=3
ORIGIN
    1 gctcccactc catgaggtat ttccacaccg ccatgtcccg gcccgccgc ggggagcccc
    61 gcttcatcac cgtgggctac gtggacgaca cgctgtcgt gaggttcgac agcgacgcca
    121 cgagtccgag gaaggagccg cgggcgcat gatatagca ggaggggccc gagtattggg
    181 accgggagac acagatctcc aagaccaaca cacagactta ccgagagagc ctgcggaacc
    241 tgcgcggcta ctacaaccag agcgaggccg
        [gap 100 bp] Expand Ns
    371      ggtctcacac ttggcagagg atgtatggct gcgacctggg gcccgacggg
    421 cgctcctcc gcgggtataa ccagttagcc tacgacggca aggattacac cgccctgaac
    481 gaggacctga gctctggac cgcggcggac accgcggctc agatcaccca gcgcaagtgg
    541 gagcggccc gtgaggcggg gcatctgaga gctacctgg agggcctgtg cgtggagtgg
    601 ctccgcagat acctggagaa cgggaaggag acgctgcagc gcgcgg
//

```

Homo sapiens isolate 144888 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*51 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477775.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477775 646 bp DNA linear PRI 30-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 144888 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*51 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477775

VERSION KC477775.1 GI:443609332

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)  
AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.  
TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing  
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)  
AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (07-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratorio IMUNOLAB  
Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11  
andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..646  
/organism="Homo sapiens"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolate="144888"  
/db\_xref="taxon:9606"

gene <1..>646  
/gene="HLA-B"  
/allele="HLA-B\*51 new"

mRNA join(<1..270,371..>646)  
/gene="HLA-B"  
/allele="HLA-B\*51 new"  
/product="MHC class I human leukocyte antigen"

CDS join(<1..270,371..>646)  
/gene="HLA-B"  
/allele="HLA-B\*51 new"  
/function="antigen presenting molecule"  
/codon\_start=3  
/product="MHC class I human leukocyte antigen"  
/protein\_id="AGC95099.1"  
/db\_xref="GI:443609333"  
/translation="SHSMRYFHTAMSRPGRGEPFRFIAVGVVDDTQFVRFSDAASPRT  
EPRAPWIEQEGPEYWDNRNTQIFKTNQTYRENLRALRYYNQSEAGSHTWQTMYGCDV  
GPDGRLLRGHNQYAYDGDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQLRAYLE  
GLCVEWLRRLHLENGKETLQRA"

exon <1..270  
/gene="HLA-B"  
/allele="HLA-B\*51 new"  
/number=2

gap 271..370  
/estimated\_length=unknown

exon 371..>646  
/gene="HLA-B"  
/allele="HLA-B\*51 new"  
/number=3

ORIGIN  
1 gctcccactc catgaggtat ttccacaccg ccatgtcccg gcccgccgc ggggagcccc  
61 gcttcattgc agtgggctac gtggacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgacgccg  
121 cgagtccgag gacggagccc cgggcgcat ggatagagca ggaggggccc gagtattggg  
181 accggaacac acagatcttc aagaccaaca cacagactta ccgagagaac ctgcggatcg  
241 cgctccgcta ctacaaccag agcgaggccg  
[gap 100 bp] Expand Ns  
371 ggtctcacac ttggcagacg atgtatggtc gcgacgtggg gccggacggg  
421 cgctcctcc gcgggcataa ccagtacgcc tacgacggca aagattacat cgccctgaac  
481 gaggacctga gctcctggac cgcggcggac accgcggctc agatcaccca gcgcaagtgg  
541 gaggcggccc gtgaggcgga gcagctgaga gcctacctgg agggcctgtg cgtggagtgg

601 ctccgcagac acctggagaa cggaaggag acgctgcagc gcgcgg  
//

Homo sapiens isolate 102115 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*57 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477773.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface control Go to:

LOCUS KC477773 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 102115 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*57 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477773

VERSION KC477773.1 GI:443609328

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti, R.A. and Nascimento, E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti, R.A. and Nascimento, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratorio IMUNOLAB  
Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11  
andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="genomic DNA"

/isolate="102115"

/db\_xref="taxon:9606"

gene <1..>646

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*57 new"

mRNA join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*57 new"

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

CDS join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*57 new"

/function="antigen presenting molecule"

/codon\_start=3

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

/protein\_id="AGC95097.1"

/db\_xref="GI:443609329"

/translation="SHSMRYFYTAMSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDAASPRM

APRAPWIEQEGPEYWDGETRNMKASAQTYRENLRALRYYNQSEAGSHIIQVMYGCDV  
GPDGRRLLRGHNQYAYDGDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLE  
GLCVEWLRRYLENGKETLQRA"

```

exon      <1..270
          /gene="HLA-B"
          /allele="HLA-B*57 new"
          /number=2
gap       271..370
          /estimated_length=unknown
exon      371..>646
          /gene="HLA-B"
          /allele="HLA-B*57 new"
          /number=3
ORIGIN
  1 gctcccactc catgaggtat ttctacaccg ccatgtcccc gcccgccgc ggggagcccc
  61 gcttcatcgc agtgggctac gtggacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgacgccg
 121 cgagtccgag gatggcgccc cgggcgcat ggatagagca ggaggggccc gagtattggg
 181 acggggagac acggaacatg aaggcctccg cgacagacta ccgagagaac ctgcggatcg
 241 cgctccgcta ctacaaccag agcgaggccc
    [gap 100 bp]   Expand Ns
 371      ggctccatc catccaggtg atgtatggct gcgacgtggg gccggacggg
 421 cgctcctcc gcgggcataa ccagtacgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
 481 gaggacctga gctcctggac cgcgcgggac acggcggctc agatcaccca gcgcaagtgg
 541 gaggcggccc gtgaggcgga gcagcggaga gcctacctgg agggcctgtg cgtggagtgg
 601 ctccgcagat acctggagaa cgggaaggag acgctgcagc gcgcgg
//

```

Homo sapiens isolate 109716 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*57 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477776.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477776 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 109716 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*57 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477776

VERSION KC477776.1 GI:443609334

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratoro IMUNOLAB Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="genomic DNA"



```

/isolate="109716"
/db_xref="taxon:9606"
gene      <1..>646
          /gene="HLA-B"
          /allele="HLA-B*57 new"
mRNA      join(<1..270,371..>646)
          /gene="HLA-B"
          /allele="HLA-B*57 new"
CDS       join(<1..270,371..>646)
          /product="MHC class I human leukocyte antigen"
          /gene="HLA-B"
          /allele="HLA-B*57 new"
          /function="antigen presenting molecule"
          /codon_start=3
          /product="MHC class I human leukocyte antigen"
          /protein_id="AGC95100.1"
          /db_xref="GI:443609335"
          /translation="SHSMRYFYTAMSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASPRM
APRAPWIEQEGPEYWDGETRNMKASQAQTYRENLRIALRYYNQSEAGSHIIQVMYGCDV
GPDGRLLRGHDQSAYDQKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAACVAEQLRAYLE
GLCWEVLRRYLENGKETLQRA"
exon      <1..270
          /gene="HLA-B"
          /allele="HLA-B*57 new"
          /number=2
gap       271..370
          /estimated_length=unknown
exon      371..>646
          /gene="HLA-B"
          /allele="HLA-B*57 new"
          /number=3

```

ORIGIN

```

1 gctcccactc catgaggtat ttctacaccg ccatgtcccc gcccgccgc ggggagcccc
61 gcttcatcgc agtgggctac gtggacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgacgccc
121 cgagtccgag gatggcgccc cgggcgccat ggatagagca ggaggggccc gagtattggg
181 acggggagac acggaacatg aaggcctccg cgagactta ccgagagaac ctgcggatcg
241 cgctccgcta ctacaaccag agcgaggccc
   [gap 100 bp]   Expand Ns
371   ggtctcacat catccaggtg atgtatggct gcgacgtggg gccggacggg
421 cgctcctcc gcgggcatga ccagtccgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
481 gaggacctga gctcctggac cgcggcggac acggcggctc agatcaccca gcgcaagtgg
541 gaggcggcct gtgtggcgga gcagctgaga gcctacctgg agggcctgtg cgtggagtgg
601 ctccgcagat acctggagaa cgggaaggag acgctgcagc gcgcgg

```

//

Homo sapiens isolate 216790 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*58 new allele, exons 2, 3 and partial cds

GenBank: KC477769.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC477769 646 bp DNA linear PRI 29-JAN-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 216790 MHC class I human leukocyte antigen (HLA-B) gene, HLA-B\*58 new allele, exons 2, 3 and partial cds.

ACCESSION KC477769

VERSION KC477769.1 GI:443609320

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A., Vilela,B. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-B allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Fabreti,R.A., Vilela,B. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-JAN-2013) Molecular Biology, Laboratorio IMUNOLAB  
Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11  
andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..646

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="genomic DNA"

/isolate="216790"

/db\_xref="taxon:9606"

gene <1..>646

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*58 new"

mRNA join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*58 new"

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

CDS join(<1..270,371..>646)

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*58 new"

/function="antigen presenting molecule"

/codon\_start=3

/product="MHC class I human leukocyte antigen"

/protein\_id="AGC95093.1"

/db\_xref="GI:443609321"

/translation="SHSMRYFYTAMSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASPRT

EPRAPWIEQEGPEYWDGETRNMKASAQTYRENLRALRFYNQSEAGSHIIQRMYGCDL

GPDGRRLLRGHDQSAYDGDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQLRAYLE

GLCVEWLRRYLENGKETLQRA"

exon <1..270

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*58 new"

/number=2

gap 271..370

/estimated\_length=unknown

exon 371..>646

/gene="HLA-B"

/allele="HLA-B\*58 new"

/number=3

ORIGIN

1 gctcccactc catgaggtat ttctacaccg ccatgtcccg gcccggccgc ggggagcccc

61 gcttcatcgc agtgggctac gtggacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgcgcgcc

121 cgagtccgag gacggagccc cgggcgcat ggatagagca ggaggggccc gagtattggg

181 acggggagac acggaacatg aaggcctccg cgcagactta ccgagagaac ctgcggatcg

```

241 cgctccgctt ctacaaccag agcgaggccg
   [gap 100 bp] Expand Ns
371      ggtctcatat catccagagg atgtatggct gcgacctggg gcccgcgagg
421 cgctcctcc gcggcatga ccagtccgc tacgacggca aggattacat cgccctgaac
481 gaggacctga gctcctggac cgcggcggac accgcggctc agatcaccca gcgcaagtgg
541 gaggcggccc gtgtggcgga gcagctgaga gcctacctgg agggcctgtg cgtggagtgg
601 ctccgcagat acctggagaa cggaaggag acgctgcagc gcgcgg
//

```

Homo sapiens isolate 213742 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*04 new allele, exon 2 and partial cds

GenBank: KC433573.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC433573 270 bp DNA linear PRI 21-FEB-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 213742 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*04 new allele, exon 2 and partial cds.

ACCESSION KC433573

VERSION KC433573.1 GI:451344615

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 270)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-DRB1 allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 270)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-JAN-2013) Laboratorio IMUNOLAB Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

```

source          1..270
                 /organism="Homo sapiens"
                 /mol_type="genomic DNA"
                 /isolate="213742"
                 /db_xref="taxon:9606"
                 /sex="male"
                 /tissue_type="peripheral blood"
gene            <1..>270
                 /gene="HLA-DRB1"
                 /allele="HLA-DRB1*04 new"
mRNA           <1..>270
                 /gene="HLA-DRB1"
                 /allele="HLA-DRB1*04 new"
                 /product="MHC class II human leukocyte antigen"
CDS            <1..>270
                 /gene="HLA-DRB1"
                 /allele="HLA-DRB1*04 new"
                 /function="antigen presentation molecule"

```

```

/codon_start=3
/product="MHC class II human leukocyte antigen"
/protein_id="AGF39093.1"
/db_xref="GI:451344616"
/translation="RFLEQVKHECHFFNGTERVRFDRYFYHQEEYVRFSDVGEYRA
VTELGRPSAEYWNSQKDLLEQRRAEVDTYCRHNYGVVESFTVQRR"
exon      <1..>270
          /gene="HLA-DRB1"
          /allele="HLA-DRB1*04 new"
          /number=2
ORIGIN
1  cagtttctt ggagcaggtt aaacatgagt gtcatttct caacgggacg gagcgggtgc
61 ggttcttga cagatacttc taccaccaag aggagtacgt gcgcttcgac agcgacgtgg
121 gggagtaccg ggcggtgacg gagctggggc ggcctagcgc tgagtactgg aacagccaga
181 aggacctctt ggagcagagg cgggccgagg tggacaccta ctgcagacac aactacgggg
241 ttgtggagag cttcacagtg cagcggcgag
//

```

Homo sapiens isolate 227245 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*10 new allele, exon 2 and partial cds

GenBank: KC438413.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version. Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC438413 270 bp DNA linear PRI 21-FEB-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 227245 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*10 new allele, exon 2 and partial cds.

ACCESSION KC438413

VERSION KC438413.1 GI:451344619

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 270)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-DRB1 allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 270)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-JAN-2013) Laboratorio IMUNOLAB Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..270

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="genomic DNA"

/isolate="227245"

/db\_xref="taxon:9606"

/sex="female"

/tissue\_type="peripheral blood"

gene <1..>270

/gene="HLA-DRB1"

```

mRNA      /allele="HLA-DRB1*10 new"
          <1..>270
          /gene="HLA-DRB1"
          /allele="HLA-DRB1*10 new"
          /product="MHC class II human leukocyte antigen"
CDS       <1..>270
          /gene="HLA-DRB1"
          /allele="HLA-DRB1*10 new"
          /function="antigen presenting molecule"
          /codon_start=3
          /product="MHC class II human leukocyte antigen"
          /protein_id="AGF39095.1"
          /db_xref="GI:451344620"
          /translation="RFLEEVKFECHFFNGTERVLLERRVHNQEEYARYDSDVGEYRA
VTELGRPSAEYWNSQKDLLERRRAAVDTYCRHNYGVGESFTVQRR"
exon      <1..>270
          /gene="HLA-DRB1"
          /allele="HLA-DRB1*10 new"
          /number=2
ORIGIN
1 cacgttctt ggaggaggtt aagtttgagt gtcatttctt caacgggacg gagcgggtgc
61 ggttgctgga aagacgcgtc cataaccaag aggagtacgc gcgctacgac agcgactggt
121 gggagtaccg gccggtgacg gagctggggc gccctagcgc cgagtactgg aacagccaga
181 aggacctctt ggagcggagg cgtgccgagg tggacaccta ctgcagacac aactacgggg
241 ttgtgagag cttcacagtg cagcggcgag
//

```

Homo sapiens isolate 226693 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*15 new allele, exon 2 and partial cds

GenBank: KC438414.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC438414 270 bp DNA linear PRI 21-FEB-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 226693 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*15 new allele, exon 2 and partial cds.

ACCESSION KC438414

VERSION KC438414.1 GI:451344621

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 270)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE A new HLA-DRB1 allele identified by haplotype-specific sequencing

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 270)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-JAN-2013) Laboratorio IMUNOLAB Imunologia de Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

```

source      1..270
            /organism="Homo sapiens"
            /mol_type="genomic DNA"
            /isolate="226693"
            /db_xref="taxon:9606"
            /sex="female"
            /tissue_type="peripheral blood"
gene        <1..>270
            /gene="HLA-DRB1"
            /allele="HLA-DRB1*15 new"
mRNA        <1..>270
            /gene="HLA-DRB1"
            /allele="HLA-DRB1*15 new"
            /product="MHC class II human leukocyte antigen"
CDS         <1..>270
            /gene="HLA-DRB1"
            /allele="HLA-DRB1*15 new"
            /function="antigen presenting molecule"
            /codon_start=3
            /product="MHC class II human leukocyte antigen"
            /protein_id="AGF39096.1"
            /db_xref="GI:451344622"
            /translation="RFLWQPKRECHFFNGTERVFLDRHFYNQEESVRFDSVGEFRA
GTGLGRPDAEYWNSQKDILEQARAADVITYCRHNYGVVESFTVQRR"
exon        <1..>270
            /gene="HLA-DRB1"
            /allele="HLA-DRB1*15 new"
            /number=2
ORIGIN
1  cagtttct gtgcagcct aagagggagt gtcatttct caatgggacg gagcgggtgc
61 ggttcctgga cagacactc tataaccagg aggagtccgt gcgcttcgac agcgacgtgg
121 gggagtccg ggccgggacg gagctggggc ggctgacgc tgagtactgg aacagccaga
181 aggacatcct ggagcaggcg cgggccgcgg tggacaccta ctgcagacac aactacgggg
241 ttgtggagag cttcacagtg cagcggcggag
//

```

Homo sapiens isolate 214440 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*16 new allele, exon 2 and partial cds

GenBank: KC438412.1

FASTA Graphics

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.Destroy user interface controlGo to:

LOCUS KC438412 270 bp DNA linear PRI 21-FEB-2013

DEFINITION Homo sapiens isolate 214440 MHC class II human leukocyte antigen (HLA-DRB1) gene, HLA-DRB1\*16 new allele, exon 2 and partial cds.

ACCESSION KC438412

VERSION KC438412.1 GI:451344617

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

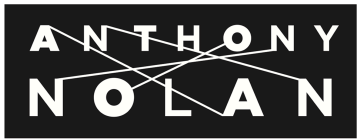
REFERENCE 1 (bases 1 to 270)

AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.



TITLE A new HLA-DRB1 allele identified by haplotype-specific sequencing  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 270)  
 AUTHORS Fabreti,R.A., Fabreti,C.K., Vale,E.M.G. and Nascimento,E.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (03-JAN-2013) Laboratorio IMUNOLAB Imunologia de  
 Transplantes Ltda, Av. Bernardo Monteiro, 971 - 11 andar, Belo  
 Horizonte, Minas Gerais 30150281, Brazil  
 FEATURES Location/Qualifiers  
   source 1..270  
     /organism="Homo sapiens"  
     /mol\_type="genomic DNA"  
     /isolate="214440"  
     /db\_xref="taxon:9606"  
     /sex="female"  
     /tissue\_type="peripheral blood"  
   gene <1..>270  
     /gene="HLA-DRB1"  
     /allele="HLA-DRB1\*16 new"  
   mRNA <1..>270  
     /gene="HLA-DRB1"  
     /allele="HLA-DRB1\*16 new"  
     /product="MHC class II human leukocyte antigen"  
   CDS <1..>270  
     /gene="HLA-DRB1"  
     /allele="HLA-DRB1\*16 new"  
     /function="antigen presenting molecule"  
     /codon\_start=3  
     /product="MHC class II human leukocyte antigen"  
     /protein\_id="AGF39094.1"  
     /db\_xref="GI:451344618"  
     /translation="CFLWQPKRECHFFNGTERVRFDRYFYNQEESVRFDSVDVGEYRA  
     VTELGRPDAEYWNSQKDLLED RRAAVDTYCRHNYGVGESFTVQRR"  
   exon <1..>270  
     /gene="HLA-DRB1"  
     /allele="HLA-DRB1\*16 new"  
     /number=2  
 ORIGIN  
   1 catgtttcct gtggcagcct aagagggagt gtcatttct caatgggacg gagcgggtgc  
   61 ggttcctgga cagatacttc tataaccagg aggagtccgt gcgcttcgac agcgacgtgg  
   121 gggagtaccg ggcggtgacg gagctggggc ggctgacgc tgagtactgg aacagccaga  
   181 aggacctct ggaagacagg cgcgccgagg tggacaccta ctgcagacac aactacgggg  
   241 ttggtgagag cttcacagtg cagcggcgag  
 //

**ANEXO IV: Nomenclatura HLA para os novos alelos definida pelo do  
Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

29 January, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017460). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

**A\*80:03**

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name A\*80:03 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in January 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### Reference

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

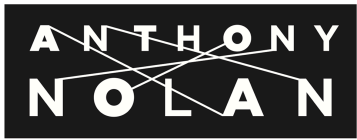
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017868). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*07:184***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*07:184 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

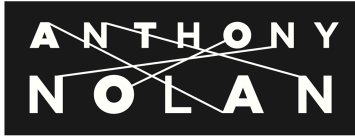
Best wishes,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Steve Marsh', written over a white background.

Professor Steven GE Marsh  
Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017858). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*27:102***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*27:102 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

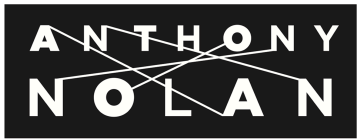
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017859). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*41:27***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*41:27 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

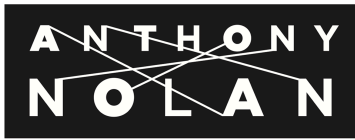
Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**





BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017863). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*42:19***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*42:19 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

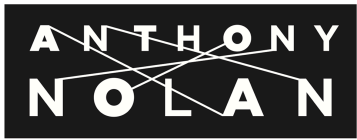
Best wishes,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Steve Marsh', written over a white background.

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017862). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*42:20***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*42:20 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

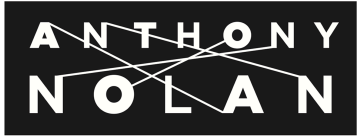
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017866). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*50:32***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*50:32 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

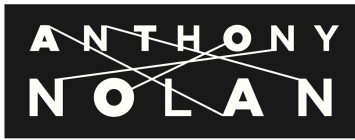
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017867). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*51:151***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*51:151 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

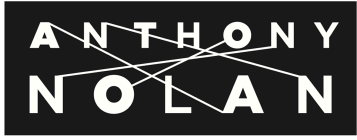
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017801). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*57:63***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*57:63 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

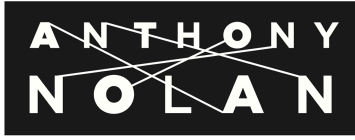
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017861). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*57:64***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*57:64 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

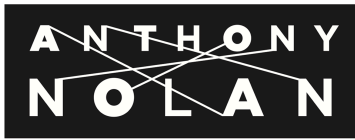
Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**





BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017864). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***B\*58:42***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name B\*58:42 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

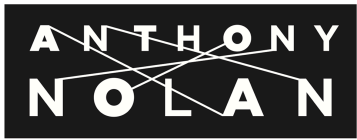
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017860). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

***DRB1\*04:11:03***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name DRB1\*04:11:03 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

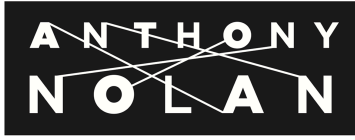
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017871). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

### ***DRB1\*10:05***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name DRB1\*10:05 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

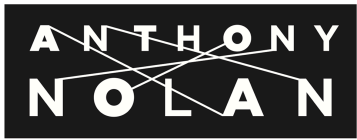
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017869). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

### ***DRB1\*15:94***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name DRB1\*15:94 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

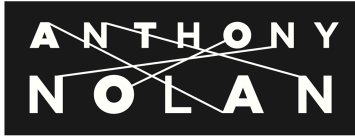
I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**



BE A MATCH, SAVE A LIFE

**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research

**ANTHONY NOLAN**  
**Research Institute**

The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG

**020 7284 8321**

**steven.marsh@ucl.ac.uk**

Dr Raquel Fabreti  
Molecular Biology  
Laboratorio Imunolab  
Av. Bernardo Monteiro, 971, andar  
Belo Horizonte  
Minas Gerais 30150-281  
Brazil

28 February, 2013

Dear Dr Raquel Fabreti

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10017875). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

### ***DRB1\*16:22***

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name DRB1\*16:22 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in February 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

#### **Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) **75** 291-455

I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
*Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/imgt/hla

**www.anthonynolan.org**

## ANEXO V: Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte

1



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

#### PARECER CONSUBSTANCIADO

Registro CEP: 073/2007 (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto).

**Título:** "Ensaio clínico retro e prospectivo, aberto, para avaliar os aloanticorpos e marcadores moleculares na evolução e na sobrevida dos transplantes renais humanos com órgãos de doadores falecidos e vivos".

**Pesquisador Responsável:** Dr. Evaldo Nascimento

**Instituição:** Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte / Multicêntrico Nacional

#### Objetivos:

- 1) Estudo retrospectivo: avaliar a presença de anticorpos anti HLA de classe I e/ou II, e/ou anti-MICA e correlacionar os achados com a evolução clínica, as intercorrências, os protocolos de imunossupressão e a relação desses anticorpos com a sobrevida do enxerto.
- 2) Estudo prospectivo: avaliar prospectivamente a evolução clínica e imunológica dos transplantes renais, intercorrências, protocolos de imunossupressão e a presença de anticorpos anti-HLA de classe I e II, anti MICA antes e após o transplante renal e sua relação com a sobrevida do enxerto.

#### Comentários:

Do ponto de vista ético, atende às determinações da Resolução CNS 196/96; o Consentimento Livre e Esclarecido reflete a natureza do estudo e está redigido de maneira clara; os demais documentos estão completos.

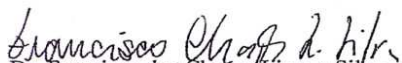
#### Parecer

Diante do exposto, o CEP da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião de 25 de janeiro de 2008, **aprovou** o referido estudo.

#### OBS.:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final (para o primeiro semestre o prazo é 30 de junho; para o segundo semestre é 31 de dezembro).

Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2008.

  
Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva  
Coordenador do CEP



## ANEXO VI: Termo de Consentimento Informado e Esclarecido.

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO ESCLERECIDO PARA TRANSPLANTES (TCIE)

Protocolo nº: \_\_\_\_\_

EU \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_ / CPF \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ HOSPITAL \_\_\_\_\_

TIPO DE TRANSPLANTE: \_\_\_\_\_

Como receptor de transplante autorizo a coleta e o uso de meu sangue e de meus doadores que concordaram voluntariamente, para realização dos exames: tipificação HLA AB, DR, DQ, provas cruzadas, painéis de reatividade de anticorpos contra antígenos HLA (PRA). Esses exames serão realizados no pré, pós-transplante e em estudos clínicos no laboratório IMUNOLAB de Histocompatibilidade e Imunogenética, assim como, o uso dos resultados dos meus exames pelo meu médico e pelos médicos dos hospitais dos Centros de transplantes, ao qual estou vinculado.

#### Objetivo:

Avaliar a compatibilidade genética pelo HLA entre RECEPTOR e DOADOR, freqüências dos antígenos e alelos HLA na população de Minas Gerais, a presença de anticorpos anti-HLA de classe I e/ou II, e/ou anti-MICA no pré e pós-transplante e correlacionar os achados com a rejeição clínica e subclínica, evolução clínica, disfunção do transplante, protocolos de imunossupressão e a sobrevida do transplante.

#### Sobre a coleta de sangue:

Você será submetido à coleta de sangue por punção venosa pelo sistema a vácuo e estéril de acordo com os exames solicitados:

Exames	Material	Quantidade
Tipificação HLA	Sangue/Linfócitos (Tubo tampa roxa c/ EDTA )	1 tubo de 5ml , exceto para receptores de MO que deverão ser 4 tubos de 5 ml
PRA	Sangue/Soro (Tubo tampa vermelha/amarela c/ gel)	1 tubo de 5ml
Soroteca		1 tubo de 5ml
Prova Cruzada	Receptor: Sangue/Soro (tubo tampa vermelha/amarela c/ gel)	1 tubo de 5 ml
	Doador: Sangue/Linfócitos (Tubo tampa amarela c/ ACD)	2 tubos de 10 ml

Os resultados dos exames serão entregues a você ou ao seu médico entre 7 a 15 dias, mas raramente esse tempo poderá estender, pois estarão sujeitos aos imprevistos técnicos e de qualidade de amostra clínicas coletadas.

#### Consentimento do Paciente:

Declaro ter sido esclarecido satisfatoriamente a respeito dos exames, do sigilo a respeito dos meus dados pessoais e dos resultados, ter recebido informações referentes à coleta de sangue e sobre os resultados dos exames. Li (ou leram para mim) e ouvi as explicações sobre o uso no estudo e tive a oportunidade de fazer perguntas. Eu autorizo a liberação dos resultados dos meus exames para o meu médico, para os médicos responsáveis por minha avaliação imunológica pré e pós-transplante, para os hospitais em que estou

vinculado, para divulgação de meus dados imunológicos, para melhorar o conhecimento sobre transplantes em revistas científicas médicas e para os Comitês de Ética Médica.

Nome do receptor: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do doador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do doador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do doador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do doador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do doador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Belo Horizonte, Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Responsável:**

No melhor de meu conhecimento, este paciente entendeu os procedimentos, riscos e benefícios envolvidos na sua preparação pré e na avaliação pós-transplante para evitar as rejeições.

Assinatura e Carimbo: \_\_\_\_\_

Belo Horizonte, Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**-----Utilize o que segue apenas quando aplicável -----**

*Se esse formulário de consentimento foi lido para o sujeito porque ele é incapaz de ler, uma testemunha imparcial, não relacionada com a pesquisa ou ao pesquisador, deve estar presente durante o procedimento de consentimento e assinar a declaração a seguir:*

Confirmo que as informações do formulário de consentimento e quaisquer outras informações escritas foram explicadas e compreendidas pelo indivíduo. O paciente consentiu que seu sangue fosse usado nesse Ensaio clínico.

Nome da testemunha imparcial: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha imparcial: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Anexo VII Certificados de aulas de Imunogenética de transplantes ministradas para profissionais da área de saúde.**

# CERTIFICADO

O NÚCLEO DE ENSINO E PESQUISA – NEP/ MG TRANSPLANTES, certifica que

**RAQUEL FABRETI**

Ministrou aula no **CURSO DE EXTENSÃO EM TRANSPLANTES,**

*Com o tema: Fundamentos em Imunologia dos Transplantes* no período de 2010 a 2013.

  
Dr. Charles Simão Filho

Diretor do MG Transplantes

  
Dr. Walter Antonio Pereira

Coord. Núcleo de Ensino e Pesquisa MG Transplantes.

Belo Horizonte, Janeiro de 2014

**SOCOR**  
HOSPITAL GERAL

Hospital  
**VeraCruz**

**CENEMGE**  
**CLINEMGE**  
**NEFRON** Clínica de Doenças Renais

**Santa Rita**  
HOSPITAL

FUNDAÇÃO  
EDUCACIONAL  
LUCAS MACHADO  
**FELUMA**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
DE MINAS GERAIS - FOMMG  
CENTRO DE PESQUISA E  
PÓS-GRADUAÇÃO - CPG  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
SÃO JOSÉ - HUSJ  
CIÊNCIAS MÉDICAS VIRTUAL

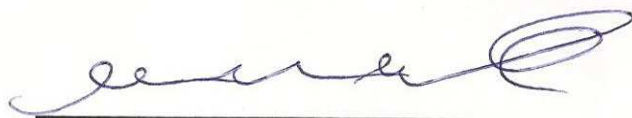
**O SERVIÇO DE RESIDÊNCIA EM NEFROLOGIA DO HOSPITAL  
VERA CRUZ EM CONJUNTO COM OS HOSPITAIS E CLINICAS  
ASSOCIADOS CONFEREM O TÍTULO DE CONFERENCISTA A:**

*Dra. Raquel Fabretti*

*Bióloga – Especialista em Histocompatibilidade – Mestre em Genética Humana*

**PELA PALESTRA: IMPORTÂNCIA DO HLA MATCHING NO  
TRANSPLANTE RENAL**

**BELO HORIZONTE, 30 DE OUTUBRO DE 2013**

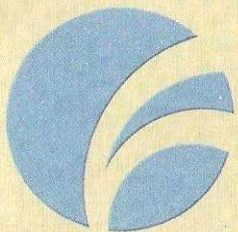


Marcos Rocha Rabello  
Diretor Geral  
Hospital Vera Cruz  
Belo Horizonte - Minas Gerais



Eduardo Roberto da Silveira  
Coordenador do Serv. Nefrologia  
Hospital Vera Cruz  
Belo Horizonte - Minas Gerais





UNIVERSIDADE  
**FUMEC/FCH**

# CERTIFICADO

Certificamos que **Raquel A. Fabreti de Oliveira** ministrou palestra com o tema. **"Importância do Sistema HLA e dos Anticorpos nos Transplantes"**, na **Semana Acadêmica de Biomedicina**, promovida pela Faculdade de Ciências Humanas, Sociais e da Saúde da Universidade FUMEC, no dia 16 de maio de 2013.

*Belo Horizonte, 16 de maio de 2013.*

*Divina Vivas*

**Profa. Divina Sebastiana Lara Vivas**  
Coordenadora do Setor de Extensão