



**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO  
PROFISSIONAL**  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE RECURSOSHUMANOS



JESSICA OLIVEIRA DE SANTIS

**Frequência dos antígenos HLA classe I e II em pacientes indicados  
para transplante de medula óssea na região de Ribeirão Preto – SP.**

Ribeirão Preto  
2018



**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO  
PROFISSIONAL**  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE RECURSOSHUMANOS



JESSICA OLIVEIRA DE SANTIS

**Frequência dos antígenos HLA classe I e II em pacientes indicados  
para transplante de medula óssea na região de Ribeirão Preto – SP.**

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP, elaborado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo –USP.

**Área de concentração:** Imunogenética

**Orientadora:** Dra Neifi Hassan Saloum Deghaide

Ribeirão Preto  
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação  
Serviço de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Santis, Jessica Oliveira de

Frequência dos antígenos HLA classe I e II em pacientes indicados para transplante de medula óssea na região de Ribeirão Preto – SP. – 2019

49 f.

Monografia (Aprimoramento Profissional em Imunogenética) – Programa de Aprimoramento Profissional, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, FMRP, Universidade de São Paulo, 2019.

Versão original

1. Imunogenética. 2. Antígenos HLA. 3. Histocompatibilidade.  
4. Transplante de Medula Óssea.

## **DEDICATÓRIA**

A minha Maria Helena, por todo apoio nas minhas decisões, te amo.

A Carlos e Nina, por nunca terem me abandonado apesar da distância.

Santis JO. Frequência dos antígenos HLA classe I e II em pacientes indicados para transplante de medula óssea na região de Ribeirão Preto – SP. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** Diversas patologias podem indicar um paciente ao transplante de medula óssea, e a compatibilidade nos casos dos transplantes alogênicos é necessária como fator de segurança para receptor. A avaliação dessa compatibilidade é feita pela comparação dos antígenos e alelos do sistema HLA entre doador e receptor. Esses genes incluem duas classes principais e seis *locus* clássicos, e além do seu papel na aceitação e rejeição de um transplante, já foi associado com diversas doenças. **Objetivo:** Estudar a prevalência dos antígenos HLA de classe I e II tipificados em pacientes com indicação a transplante de medula óssea na região de Ribeirão Preto – SP, e verificar presença de correlação entre os antígenos encontrados e a patologia de base. **Método:** Estudo observacional retrospectivo de pacientes que foram encaminhados para tipificação dos antígenos HLA de classe I e II ao Laboratório de HLA da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Com uma casuística de 854 pacientes, foram avaliados os antígenos HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 e -DQB1, e as frequências encontradas foram comparadas com um grupo controle de indivíduos saudáveis para avaliação de associação entre os antígenos e as patologias dos pacientes. **Resultados:** Das 37 patologias descritas para os pacientes, as mais prevalentes foram Leucemia Mielóide Aguda (19,0%), Anemia Aplástica (17,0%), Leucemia Linfóide Aguda (15,8%), Anemia Falciforme (15,4%) e Leucemia Mielóide Crônica (6,1%). Os antígenos mais frequentes nos registros foram HLA-A\*02, B\*35 e B\*44, C\*07, DRB1\*07, DQA1\*01 e DQB1\*03. Quando comparadas com a prevalência entre indivíduos saudáveis, apenas uma diferença apresentou valor estatístico significativo ( $p < 0,0016$ ), e foi entre HLA-DRB1\*15 e a Anemia Aplástica. **Conclusão:** Os resultados das frequências se apresentaram em concordância com a de indivíduos saudáveis da região. Para a associação que foi encontrada, embora já descrita, precisa ser confirmada com estudos em um grupo maior de pacientes.

**DESCRITORES:** Imunogenética, Antígenos HLA, Histocompatibilidade, Transplante de Medula Óssea.

Santis JO. Frequency of HLA class I and II antigens in patients indicated for bone marrow transplant in the region of Ribeirão Preto - SP [monograph]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018.

## ABSTRACT

**Background:** Several pathologies may indicate a patient to bone marrow transplantation, and compatibility in cases of allogeneic transplants is necessary as a receptor's safety factor. The evaluation of this compatibility is done by comparing the antigens and alleles of the HLA system between donor and recipient. These genes include two major classes and six classical *locus*, and, in addition to their role in accepting and rejecting a transplant, has already been associated with several diseases. **Objective:** Study the prevalence of HLA class I and II antigens typified in patients with bone marrow transplantation in the Ribeirão Preto - SP region, and to verify the presence of a correlation between the antigens found and the pathology described. **Methods:** Retrospective observational study of patients who were referred for HLA typing of class I and II antigens to the Laboratório de HLA da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. With a sample of 854 patients, HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 antigens were evaluated, and the frequencies found were compared with a control group of healthy individuals to evaluate association between the antigens and the pathologies of the patients. **Results:** Of the 37 pathologies described for the patients, the most prevalent were Acute Myeloid Leukemia (19.0%), Aplastic Anemia (17.0%), Acute Lymphoid Leukemia (15.8%), Sickle Cell Anemia (15.4%) and Chronic Myeloid Leukemia (6.1%). The most frequent antigens in the registries were HLA-A\*02, B\*35 and B\*44, C\*07, DRB1\*07, DQA1\*01 and DQB1\*03. When compared with the prevalence among healthy individuals, only one difference presented significant statistical value ( $p < 0.0016$ ), and was between HLA-DRB1\*15 and aplastic anemia. **Conclusion:** The results of the frequencies were in agreement with healthy individuals of the region. For the association that was found, although already described, it needs to be confirmed with studies in a larger group of patients.

**DESCRIPTORS:** Immunogenetics, HLA Antigens, Histocompatibility, Bone Marrow Transplantation.

# SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
3.1 SISTEMA HLA .....	11
3.1.1 Genes HLA .....	12
3.1.2 Antígenos HLA .....	14
3.1.3 Métodos de tipificação .....	16
3.1.3.1 Sorológico .....	16
3.1.3.2 Moleculares .....	16
3.1.4 Associação do sistema HLA com doenças .....	19
3.2 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA .....	21
3.2.1 Histórico .....	22
3.2.1 Transplante de medula óssea .....	23
3.2.1.1 Métodos de obtenção das células tronco hematopoiéticas (CTH) .....	24
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
4.1 CASUÍSTICA .....	26
4.2 COLETA DE DADOS .....	27
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
4.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	27
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
5.1 PATOLOGIAS DE BASE INDICADAS NO ESTUDO .....	28
5.2 FREQUÊNCIAS ANTIGÊNICAS DOS <i>LOCI</i> HLA .....	29
5.2.1 Frequência dos antígenos por patologia de base .....	31
5.2.1 Associação entre HLA e doenças na população estudada .....	35
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante de medula óssea (TMO) é uma terapêutica indicada para tratar doenças hematológicas e pacientes com alterações genéticas, que consiste em uma administração intravenosa de células do tecido hematopoiético de um indivíduo saudável, no intuito de recobrar as atividades normais de uma medula doente ou não funcional. As indicações para o transplante incluem causas neoplásicas como Leucemias, linfomas e síndromes mielodisplásticas, e causas não neoplásicas, Anemias Aplástica e falciforme, imunodeficiências e talassemias (CASTRO JR et al, 2001).

Diferente dos outros tipos de transplante, a realização do TMO depende de uma compatibilidade completa (100%) entre doador e receptor, e a possibilidade de encontrar um doador compatível entre membros da família é de apenas 40%, no restante de casos, é preciso recorrer às bases de doadores voluntários cadastrados. Numa população extremamente miscigenada como a brasileira, as chances de encontrar um doador compatível não aparentado é em média 1:100.000. Nos casos em que há incompatibilidade de alelos e/ou antígenos podem ocorrer rejeição, onde as células da medula do doador transplantado não reconhecem o organismo onde foram transplantadas, e desencadeiam uma resposta imunológica (CASTRO JR et al, 2001; CORGOZINHO et al, 2012). Por isso, é essencial para um bom resultado do transplante que seja realizada uma análise de compatibilidade completa e segura.

No parâmetro de transplantes, o sistema HLA (antígenos leucocitários humanos) é fundamental como determinante de um bom resultado e da não rejeição do órgão ou tecido transplantado. Para o transplante de medula óssea, um fator necessário para que este seja bem sucedido é a compatibilidade entre doador e receptor das moléculas codificadas pelos genes HLA de classe I e II (MEINERZ et al, 2008).

O sistema HLA é composto por um grupo de genes que codificam um complexo proteico homônimo. Seu sistema de genes está localizado no braço curto do cromossomo seis (chr 6), possuem um perfil altamente polimórfico, e abrigam mais de 220 genes codificadores. A principal função do sistema HLA é o controle do reconhecimento do que é próprio, assegurando uma resposta mais específica a

antígenos patogênicos. O polimorfismo das suas moléculas tem papel fundamental nesse processo de reconhecimento. Para manter sua habilidade de responder de forma adequada a doenças, é preciso que haja harmonia entre expressão gênica e necessidade da proteína, e essas variações são estudadas em nível de gene, indivíduo e população (TORRES; MORAES, 2011; KELLY; TROWSDALE, 2017). As proteínas do sistema HLA estão presentes e são reconhecidas em todos os tecidos do corpo, e devido seu polimorfismo, é difícil encontrar indivíduos que apresentem os mesmos antígenos. A seleção de doador depende de um grau adequado de compatibilidade com os antígenos HLA do receptor, pois tais moléculas têm ação de alogenicidade no pós-transplante (PEREIRA et al, 2010).

Os genes e antígenos HLA tem papel conhecido na medicina personalizada e na biologia de transplantes, sendo associado a diversas patologias, como condições infecciosas e de forma mais direta, a doenças com caráter autoimune (KELLY; TROWSDALE, 2017). Essa associação estuda a relação de alelos HLA específicos que predisõem alguma doença. Um estudo da década de 70 relatou uma associação positiva entre o HLA-B\*27 e Espondilite Anquilosante (SCHLOSSTEIN et al, 1973). Seguindo a essa descoberta, outros estudos foram realizados para avaliar correlação dos genes com doenças autoimunes, infecciosas, neoplásicas e idiopáticas. A ocorrência de associação deve apresentar resultados estatísticos significantes quando comparado frequência dos antígenos em pacientes e indivíduos controle (DONADI, 2000).

O presente trabalho tem como objetivo levantar e avaliar a frequência dos antígenos HLA de classe I e II em pacientes tipificados no Laboratório de HLA da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, comparando essas prevalências com de indivíduos saudáveis da mesma região, procurando identificar diferenças significativas que possam relacionar o antígeno a patologia indicada. O trabalho foi composto de uma revisão de literatura que pretendeu introduzir os temas de Sistema HLA e transplante de medula óssea; um capítulo com Materiais e Métodos, que descreveu a casuística do estudo e as análises realizadas no levantamento; seguido do capítulo com resultados descritos em tabelas e gráficos; o sexto capítulo contém a discussão com artigos similares e com objetivos que condizem com os do presente trabalho; com o próximo capítulo contendo a conclusão do estudo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Levantar prevalência dos antígenos HLA de classe I e II tipificados em pacientes com indicação a transplante de medula óssea na região de Ribeirão Preto - SP.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar a concordância da prevalência dos antígenos com a de indivíduos saudáveis da região do estudo.
- Estudar antígenos mais presentes de acordo com cada patologia.
- Verificar presença de correlação entre os antígenos encontrados e a doença do paciente.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

A sobrevivência de um organismo depende da sua habilidade de interpretar e responder a mudanças no ambiente, eliminando aquilo que é considerado patogênico e reconhecer o que é próprio dele, de forma que o sistema imunológico ataque células saudáveis e funcionais do organismo. A descoberta de genes caracterizados por possuir intenso polimorfismo e ter grande influência nos mecanismos de rejeição, aconteceu como resultado de um experimento de enxertia entre espécies. Estudos posteriores sobre transplantes mostraram uma quantidade grande de genes que controlavam a histocompatibilidade entre doador e receptor. Esses genes foram nomeados como MHC.

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) consiste em uma região altamente polimórfica do genoma de vertebrados, cuja função está em codificar proteínas que atuam, em maioria, no sistema imune do organismo. O papel dessas proteínas na imunidade adaptativa tem sido amplamente estudado desde sua descoberta. A maioria de seus produtos tem como função prover representação extracelular de invasões intracelulares. As moléculas codificadas pelo MHC evocam respostas efetoras após serem reconhecidas pelos receptores específicos para antígenos dos linfócitos T. Na espécie humana, esse complexo recebe o nome de sistema HLA (GERMAIN, 1994; JONGSMA; GARDA; SPAAPEN, 2017).

#### 3.1 Sistema HLA

O sistema HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) foi inicialmente descrito na década de 50 em um estudo que observou que o soro de pacientes submetidos à transfusão aglutinava com leucócitos de outros indivíduos. Acreditava-se que as moléculas HLA estavam relacionadas apenas à rejeição a transplantes, posteriormente foi comprovado que a função do sistema HLA é mais abrangente, e tem relação direta com o sistema imune, especialmente com a resposta adquirida (FAÉ; DRIGO; GOLDBERG, 2006).

Desde 1967, quando se iniciou a normatização nomenclatura dos alelos HLA, houve mudanças na mesma de acordo com a necessidade e o aparecimento de novos alelos. A última atualização foi implantada em 2010, passando a se determinar os alelos como “HLA-A\*01:01:01:01”, descrita com a sigla HLA seguida

da letra correspondente ao *locus*, um asterisco que designava o método de definição como molecular, e os numerais separados por delimitadores, na ordem: o grupo alélico ou equivalente sorológico, alelo ou proteína específica, mutações silenciosas sinônimas, e variações em regiões de íntrons (TORRES; MORAES, 2011).

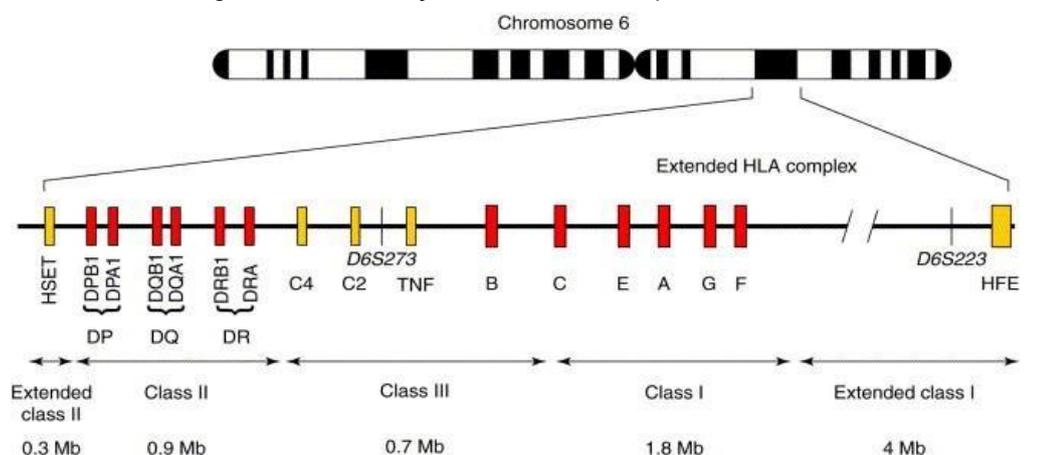
### 3.1.1 Genes HLA

O sistema HLA contém cerca de quatro milhões de pares de base, e agrupam-se em três regiões no mesmo *loci* no cromossomo. Essas regiões são chamadas de classe I, II e III. Sendo que as regiões I e II codificam antígenos que tem função de apresentar peptídeos derivados de organismos patogênicos para as células T, o que dá início a uma resposta imune, enquanto a região III codificam proteínas que tem ação no sistema complemento. Portanto, os antígenos de classe III não são avaliados em uma análise de compatibilidade (MARSH; PARHAM; BARBER, 2000).

“Dentre todos os genes humanos, os genes HLA são os mais polimórficos. O polimorfismo apresentado por estes genes está basicamente restrito à região codificadora da fenda de ligação do peptídeo que será apresentado aos linfócitos T durante a resposta imunológica, e tem sido frequentemente utilizado na caracterização genética de diferentes populações mundiais” (DELLALIBERA, 2004)

Localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31) e compreende 239 *loci* gênicos. Representa cerca de 0,1% do genoma, sendo uma das regiões mais densa do genoma humano. Dos genes sequenciados, 128 são codificadores, com 40% atuando no sistema imune (MARSH; PARHAM; BARBER, 2000).

Figura 1 – Localização dos alelos HLA pelo cromossomo



Fonte: UNDLIEN et al (2001)

Na porção mais telomérica encontra-se os genes de classe I que contém cerca de 20 genes, onde os HLA-A, -B e -C são considerados como clássicos, eles contém informação para codificar antígenos que serão apresentados nas membranas das células.

Diferentes éxons, que são as porções do gene com informação para codificar uma proteína, são responsáveis pela codificação de uma parte do antígeno HLA final. Em relação à cadeia pesada do antígeno, conhecidas como *alfa*, o peptídeo sinal é codificado pelo éxon1, os domínios extracelulares são codificados por 2, 3 e 4, enquanto a porção transmembrana é codificada pelo éxon 5. Os éxons6 e 7 contém informação para a cauda citoplasmática. A maior parte do polimorfismo do antígeno vem de diferentes variantes nos éxons2 e 3. A cadeia leve da molécula final, chamada de *beta*, fica codificada no cromossomo 15, porém está não apresentou variação polimórfica (MARSH; PARHAM; BARBER, 2000).

Os genes de classe II ficam localizados na parte mais perto do centrômero. Apresentam maior polimorfismo, e apresentam os *loci* DP, DN, DO, DQ e DR. Os antígenos dos *loci* DP e DQ são produtos dos genes DPA1 e DPB1, e DQA1 e DQB1, respectivamente.

O *locus* DR apresenta um maior número de genes, tendo sua proteína final determinada por dez genes, sendo um gene que codifica a cadeia  $\alpha$ (cadeia alfa, gene A) e até nove genes, para a cadeia  $\beta$ (cadeia beta, genes B). Por isso, o que estabelece o polimorfismo dos antígenos DR são variantes nos genes B, que se apresentam como o alelo DRB1, molécula clássica, e os alelos DRB3, DRB4 e DRB5, que codificam as moléculas DR52, DR53 e DR51, respectivamente. Na região DR, os éxons 1, 2 e 3 são separados por íntrons longos, sendo que o segmento 2 é o responsável pelo polimorfismo e variação da molécula, por codificar os domínios  $\alpha$ 1 e  $\beta$ 1.

A terceira porção do gene é responsável pelos antígenos HLA de classe III, e codifica as moléculas do sistema complemento (C2, C4 e fator B), 21-hidroxilase e fator de necrose tumoral (OLIVEIRA; SELL, 2002).

Devido à proximidade dos genes no cromossomo, esses possuem maior probabilidade de serem herdados em conjunto, ao contrário de separados por recombinação, isso classifica um desequilíbrio de ligação. Por essa característica, mais comumente determina-se a genotipagem HLA de um indivíduo como contendo dois haplótipos, sendo que o haplótipo contém uma cópia de cada gene e é herdado

em bloco, provindo um de origem materna e o outro, de origem paterna (KRANSDORF et al, 2017).

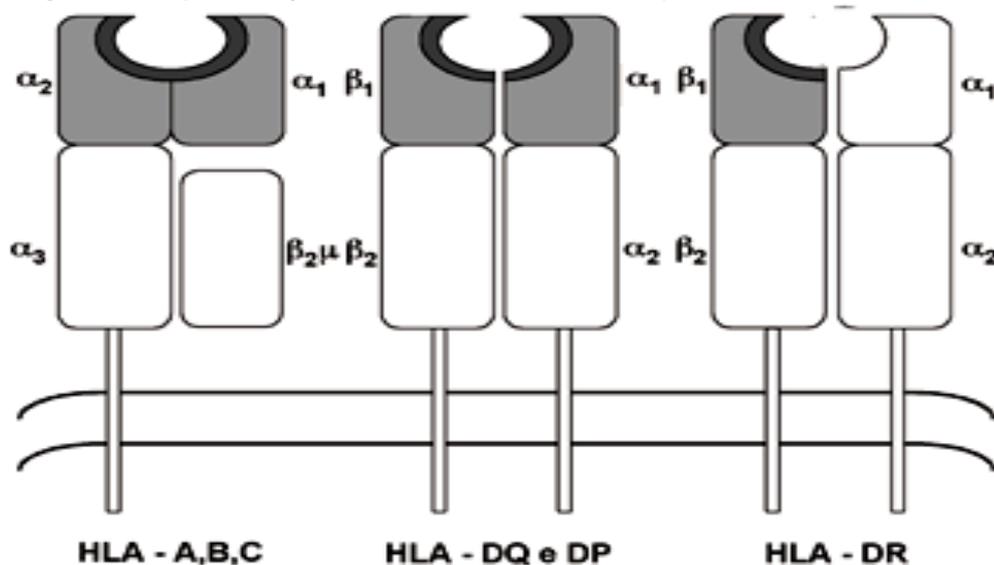
### 3.1.2 Antígenos HLA

As moléculas HLA são glicoproteínas expressos na superfície na maioria das células nucleadas, com concentração de expressão variada de acordo com o tecido. São responsáveis por apresentar peptídeos aos linfócitos T como parte da resposta de reconhecimento imunológico das células (KRANSDORF et al, 2017).

Apresentam três porções comuns entre as moléculas, uma citosólica, localizada no meio intracelular, tem função de transduzir sinais para o interior da célula; uma porção transmembrana, que mantém a molécula ligada e estável a membrana celular; e a extracelular, a maior das porções, que é responsável pela apresentação do antígeno.

Os antígenos de classe I são heterodímeros, contendo uma cadeia  $\alpha$  com três domínios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , sendo que os dois primeiros contém o polimorfismo expresso pelos genes, enquanto o domínio  $\alpha_3$  não é polimórfico e apresenta estrutura similar a cadeia pesada dos anticorpos. Associada a cadeia alfa está a cadeia  $\beta_2$ -microglobulina, também não polimórfica e codificada por genes a parte, localizados no cromossomo 15. Sendo as moléculas para HLA-A, B e C codominantes, podem ser encontradas até seis moléculas diferentes por indivíduos (DONADI, 2000; KRANSDORF et al, 2017).

Figura 2 – Representação das moléculas de histocompatibilidade de classe I e II.



Fonte: FERNANDES et al (2003).

As moléculas de classe II também são heterodímeros compostos por uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$ , unidas de forma não covalente. Para as moléculas dos genes HLA-DQ e DP, o polimorfismo está presente nos domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , enquanto nas moléculas HLA-DR, o polimorfismo é encontrado apenas no domínio  $\beta 1$ , sendo sua cadeia alfa não polimórfica. Os domínios  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  também apresentam estrutura homóloga com as cadeias pesadas das imunoglobulinas. O número de moléculas HLA-DR e DQ presentes na superfície da célula pode chegar a oito, e varia de acordo com o haplótipo e da complementaridade dos genes DQA1/B1 e DPA1/B1, estando esses presentes no mesmo ou em haplótipos diferentes.

Durante o processo de apresentação dos antígenos, os domínios  $\alpha 3$  na classe I, e o  $\beta 2$  nas moléculas de classe II fazem a ligação com os receptores nas células CD8 e CD4, respectivamente. As moléculas de classe I têm função na apresentação de antígenos intracelulares ou virais as células T citotóxicas (CD8+), e estão envolvidos na resposta imunológica mediada pelas células NK (*Natural Killer*). Os peptídeos que servirão como indicativo da infecção para os linfócitos são gerados no citosol com ação de proteases. Simultaneamente, os outros domínios da molécula são processados, também pelo retículo endoplasmático. O sítio de ligação do peptídeo é composto por “fenda profunda, formada lateralmente pelas  $\alpha$  hélices dos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , e o assoalho, por oito (08) fitas  $\beta$ , pregueadas, desses mesmos domínios, acomodando peptídeos de 9-14 resíduos de aminoácidos” (DONADI, 2000).

As moléculas de classe II apresentam antígenos exógenos para linfócitos T auxiliares (CD4+), e são expressos por subgrupos das células imunes, como as células B, células T ativadas, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais do timo. O sítio de ligação dessas moléculas acomoda peptídeos maiores, com 15 a 24 resíduos de aminoácidos. Esses peptídeos são processados por catepsinas presentes em endossoma e lisossoma das células. Seu processamento requer auxílio das moléculas HLA-DMA e DMB, que também fazem parte da classe II dos genes, porém não geram incompatibilidade em transplantes (DONADI, 2000; BOQUETT, 2017).

### **3.1.3 Métodos de tipificação**

#### *3.1.3.1 Sorológico*

A análise sorológica determina a presença dos antígenos nas células, por um método de citotoxicidade celular mediada por anticorpo e dependente do complemento. O método consiste na reatividade entre antígeno HLA presente na superfície da célula estudada e o anticorpo anti-HLA correspondente, sendo ele de origem policlonal ou monoclonal. Ambos são incubados em placa, e uma vez que o antígeno é reconhecido pelo anticorpo, ocorre a ligação. Após essa reação, é adicionado um complemento que promove a lise celular, pelo complexo de ataque a membrana, das células cujos antígenos foram reconhecidos, dessa forma é possível diferenciar onde ocorreu ou não a ligação do anticorpo, e, portanto, qual antígeno está sendo apresentado pela célula. A morte celular vai ocorrer nos poços onde houver compatibilidade entre antígeno e anticorpo, e com a adição de um composto fluoróforo, é possível observar o resultado dessa reação em microscopia de fluorescência. Para moléculas de classe I, utilizam-se linfócitos T, enquanto os linfócitos B são utilizados para tipificação das moléculas de classe II.

Resultado rápido e possibilidade de discriminar alelos não expressos em antígenos são vantagens descritas para esse método, que tem como desvantagens a dificuldade de identificar e purificar anticorpos suficientes para o crescente número de alelos HLA descobertos, e a baixa especificidade para polimorfismos em nível de aminoácidos no antígeno (FERNANDES et al, 2003; TINCKAM, 2009).

Uma vez que os plasmas tipados não podem ser específicos para um único alelo, essa metodologia nem sempre consegue definir com especificidade quais alelos estão presentes. Atualmente, essa técnica tem sido pouco utilizada devido suas limitações, sendo que a liberação do resultado depende de células viáveis, dependentes do aloantígeno, do complemento e da expressão dos antígenos. Essa metodologia foi substituída na maioria dos casos pelos métodos moleculares, que apresentam as vantagens de maior sensibilidade e especificidade (VOLTARELLI; STRACIERI, 2000).

#### *3.1.3.2 Moleculares*

Com um aumento no conhecimento sobre complexidade genética e polimorfismo dos genes HLA, a tipificação por métodos moleculares se tornou mais utilizada, e inclui duas técnicas com base na reação de cadeia em polimerase

(PCR), primer de sequência específica (SSP) e oligonucleotídeo de sequência específica (SSO), e o sequenciamento direto de DNA (BONTADINI, 2012).

O princípio do PCR-SSP consiste na utilização de um par de primer com complementaridade total ao DNA a ser analisado, atuando de forma mais eficiente quando comparada com primers com pequenas variações alterando a pareabilidade das bases. A tipificação é baseada na especificidade do primer, que permite que uma base não pareada iniba a ligação do primer ou não a ligue fortemente, culminando na ausência do pareamento, ou como produto final, na ineficiência da amplificação dos fragmentos que estarão ausentes na sequência exata complementar. Dessa forma, a escolha de primers dentro da região polimórfica permite uma amplificação específica e determinante ao alelo a ser tipificado. A mesma amostra de DNA é amplificada em vários poços contendo primers diferentes, e a leitura dos resultados é feita em eletroforese, pela determinação da presença ou ausência da amplificação dos éxons 2 e 3 do gene para os alelos de classe I, e do éxon 2 para alelos de classe II.

Essa metodologia é simples, rápida e ideal para tipificações de amostra única, porém apresenta baixa funcionalidade quando é necessária a análise de uma grande quantidade de amostras, tendo como desvantagens que o uso dos primers específicos tenha que acompanhar os novos polimorfismos encontrados, o gasto aumentado de primers e mix para a PCR, e as etapas no termociclador e a leitura em gel de eletroforese não permitem a automação do método. Para um resultado com alta resolução são necessárias várias reações distintas de PCR (TINCKAM, 2009; BONTADINI, 2012).

O método PCR-SSO não requer o uso de eletroforese e possibilita uma maior quantidade de amostras analisadas simultaneamente. A análise depende de primers seletivos para porções conservadas, que levam a uma amplificação especificadas regiões polimórficas do gene, sendo os éxons 2 e 3 para os genes HLA de classe I e éxon 2 para classe II. O produto dessa amplificação são biotinilados e detectados por um conjugado de estreptavidina e ficoeritrina.

Sondas de oligonucleotídeos contendo beads (sondas) com código de cor que permite identificação da sequência, e complementares a sequências específicas do DNA em diferentes alelos são então hibridizadas ao material genético amplificado após um processo de desnaturação desse material. Os oligonucleotídeos contêm cerca de 20 nucleotídeos, esse comprimento garante que a sonda reconheça uma

sequência única, porém presente instabilidade se houver pareamento incorreto. A hibridização ocorre sob condições rígidas, com uma temperatura contínua que possibilita o anelamento de todas as sondas complementares aos alelos da amostra. A primeira técnica de detecção desse sinal das sondas usava de radiação, e foi substituída por métodos com quimiluminescência e sondas ligadas a enzimas (BONTADINI, 2012; PICASCIA; GRIMALDI; NAPOLI, 2016).

A resolução desse método depende do número de sondas, com testes de 50-100 beads que determinam um resultado com resolução média/alta, porém existem testes de 500 beads, que associados a um sistema de interpretação compatível, consegue reduzir e resolver ambiguidades (PICASCIA; GRIMALDI; NAPOLI, 2016).

As metodologias por hibridização definem os dois primeiros campos da nomenclatura HLA, que correspondem o grupo alélico e proteína específica, respectivamente, sendo ambos definidos pela região de ligação do peptídeo na molécula HLA. A aplicação do sequenciamento na tipificação HLA permite considerar polimorfismo nos alelos em nível de diferença de nucleotídeos, variações por substituições sinônimas em regiões codificadoras e polimorfismo em regiões não codificadoras do gene. Alelos HLA podem se diferenciar por uma ou múltiplas trocas de nucleotídeos (SANCHEZ-MAZAS; MEYER, 2014).

A primeira técnica de sequenciamento utilizada foi a de Sanger, denominada como tipificação baseada em sequenciamento (SBT, *Sequencing Based Typing*), que inicia as tipificações de alta resolução, porém ainda apresentava resultados ambíguos, em razão de regiões não marcadas pelos primers e a incapacidade de definir polimorfismos e amostras heterozigotas. As metodologias de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) baseiam-se em amplificação clonal, usando da técnica de PCR para a montagem da biblioteca que será seqüenciada. A etapa de amplificação antes do sequenciamento permite uma maior resolução do resultado e uma tipificação de alta produtividade, conhecido como *high throughput*.

Os diferentes tipos de sequenciamento variam entre si pela sequência do primer e tipo de sequenciador. A montagem do primer é etapa crítica e pode ser decisivo na escolha do resultado esperado, podendo ser (1) altamente específico e amplificar apenas um *locus*, aumentando o número de leituras para uma mesma região, ou (2) mais abrangente e amplificar todos os alelos com eficiência semelhante, realizando uma leitura mais completa do gene na mesma análise. A

sensibilidade para detecção de variações na sequência do gene é devida ao princípio de determinação dos alelos por determinação da sequência completa do DNA, e não por comparação com banco de dados de alelos já reportados (ERLICH, 2015).

#### **3.1.4 Associação do sistema HLA com doenças**

Estudos de associação entre alelos HLA e suscetibilidade e resistência a doenças tiveram início com a padronização dos métodos de tipificação sorológica. Os primeiros estudos começaram quando apenas a classe I era conhecida, e algumas das associações com doenças feitas durante esse período apresentaram uma correlação mais forte com antígenos da classe II, que se mostrou mais fortemente relacionada a patologias em relação à classe I. Algumas doenças também já foram relacionadas a variações em outras regiões, como a classe III, que codifica o esteróide 21-hidroxilase, cujo defeito pode causar hiperplasia adrenal congênita.

Em sua maioria, as doenças associadas aos genes HLA apresentam sinais e sintomas de estado de inflamação crônica e autoimunidade. A introdução às correlações veio em 1973, quando o antígeno HLA-B\*27 foi encontrado com uma frequência muito maior em pacientes com Espondilite Anquilosante em comparação a população geral, com percentuais de 95% e 2%, respectivamente. Essa primeira associação se mostrou importante devido à discrepância significativa entre doente e indivíduos saudáveis (MARSH; PARHAM; BARBER, 2000).

Outras doenças foram associadas a alelos HLA: DRB1\*03 e 04, Diabetes Mellitus dependente de insulina; DRB1\*02, síndrome de Goodpasture e Esclerose Múltipla; DRB1\*03, Lúpus Eritematoso Sistêmico, doença de Graves e Miastenia Grave; DRB1\*04, Pênfigo Vulgar e Artrite Reumatóide; B\*27, Uveíte Anterior Aguda. No caso de doenças infecciosas, os antígenos HLA aparecem como atuantes na evolução da patologia, podendo estar envolvidos como similares ao patógeno, apresentando de forma ineficiente os antígenos virais e bacterianos, facilitando a entrada de vírus nas células, ou fornecendo sítios de ligação para patógenos (MARSH; PARHAM; BARBER, 2000; DESHPANDE, 2017).

As associações reportadas até o momento têm implicações em fatores de diagnóstico, prognóstico e profilaxia para doenças, e têm ajudado também no entendimento da heterogeneidade das patologias, porém o mecanismo pelo qual essas doenças se relacionam ao sistema HLA ainda não foi totalmente clarificado. De forma geral, doenças associadas a antígenos da classe I podem estar envolvidos

com linfócitos T citotóxicos, enquanto as correlações com a classe II, principalmente relacionado ao HLA-DRB1, envolvem linfócitos T auxiliares.

Em uma aplicação clínica, o polimorfismo dos genes associados a doenças e resposta ou resistência terapêutica poderia auxiliar na predição de eficácia de uma linha de tratamento, racionalizando o uso de terapias biológicas. Análise molecular de associações bem definidas pode auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas e imunoterapias (GHODKE et al, 2005).

Figura 3 – Doenças associadas aos alelos e antígenos HLA.

HLA subtype	Associated diseases
<b>HLA Class I</b>	
<b>A</b>	
HLA - A3	Hemochromatosis, multiple sclerosis
HLA - A29	Birdshot retinochoroidopathy
HLA - A2	Acute lymphoblastic leukemia, chronic myelocytic leukemia
HLA - A1	Hodgkin's disease, psoriasis
HLA - A11	Hodgkin's disease
<b>B</b>	
HLA - B8	Grave's disease, celiac disease, chronic hepatitis, Hodgkin's disease
HLA - B16	Multiple sclerosis
HLA - B18	Type I diabetes mellitus, chronic lymphocytic leukemia
HLA - B27	Ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, arthritis of inflammatory bowel disease, juvenile arthritis, reactive arthritis, reactive arthropathy including Reiter's syndrome, acute anterior uveitis
HLA - B35	Lymphoid leukemia
HLA - B51	Behcet's syndrome
HLA - B47	Congenital adrenal hyperplasia
HLA - B5	Grave's disease
HLA - B15	Hodgkin's disease
HLA - B7	Multiple sclerosis
HLA - B13	Psoriasis
HLA - B37	Psoriasis
<b>C</b>	
HLA - Cw6	Psoriasis vulgaris
<b>HLA Class II</b>	
<b>DR</b>	
HLA - DR1	Myasthenia gravis, rheumatoid arthritis, schizophrenia
HLA - DR2	Multiple sclerosis, hay fever, systemic lupus erythematosus, good pasture syndrome, narcolepsy, type I diabetes mellitus
HLA - DR3	Addison's disease, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, Grave's disease, type I diabetes mellitus, celiac disease, dermatitis herpetiformis, sicca syndrome, idiopathic membranous nephropathy, chronic hepatitis, juvenile diabetes mellitus
HLA - DR4	Type I diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, postpartum thyroiditis, pemphigus vulgaris, juvenile diabetes mellitus
HLA - DR5	Type I diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis, pernicious anemia
HLA - DR7	Steroid-responsive nephrotic syndrome, celiac disease
HLA - DR11	Hashimoto's thyroiditis, celiac disease
HLA - DRw51	Multiple sclerosis
HLA - DR15	Multiple sclerosis
HLA - DR8	Reiter's syndrome
<b>DQ</b>	
HLA - DQ1	Narcolepsy
HLA - DQ2	Celiac disease, type I diabetes mellitus
HLA - DQ8	Celiac disease
HLA - DQ3	Type I diabetes mellitus
HLA - DQA1*05	Celiac disease
HLA - DQ6	Multiple sclerosis

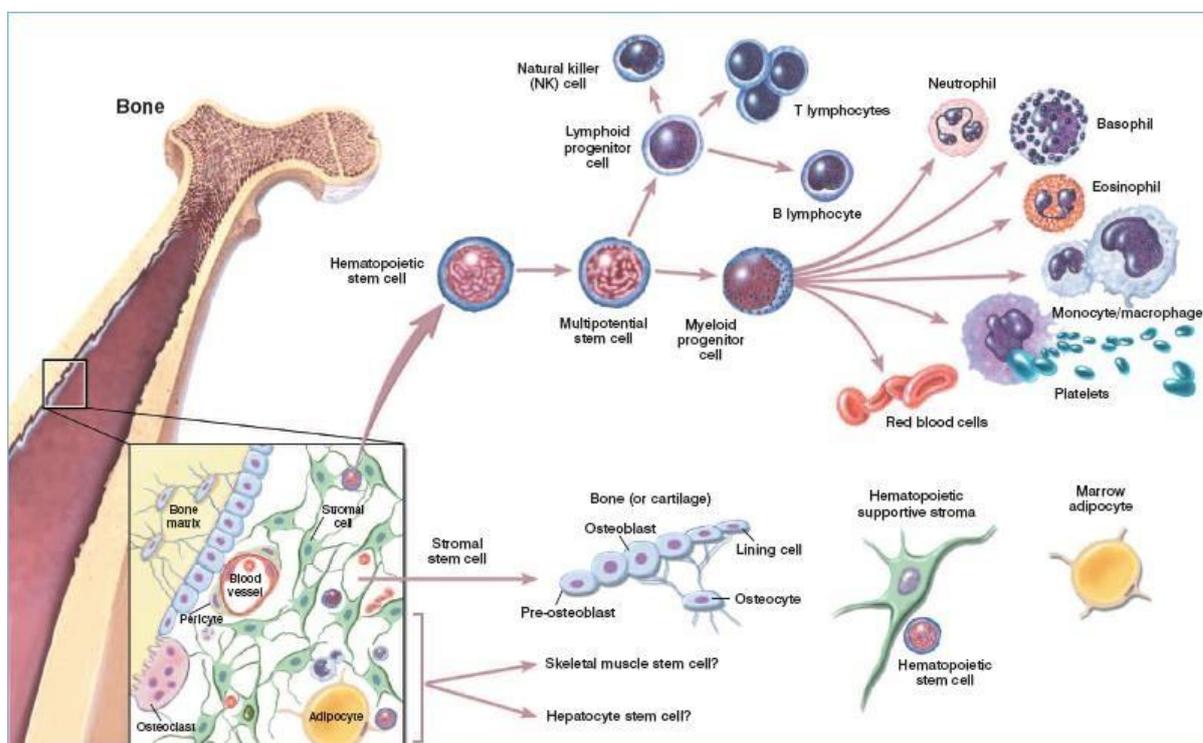
HLA: Human leukocyte antigen

Fonte: DESHPANDE (2017).

### 3.2 Transplante de medula óssea

A medula óssea (MO) é um tecido mole encontrado no interior dos ossos, altamente vascularizado devido sua função de produção das células do sangue. Todas, eritrócitos, leucócitos e plaquetas, derivam de células-tronco hematopoiéticas (CTH ou HSC, *Hematopoietic Stem Cells*) encontradas na medula óssea. Em crianças esse tecido fica localizado em todos os ossos, enquanto em adultos, mais comumente encontra-se CTH nos ossos do quadril, braços e fêmur. As células-tronco podem se dividir para formar mais células-tronco, processo chamado de auto-renovação, ou podem passar por processos de maturação e diferenciação até o estágio de células maduras do sangue (KREBSBACH et al, 1999).

Figura 4 – Diferenciação celular hematopoiética e estromal.



Fonte: © 2001 Terese Winslow assisted by Lydia Kibiuk and Caitlin Duckwall.

Em razão dessa capacidade de produção de células do sangue, o transplante de medula óssea (TMO) é utilizado para regeneração da função das CTH de indivíduos doentes. Esse procedimento tem como princípio a reposição da medula disfuncional por uma saudável, de acordo com a propriedade de proliferação dessas células que repopulam a medula óssea do paciente (ANDERS, 2004).

“O transplante de medula óssea é um procedimento terapêutico com propriedade mielo e imunoablativas e consiste na infusão, por via intravenosa, de sangue da medula óssea, obtido de doador previamente

selecionado, em receptor adequadamente condicionado, ou seja, é submetido a um regime quimioterápico, com ou sem radioterapia.” (ANDERS, 2004)

TMO é uma terapêutica indicada e utilizada de forma crescente em muitas doenças, em qualquer faixa etária. Ainda que seja uma terapia complexa e com alta taxa de morbimortalidade, apresenta resultados significativos referentes à sobrevivência dos pacientes e mesmo, à cura (ANDERS, 2004).

### 3.2.1 Histórico

Os estudos sistemáticos em relação ao TMO se iniciaram após as investigações das consequências das explosões da bomba atômica em 1945. Observando soldados nas duas Guerras Mundiais, percebeu-se que àqueles expostos ao gás mostarda apresentavam leucopenia, redução do número de leucócitos. Essa descoberta levou o uso do gás como terapêutica quimioterápica para linfomas, sendo que esse agente originou as drogas aniquilantes para combate às células cancerígenas, ciclofosfamida e clorambucila.

Além dos efeitos dos químicos utilizados como armas na guerra, foi observado impacto da radiação liberada pelas bombas atômicas, o que deu início aos estudos relacionados a cuidado e recuperação da medula óssea atingida por radiação. Os primeiros estudos no assunto, concluíram que camundongos sobreviveriam aos efeitos de irradiação tóxica para a medula óssea, e teoricamente letal, se o baço ou outro órgão hematopoético fosse protegido por uma caixa de chumbo, ou se células provenientes de baço ou próprias da medula fossem infundidas no animal após a irradiação (SOUZA, 2017).

Poucos anos depois, um estudo em seres humanos demonstrou que uma grande quantidade de medula poderia ser infundida de forma segura via intravenosa, e descreveu a transição do enxerto até a “pega medular” (enxertia ou *engraftment*) em um indivíduo. O desenvolvimento da metodologia foi lento até a década de 60, devido complicações relacionadas a efeitos indesejados, como infecções fatais fúngicas e virais, e rejeição imunológica do enxerto, condição agora denominada como doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), que causava alterações cutâneas, diarreia e anormalidade hepáticas.

Diversos trabalhos realizados culminaram no conhecimento do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) ou antígenos leucocitários humanos (HLA), quando presente no genoma humano, e sua importância em transplantes. Como resultado, o “aumento do conhecimento sobre o HLA no final da década de 60, o

desenvolvimento do suporte adequado para a transfusão de plaquetas e a descoberta de antibióticos e agentes anticancerígenos mais eficientes” (SOUZA, 2017), tornaram possível novas tentativas de transplante alogênico.

Esses avanços foram seguidos de esforços para aplicação do transplante em casos de Leucemias agudas e o estabelecimento de centros de transplante de medula óssea. Avanços em relação a outras Leucemias agudas e crônicas também foram realizados no mesmo período. O uso de transplante autólogo também apareceu com novas indicações em casos de tumores sólidos e algumas Leucemias. Ainda com todos os progressos realizados, os efeitos colaterais primeiro observados, incompatibilidade, rejeição e infecções oportunistas, ainda eram reportados (HARDY; IKPEAZU, 1989).

Apesar da complexidade do procedimento e do alto custo, que envolve para seu funcionamento uma equipe multidisciplinar, laboratórios para tipificação HLA e tempo de internação longo, a avaliação custo benefício compensam a escolha do transplante de medula óssea para tratamento de doenças hematológicas. Atualmente, o TMO é uma importante modalidade terapêutica, sendo uma das formas de transplante mais utilizada (EID, 2001).

### **3.2.1 Transplante de medula óssea**

O TMO é caracterizado pela infusão endovenosa de células tronco hematopoiéticas para reestabelecimento da função medular. Existem dois tipos de TMO: autólogo e alogênico. O transplante autólogo ou autogênico é definido pelo uso das próprias CTH do paciente coletadas previamente, e está indicado em doenças autoimunes e neoplasias malignas que não apresentam infiltração na medula óssea que cause deficiência na sua função. O transplante singênico apresenta mesmo padrão em relação à compatibilidade, e ocorre em casos em que o paciente tenha um irmão idêntico que possa realizar a doação (MARINHO, 2013).

O transplante alogênico ocorre quando o paciente recebe a medula de outra pessoa, e tem como objetivo reconstituir em quantidade e qualidade a hematopoiese e outras linhagens celulares como as do sistema linfóide. Nesses casos, a medula do paciente apresenta alguma forma de alteração ou disfunção e precisa ser realizada a troca da mesma por uma saudável. Como o fator de compatibilidade nesses casos se faz presente, o ideal é que apresenta maior probabilidade de ser encontrado doador, são nos casos de transplante alogênico aparentado, porém

mesmo entre irmãos, o paciente se depara com uma em quatro possibilidades de ter um irmão compatível. Em casos em que não há compatibilidade entre relativos, pode se recorrer a procura entre doadores voluntários cadastrados (MARINHO, 2013).

O transplante é definido em três fases: o período pré-transplante, durante o qual o paciente recebe acompanhamento ambulatorial até a internação; o TMO, que abrange desde o início da internação hospitalar, seguido da administração da quimioterapia e radioterapia com a intenção de ablação da medula doente do paciente, a fase de coleta das CTH, seja do doador ou do próprio paciente, o processamento e a infusão das células, e se estende até a alta hospitalar; e o pós-TMO, que se inicia com a alta do hospital e se divide em imediato, que se dá até 100 dias da infusão da medula, e tardio, que segue a partir do fim do imediato e não possui prazo final (OLIVEIRA-CARDOSO et al, 2009).

Este procedimento terapêutico é indicado para um número alto de hemopatias malignas, falhas na função medular, incluindo aplasia, diferentes síndromes imunodeficientes e para reestabelecimento da resposta imune em casos de patologias autoimunes (COUTINHO, 2009). As doenças com maior índice de indicação ao transplante são: falências medulares adquiridas e constitucionais, como Anemia Aplástica e Hemoglobinúria Paroxística Noturna, e Anemia de Fanconi e Disceratose Congênita; Hemoglobinopatias, como a doença falciforme e Talassemias; Leucemias Linfóides e Mielóides; neoplasias mieloproliferativas, Policetemia Vera, Trombocitose Essencial e Mielofibrose Primária; Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin; doenças autoimunes como Esclerose Múltipla e Sistêmica e Diabetes Mellitus tipo I (COUTINHO, 2009; SOUZA, 2017).

### *3.2.1.1 Métodos de obtenção das células tronco hematopoiéticas (CTH)*

As CTH podem ser coletadas por punção óssea, aférese ou pelo sangue de cordão umbilical. A coleta por punção foi o primeiro método de coleta descrito, e consiste em múltiplas punções e aspirações diretamente da medula pela crista ilíaca do doador. Esse método é realizado com o doador internado e apresenta baixo risco, com complicações em cerca de 0,4% dos procedimentos, e em sua maioria, devido doença prévia do doador ou relacionada a anestesia aplicada. A principal queixa nesses casos é de dor leve a moderada no local das punções, que cedem com uso de analgésicos comuns, e pode ser recomendada a transfusão de concentrado de eritrócitos, caso a quantidade de medula doada seja grande, e o uso

de reposição de ferro oral por um período de trinta dias (CASTRO JR, 2002; COUTINHO, 2009).

No caso das células coletadas por aférese, é realizada uma mobilização das células para a circulação periférica utilizando de fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF), que são então coletadas por separação em um aparelho de aférese. Esse método foi introduzido na década de 80 e é mais utilizada em casos de transplantes autólogos, embora também seja indicado em alguns casos em que o doador não pode ser anestesiado para o procedimento de punção. Complicações mais frequentes estão relacionadas ao uso do G-CSF, que pode causar dor óssea, cefaleia e febre (CASTRO JR, 2002).

A obtenção das CTH em sangue de cordão umbilical teve sua primeira experiência bem-sucedida de 1988, na França. Para sua utilização, o sangue é coletado logo após o nascimento da criança e “posteriormente processado e mantido congelado até a infusão”(CASTRO JR, 2002).

## 4 METODOLOGIA

Estudo observacional retrospectivo de pacientes indicados para transplante de medula óssea região de Ribeirão Preto/SP, que foram encaminhados para tipificação dos antígenos HLA de classe I e II ao Laboratório de HLA da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

### 4.1 Casuística

Um total de 949 pacientes foi tipificado pelo Laboratório de HLA do Hemocentro de Ribeirão Preto entre Janeiro de 2009 e Julho de 2018. Foram inicialmente incluídos todos os pacientes com registro de entrada no laboratório. Os critérios de exclusão seguiram: ausência da tipificação, por motivo da análise ter sido realizada em outros laboratórios ou não recebimento da amostra do paciente; e doença de base não descrita na base de dados do laboratório. Por um ou ambos os critérios de exclusão, os dados de 95 pacientes não foram incluídos no estudo.

A amostra total foi composta por 854 pacientes, sendo 57,0% de homens e 43,0% de mulheres, com faixa etária entre 0 e 77 anos, com idade média de  $29,1 \pm 18,8$  anos. Distribuídos etnicamente em 80,7% caucasianos, 11,6% de população parda, negros com 5,2%, e asiáticos e mulatos com 1,3% e 1,2%, respectivamente.

O número de pacientes indicados ao transplante em cada ano do estudo foi calculado, e apresentou um aumento do ano de 2009 até 2017, último ano com contabilização completa dos casos. As porcentagens variaram de 7,1% (2009), 7,7% (2010), 8,7% (2011), 11,1% (2012), 11,0% (2013), 10,6% (2014), 10,2% (2015), 12,5% (2016), 13,6% (2017), e no período parcial do ano de 2018, entre os meses de janeiro a julho, foram contabilizados 63 casos (7,5% do total).

Em relação à frequência de compatibilidade encontrada entre paciente e os relativos (parentes consanguíneos próximos) testados foi calculado em cima de 911 pacientes que tiveram a tipificação própria e dos relativos feita no Laboratório onde o estudo foi realizado. Entre esse total de pacientes, foi encontrada compatibilidade entre 36,9% dos casos, enquanto nos restantes 63,1%, não foi encontrada compatibilidade entre familiares tipificados.

## 4.2 Coleta de dados

O método de coleta dos resultados das tipificações foi análise do banco de dados interno do laboratório. As informações foram tabeladas contendo dados de ano de indicação ao transplante, data de nascimento, sexo, etnia, doença de base, compatibilidade com relativo, e resultado da tipificação dos antígenos de classe I, HLA-A, B e C, e de classe II, HLA-DRB1, DQA1 e DQB1.

Os dados coletados divididos de duas formas: a primeira, reunindo de forma geral por classe de antígeno (A, B, C, DRB1, DQA1, DQB2); e a segunda onde foi classificada a frequência dos antígenos por doença de base.

Para comparação com indivíduos saudáveis, foram utilizados dados disponibilizados no banco de dados AlleleFrequency Net Database (AFND). Para obtenção do dado de todos os antígenos estudados, foram utilizadas três populações descritas no AFND: “Brazil REDOME Sao Paulo (n=800809)” para os antígenos HLA-A, -B e -DRB1; “Brazi IMixed (n=108)” para o HLA-C; e a população “Brazil Sao Paulo Mixed (n=239)” para os HLA-DQA1 e -DQB1.

## 4.3 Análise estatística

A frequência antigênica (FA) foi calculada por contagem direta. As frequências encontradas na população estudada foram comparadas com as frequências de indivíduos saudáveis através do teste exato de Fisher, sendo considerado nível de significância igual a 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

As amostras que apresentaram resultado significativo pelo teste de Fisher foram corrigidas multiplicando o valor de  $p$  pelo número total de antígenos testados, e em seguida avaliados pela razão de possibilidade (OR, em inglês *odds ratio*) e intervalo de confiança 95%.

Todos os testes foram realizados utilizando o programa GraphPadPrism 5.0.

## 4.4 Considerações Éticas

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob o número 2.847.946.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Patologias de base indicadas no estudo

As patologias de base foram muito variadas, conforme descritos na tabela 01. Doenças com base diretamente ligada aos sistemas sanguíneo e hematopoiético, síndromes hereditárias, patologias oncológicas, doenças autoimunes ou deficiências de função ligadas às células do sangue. Algumas patologias que no presente estudo apareceram com menor prevalência não possuem indicação para o transplante de medula óssea, porém por motivos variados o procedimento pode beneficiar o paciente, como no caso da Diabetes Melitus tipo I e a Adrenoleucodistrofia.

Tabela 01 – Prevalência das patologias de base descritas nos pacientes do estudo.

<b>Doença de base</b>	<b>n (%)</b>
Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	169 (19,0)
Anemia Aplástica(AA)	145 (17,0)
Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	134 (15,8)
Anemia Falciforme (AF)	131 (15,4)
Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	52 (6,1)
Síndrome Mielodisplásica (SMD)	37 (4,3)
Mielofibrose	29 (3,4)
Leucemias não-classificadas	28 (3,3)
Linfoma não-Hodgkins	17 (2,0)
Linfoma Hodgkins	16 (1,9)
Linfomas não-classificados	14 (1,6)
Talasseмииas	14 (1,6)
Anemia Fanconi	8 (0,9)
Diabetes Melitus (DM)	8 (0,9)
Imunodeficiências	6 (0,7)
Mieloma Múltiplo (MM)	6 (0,7)
Síndrome Wiskott-Aldrich	6 (0,7)
Anemia Refratária	5 (0,6)
Leucemia Linfóide Crônica (LLC)	4 (0,5)
Adrenoleucodistrofia	3 (0,4)
Síndrome Hemofagocítica	3 (0,4)
Anemia Blackfan Diamond	2 (0,2)
Hipogamaglobulinemia não familiar	2 (0,2)

Síndrome de Chediak Higashi	2 (0,2)
Anemia Diseritropoética Congênita	1 (0,1)
Atrofia Muscular Espinhal (SMA)	1 (0,1)
Doença Granulomatosa Crônica (DGC)	1 (0,1)
Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN)	1 (0,1)
Hialinose Infantil Sistêmica (ISH)	1 (0,1)
Meduloblastoma	1 (0,1)
Mucopolidose II	1 (0,1)
Neuropatia Periférica	1 (0,1)
Pancitopenia	1 (0,1)
Porfíria	1 (0,1)
Síndrome de Benarol Souler	1 (0,1)
Síndrome de DiGeorge (SDG)	1 (0,1)
Telomeroparia	1 (0,1)

## 5.2 Frequências antigênicas dos *loci* HLA

As metodologias utilizadas pelo laboratório durante o período de corte estudado incluíram métodos sorológicos e moleculares, com isso, durante o levantamento da prevalência dos antígenos, em alguns casos tipificados por sorologia não foi possível identificar um dos antígenos, classificados como “*blank*” (antígenos não expressos) e demonstrados no estudo pelo sinal de hífen (-). Tais antígenos podem ser casos de homozigose ou antígenos não inclusos nos anticorpos monoclonais utilizados.

Para os 854 pacientes (n), foram identificados um total de 1706 antígenos (2n) por *locus*. O estudo apresentou 21 antígenos para o *locus* A; 33 antígenos para o *locus* B, onde foi encontrado maior polimorfismo; e 15 antígenos para o *locus* C. Em relação à classe II, o *locus* DRB1 apresentou 14 antígenos, e os *loci* DQA1 e DQB1 apresentaram 6 e 7 variações de antígenos, respectivamente. Os dados da frequência dos antígenos de classe I e II estão descritos nas tabelas 02 e 03.

Tabela 02 – Frequência antigênica (FA) da classe I. Em destaque estão os antígenos com maior prevalência

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
A*01	0,090	B*07	0,065	C*01	0,031
<b>A*02</b>	<b>0,249</b>	B*08	0,046	C*02	0,079

A*03	0,083	B*13	0,016	C*03	0,094
A*11	0,047	B*14	0,054	C*04	0,143
A*23	0,050	B*15	0,099	C*05	0,054
A*24	0,083	B*18	0,051	C*06	0,074
A*25	0,110	B*27	0,022	<b>C*07</b>	<b>0,242</b>
A*26	0,036	<b>B*35</b>	<b>0,103</b>	C*08	0,069
A*29	0,041	B*37	0,013	C*12	0,048
A*30	0,069	B*38	0,023	C*14	0,020
A*31	0,043	B*39	0,030	C*15	0,036
A*32	0,032	B*40	0,038	C*16	0,064
A*33	0,039	B*41	0,009	C*17	0,033
A*34	0,008	B*42	0,026	C*18	0,005
A*36	0,009	<b>B*44</b>	<b>0,099</b>	C*-	0,008
A*66	0,008	B*45	0,025		
A*68	0,065	B*46	0,0005		
A*69	0,002	B*47	0,003		
A*74	0,017	B*48	0,003		
A*80	0,005	B*49	0,032		
A*-	0,013	B*50	0,020		
		B*51	0,085		
		B*52	0,023		
		B*53	0,026		
		B*54	0,001		
		B*55	0,009		
		B*56	0,001		
		B*57	0,034		
		B*58	0,034		
		B*67	0,0005		
		B*73	0,002		
		B*81	0,006		
		B*-	0,001		

Tabela 03 – Frequência antigênica (FA) da classe II. Em destaque estão os antígenos com maior prevalência

HLA-DRB1		HLA-DQA1		HLA-DQB1	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
DRB1*01	0,087	<b>DQA1*01</b>	<b>0,401</b>	DQB1*02	0,202
DRB1*03	0,105	DQA1*02	0,133	<b>DQB1*03</b>	<b>0,331</b>
DRB1*04	0,112	DQA1*03	0,139	DQB1*04	0,063
<b>DRB1*07</b>	<b>0,136</b>	DQA1*04	0,066	DQB1*05	0,182
DRB1*08	0,066	DQA1*05	0,253	DQB1*06	0,218
DRB1*09	0,016	DQA1*06	0,008	DQB1*07	0,002
DRB1*10	0,015			DQB1*-	0,002

DRB1*11	0,138		
DRB1*12	0,017		
DRB1*13	0,115		
DRB1*14	0,039		
DRB1*15	0,113		
DRB1*16	0,036		
DRB1*-	0,005		

### 5.2.1 Frequência dos antígenos por patologia de base

Na segunda etapa do projeto, os pacientes foram subdivididos de acordo com a patologia de base (descritas na tabela 02), e para cada patologia, foi avaliada a frequência dos antígenos encontrados. Essas foram comparadas com as frequências da amostragem total, e foi encontrada concordância nas de maior prevalência, indicando que não foram identificados antígenos que caracterizem qualquer das patologias estudadas. Com o objetivo de gerar esse valor estatístico de comparação, o presente estudo descreveu as cinco patologias que apresentaram prevalência de mais de 5,0% dos pacientes estudados.

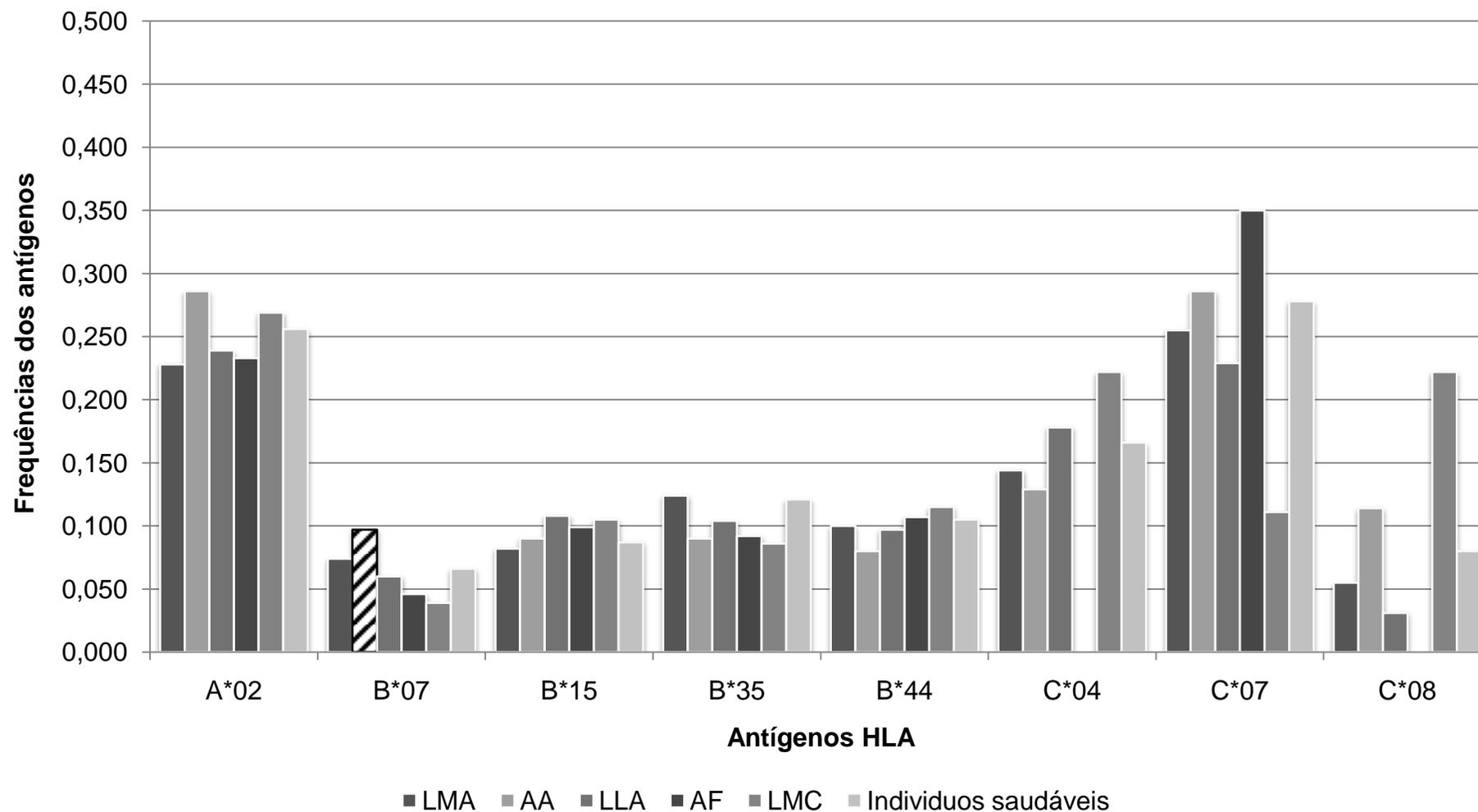
Ambos, a tabela 04e os gráficos 01 e 02,descrevem a frequência dos antígenos de maior prevalência entre essas patologias, comparados com a frequência de indivíduos saudáveis da mesma região e estado do estudo. Para HLA-A, HLA-DQA1 e HLA-DQB1, os antígenos de maior frequência foram os mesmo nas cinco patologias estudadas e na amostragem total, respectivamente A\*02, DQA1\*01 e DQB1\*03. O antígeno HLA-C\*07 foi o mais prevalente em 4 das 5 patologias (LMA, AA, LLA e AF), somente a LMC que indicou maior frequência nos antígenos C\*04 e C\*08 com prevalência igual. Os demais antígenos (HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1) variaram por patologia, sendo que na Leucemia Mielóide Aguda (LMA), os mais frequentes foram B\*35 e DRB1\*13; para a Anemia Aplástica foi encontrado um resultado diferente e discutível com a literatura nos outros antígenos, sendo os mais prevalentes o B\*07 e DRB1\*15; a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) apresentou B\*15 e DRB1\*07; na Anemia Falciforme (AF), B\*44 e DRB1\*07; e para a LeucemiaMielóide Crônica (LMC), os mais frequentes foram B\*35 e DRB1\*07.

Tabela 04 – Frequências dos antígenos mais prevalentes nas doenças comparados com a frequência encontrada nos indivíduos saudáveis. Em destaque estão os antígenos com valor de p significativo.

	LeucemiaMielóide aguda (n=169)		AnemiaAplástica (n=145)		Leucemialinfoide aguda (n=134)		Anemiafalciforme (n=131)		LeucemiaMielóide crônica (n=52)		Indivíduos saudáveis
	FA	p.	FA	p.	FA	p.	FA	p.	FA	p.	FA
HLA-A*02	<b>0,228</b>	<b>NS</b>	<b>0,286</b>	<b>NS</b>	<b>0,239</b>	<b>NS</b>	<b>0,233</b>	<b>NS</b>	<b>0,269</b>	<b>NS</b>	0,256 *
HLA-B*07	0,074	NS	0,097	0,0375	0,060	NS	0,046	NS	0,039	NS	0,066 *
HLA-B*15	0,082	NS	0,090	<b>NS</b>	<b>0,108</b>	NS	0,099	NS	0,105	NS	0,087 *
HLA-B*35	<b>0,124</b>	NS	0,090	NS	0,104	NS	0,092	NS	0,086	<b>NS</b>	0,121 *
HLA-B*44	0,100	NS	0,080	NS	0,097	<b>NS</b>	<b>0,107</b>	<b>NS</b>	<b>0,115</b>	NS	0,105 *
HLA-C*04	0,144	NS	0,129	NS	0,178	NS	0,000	<b>NS</b>	<b>0,222</b>	NS	0,166 **
HLA-C*07	<b>0,255</b>	<b>NS</b>	<b>0,286</b>	<b>NS</b>	<b>0,229</b>	<b>NS</b>	<b>0,350</b>	NS	0,111	<b>NS</b>	0,278 **
HLA-C*08	0,055	NS	0,114	NS	0,031	NS	0,000	<b>NS</b>	<b>0,222</b>	NS	0,080 **
HLA-DRB1*07	0,113	NS	0,115	<b>NS</b>	<b>0,164</b>	<b>NS</b>	<b>0,145</b>	<b>NS</b>	<b>0,144</b>	<b>NS</b>	0,127 *
HLA-DRB1*13	<b>0,128</b>	NS	0,084	0,0141	0,108	NS	0,130	<b>NS</b>	<b>0,144</b>	NS	0,133 *
HLA-DRB1*15	0,113	NS	0,184	< 0,0001	0,093	NS	0,069	NS	0,096	NS	0,094 *
HLA-DQA1*01	<b>0,401</b>	<b>NS</b>	<b>0,414</b>	<b>NS</b>	<b>0,387</b>	<b>NS</b>	<b>0,392</b>	<b>NS</b>	<b>0,417</b>	<b>NS</b>	0,474 ***
HLA-DQB1*03	<b>0,313</b>	<b>NS</b>	<b>0,346</b>	<b>NS</b>	<b>0,306</b>	<b>NS</b>	<b>0,326</b>	<b>NS</b>	<b>0,405</b>	<b>NS</b>	0,288 ***

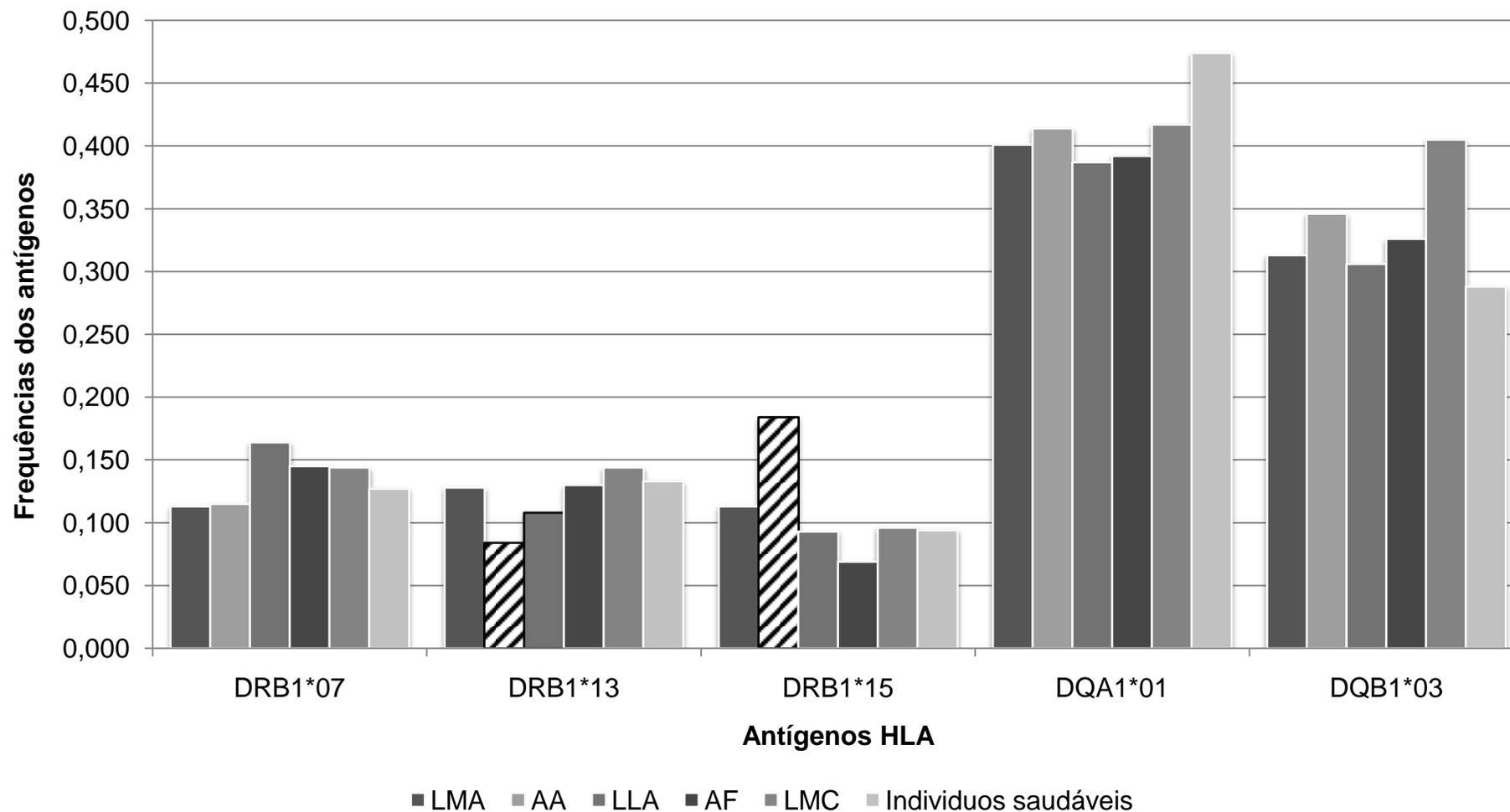
Legenda: FA, frequência antigênica; p., valor de p calculado pelo teste exato de Fisher, sem correção; NS, não significativo; \*, População controle Brazil REDOME Sao Paulo (n=800809); \*\*, População controle Brazil Mixed (n=108); \*\*\*, População controle Brazil Sao Paulo Mixed (n=239).

Gráfico 01 – Representação gráfica da tabela 05: frequências dos antígenos de classe I.



Legenda: Representação da frequência dos antígenos de classe I mais prevalentes das cinco patologias mais encontradas, comparadas com a frequência dos mesmos antígenos em indivíduos saudáveis. No caso dos antígenos HLA-C\*04 e C\*08, não foram encontrados em pacientes com Anemia Falciforme. O valor de p entre a frequência do antígeno B\*07 de pacientes com Anemia Aplástica e indivíduos saudáveis se mostrou significante antes da correção (destacado no gráfico com padrão).

Gráfico 02 – Representação gráfica da tabela 05: frequências dos antígenos de classe II.



Legenda: Representação da frequência dos antígenos mais prevalentes de classe II das cinco patologias mais encontradas, comparadas com a frequência dos mesmos antígenos em indivíduos saudáveis. Os antígenos DRB1\*13 e DRB1\*15 destacados apresentaram valor de p significativo antes da correção.

### 5.2.1 Associação entre HLA e doenças na população estudada

A associação foi realizada entre os antígenos com maior prevalência, e avaliada por frequência, e valor de p calculado pelo teste exato de Fisher (p-value), sendo considerados significantes os resultados com valor de  $p < 0,05$ . Seguindo esses parâmetros, somente entre pacientes com Anemia Aplástica foram encontrados valores de p (p-value) significantes para a análise, nos antígenos HLA-B\*07, que apresentou  $p = 0,0375$ ; DRB1\*13,  $p = 0,0141$ ; e o DRB1\*15, que apresentou um resultado de  $p < 0,0001$ . As outras comparações resultaram em valores não significativos.

Os três antígenos que apresentaram resultado significativo para o teste de Fisher tiveram seu valor de p corrigido com o total de antígenos pesquisados, e foram avaliados pela razão de possibilidades (OR, do inglês *odds ratio*) e intervalo de confiança 95%. Esses dados foram descritos na tabela 05.

Os valores da razão de possibilidade (OR) indicaram o que pode ser observado pelas frequências antigênicas, que os HLA-B\*07 e DRB1\*15 expressaram uma associação positiva com a patogênese da Anemia Aplástica, enquanto o DRB1\*13 indicou uma associação negativa. Quando corrigidos, os valores de p dos antígenos HLA-B\*07 e HLA-DRB1\*13 apresentaram resultados não significativos, 0,9750 e 0,2256, respectivamente. No caso do HLA-DRB1\*15, o resultado continuou significativo a  $p < 0,5$  depois de corrigido.

Tabela05 – Análise estatística dos antígenos que apresentaram resultados significantes para o teste de Fisher (tabela 05). Destacado está o valor que permaneceu significativo após a correção.

	FA	p.	pc.	OR	95% CI
HLA-B*07	0,097	0,0375	0,9750 <b>NS</b>	1,5124	1,0242 – 2,1333
HLA-DRB1*13	0,084	0,0141	0,2256 <b>NS</b>	0,5926	0,3902 – 0,9001
HLA-DRB1*15	0,184	< 0,0001	< 0,0016	2,1737	1,6134 – 2,9288

Legenda: FA, frequência antigênica; p., valor de p calculado pelo teste exato de Fisher, sem correção; pc., valor de p corrigido com a multiplicação pelo número de antígenos testados; OR, razão de possibilidades; CI, intervalo de confiança; NS, não significativo.

Os dados brutos da frequência antigênica das cinco patologias comparadas nessa sessão do trabalho estão descritas no anexo como Tabelas A01, A02, A03, A04, A05.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os antígenos HLA de classe I e II em pacientes que foram indicados ao transplante de medula óssea por motivos e patologias variadas. O objetivo principal era avaliar a frequência dos antígenos comparando com a de indivíduos saudáveis da mesma região. De forma similar a estudos realizados em outras populações brasileiras (BORTOLOTTO et al, 2012; CARVALHO et al, 2013; NUNES et al, 2016; TORRES et al, 2017) ou de outras nacionalidades (ANDRIC et al, 2014; GOURRAUD et al, 2015; KWOW et al, 2016), esses resultados contribuem para a caracterização fenotípica do sistema HLA na população.

Para a amostragem total de 854 pacientes (n), foram descritos 1706 antígenos (2n) por *locus*. O *locus* B foi o mais polimórfico dentro do estudo, o que concorda com o que foi descrito por Acuña-Alonzo et al (2006).

Quando comparado com outros estudos realizados em população brasileira de outros estados, os resultados desse estudo foram concordantes. Como no estudo de Dalalio et al (2002), realizado em uma população de doadores de medula óssea, da região de Curitiba e Norte/Noroeste do Estado do Paraná, que avaliou pelo método sorológico as frequências dos antígenos HLA-A e HLA-B. Nesse estudo foram encontrados como os antígenos de maior prevalência os HLA-A\*02, com frequência genotípica de 0,293; B\*35, frequente em 0,119 da população; e B\*44, com frequência similar ao anterior de 0,118. Esses resultados foram condizentes com os do presente estudo, que apresentou respectivamente as frequências 0,249, 0,103 e 0,099.

Em um estudo realizado em doadores voluntários de medula óssea do estado do Maranhão (FERREIRA, 2007), os mesmos antígenos foram identificados como mais frequentes, tendo como frequência para o HLA-A\*02, 0,249; HLA-B\*35, 0,092; e HLA-B\*44, 0,094. Esse estudo também avaliou a frequência do antígeno DRB1, e essas foram concordantes com os pacientes desse estudo na frequência dos antígenos mais prevalente: HLA-DRB1\*07, com frequência de 0,128 comparada com a de 0,136 encontrada no presente estudo; e para o HLA-DRB1\*13, com frequência de 0,106 nos doadores para 0,115 nos pacientes.

Em outro estudo similar foi realizada o levantamento dos dados dos alelos HLA em dois grupos, pacientes na fase pré-transplante e doadores voluntários de medula óssea, em uma população do estado de São Paulo, atendida pelo Laboratório de Histocompatibilidade do Hospital do Câncer de Barretos (CAMPAGNUOLO; CITA; COLOMBO, 2018). Os resultados comparados entre os antígenos mais frequentes de ambos os estudos estão descritos no quadro 01.

Quadro 01 –Comparação entre frequências de pacientes e indivíduos saudáveis.

Antígeno	*	**	***
HLA-A*02	0,249	0,311	0,296
HLA-B*35	0,103	0,099	0,123
HLA-B*44	0,099	0,109	0,117
HLA-C*07	0,242	0,273	0,296
HLA-DRB1*01	0,087	0,132	0,153
HLA-DRB1*07	0,136	0,158	0,122
HLA-DRB1*13	0,115	0,169	0,127
HLA-DRB1*15	0,113	0,104	0,127
HLA-DQB1*03	0,331	0,269	0,265
HLA-DQB1*06	0,218	0,254	0,250

Legenda: \*, frequência dos antígenos dos pacientes inclusos do estudo atual; \*\*, frequência dos antígenos dos pacientes na fase pré-transplante do estudo de Barretos; \*\*\*, frequência dos antígenos dos doadores voluntários de medula óssea do estudo de Barretos. (CAMPAGNUOLO; CITA; COLOMBO, 2018)

Em relação à associação com patologias, Patiroğlu e Akar (2016) descreveram os alelos e haplótipos dos *locus* A, B e DRB1 de pacientes com Leucemia linfoblástica aguda (LLA) numa população da Turquia. Nesse estudo encontraram maior prevalência nos alelos HLA-A\*03, B\*35 e DRB1\*04. Quando comparara com um grupo controle sem a patologia, o *locus* B apresentou uma frequência similar, e não teve resultado significativo na comparação. Os valores de p para os outros dois *locus* foram 0,002 para ambos, portanto indicando associação positiva com a doença. A mesma análise foi realizada para associação negativa, e os alelos HLA-A\*23, B\*13 e B\*40, DRB1\*13, com valores de p igual 0,002, 0,007, 0,002 e 0,003, respectivamente. No presente estudo, os *locus* descritos por Patiroğlu e Akar foram avaliados, porém apresentaram como

correlação não significativa com a patogênese da LLA e de outras patologias.

Um estudo mexicano (FERNÁNDEZ-TORRES et al, 2013) relacionou o *locus* B, em destaque ao alelo B\*40, com Leucemias agudas, e encontrou associações positivas e negativas entre os alelos e as doenças nas formas Linfóides e Mielóides. Os valores de p mais significantes ( $p = 0,0001$ ) foram entre os alelos HLA-B\*15, com associação negativa, e o B\*27 com associação positiva com a Leucemia Mielóide aguda (LMA). Em relação ao B\*40, ele apresentou uma associação com ambas as Leucemias. Nos pacientes com LMA do estudo, ambos os alelos se apresentaram com valor de p não significantes quando comparado com o grupo controle. A conclusão do trabalho de Fernández-Torres (2013) que diz que o alelo HLA-B\*40 parece um possível biomarcador para Leucemias agudas não foi encontrada na população do presente estudo.

Quanto à associação positiva encontrada nesse estudo entre o antígeno HLA-DRB1\*15 e a Anemia Aplástica ( $p < 0,0016$ , OR = 2,1737), a mesma já foi avaliada e discutida em outros artigos da literatura (DHALIWAL et al, 2011; FERNÁNDEZ-TORRES et al, 2012; OGUZ et al, 2002; SAUNTHARARAJAH et al, 2002; SUGIMORI et al, 2007).

## CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo levantar a frequências dos antígenos HLA de uma amostra de pacientes da região de Ribeirão Preto, buscando verificar as correlações entre os antígenos e as patologias de base de casa paciente. Com isso, visando identificar fenótipos relacionados a expressão dos antígenos, comparando isso com a literatura já reportada no tema.

Os antígenos mais prevalentes tipificados nos 854 pacientes do estudo da região de Ribeirão Preto foram os HLA-A\*02, B\*35 e B\*44, C\*07, DRB1\*07, DQA1\*01 e DQB1\*03. Os resultados das frequências se apresentaram em concordância com a de indivíduos saudáveis da região, quando comparados com indivíduos cadastrados como doadores voluntários pelo REDOME.

Para a associação positiva que foi encontrada entre a frequência do antígeno HLA-DRB1\*15 nos pacientes de Anemia Aplástica e no grupo controle de doadores voluntários de medula óssea cadastrados como residentes no estado de São Paulo, embora já descrita na literatura, precisa ser confirmada com estudos em um grupo maior de pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA-ALONZO, V. et al. Variación del HLA-B em poblaciones mexicanas. **Bioquimia**, v. 31, n. 2, p. 49-58, 2006.
- ANDERS, J. C. O transplante de medula óssea e suas repercussões na qualidade de vida de crianças e adolescentes que o vivenciaram. 2004. 203 f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- ANDRIC, Z. et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and –DQB1 allele and haplotype frequencies in the Serbian population. **Human Immunology**, v. 75, p. 218-226, 2014.
- BONTADINI, A. HLA techniques: Typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. **Methods**, v. 56, p. 471-76, 2012.
- BOQUETT, J. A. Perfil HLA na população do Rio Grande do Sul: Diversidade genética e potencial impacto na gestão de Transplante de Medula Óssea. 2017. 59 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- BORTOLOTTI, A. S. et al. HLA-A, -B and –DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul. **Human Immunology**, v. 73, p. 180-85, 2012.
- CAMPAGNUOLO, D. G.; CITA, R. F.; COLOMBO, T. E. Frequência dos alelos do sistema antígeno leucocitário humano em doadores e pacientes pré-transplante de medula óssea. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 25, n. 1, p. 71-75, 2018.
- CARVALHO, M. G. et al. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies in Piauí's volunteer bone marrow donors enrolled at the Brazilian registry. **Human Immunology**, v. 74, p. 1598-1602, 2013.
- CASTRO Jr, C. G; GREGIANIN, L. J.; BRUNETTO, A. L. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 345-60, 2001.
- \_\_\_\_\_. Análise clínica e epidemiológica do transplante de medula óssea no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. 2002. 161 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- CORGOZINHO, M. M.; GOMES, J. R. A. A.; GARRAFA, V. Transplantes de Medula Óssea no Brasil: Dimensão Bioética. **Rev. Latinoam. Bioet.**, Nueva Granada, v. 12, n. 1, p. 36-45, 2012.
- COUTINHO, A. P. Avaliação econômica da implantação da Unidade de Ambiente Protetor destinado a pacientes submetidos a transplante de medula óssea. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

DALALIO, M. M. O. et al. Frequência dos antígenos HLA- A e HLA- B em populações das regiões de Curitiba e Norte/Noroeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 3, p. 743-748, 2002.

DELLALIBERA, E. Polimorfismo de Genes HLA Classe II (DRB1, DQA1 e DQB1) e Associação com Doenças Parasitárias na População do Estado de Pernambuco. 2004. 104 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

DESHPANDE, A. The Human Leukocyte Antigen System...Simplified. **Global Journal of Transfusion Medicine**, v. 2, n. 2, p. 77-88, 2017.

DHALIWAL, J. S. et al. Susceptibility to aplastic Anemia is associated with HLA-DRB1\*15 in an aboriginal population in Sabah, Malaysia. **Human Immunology**, v. 72, p. 889-892, 2011.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 7-18, 2000.

EID, K. A. B. Seleção dos pacientes e doadores para transplante de medula óssea alogênico aparentado na unidade de transplante de medula óssea na Universidade Estadual de Campinas. 2002. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ERLICH, H. A. HLA typing using next generation sequencing: An overview. **Human Immunology**, v. 76, p. 887-890, 2015.

FAÉ, K.C.; DRIGO, A.S.; GOLDBERG, A.C. Associação entre antígenos HLA e doenças específicas. In: Vários colaboradores. **Diagnóstico e tratamento**, volume 1, 1 ed, Barueri: Manole, 2006, p. 356-363.

FERNANDES, A. P. M. et al. Como Entender a Associação Entre o Sistema HLA e as Doenças Auto-Imunes Endócrinas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 5, p. 601-11, 2003.

FERNÁNDEZ-TORRES, J. et al. The ancestry of the HLA-DRB1\*15 allele predisposes the Mexican mestizo to the development of aplastic Anemia. **Human Immunology**, v. 73, p. 840-43, 2012.

\_\_\_\_\_. et al. HLA-B\*40 Allele Plays a Role in the Development of Acute Leukemia in Mexican Population: A Case-Control Study. **BioMedResearch International**, v. 2013, 1-6, 2013.

FERREIRA, F. L. Polimorfismo Genético do Sistema HLA em uma amostra de Doadores Voluntários de Medula Óssea do Maranhão. 2007. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2007.

- GERMAIN, R. N. MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T Lymphocyte Activation. **Cell**, Cambridge, v. 76, p. 287-299, 1994.
- GHODKE, Y. et al. HLA and disease. **European Journal of Epidemiology**, v. 20, p. 475-488, 2005.
- GOURRAUD, P. et al. High-resolution HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies from the French Bone Marrow Donor Registry. **Human Immunology**, v. 76, 381-384, 2015.
- HARDY, R. E.; IKPEAZU, E. V. Bone Marrow Transplantation: A Review. **Jornal of the National Medical Association**, v. 81, n. 5, p. 518-23, 1989.
- JONGSMA, M. L. M.; GUARDA, G.; SPAAPEN, R. M. The regulatory network behind MHC class I expression. **Molecular Immunology** [online], In Press, Available online Dec 2017.
- KELLY, A.; TROWSDALE, J. Introduction: MHC/KIR and governance of specificity. **Immunogenetics**, Cambridge, v. 69, p. 481-88, 2017.
- KRANSDORF, E. P. et al. HLA Population Genetics in Solid Organ Transplantation. **Transplantation**, Philadelphia, v. 101, n. 9, p. 1971-76, 2017.
- KREBSBACH, P. H. et al. Bone Marrow Stromal Cells: Characterization and Clinical Application. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.12, n. 2, p. 165-81, 1999.
- KWOK, J. et al. HLA-A, -B, -C and -DRB1 genotyping and haplotype frequencies for a Hong Kong Chinese population of 7595 individuals. **Human Immunology**, v. 77, p. 1111-1112, 2016.
- MARINHO, D. H. Complicações precoces do transplante de células tronco hematopoiética não aparentado em pacientes pediátricos. 2013. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- MARSH, S. G. E.; PARHAM, P.; BARBER, L. D. The HLA FactsBook, volume 1, 1 ed, Cambridge: Academic Press, 2000, 416 p.
- MEINERZ, C. et al. Avaliação do percentual de compatibilidade HLA entre membros da mesma família para pacientes à espera de transplante de medula óssea em Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 5, p. 359-62, 2008.
- NUNES, K. et al. Population variation of HLA genes in rural communities in Brazil, the Quilombos from the Vale do Ribeira, São Paulo – Brazil. **Human Immunology**, v. 77, p. 447-448, 2016.
- OGUZ, F. S. et al. HLA-DRB1\*15 and pediatric aplastic Anemia. **Haematologica**, v. 87, n. 7, p. 772-4, 2002.
- OLIVEIRA, E. A.; SELL, A. M. Os antígenos HLA e a hemoterapia. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 3, p. 731-736, 2002.

OLIVEIRA-CARDOSO, E. A. et al. Qualidade de Vida de Sobreviventes do Transplante de Medula Óssea (TMO): Um Estudo Prospectivo. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 25, n. 4, p. 621-28, 2009.

PATIROĞLU, T.; AKAR, H. H. The Frequency of HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 Alleles in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in the Turkish Population: A Case-Control Study. **Turk J Hematol**, v. 33, p. 339-345, 2016.

PEREIRA, N. F. et al. Seleção de doador de medula óssea ou sangue periférico. **Rev. Bras. Hematol.Hemoter.**[online], v. 32, suppl. 1, p. 03-05, 2010.

PICASCIA, A.; GRIMALDI, V.; NAPOLI, C. From HLA typing to anti-HLA antibody detection and beyond: The road ahead. **Transplantation Reviews**, v. 30, p. 187-194, 2016.

SANCHEZ-MAZAS, A.; MEYER, D. The Relevance of HLA Sequencing in Population Genetics Studies. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

SAUNTHARARAJAH, Y. et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic Anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1570-74, 2002.

SCHLOSSTEIN, L. et al. High association of na HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. **N Engl J Med**, Massachusetts, v. 288, n. 14, p. 704-6, 1973.

SOUZA, G. P. S. C. M. Caracterização Epidemiológica e estudos de fármacos utilizados em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea em um Hospital Público de Curitiba – Paraná. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SUGIMORI, C. et al. Roles of DRB1\*1501 and DRB1\*1502 in the pathogenesis of aplastic Anemia. **Experimental Hematology**, v. 35, p. 13-20, 2007.

TINCKAM, K. Histocompatibility methods. **Transplantation Reviews**, v. 23, p. 80-93, 2009.

TORRES, L. et al. Distribution of HLA-A, -B and -DRB1 antigenic groups and haplotypes from the Brazilian bone marrow donor registry (REDOME). **Human Immunology**, v. 78, p. 602-609, 2017.

TORRES, M. A.; MORAES, M. E. H. Nomenclatura dos fatores do sistema HLA. **Einstein**, São Paulo, v. 9, n. 2 pt 1, p. 249-51, 2011.

UNDLIEN, D. E.; LIE, B. A.; THORSBY, E. HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved?. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 2, p. 93-100, 2001.

VOLTARELLI, J. C.; STRACIERI, A. B. P. L. Aspectos imunológicos dos transplantes de células troncohematopoéticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 443-62, 2000.

## ANEXOS

Tabela A01 – Frequência antigênica (FA) dos pacientes com Leucemia Mielóide aguda (LMA).

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
A*01	0,110	B*07	0,074	C*01	0,034
A*02	0,228	B*08	0,059	C*02	0,078
A*03	0,065	B*13	0,032	C*03	0,089
A*11	0,048	B*14	0,038	C*04	0,144
A*23	0,035	B*15	0,082	C*05	0,067
A*24	0,084	B*18	0,044	C*06	0,089
A*25	0,003	B*27	0,021	C*07	0,255
A*26	0,041	B*35	0,124	C*08	0,055
A*29	0,044	B*37	0,030	C*12	0,044
A*30	0,062	B*38	0,015	C*15	0,034
A*31	0,035	B*39	0,021	C*16	0,055
A*32	0,041	B*40	0,021	C*17	0,034
A*33	0,065	B*41	0,015	C*18	0,022
A*34	0,006	B*42	0,027		
A*36	0,021	B*44	0,100		
A*66	0,009	B*45	0,027		
A*68	0,065	B*47	0,003		
A*69	0,003	B*49	0,021		
A*74	0,012	B*50	0,024		
A*80	0,005	B*51	0,079		
A*-	0,018	B*52	0,018		
		B*53	0,027		
		B*54	0,003		
		B*55	0,012		
		B*57	0,033		
		B*58	0,035		
		B*81	0,009		
		B*-	0,006		
HLA-DRB1		HLA-DQA1		HLA-DQB1	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
DRB1*01	0,089	DQA1*01	0,401	DQB1*02	0,212
DRB1*03	0,125	DQA1*02	0,114	DQB1*03	0,313
DRB1*04	0,110	DQA1*03	0,121	DQB1*04	0,074
DRB1*07	0,113	DQA1*04	0,073	DQB1*05	0,165
DRB1*08	0,065	DQA1*05	0,287	DQB1*06	0,233
DRB1*09	0,012	DQA1*06	0,004	DQB1*-	0,003
DRB1*10	0,012				

DRB1*11	0,145		
DRB1*12	0,015		
DRB1*13	0,128		
DRB1*14	0,045		
DRB1*15	0,113		
DRB1*16	0,020		
DRB1*-	0,008		

Tabela A02 – Frequência antigênica (FA) dos pacientes com Anemia Aplástica (AA).

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
A*01	0,066	B*7	0,097	C*01	0,014
A*02	0,286	B*8	0,048	C*02	0,086
A*03	0,093	B*13	0,014	C*03	0,071
A*11	0,038	B*14	0,065	C*04	0,129
A*23	0,035	B*15	0,090	C*05	0,057
A*24	0,090	B*18	0,076	C*06	0,043
A*25	0,014	B*27	0,003	C*07	0,286
A*26	0,027	B*35	0,090	C*08	0,114
A*29	0,038	B*37	0,007	C*12	0,043
A*30	0,072	B*38	0,017	C*15	0,043
A*31	0,038	B*39	0,024	C*16	0,086
A*32	0,041	B*40	0,083	C*17	0,014
A*33	0,021	B*41	0,007	C*-	0,014
A*34	0,014	B*42	0,007		
A*36	0,017	B*44	0,080		
A*66	0,007	B*45	0,014		
A*68	0,072	B*48	0,007		
A*74	0,021	B*49	0,020		
A*-	0,010	B*50	0,017		
		B*51	0,090		
		B*52	0,024		
		B*53	0,048		
		B*55	0,003		
		B*57	0,020		
		B*58	0,042		
		B*81	0,007		
HLA-DRB1		HLA-DQA1		HLA-DQB1	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
DRB1*01	0,045	DQA1*01	0,414	DQB1*02	0,171
DRB1*03	0,097	DQA1*02	0,108	DQB1*03	0,346
DRB1*04	0,111	DQA1*03	0,190	DQB1*04	0,060

DRB1*05	0,003	DQA1*04	0,051	DQB1*05	0,141
DRB1*06	0,003	DQA1*05	0,233	DQB1*06	0,274
DRB1*07	0,115	DQA1*06	0,004	DQB1*08	0,004
DRB1*08	0,053			DQB1*11	0,004
DRB1*09	0,035				
DRB1*10	0,010				
DRB1*11	0,163				
DRB1*12	0,017				
DRB1*13	0,084				
DRB1*14	0,038				
DRB1*15	0,184				
DRB1*-	0,007				

Tabela A03 – Frequência antigênica (FA) dos pacientes com LeucemiaLinfóide aguda (LLA).

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
A*01	0,108	B*07	0,060	C*01	0,031
A*02	0,239	B*08	0,063	C*02	0,042
A*03	0,093	B*13	0,008	C*03	0,104
A*11	0,045	B*14	0,056	C*04	0,178
A*23	0,064	B*15	0,108	C*05	0,062
A*24	0,079	B*18	0,034	C*06	0,062
A*25	0,015	B*27	0,015	C*07	0,229
A*26	0,037	B*35	0,104	C*08	0,031
A*29	0,037	B*37	0,004	C*12	0,052
A*30	0,048	B*38	0,034	C*14	0,042
A*31	0,045	B*39	0,034	C*15	0,021
A*32	0,037	B*40	0,030	C*16	0,073
A*33	0,037	B*41	0,022	C*17	0,052
A*34	0,004	B*42	0,037	C*-	0,021
A*36	0,004	B*44	0,097		
A*66	0,015	B*45	0,034		
A*68	0,064	B*47	0,004		
A*74	0,018	B*48	0,007		
A*80	0,004	B*49	0,037		
A*-	0,007	B*50	0,008		
		B*51	0,078		
		B*52	0,022		
		B*53	0,011		
		B*55	0,007		
		B*57	0,044		
		B*58	0,030		

HLA-DRB1		HLA-DQA1		HLA-DQB1	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
DRB1*01	0,067	DQA1*01	0,387	DQB1*02	0,216
DRB1*03	0,127	DQA1*02	0,165	DQB1*03	0,306
DRB1*04	0,086	DQA1*03	0,122	DQB1*04	0,068
DRB1*07	0,164	DQA1*04	0,071	DQB1*05	0,176
DRB1*08	0,071	DQA1*05	0,250	DQB1*06	0,216
DRB1*09	0,019	DQA1*06	0,005	DQB1*07	0,014
DRB1*10	0,023			DQB1*-	0,004
DRB1*11	0,149				
DRB1*12	0,026				
DRB1*13	0,108				
DRB1*14	0,037				
DRB1*15	0,093				
DRB1*16	0,026				
DRB1*-	0,004				

Tabela A04 – Frequência antigênica (FA) dos pacientes com Anemia falciforme (AF).

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
A*01	0,080	B*07	0,046	C*01	0,050
A*02	0,233	B*08	0,038	C*02	0,100
A*03	0,092	B*13	0,004	C*03	0,200
A*11	0,050	B*14	0,053	C*05	0,050
A*23	0,088	B*15	0,099	C*06	0,050
A*24	0,072	B*18	0,034	C*07	0,350
A*25	0,008	B*27	0,027	C*12	0,100
A*26	0,019	B*35	0,092	C*15	0,050
A* 29	0,026	B*37	0,011	C*16	0,050
A*30	0,103	B*38	0,011		
A*31	0,057	B*39	0,015		
A*32	0,019	B*40	0,034		
A*33	0,042	B*41	0,004		
A*34	0,008	B*42	0,031		
A*36	0,004	B*44	0,107		
A*66	0,004	B*45	0,038		
A*68	0,061	B*47	0,008		
A*74	0,015	B*49	0,042		
A*80	0,011	B*50	0,019		

A*-	0,008	B*51	0,088		
		B*52	0,046		
		B*53	0,042		
		B*55	0,004		
		B*56	0,004		
		B*57	0,038		
		B*58	0,050		
		B*67	0,004		
		B*81	0,011		
HLA-DRB1		HLA-DQA1		HLA-DQB1	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
DRB1*01	0,095	DQA1*01	0,392	DQB1*02	0,219
DRB1*03	0,103	DQA1*02	0,136	DQB1*03	0,326
DRB1*04	0,134	DQA1*03	0,153	DQB1*04	0,067
DRB1*07	0,145	DQA1*04	0,062	DQB1*05	0,194
DRB1*08	0,080	DQA1*05	0,240	DQB1*06	0,194
DRB1*09	0,011	DQA1*06	0,017		
DRB1*10	0,019				
DRB1*11	0,111				
DRB1*12	0,019				
DRB1*13	0,130				
DRB1*14	0,038				
DRB1*15	0,069				
DRB1*16	0,046				

Tabela A05 – Frequência antigênica (FA) dos pacientes com Leucemia Mielóide crônica (LMC).

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
A*01	0,115	B*07	0,039	C*02	0,056
A*02	0,269	B*08	0,020	C*03	0,056
A*03	0,087	B*13	0,020	C*04	0,222
A*11	0,019	B*14	0,077	C*05	0,111
A*23	0,048	B*15	0,105	C*06	0,056
A*24	0,067	B*18	0,077	C*07	0,111
A*25	0,019	B*27	0,039	C*08	0,222
A*26	0,058	B*35	0,086	C*16	0,166
A*29	0,038	B*37	0,030		
A*30	0,086	B*38	0,030		
A*31	0,010	B*39	0,030		
A*32	0,029	B*40	0,039		
A*33	0,010	B*42	0,030		

A*66	0,010	B*44	0,115		
A*68	0,077	B*45	0,039		
A*69	0,010	B*49	0,048		
A*74	0,019	B*50	0,010		
A*-	0,029	B*51	0,039		
		B*52	0,010		
		B*53	0,020		
		B*57	0,067		
		B*58	0,010		
		B*73	0,020		
HLA-DRB1		HLA-DQA1		HLA-DQB1	
Antígeno	FA	Antígeno	FA	Antígeno	FA
DRB1*01	0,077	DQA1*01	0,417	DQB1*02	0,122
DRB1*03	0,067	DQA1*02	0,139	DQB1*03	0,405
DRB1*04	0,155	DQA1*03	0,139	DQB1*04	0,054
DRB1*07	0,144	DQA1*04	0,069	DQB1*05	0,243
DRB1*08	0,067	DQA1*05	0,222	DQB1*06	0,176
DRB1*10	0,029	DQA1*06	0,014	DQB1*02	0,122
DRB1*11	0,096				
DRB1*12	0,019				
DRB1*13	0,144				
DRB1*14	0,048				
DRB1*15	0,096				
DRB1*16	0,058				