

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**PERFIL HLA NA POPULAÇÃO DO RIO GRANDE DO SUL: DIVERSIDADE GENÉTICA
E POTENCIAL IMPACTO NA GESTÃO DE TRANSPLANTES DE MEDULA ÓSSEA**

JULIANO ANDRÉ BOQUETT

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau do Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. LAVÍNIA SCHÜLER-FACCINI
CO-ORIENTADOR: PROF^o. DR. NELSON JURANDI ROSA FAGUNDES

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Antropologia, Genética e História do Povoamento (AGP) da Universidade de Genebra (UniGe), Suíça, com a colaboração do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Este projeto contou com suporte financeiro do INCT-INaGeMP e Ministério de Ciências e Tecnologia/CNPq, (grants no. 476978/2008-4).

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pelo Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Lavínia, pela confiança e disposição em me orientar neste projeto e por todas as oportunidades de crescimento que me proporcionou. Tu és um exemplo e ser seu orientado é, mais uma vez, um privilégio!

Ao professor Nelson Fagundes, por ter aceitado prontamente a me co-orientar sendo fundamental para a realização deste trabalho. Pelo companheirismo e pelas mais variadas discussões nos intervalos, tornando o ambiente de trabalho sempre agradável.

À Tábita Hunemeier pelo incentivo e fundamental contribuição no início deste trabalho.

Ao Marcelo Zagonel por todo empenho e disposição dispensados na realização deste trabalho, sempre com muito bom humor e paciência.

Aos professores Alícia Sacher-Mazas e José Manuel Nunes que me receberam muito bem no Laboratório de Antropologia, Genética e História do Povoamento na Universidade de Genebra. Sua colaboração foi imprescindível para a execução deste trabalho, além de ter sido uma experiência muito valiosa ter trabalhado em seu laboratório. Ao amigo Nuno Silva, por sua amizade e acolhimento em Genebra.

Ao professor Luiz Fernando Jobim e todo o Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que através de sua colaboração tornaram possível a realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao Elmo, sempre disposto a resolver qualquer problema e ajudar os alunos do programa.

Aos colegas do laboratório 113 que colaboram para um clima descontraído e agradável.

Aos meus pais e meu irmão, por todo o apoio e suporte. Em especial à minha mãe, minha orientadora da vida, a quem dedico este trabalho.

À Juliana por me acompanhar nessa jornada, por todo o apoio e incentivo. Muito obrigado!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	7
Capítulo 1 – Introdução	10
1.1 Sistema HLA	11
1.2 Estrutura e Função	11
1.3 Polimorfismos no HLA	15
1.4 Nomenclatura do HLA	18
1.5 Evolução do Sistema HLA	20
1.6 Importância médica do HLA	22
1.6.1 TCTH – Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas	22
1.6.2 Doenças associadas ao MHC	26
1.7 Estudos de Diversidade Genética no Rio Grande do Sul	28
Capítulo 2 – Justificativa	30
Capítulo 3 – Objetivos	32
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
Capítulo 4 – <i>Self-assessment of color categories and its relationship with HLA profiling in Brazilian bone marrow donors</i>	34
Capítulo 5 – <i>The HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in a large dataset of South Brazil bone marrow donors from Rio Grande do Sul</i>	44
Capítulo 6 – Análise de estrutura genética espacial HLA e sua correlação com doenças autoimunes no Rio Grande do Sul	93
Capítulo 7 – Discussão	168
Referências Bibliográficas	177
Anexo	186

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC – *Approximate Bayesian Computation*
- BF – Fator B (*B factor*)
- BMDW – Banco Mundial de Doadores de Medula Óssea (*Bone Marrow Donors Worldwide*)
- CNV – Variação no número de cópias (*Copy Number Variation*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- GVHD – Doença do enxerto contra o hospedeiro (*Graft versus host disease*)
- GWAS – Estudos de associação de todo o genoma (*Genome-wide association studies*)
- HLA – Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- IPD-IMGT/HLA – *Immuno Polymorphism Database - ImMunoGeneTics HLA*
- Kb – Kilobases
- LTA – Linfotóxina alfa (*Lymphotoxin alpha*)
- LTB – Linfotóxina beta (*Lymphotoxin beta*)
- Mb – Megabases
- MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major Histocompatibility Complex*)
- NK – *Natural killer*
- PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
- REDOME – Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea
- REREME – Registro Nacional de Receptores de Medula Óssea
- SBT – Tipagem baseada no sequenciamento (*Sequence-based typing*)
- SBTMO – Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea
- SNP – Polimorfismo de base única (*Single Nucleotide Polymorphism*)
- SSOP – *Sequence specific oligonucleotide probes*
- SSP – *Sequence specific primers*
- TCTH – Transplante de células tronco hematopoiéticas
- TM – Transmembrana
- TNF – Fator de necrose tumoral (*Tumoral necrosis factor*)
- WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)
- xMHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal estendido

RESUMO

Os genes HLA são os mais polimórficos do genoma humano e suas frequências alélicas variam entre populações de diferentes regiões e etnias pelo mundo. Assim, os genes HLA têm sido usados como marcadores genéticos em estudos de genética de populações e história do povoamento humano. Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização HLA da população gaúcha, visando contribuir no melhor entendimento da ancestralidade e miscigenação da população do Rio Grande do Sul, bem como na efetividade na gestão de programas de transplante de medula óssea.

Foi realizado um estudo com dados genéticos HLA de doadores de medula óssea do Rio Grande do Sul (RS), onde foi avaliada a correspondência do perfil HLA dentro e entre grupos étnicos com a autodeclaração de cor de pele – sistema oficial adotado pelo IBGE para caracterização étnica da população. Os resultados indicam que o sistema HLA é um melhor indicador de ancestralidade que a auto avaliação baseada em cor de pele, sendo esta uma ferramenta ineficiente para a caracterização da população. Para a caracterização da variação molecular HLA em diferentes regiões do RS, foram realizadas análises em dados genéticos HLA de mais de 90 mil doadores de medula óssea. Os resultados não indicaram correlação entre a variação HLA e a divisão geográfica oficial definida pelo IBGE no RS. Por outro lado, foram observadas diferenças a respeito da etnia. Além disso, quando comparada com as populações parentais e com dados históricos, a população rio-grandense apresenta maior similaridade genética com suas populações parentais correspondentes. Este estudo apresenta uma caracterização completa da variação genética HLA no RS.

Análise espacial e georeferenciamento de dados genéticos HLA e de doenças autoimunes no estado também foram realizadas. Os resultados indicam uma estrutura genética HLA compatível com a história de colonização do RS, onde é possível observar diferenciação entre as regiões que sofreram processo de colonização distintos, como as regiões sudoeste e metropolitana em relação à região central e noroeste. Análises espaciais sobre dados de internação de doenças autoimunes foram realizadas, revelando agrupamentos para artrite reumatoide e doença de Crohn na região centro-oriental do estado e para esclerose múltipla agrupamento na região centro-ocidental. A avaliação da correlação entre a frequência alélica e a ocorrência de doenças autoimunes indicou uma correlação significativa entre o alelo HLA-B*08 e artrite reumatoide. O mapeamento genético de populações tem grande relevância econômica na formulação de campanhas e políticas de

saúde pública, contribuindo no planejamento e ajuste de ações clínicas, bem como informar e educar profissionais e público.

Nesta pesquisa são apresentados extensivos dados referentes à caracterização HLA da população rio-grandense levando em consideração dados históricos e geográficos. Os resultados aqui apresentados podem ter utilidade na otimização de campanhas de recrutamento de medula óssea bem como contribui com o entendimento do contexto histórico e demográfico do estado do Rio Grande do Sul. As estratégias e ferramentas utilizadas nesta pesquisa poderão servir como base para futuros estudos em outras populações.

ABSTRACT

HLA genes are the most polymorphic of the human genome and their allelic frequencies vary among populations from different regions and ethnicities throughout the world. Thus, HLA genes has been used as genetic markers in population genetics studies and in the history of human settlement. This work aimed to perform the HLA characterization of Rio Grande do Sul (RS) population, looking forward to contribute in the understanding of the ancestry and miscegenation of the Rio Grande do Sul population, as well as in the effectiveness in the management of bone marrow transplantation programs.

A study with HLA genetic data of bone marrow donors from Rio Grande do Sul was performed, evaluating the correspondence of the HLA profile within and between ethnic groups with the self-declaration of skin color – official system adopted by the IBGE for population ethnic characterization. The results indicate that the HLA system is a better indicator of ancestry than the self-evaluation based on skin color, this being an inefficient tool for the characterization of the population. For the characterization of HLA molecular variation in different RS regions, analyzes were performed on HLA genetic data of more than 90,000 bone marrow donors. The results did not indicate correlation between the HLA variation and the official geographic division defined by IBGE in RS. On the other hand, major differences were observed regarding. In addition, when compared to the parental populations and with historical data, local populations from Rio Grande do Sul were found to be genetically similar to their corresponding parental European populations. This study provides a thorough characterization of the HLA genetic variation in RS.

Spatial and georeferencing analysis of HLA genetic data and autoimmune diseases in the state were also performed. The results indicate a HLA genetic structure compatible with the RS history of colonization, where it is possible to observe differentiation among regions that underwent different colonization processes, such as the southwest and metropolitan regions in relation to the central and northwestern regions. Spatial analyzes with data from hospitalization of autoimmune diseases were performed, revealing clusters for rheumatoid arthritis and Crohn's disease in the central-oriental region of the state and for multiple sclerosis clustering in the central-occidental region. The correlation analysis between allelic frequency and the occurrence of autoimmune diseases indicated a significant correlation between the HLA-B*08 allele and rheumatoid arthritis. Genetic mapping of populations has great economic relevance in the formulation of public health campaigns and

policies, contributing to the planning and adjustment of clinical actions, as well as informing and educating professionals and the public.

In this research, extensive data referring to the HLA characterization of the Rio Grande population taking into account historical and geographic data are presented. The results presented here may be useful in the optimization of bone marrow recruitment campaigns as well as contribute to the understanding of the historical and demographic context of Rio Grande do Sul state. The strategies and tools used in this research may be useful as a basis for future studies in other populations.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Sistema HLA

Descoberto por Peter Gorer em um estudo de transplantes de tecidos em camundongos na década de 30, o Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) tornou-se uma das regiões mais estudadas nos genomas de vertebrados (Gorer, 1936; Klein, 1986). A primeira descrição em humanos ocorreu na década de 50, quando Jean Dausset observou que o soro de pessoas submetidas a transfusões sanguíneas aglutinava com leucócitos de outros indivíduos. O primeiro antígeno MHC humano foi batizado como “MAC” (M, A e C eram as letras iniciais dos sobrenomes dos 3 indivíduos “não-aglutinantes” em seu experimento), hoje denominado HLA-A*02, tendo sua descoberta sido facilitada pela sua alta frequência – 50% – na população francesa (Dausset, 1954; Dausset, 1958; Dausset, 1984).

Localizados na superfície celular de leucócitos, os primeiros produtos dos genes MHC ficaram conhecidos como antígenos leucocitários, razão pela qual o MHC humano é conhecido como HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (Horton *et al.*, 2004). Embora as moléculas do MHC terem sido estudadas inicialmente por sua habilidade em conferir tolerância – histocompatibilidade – a enxertos de tecido e, mais tarde, transplante de órgãos, sua função primária seria a reação imunológica contra patógenos (Benacerraf e McDevitt, 1972; Snell, 1981; Horton *et al.*, 2004).

1.2 Estrutura e Função

Em 1999 foi realizado o sequenciamento e mapa gênico do MHC humano (The MHC sequencing consortium, 1999). Localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31), o MHC humano abrange 3,6 Mb de extensão e compreende 239 *loci* gênicos identificados (Shiina *et al.*, 2009), sendo a região gênica mais densa do genoma humano sequenciada até o momento. A densidade genica média (incluindo pseudogenes) ao longo dos 3,6Mb do MHC é de 1 gene por 16 kb, com variações regionais distintas. Dos genes identificados, 128 são expressos e destes estima-se que 40% têm função no sistema imune (The MHC

Sequencing Consortium, 1999).

A confirmação do alto desequilíbrio de ligação (Malfroy *et al.*, 1997), da evidencia de sintenia conservada (Yoshino *et al.*, 1997) e da presença de genes MHC relevantes distantes dos limites MHC definidos previamente, levou à ideia de um MHC estendido (xMHC) em humanos. O sequenciamento completo do cromossomo 6 permitiu a definição do xMHC, que cobre um total de 7,6 Mb no braço curto deste cromossomo. Nesta região, cerca de 28% dos transcritos estão potencialmente associados a processos relacionados com a imunidade, como apresentação/processamento de antígeno, inflamação, regulação imune e resposta ao estresse (Mungall *et al.*, 2003; Horton *et al.*, 2004).

O MHC é dividido em 3 regiões com estruturas e funções distintas: classe II (centromérica) e classes I e III (teloméricas) (Figura 1). A função de ambas moléculas HLA classe I e II é a apresentação de pequenos peptídeos derivados de patógenos para células T, processo que dá início à resposta imune adaptativa.

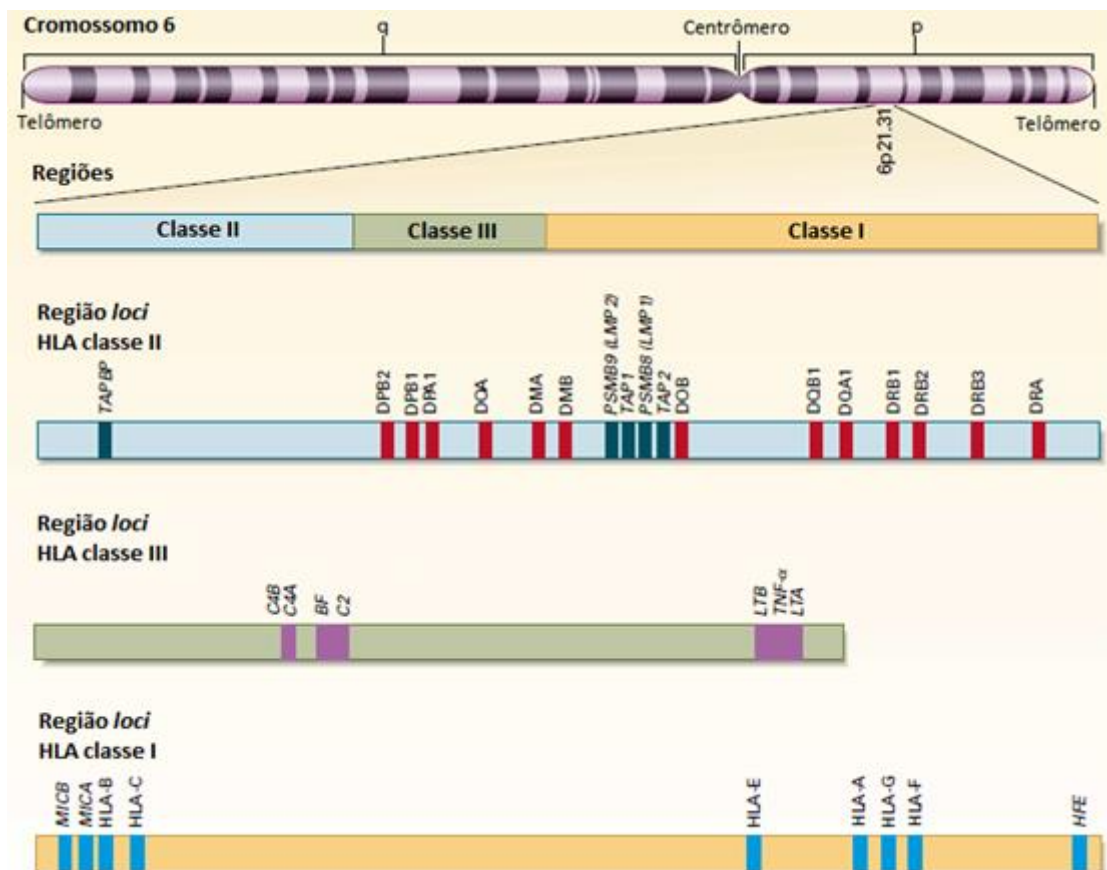


Figura 1: Localização e organização do complexo HLA no cromossomo 6. Apenas alguns são mostrados. Nos genes classe I e II, apenas os genes expressos são apresentados. Na classe III, são apresentados genes do sistema complemento e de resposta inflamatória (Klein e Sato, 2000).

Existem cerca de 20 genes HLA classe I, onde os genes HLA-A, -B e -C são conhecidos como genes HLA classe I clássicos, devido sua importância na resposta imunológica. (Klein e Sato, 2000). As moléculas HLA classe I são formadas por cadeias polipeptídicas α (pesada), codificadas por genes HLA classe I, e β (leve), codificadas pelo gene beta₂-microglobulina, localizado no cromossomo 15. A cadeia α possui cinco domínios: dois domínios de ligação peptídica ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), um domínio imunoglobulina-*like* ($\alpha 3$), região transmembrana (TM) e cauda citoplasmática (Figura 2) (Klein e Sato, 2000). Os genes HLA classe I codificam produtos que apresentam antígenos endógenos para células T CD8⁺ e estão envolvidos com a resposta imune mediada pelas células NK (*Natural Killer*) (Horton *et al.*, 2004). Esses genes são expressos pela maioria das células nucleadas, embora o nível de expressão possa variar de acordo com cada tecido (Klein, 1986, Klein e Sato, 2000, René *et al.*, 2016) e sob algumas condições, como infecção, câncer e inflamação, essa expressão pode ser induzida ou reprimida por diferentes mecanismos (René *et al.*, 2016).

Os genes HLA classe II codificam as cadeias polipeptídicas α e β das moléculas classe II. Cada cadeia α e β da classe II possui 4 domínios: o domínio de ligação peptídica ($\alpha 1$ ou $\beta 1$), o domínio imunoglobulina-*like* ($\alpha 2$ ou $\beta 2$), a região transmembrana (TM) e cauda citoplasmática (Figura 2) (Klein e Sato, 2000). Existem 24 genes HLA classe II, onde os genes HLA-DP, -DQ e -DR são os genes HLA classe II clássicos. Estes genes apresentam antígenos exógenos para células T CD4⁺ (Horton *et al.*, 2004) e são normalmente expressos por um subgrupo de células imunes, que inclui células B, células T ativadas, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais tímicas (Klein, 1986, Klein e Sato, 2000). Entretanto, outros tipos de células podem expressar moléculas HLA classe II na presença de interferon γ (Klein e Sato, 2000). A designação do *loci* gênico classe II no cromossomo 6 consiste de 3 letras: a primeira (D) indica a classe, a segunda (M, O, P, Q ou R) indica família a terceira (A ou B) a cadeia (α ou β , respectivamente). O gene HLA-DRB1, por exemplo, codifica a cadeia β da molécula classe II pertencente à família R (Klein e Sato, 2000).

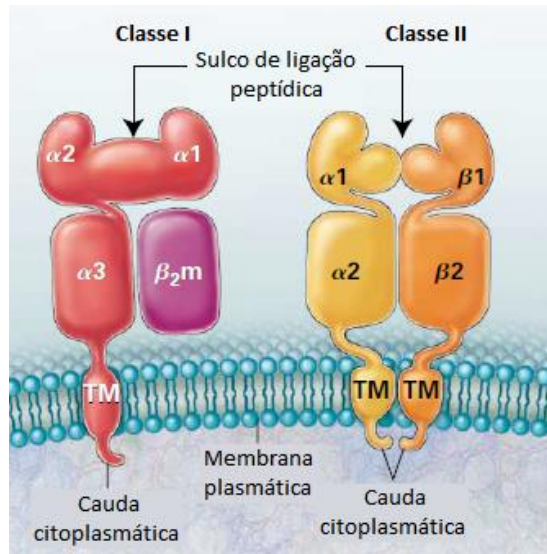


Figura 2: Estrutura das moléculas HLA classe I e II. (Klein e Sato, 2000).

A densidade gênica média (incluindo pseudogenes) em todo o HLA é de 1 gene por kilobase. As regiões HLA de Classe I e II são ricas em pseudogenes, enquanto a região de classe III apresenta poucos pseudogenes. Ambas regiões de Classe I e II aparentam terem sido duplicadas muitas vezes, gerando novos membros da família genica que se divergiram em novas funções. Uma possível explicação para a manutenção de níveis tão altos de pseudogenes poderia ser a de que eles estão envolvidos em gerar novos alelos por conversão genica (The MHC sequencing consortium, 1999), fenômeno que já fora observado em outros *loci* do sistema imune (Haino *et al.*, 1994).

Os genes HLA classe I e II estão separados por uma sequência de aproximadamente 700 kb chamada HLA classe III. Esta é a região mais densa do genoma humano, onde mais de 14% da sequência é codificante e aproximadamente 72% é transcrita, possuindo uma média de 8,5 genes por 100 kb (Xie *et al.*, 2003; Vandiedonck e Knight, 2009). Os genes desta região estão relacionados com os genes HLA classe I e II funcionalmente ou estruturalmente, ainda que alguns estejam envolvidos com a resposta imune, como no caso dos genes de fixação de complemento C4, C2 e BF (*B factor*) que exercem função na imunidade inata e os genes TNF (*Tumor Necrosis Factor*), LTA (*Lymphotoxin alpha*) e LTB (*Lymphotoxin beta*) que codificam citocinas pró-inflamatórias (Xie *et al.*, 2003; Shiina *et al.*, 2004; Shiina *et al.*, 2009). Muitos dos genes expressos na região de classe III não possuem função especializada na resposta imune, mas possuem papel chave nos processos

celulares, como regulação da transcrição, biossíntese, transporte de elétrons e atividade de hidrolase, interações proteína-proteína, função e sinalização de chaperonas (Xie *et al.*, 2003; Shiina *et al.*, 2004; Shiina *et al.*, 2009).

1.3 Polimorfismos no HLA

A maioria dos genes possuem um número modesto de variantes, algumas vezes possuindo apenas dois ou três alelos principais enquanto que outros são variantes raras ou incomuns. Os genes HLA, por sua vez, são os mais polimórficos do genoma humano, contando com mais de 15 mil alelos descritos de acordo com o release 3.26.0.1 (2016-11-08) do banco de dados IMGT/HLA (*ImMunoGeneTics HLA*) (Robinson *et al.*, 2015). A maior variação é encontrada nas regiões HLA de classe I e II, enquanto a região de classe III apresenta variações que são típicas do genoma como um todo (Xie *et al.*, 2003). Dentre todos, o gene HLA-B é o mais polimórfico, contando com 4.647 alelos descrito até dezembro de 2016 (Robinson *et al.*, 2015). O número de alelos dos principais genes HLA de classe I e II são apresentados na tabela 1 e na figura 3. O número de alelos novos descritos aumenta à medida que aumenta o número do registro de doadores: atualmente, o banco mundial de doadores de medula óssea (*Bone Marrow Donors Worldwide – BMDW*) conta com 28.827.958 doadores registrados (bmdw.org, acesso em novembro de 2016). Além do registro de doadores, novos alelos HLA também são descritos em estudos envolvendo HLA e genética de populações.

Polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs*) são o tipo mais comum de variação encontrada nos genes HLA, que também conta com polimorfismos do tipo inserção/deleção (*indels*) e variação no número de cópias (*Copy Number Variation – CNV*) (Horton *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2004; Trowsdale e Knight 2013). O papel central das moléculas HLA na histocompatibilidade e na resposta imune adaptativa levou seu alto polimorfismo a ser interpretado em um contexto funcional. Com o advento do sequenciamento de DNA, tornou-se aparente que o polimorfismo das moléculas HLA está concentrado nas regiões envolvidas com apresentação peptídica (Parham *et al.*, 1988; Buss, 1999; Meyer e Thompson, 2001, Buhler e Sanchez-Mazas, 2011). Os genes HLA classe I

não-clássicos, por exemplo, embora sejam relacionados estruturalmente com os genes HLA classe I clássicos, não estão envolvidos diretamente à ligação peptídica e são menos polimórficos (Meyer e Thompson, 2001).

Tabela 1. Número de alelos nos genes HLA de Classe I e Classe II

Gene	Alelos	Proteínas	Nulos
<i>HLA Classe I</i>			
HLA-A	3830	2703	173
HLA-B	4647	3408	141
HLA-C	3382	2391	119
HLA-E	25	8	1
HLA-F	22	4	0
HLA-G	53	18	2
<i>HLA Classe II</i>			
HLA-DRA	7	2	0
HLA-DRB	2252	1661	62
^L HLA-DRB1	2011	1465	50
HLA-DQB1	1054	727	28
HLA-DPB1	740	615	19

Fonte: IMGT/HLA. Disponível em: hla.alleles.org. Atualização de dezembro de 2016. Acesso em: fevereiro de 2016.

A região mais polimórfica dos genes HLA Classe I é encontrada nos éxons 2 e 3, enquanto que a região mais polimórfica dos genes HLA Classe II é encontrada no éxon 2 apenas. Estes éxons correspondem, em nível de proteína, à região de ligação peptídica das moléculas HLA. Espera-se, porém, que análises de sequenciamento de alta performance, se aplicadas em amostras de populações de diferentes regiões geográficas, possam revelar uma grande quantidade de polimorfismos fora das regiões dos éxons 2 e 3 tradicionalmente testadas. Interesse principal é que muitos destes *sites* possam não se comportar como polimorfismos neutros, podendo ter papel funcional (Sanchez-Mazas e Meyer, 2014). A diferença média par-a-par (*pairwise*) entre os alelos HLA está entre 10 e 26 nucleotídeos, variando de acordo com o *locus* (Buhler, 2007), sugerindo assim uma relevância funcional (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011).

Hernandez-Frederick e colaboradores (2014) identificaram 2127 novos alelos HLA-A, -B e -C através do sequenciamento de um grande número de potenciais doadores de medula óssea oriundos da Alemanha, Estados Unidos e Polônia. Do total de alelos novos identificados, 28-30% foram definidos por substituições sinônimas. Isso sugere que uma

porção significativa de polimorfismo HLA silencioso, até então negligenciado em estudos de genética de população, podem ser relevantes para inferir relações históricas e/ou geográficas entre populações. Além disso, substituições silenciosas são mais propensas à evolução neutra do que substituições não-sinônimas, em particular quando ocorrem em regiões de importância funcional, como a região de ligação peptídica (Sanchez-Mazas e Meyer, 2014).

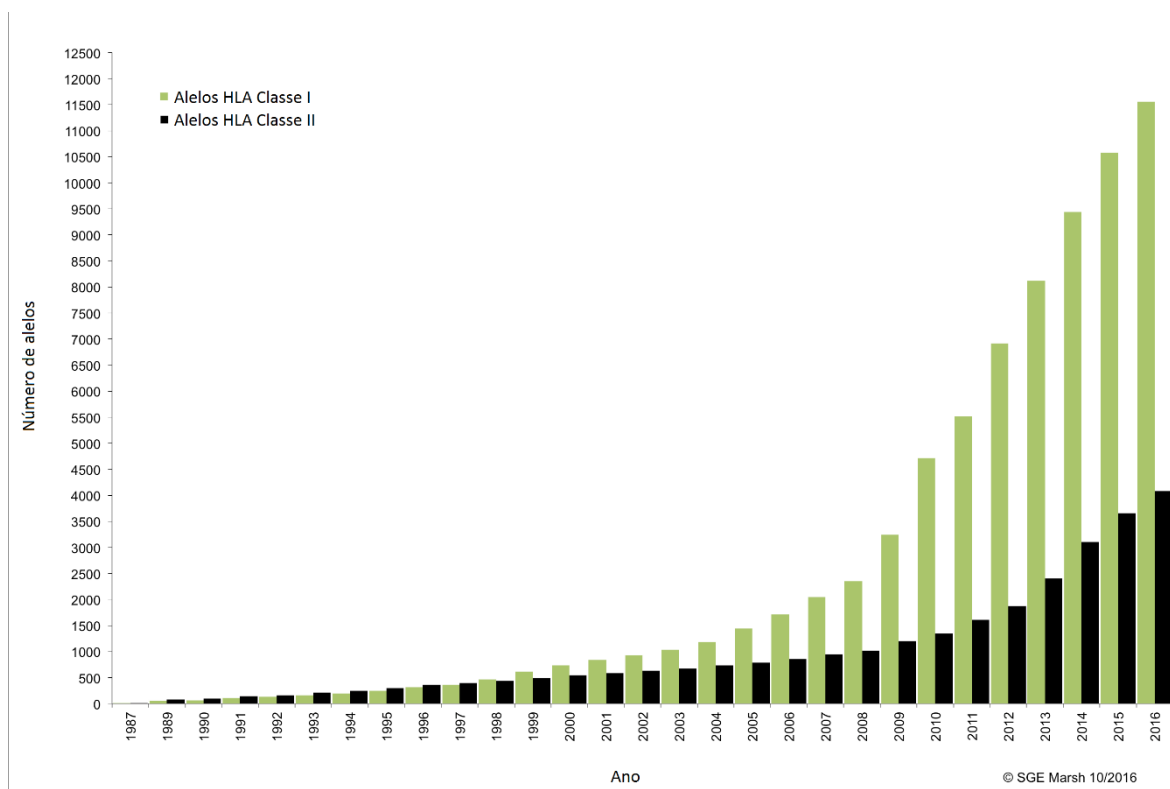


Figura 3: Número de alelos HLA identificados por ano de 1987 a setembro de 2016. Fonte: hla.alleles.org (Robinson *et al.*, 2015).

O sistema HLA possui forte desequilíbrio de ligação, que pode ser explicado por diferentes mecanismos. Blocos polimórficos podem ter surgido por uma recente expansão de grandes famílias em populações isoladas, combinadas com um tempo insuficiente para recombinação. Outro mecanismo sugere um pareamento reduzido na meiose de regiões genômicas exibindo variação acentuada. Quando a recombinação ocorreu entre haplótipos divergentes, pode ter havido a conversão de blocos altamente divergentes em blocos altamente conservados. Outra explicação para os blocos haplotípicos é o agrupamento de alelos de proteínas que atuam juntas, ou seja, a manutenção de grupos de alelos funcionalmente coordenados. Em populações europeias, um número de haplótipos está

presente em frequência relativamente alta, sugerindo uma potencial vantagem seletiva, embora alguns haplótipos possam estar associados à doenças autoimunes em algumas populações (Trowsdale e Knight, 2013).

1.4 Nomenclatura do HLA

A nomenclatura de novos genes HLA, sequencias de alelos e seu controle de qualidade é de responsabilidade do Comitê de Nomenclatura para Fatores do Sistema HLA da Organização Mundial da Saúde (*WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*). Este comitê se reuniu pela primeira vez em 1968 e estabeleceu critérios para reuniões sucessivas. Em 1989 um grande número de alelos HLA foram sequenciados e nomeados pela primeira vez, e desde então é realizado esforço de extrema importância em avaliar e manter este banco de dados. O banco de dados IPD-IMGT/HLA coleta sequencias novas e confirmatórias para analisar antes de serem nomeadas, passando por critérios rigorosos antes de ser divulgada para a comunidade clínica. Atualizações no banco de dados são lançadas trimestralmente (hla.alleles.org; Marsh *et al.*, 2010).

Cada alelo HLA possui um número único correspondente a até quatro grupos de dígitos separados por dois pontos. Todos alelos recebem um nome de pelo menos quatro dígitos, o que corresponde aos dois primeiros grupos de dígitos. Os dígitos antes dos primeiros dois pontos descrevem o tipo e o grupo seguinte de dígitos é usado para listar os subtipos. Alelos que se diferenciam apenas por substituições sinônimas de nucleotídeo são distinguidos pelo uso de um terceiro grupo de dígitos e alelos que se diferenciam apenas pela sequência polimórfica nos íntrons, ou nas regiões não traduzidas (UTR) 5' ou 3', são distintos pelo uso de um quarto grupo de dígitos (hla.alleles.org; Marsh *et al.*, 2010).

Além do número único do alelo, sufixos podem ser adicionados para indicar o *status* da expressão. Alelos que não são expressos recebem o sufixo “N” (“*Null*”); “L” indica baixa (“*Low*”) expressão na superfície celular quando comparada a níveis normais; “S” quando um alelo expressa uma proteína como solúvel, molécula secretada (“*Secreted*”) mas não presente na superfície celular; “C” em alelos que produzem proteínas presentes no

citoplasma (“*Citoplasm*”) mas não na superfície celular; “A” indica uma expressão aberrante (“*Aberrant*”) onde há alguma dúvida se a proteína é realmente expressa e; “Q” quando a expressão de um alelo é questionável (“*Questionable*”), devido à mutação observada no alelo afetar os níveis normais de expressão em outros alelos. Até junho de 2016, nenhum alelo foi nomeado com sufixos “C” ou “A” (hla.alleles.org; Marsh *et al.*, 2010). A nomenclatura atual está exemplificada na figura 4.

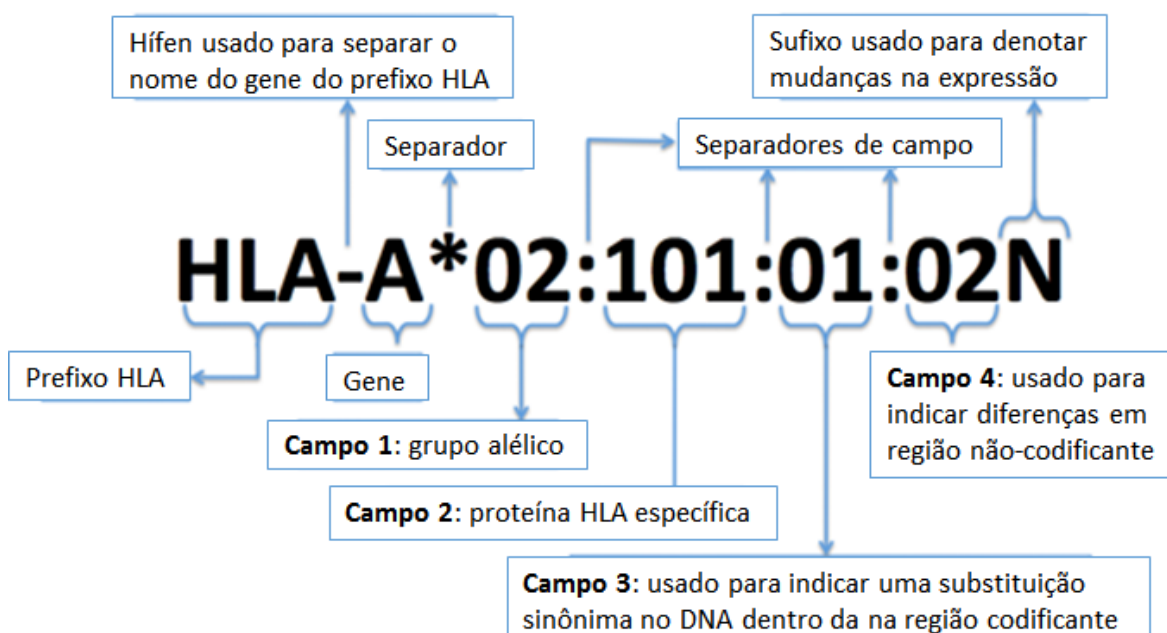


Figura 4: Nomenclatura HLA. Fonte: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (Marsh *et al.*, 2010).

Atualmente a fenotipagem HLA é baseada no DNA e, portanto, realizada através de técnicas moleculares. A reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction – PCR*) com *primers* de sequência específica (*sequence specific primers – SSP*) e/ou com sondas de oligonucleotídeos com sequência específica (*sequence specific oligonucleotide probes – SSOP*) permitem a genotipagem HLA de baixa resolução, ou seja, identificam apenas o grupo alélico. A PCR-SSP consiste em várias reações de PCR, cada uma contendo um par de *primers* para determinado alelo. Atualmente esta técnica está em desuso na rotina, mas é muito valiosa para tratar eventuais ambiguidades. Na PCR-SSOP amplifica-se uma grande região de um gene, onde o DNA amplificado é hibridado com sondas de oligonucleotídeos específicas para dado alelo do gene e permite múltiplos analitos simultaneamente em apenas

uma reação. Atualmente o método molecular comumente utilizado para o cadastro de novos doadores nos registros é a PCR-SSO reversa, que fornece resultados de média ao invés de baixa resolução. Neste caso, os reagentes empregados na tipificação dos genes HLA restringem o resultado final a um determinado grupo de alelos em vez de simplesmente identificar os dois primeiros dígitos, sendo que estes últimos incluem todos os alelos dentro de cada grupo (Heinemann, 2009 SBTMO, 2012). O sequenciamento de DNA (*sequence-based typing - SBT*) é considerado o método padrão ouro para identificação em alta resolução dos alelos HLA (SBTMO, 2012).

1.5 Evolução do Sistema HLA

A região do MHC parece ter sofrido duplicação gênica e deleção intermitente em diferentes espécies, gerando *loci* relacionados que produzem proteínas similares. Os genes do MHC de classe I em humanos, que contém os genes HLA-A, -B e -C, não possuem ortólogos em outras espécies, incluindo camundongos. A duplicação gênica produz genes que eventualmente adquirem novas funções (Delarbre *et al.*, 1992; Trowsdale e Knight, 2013). O agrupamento de genes de processamento e apresentação de antígenos no MHC é consistente com a ideia de que a região evoluiu de um bloco duplicado de genes do sistema imune (Trowsdale e Knight, 2013).

O sistema HLA possui uma evolução distinta e complexa. Quase todos os *loci* HLA clássicos estão sob influência de alguma forma de seleção natural em adição à forças estocásticas – deriva genética, evolução demográfica e migração – associada à história do povoamento humano. Isso tem sido mostrado através de diferentes abordagens: 1) testes de neutralidade, que frequentemente revelam desvios da neutralidade esperada em direção de um excesso de heterozigotos (Sanchez-Mazas, 2001; Meyer *et al.*, 2006; Solberg *et al.*, 2008; Buhler e Sanchez-Mazas, 2011); 2) comparações nas taxas de substituições sinônimas e não-sinônimas indicando um excesso de substituições de amino ácido na região de ligação peptídica das moléculas HLA (Takahata *et al.*, 1992; Satta *et al.*, 1994); 3) profundos tempos de coalescência na maioria das linhagens HLA, explicável através da seleção balanceadora (Klein *et al.*, 1993); e 4) estudos de simulação (Slatkin e Muirhead, 2000), mais

recentemente melhorados por abordagens ABC (*Approximate Bayesian Computation*) para inferir coeficientes de seleção em situações específicas (Currat *et al.*, 2010).

Devido seu alto nível de polimorfismo, os genes HLA são marcadores úteis para a reconstrução da história do povoamento humano. Entretanto, a variação HLA frequentemente desvia da seleção neutra em direção de um excesso de diversidade. O excesso de heterozigosidade observado na maioria das populações bem como o excesso de polimorfismos não-sinônimos nos genes HLA indicam um importante papel da seleção natural em moldar os padrões da diversidade HLA (Sanchez-Mazas, 2014). Devido ao papel crucial desempenhado pelos genes HLA na imunidade, esta observação é geralmente explicada pela seleção balanceadora dirigida por patógenos, pois a evolução pode facilmente adaptar o *pool* genético de populações para pressões ambientais específicas através da seleção natural (Meyer e Thompson, 2001; Prognolle *et al.*, 2005; Sanchez-Mazas *et al.*, 2011; Sanchez-Mazas *et al.*, 2012). Ainda, a variação alélica HLA deve ser mantida através da vantagem do heterozigoto, pois é conhecida a associação de alguns alelos com resistência à diversas doenças graves (Kawashima *et al.*, 2009).

Desde o início da aplicação genética destes polimorfismos foi observado que seu padrão mundial de diversidade genética tende a exibir uma estrutura geográfica. Árvores populacionais geralmente discriminam populações de diferentes continentes, indicando que a seleção natural provavelmente não foi o único mecanismo a agir na evolução destes polimorfismos, mas seu padrão de diversidade genética foi também moldado pela história de migrações humanas, levando a um aumento no interesse de se usar sistemas imunogenéticos como ferramentas informativas para reconstruir a história do povoamento humano (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011). Correlações significantes com a geografia são obtidas em escala global quando distancias genéticas são estimadas ponderadas por distancias moleculares entre alelos (Buhler e Sanchez-Mazas, 2011). Estes achados levam à conclusão que migrações humanas foram a força primária na evolução da variação HLA no mundo todo, em adição à expansões e contrações demográficas (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que indivíduos de origem africana possuem frequências mais altas de alelos associados à resposta pró-inflamatória (Ness *et al.*, 2004), níveis aumentados de proteína C-reativa circulante (Kelley-Hedgpeeth *et al.*, 2008), um índice mais alto de doenças inflamatórias que indivíduos de origem europeia (Pennington *et al.*, 2009) e também

resposta mais forte à infecção induzida nos macrófagos do que indivíduos de origem europeia (Nédélec *et al.*, 2016). Uma possível explicação é que após a migração das populações humanas para fora da África, elas foram expostas a níveis mais baixos de patógenos (Guernier *et al.*, 2004), reduzindo a necessidade de fortes sinais pró-inflamatórios. Mudanças nesse sentido podem ter ocorrido devido às consequências prejudiciais de inflamação aguda ou crônica, que podem contribuir para o desenvolvimento de doenças autoinflamatórias e autoimunes (Okin e Medzhitov, 2012). Alternativamente, a resposta inflamatória mais fraca detectada em europeus pode ter resultado do relaxamento da restrição seletiva em um ambiente onde a carga de patógenos foi reduzida, ou pelo menos de diferente natureza, daqueles encontrados na África (Nédélec *et al.*, 2016).

1.6 Importância médica do HLA

1.6.1 TCTH – Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

Além da conhecida importância na resposta imune, os *loci* HLA e têm grande importância clínica no transplante de células tronco hematopoiéticas e de órgãos, pois são os determinantes primários de tolerância ou rejeição aos transplantes e enxertos (Buhler *et al.*, 2012). O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) a partir da medula óssea é clinicamente indicado para o tratamento de distúrbios do sistema hematopoiético ou do sistema imune e em casos de doenças malignas da medula óssea e tumores sólidos disseminados (Janeway *et al.*, 2007). Um estudo global com dados dos anos de 2006 a 2008 envolvendo 1.411 centros de transplante de 72 países dos cinco continentes mostrou que leucemia é a principal indicação para TCTH alogênico (72%), seguido por doenças linfoproliferativas (15%), doenças não malignas (12%) e tumores sólidos (0,6%) (Gratwohl *et al.*, 2010, Gratwohl *et al.*, 2013). Na figura 5 estão representados os avanços na aplicação dos transplantes ao longo do tempo.

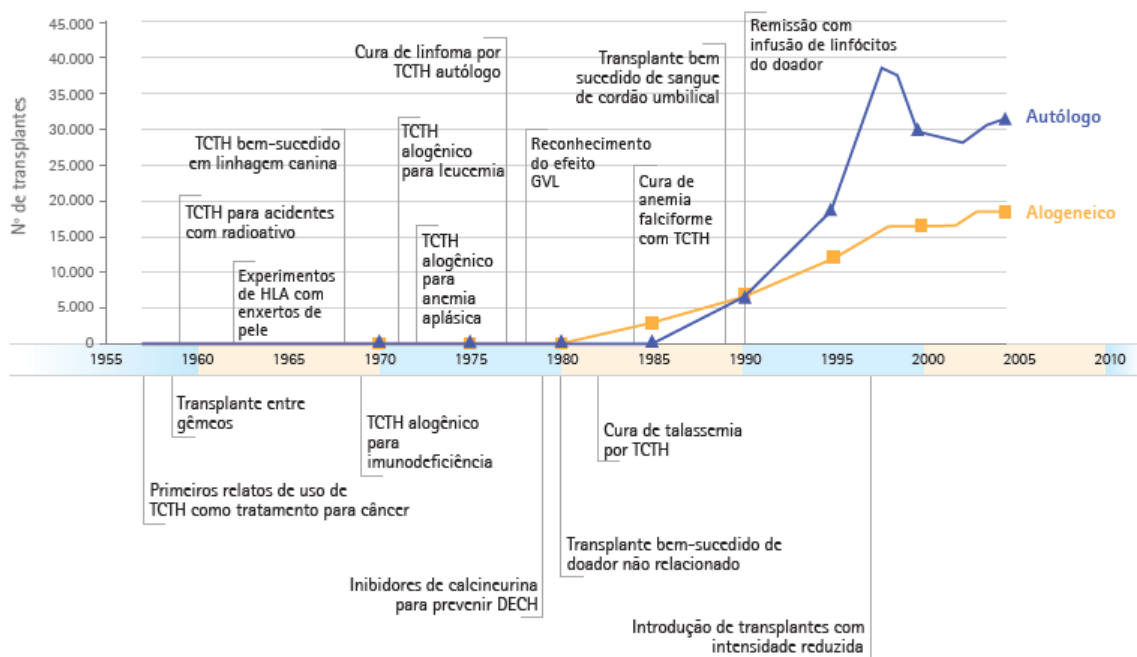


Figura 5: Principais etapas de desenvolvimento do transplante de células-tronco hematopoiéticas no mundo (INCA, 2012).

A prática clínica de TCTH é em grande parte dependente da histocompatibilidade entre doador e receptor. A compatibilidade HLA entre doador e receptor é fundamental na redução dos riscos de rejeição do enxerto. O transplante de medula óssea pode ser (INCA, 2012):

- *Autólogo*: quando a medula óssea é originária do próprio paciente, com ou sem tratamento *in vitro*);
- *Singênico*: quando o doador é irmão gêmeo do receptor;
- *Alogênico*:
 - Relacionado ou aparentado (irmão ou familiar);
 - Não-relacionado ou não-aparentado (proveniente de bancos de doadores de medula óssea).

No Brasil, cerca de 70% dos transplantes de célula tronco hematopoiética ocorrem com doador não-aparentado. Quando não é encontrado doador compatível dentro da família, é realizada a busca por doadores compatíveis em bancos de registro de doadores voluntários. O Brasil mantém o Registro Brasileiro de Doadores de Medula Óssea (REDOME), onde registra informações de dados gerais, grupo étnico e genotipagem HLA-A, -B e -DRB1. O

REDOME é o terceiro maior banco de doadores de medula óssea em todo o mundo contando com mais de 4 milhões de doadores registrados até o presente, sendo o que mais cresceu na última década. Mantido pelo Ministério da Saúde, o REDOME é o maior banco com financiamento exclusivamente público. No Brasil, a chance de identificar um doador compatível é de 88% na fase preliminar de busca e ao final do processo 64% dos pacientes têm um doador compatível confirmado (redome.inca.gov.br). Caso não seja encontrado um doador compatível no REDOME, é possível realizar a busca no Banco Mundial de Doadores de Medula Óssea (*Bone Marrow Donors Worldwide – BMDW*).

Os doadores são incluídos no REDOME com tipificação HLA-A, -B e -DRB1 em média resolução. Já a inscrição dos receptores no Registro Nacional de Receptores de Medula Óssea (REREME) deve ser realizada com tipificação HLA classe I e II em alta resolução, pois estas informações direcionam a seleção e, assim, agilizam o processo de identificação do doador (SBTMO, 2012). Os requisitos mínimos para a compatibilidade HLA podem variar com a situação clínica. Os fatores avaliados pelos centros de TCTH para identificar o melhor doador para determinado paciente é baseado em critérios que aumentam a probabilidade de sucesso no transplante. Estes critérios podem variar de acordo com protocolos de tratamento e entre os centros de transplante (Hurley *et al.*, 2003, Majhail *et al.*, 2015).

A Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO) define os seguintes critérios para seleção de doador de medula óssea não-aparentado (SBTMO, 2012):

- Realizar tipagem de alta resolução para os loci HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 de todos os pacientes para a busca de doador não-aparentado e de seus potenciais doadores, pois as incompatibilidades alélicas podem ser funcionalmente relevantes;
- Selecionar preferencialmente doador com compatibilidade alélica 8/8 (HLA-A, -B, -C e -DRB1) devido ao efeito cumulativo ou sinergismo das incompatibilidades HLA;
- Quando não houver doador com compatibilidade alélica 8/8 (HLA-A, -B, -C e -DRB1), escolher preferencialmente:
 - Doador com compatibilidade DQB1 (9/10) para evitar um efeito aditivo de DQB1;
 - Doador com compatibilidade DRB1 e uma incompatibilidade em um dos loci de classe I (HLA-A, -B ou -C);

- Doador com incompatibilidade de alelos ao invés de antígenos. As incompatibilidades de antígenos (baixa resolução), mas não de alelos (alta resolução) estão associadas com falha de pega do enxerto. Com respeito ao risco de mortalidade, as incompatibilidades alélicas e antigênicas apresentam efeitos similares, exceto para o loco HLA-C no qual a incompatibilidade alélica parece ser mais tolerada em relação à antigênica;
- Incompatibilidades -DPB1 não constituem critério de exclusão de doador, exceto quando o receptor apresentar anticorpos pré-formados contra moléculas HLA-DP expressas pelo doador;
- Evitar doador incompatível em qualquer loco HLA quando o receptor apresentar anticorpos específicos para moléculas HLA expressas pelo doador.
- Quando o receptor apresentar anticorpos anti-DPB1, considerar a tipagem DPB1 do par doador/receptor.
- Se não houver outro doador disponível ou tempo para iniciar outro processo de busca, empregar medidas para a remoção dos anticorpos anti-HLA pré-formados.

O principal desafio para o sucesso do TCTH entre doador e receptor não-aparentados é superar o alorreconhecimento do hospedeiro contra o enxerto, e do enxerto contra o hospedeiro, que dão origem à falência do enxerto e à doença do enxerto contra o hospedeiro (*graft-versus-host disease, GVHD*). Esforços para diminuir os riscos de falência do enxerto e GVHD, e promover a reconstituição imune, requerem ótima compatibilidade de alelos classe I e II entre doador e receptor (Petersdorf *et al.*, 2003). Os produtos do sistema HLA são fortemente imunogênicos, tendo maior importância no processo de rejeição. Porém, antígenos secundários de histocompatibilidade (MiAgs), H-Y e ABO, também se relacionam com o sucesso e o insucesso de um transplante (INCA, 2012).

O uso de métodos moleculares para uma melhor precisão da tipagem HLA aumentou o sucesso no desfecho de TCTH entre doador e receptor não-aparentados. Os riscos de falência do enxerto, GVHD e mortalidade são definidos por características quantitativas e qualitativas de incompatibilidade entre doador e receptor. A incompatibilidade alélica ocorre em níveis variáveis dependendo dos haplótipos e do *background* étnico de doadores e receptores. A definição das incompatibilidades que são mais bem toleradas poderá permitir

que pacientes tenham como opção doadores parcialmente compatíveis para o transplante (Petersdorf *et al.*, 2003; Petersdorf 2016).

Incompatibilidades em cada um dos *loci* HLA-A, -B, -C e -DRB1 possuem efeitos adversos similares quanto à mortalidade, enquanto HLA-A demonstra efeitos adversos significativos em GVHD. Os efeitos adversos são mais evidentes em transplantes onde há incompatibilidades em baixa resolução (grupo alélico) do que em alta resolução. Incompatibilidades nos *loci* HLA de Classe II, HLA-DQ e HLA-DQ, não possuem efeito significativo pós-transplante (Flomenberg *et al.*, 2004). O número e o tipo de incompatibilidades podem impactar significativamente na sobrevivência do paciente transplantado (Fürst *et al.*, 2013).

A diversidade dos genes relacionados a transplantes provavelmente se correlaciona com a diversidade do *pool* de genes em uma população humana em particular. A diversidade deste *pool* de genes, por sua vez, reflete a ‘mistura’ da população (Oh *et al.*, 2005). Os alelos, antígenos e frequências haplotípicas do sistema HLA refletem a etnia de pacientes e doadores (Petersdorf *et al.*, 1998, Petersdorf *et al.*, 2003). Riscos da ocorrência de GVHD relacionados à etnia após TCTH já foram identificados (Oh *et al.*, 2005; Morishima *et al.*, 2010).

1.6.2 Doenças associadas ao MHC

Genes do MHC ou ligados ao MHC humano apresentam associação à diversas doenças, seja protegendo ou predispondo. Para entender como doenças podem contribuir para o polimorfismo HLA, é preciso considerar a geração da variação e a seleção das variantes na população (Trowsdale e Knight, 2013). Considerando associações de marcadores do MHC com infecções, em muitos casos o fenótipo da doença não é necessariamente de susceptibilidade, mas pode ser de complicação após uma infecção, como no caso da síndrome do choque da dengue, uma complicação da dengue com risco de morte (Khor *et al.*, 2011). Este tipo de efeito não é surpreendente, considerando os complexos efeitos do MHC sobre as respostas imunológicas.

Estudos de associação de todo o genoma (*genome-wide association studies – GWAS*) para condições autoimunes tem implicado muitos genes e marcadores. Muitas dessas condições estão associadas com um grupo particular de alelos de Classe I ou II, consistente com o envolvimento de peptídeos específicos, embora em muitos casos não são relacionadas com um único alelo. Na maioria dos casos é difícil identificar a ligação genética devido algumas razões, como: a densidade dos genes no MHC; o grande desequilíbrio de ligação e; os efeitos dos múltiplos *loci* HLA, tornando a análise genética no MHC mais problemática do que em outros cromossomos (Trowsdale e Knight, 2013).

Deve-se considerar, ainda, que condições autoimunes são multifatoriais e envolvem gatilhos ambientais além das muitas variantes gênicas. A esclerose múltipla é um bom exemplo da complexidade de fatores. Esta condição está associada ao HLA-DRB1*1501, e a susceptibilidade pode aumentar pela pouca exposição à luz solar, resultando em baixos níveis de vitamina D. Interessantemente, os elementos de resposta da vitamina D surgem ao redor do gene HLA-DRB1. A expressão de HLA-DR pode ser influenciada pela vitamina D, ligando assim fatores genéticos e ambientais (Ramagopalan *et al.*, 2009; Handunnetthi *et al.*, 2010).

A artrite reumatoide, doença reumática inflamatória autoimune, também é desencadeada por fatores genéticos, ambientais e gatilhos autoimunes. Tem herdabilidade estimada em 60% (van der Helm-van Mil, 2005), enquanto que a contribuição do HLA para herdabilidade tem sido estimada em 11-37% (van der Helm-van Mil, 2005; van der Woude, 2009). Alelos que compartilham epítomos, como HLA-DRB1*01 e HLA-DRB1*04 (du Montcel *et al.*, 2005), e outros como HLA-DRB1*13 e HLA-DRB1*15 (Kurkó *et al.*, 2013) já foram associados à susceptibilidade para artrite reumatoide, enquanto que estudos de GWAS identificaram mais de 30 *loci* envolvidos com a patogênese dessa doença (Szodoray *et al.*, 2010; Kurkó *et al.*, 2013).

São exemplos de outras doenças com associação HLA estabelecidas: espondilite anquilosante (HLA-B*27); lúpus eritematoso sistêmico e pênfigo vulgar (HLA-DRB1*0301); colite ulcerativa (HLA-DRB1*1101); psoríase (HLA-C*0602) e; doença celíaca (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201) (Trowsdale e Knight, 2013).

1.7 Estudos de Diversidade Genética no Rio Grande do Sul

Embora saibamos que os humanos são muito similares geneticamente, pequenas variações podem ser importantes. Estas pequenas variações levam a muitas diferenças fenotípicas entre os indivíduos, tanto dentro como entre diferentes etnias. Estudos a respeito da diversidade genética humana possuem tanto significado evolutivo como relevância médica. No campo da evolução, estes estudos podem ser usados para abordar uma série de questões da genética evolutiva, bem como compreender a origem de determinados alelos e a rota migratória de determinadas populações. Na medicina, estudos acerca da diversidade genética humana são importantes na identificação de alelos que possam conferir resistência ou susceptibilidade a determinadas doenças, bem como suas frequências de acordo com as regiões geográficas.

Estes estudos podem identificar importantes características de alelos raros. Geralmente, alelos raros e comuns possuem histórias populacionais diferentes: alelos comuns são mais antigos e frequentes em quase todas as populações; enquanto que alelos raros são provavelmente população-específicos, tendo sido originados de efeito fundador (Frazer *et al.*, 2009). Além disso, estudos de diversidade genética humana podem contribuir na identificação e de desequilíbrios de ligação entre *loci* gênicos, sendo útil no mapeamento destes *loci* que possam estar relacionados a doenças ou outros fenótipos.

Os alelos e haplótipos HLA são herdados de ambas as linhagens parentais e estão distribuídos em frequências diferentes ao redor do globo de acordo com cada etnia. O número e a origem dos alelos presentes em cada população podem indicar o grau de mistura desta população. (Middleton *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001). O sistema HLA é altamente informativo em estudos de genética de populações, devido ao seu elevado polimorfismo e ao forte desequilíbrio de ligação entre *loci* próximos. Informações a respeito da variedade genética em populações humanas podem ser aplicadas para o entendimento dos haplótipos HLA e suas implicações no transplante e terapias relacionadas.

Localizado no extremo sul do Brasil, o estado do Rio Grande do Sul é formado por uma área de aproximadamente 282.000 km² e possui uma população superior a 10 milhões de habitantes, com forte influência da colonização europeia. Segundo dados do IBGE de 2010, a população do estado está constituída etnicamente por 81,4% de brancos, 5,0% de

negros, 13,3% de pardos e 0,3% de amarelos ou indígenas (IBGE, 2010).

Até o presente, poucos estudos genéticos foram realizados acerca da diversidade genética da população do Rio Grande do Sul. Na tabela 2 estão representados os estudos realizados nas populações do Rio Grande do Sul:

Tabela 2: Ancestralidade geográfica de populações do Rio Grande do Sul

Cor da pele (N)	DNA	Ancestralidade geográfica (%)			Referência
		Europeia	Ameríndia	Africana	
Branca (190) ^a	Cromossomo Y	99	0	<1	Guerreiro-Junior, 2007
Branca (172) ^a	Mitocondrial	69	21	10	Guerreiro-Junior, 2007
Branca (35) ^b	Cromossomo Y	100	0	0	Marrero <i>et al.</i> , 2005
Branca (88) ^b	Mitocondrial	97	3	0	Marrero <i>et al.</i> , 2005
Branca (24) ^c	Cromossomo Y	100	0	0	Marrero <i>et al.</i> , 2005
Branca (31) ^c	Mitocondrial	48	36	16	Marrero <i>et al.</i> , 2005
Branca (150) ^d	Cromossomo Y	91	5	4	Marrero, 2006
Branca (105) ^d	Mitocondrial	37	52	11	Marrero, 2006
Negra (120) ^a	Cromossomo Y	56	6	38	*Bisso-Machado, 2006; Hünemeier <i>et al.</i> , 2007
Negra (109) ^a	Mitocondrial	5	16	79	*Hünemeier, 2006; Hünemeier <i>et al.</i> , 2007
Mestiços (20) ^e	Autossômico e X	70 e 50	20 e 30	10 e 20	Wang <i>et al.</i> , 2008

Populações: ^aPorto Alegre, ^bSerra, ^cVárias regiões, ^dPampa, ^eBagé e Alegrete. *Dados compilados

Os estudos listados na tabela 1 foram realizados em regiões específicas do estado, e com restrito tamanho amostral. Além disso, com exceção ao estudo de Wang e colaboradores (2008), todos os demais foram realizados a partir de amostra de DNA mitocondrial ou do cromossomo Y, e em sua maioria em população branca.

Chama bastante a atenção a miscigenação assimétrica das populações analisadas no estudo, sendo notadamente variável de acordo com a origem do DNA – mitocondrial ou nuclear (autossômico e sexual). Nos estudos envolvendo DNA mitocondrial, é possível observar a ancestralidade geográfica ameríndia variando de 16 a 52%, enquanto que a ancestralidade geográfica africana variou de 10 a 79%. Entretanto, quando apenas o cromossomo Y foi analisado a ancestralidade geográfica ameríndia variou de 0 a 6% e a ancestralidade geográfica africana variou de 0 a 38%. Estes resultados ajudam a compreender a composição da população gaúcha, formada por colonizadores europeus, escravos africanos e os povos nativos americanos.

CAPÍTULO 2
JUSTIFICATIVA

Até junho de 2014, o estado do Rio Grande do Sul contribuiu com 254.274 entre um total de 3.227.422 doadores em todo o Brasil, representando aproximadamente 8% de toda amostra do REDOME, enquanto que a população brasileira era de 191 milhões de habitantes em 2010, sendo aproximadamente 10 milhões no Rio Grande do Sul – cerca de 5% da população brasileira. Argumenta-se que o Rio Grande do Sul seria menos representativo em relação à variabilidade genética na população doadora de medula óssea por apresentar menor mistura étnica que outros estados do Brasil e, assim, coletas de doadores deveriam ser estimuladas em regiões entre populações de origem africana, asiática, européia e ameríndia tivessem tido uma maior miscigenação.

Por outro lado, quando se considera a questão de alelos e haplótipos raros, não se pode desconsiderar a possibilidade de efeitos estocásticos como o efeito fundador, em que determinadas variantes genéticas podem estar concentradas em uma pequena região geográfica definida, mesmo sendo muito raro nas populações parentais (Buhler e Sanchez-Mazas, 2011; Buhler *et al.*, 2012). Além disso, apesar da forte influência da colonização europeia no Rio Grande do Sul, no início do século XIX aproximadamente 30% da população do estado era composta por escravos de origem africana. O estado também conta, ainda que em menor grau, com a contribuição da colonização asiática desde a metade do século XX (Neto e Bezzi 2008; Neto e Bezzi, 2009).

Com a abordagem aqui proposta será possível mapear com precisão não só a diversidade genética HLA encontrada dentro do Rio Grande do Sul, como também a origem parental e como a mesma está distribuída na amostra de interesse (doadores cadastrados no REDOME). Os doadores cadastrados no REDOME representam potencialmente indivíduos oriundos de populações com uma história evolutiva e demográfica onde diferentes dinâmicas de mestiçagem podem ser detectadas. Considerando que estes processos podem variar de acordo em cada região do Brasil, o geo-referenciamento destes indivíduos deve ser visto como crucial tanto para um maior entendimento da representatividade das amostras de doadores em relação à população brasileira por região geográfica, sendo útil para o desenvolvimento de uma estratégia eficaz de captação de doadores com determinado perfil genético.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização do perfil HLA da população doadora de medula óssea do Rio Grande do Sul, visando aprimorar a gestão de transplantes e contribuir para o estudo da ancestralidade e miscigenação da população residente no Rio Grande do Sul.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar e analisar a variabilidade alélica e haplotípica de HLA-A, -B e -DRB1 no registro de doadores, considerando os mais e menos frequentes em diferentes regiões;

Comparar os dados genéticos de HLA em diferentes regiões do estado, e de acordo com autodeclaração de cor de pele;

Analisar a origem ancestral de alelos e haplótipos encontrados na amostra realizando comparações com suas populações parentais;

Geolocalizar dados de alelos e haplótipos do registro de doadores de medula óssea do Rio Grande do Sul, bem como dados de doenças autoimunes no estado;

Correlacionar dados de frequência alélica de HLA-A, -B e -DRB1 com a ocorrência de doenças autoimunes no Rio Grande do Sul.

CAPÍTULO 4

Self-assessment of color categories and its relationship with HLA profiling in Brazilian bone marrow donors

*Artigo publicado na revista *Biology Blood Marrow Transplantation*. 2015 Jun;21(6):1140-4.*

Self-Assessment of Color Categories and Its Relationship with HLA Profiling in Brazilian Bone Marrow Donors



Juliano Boquett¹, Lavínia Schüler-Faccini¹, Luis Fernando Jobim², Mariana Jobim², Nelson Jurandi Rosa Fagundes¹, Tábita Hünemeier^{3,*}

¹ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Article history:

Received 19 November 2014

Accepted 10 February 2015

Key Words:

HLA

Bone marrow donors

Self-assessed color

Admixed population

A B S T R A C T

The Brazil Ministry of Health maintains a Registry of Bone Marrow Donors that corresponds to approximately 12% of the Bone Marrow Donors Worldwide registry. This registry contains information on ethnicity (by self-assessment of color) and HLA-A, -B, and -DRB1 type. The self-assessment of color tool has been extensively used for admixed population characterization. In this context, Brazil represents a highly admixed population, resulting from 5 centuries of colonization and interbreeding, mainly, but not exclusively, among Native Americans, Europeans, and Africans. Here we evaluated self-assessed skin color and HLA genetic information from 71,291 bone marrow donors of southern Brazil to verify how likely is the HLA profiling correspondence within and between self-assessed color groups. We found that HLA itself was a better ancestry indicator than was self-assessed color. Therefore, self-assessment of color in highly admixed populations, such as that of Brazil, is not indicative of higher correspondence in the HLA profiles within skin color groups.

© 2015 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 1143.

* Correspondence and reprint requests: Tábita Hünemeier, Departamento de Genética, UFRGS, Caixa Postal 15053, Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: hunemeier@gmail.com (T. Hünemeier).

1083-8791/© 2015 American Society for Blood and Marrow Transplantation.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.02.019>

CAPÍTULO 5

The HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in a large dataset of South Brazil bone marrow donors from Rio Grande do Sul

Artigo publicado na revista HLA. 2017 Jan;89(1):29-38. Epub 2016 Dec 2.

The HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in a large dataset of South Brazil bone marrow donors from Rio Grande do Sul

J. A. Boquett¹, J. M. Nunes^{2,3}, S. Buhler^{2,4}, M. Z. de Oliveira^{1,5}, L. F. Jobim⁶, M. Jobim⁶,
N. J. R. Fagundes¹, L. Schüler-Faccini¹ & A. Sanchez-Mazas^{2,3}

1 Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (iNaGeMP), Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2 Laboratory of Anthropology, Genetics and Peopling History, Department of Genetics and Evolution - Anthropology Unit, University of Geneva, Geneva, Switzerland

3 Institute of Genetics and Genomics in Geneva (iGE3), University of Geneva, Geneva, Switzerland

4 Transplantation Immunology Unit and National Reference Laboratory for Histocompatibility, Department of Genetic and Laboratory Medicine, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland

5 Advanced Visualization Laboratory (VIZLab), Universidade do Vale dos Sinos, São Leopoldo, Brazil

6 Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Key words

bone marrow donors; genetic diversity;
HLA; population genetics

Correspondence

Lavinia Schuler-Faccini
Departamento de Genética
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Caixa Postal 15053
Agencia Campus UFRGS
CEP 91501-970
Porto Alegre RS
Brazil
Tel: +51 33086726
Fax: +51 33598010
e-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br
and

Alicia Sanchez-Mazas
Laboratory of Anthropology
Genetics and Peopling History (AGP)
Department of Genetics and
Evolution – Anthropology Unit
University of Geneva
12 rue Gustave-Revilliod
1227 Geneva
Switzerland
Tel: +41 (0)22 379 69 65
Fax: +41 (0)22 379 31 94
e-mail: alicia.sanchez-mazas@unige.ch

Abstract

Human leukocyte antigen (HLA) genes are very informative in population genetics studies and their variability has been widely used to reconstruct the history of geographic and/or demographic expansions of human populations. The characterization of HLA diversity at the population level is also fundamental in clinical studies, particularly for bone marrow transplantation programs. In this study, we investigated the HLA molecular variation in Rio Grande do Sul, South Brazil, in order to identify possible regional differences across this state. More than 97,000 bone marrow donors were typed at the HLA- A, -B and -DRB1 loci and analyzed by considering two kinds of subdivisions based on both self-identified ethnicity and place of residence: (a) the official geographic subdivision defined by the Brazilian Institute of Geography and Statistics and (b) known information about the colonization history of the state. HLA allele and haplotype frequencies were estimated and compared among the defined subgroups. The results indicate a lack of correlation between genetic variation and geography and thus no clear HLA genetic structure based on geographic criteria. On the other hand, major differences were observed regarding ethnicity. In addition, local populations from Rio Grande do Sul were found to be genetically similar to their corresponding parental European populations from Germany, Italy and Portugal, as documented by historical data. Overall, this study provides a thorough characterization of the HLA genetic variation in Rio Grande do Sul and a better understanding of its demographic history, being most useful for the development of more efficient strategies in bone marrow donors' recruitment.

Received 22 July 2016; revised 12 October
2016; accepted 26 October 2016

doi: 10.1111/tan.12933

CAPÍTULO 6

Análise da estrutura genética espacial HLA e sua correlação com doenças autoimunes no Rio Grande do Sul

Artigo a ser submetido para publicação

Análise da estrutura genética espacial HLA e sua correlação com doenças autoimunes no Rio Grande do Sul

Juliano André Boquett^{1,2 *}, Marcelo Zagonel de Oliveira^{1,3 *}, Luis Fernando Jobim⁴, Mariana Jobim⁴, Nelson Jurandi Rosa Fagundes^{1,2}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,2}

¹Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, INaGeMP, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³Advanced Visualization Laboratory (VIZLab), Universidade do Vale dos Sinos, São Leopoldo, Brazil

⁴Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

* Ambos autores contribuíram igualmente neste trabalho

Resumo

Os genes HLA são os mais polimórficos do genoma humano e apresentam frequências alélicas distintas em populações de diferentes regiões geográficas do mundo, servindo como marcadores genéticos em estudos de ancestralidade. Além disso, alelos HLA específicos podem estar associados à diversas doenças autoimunes e infecciosas. O Brasil possui o terceiro maior banco de doadores de medula óssea do mundo, onde constam dados genéticos dos loci HLA-A, -B e -DRB1. Desde 1991 o Brasil mantém o banco de dados DATASUS, sistema alimentado com dados epidemiológicos e de saúde de registro compulsório em todo o Brasil. Neste trabalho realizamos análise espacial e georeferenciamento de dados genéticos HLA e de doenças autoimunes no Rio Grande do Sul. Os resultados indicam uma estrutura genética HLA compatível com a história de colonização do RS, onde é possível observar diferenciação entre as regiões que sofreram processo de colonização distintos, como as regiões sudoeste e metropolitana em relação à região central e noroeste. Análises espaciais sobre dados de internação de doenças autoimunes foram realizadas, revelando agrupamentos para artrite reumatoide e doença de Crohn na região centro-oriental do estado e agrupamento para esclerose múltipla na região centro-ocidental. A avaliação da correlação entre a frequência alélica e a ocorrência de doenças autoimunes indicou uma correlação significativa entre o alelo HLA-B*08 e artrite reumatoide. O mapeamento genético de populações tem grande relevância econômica na formulação de campanhas e políticas de saúde pública, contribuindo no planejamento e ajuste de ações clínicas, bem como informar e educar profissionais e público.

CAPÍTULO 7

Discussão

Os genes HLA são os mais polimórficos do genoma humano e suas frequências alélicas variam entre populações de diferentes regiões geográficas e etnias pelo mundo. Desse modo, os genes HLA têm sido amplamente usados como marcadores genéticos em estudos de genética de populações e no estudo de expansões demográficas de populações humanas. O conhecimento do *background* e a diversidade genética de uma população é muito valioso para a medicina e ações de políticas públicas. Assim, nossa motivação consistiu na caracterização HLA da população gaúcha visando contribuir no melhor entendimento da ancestralidade e miscigenação da população do Rio Grande do Sul, bem como na efetividade na gestão de programas de transplante de medula óssea.

No Brasil, a caracterização étnica da população é realizada por autodeclaração baseada basicamente na cor da pele. O IBGE define cinco categorias de cor para classificação: amarela, branca, indígena, parda e preta. A população brasileira é caracterizada por sua substancial miscigenação, sendo geneticamente composta por diferentes graus de mistura entre suas populações parentais: Europeia, Africana e Nativa Americana (Sans, 2000; Salzano, 2004). As categorias de cor definidas pelo IBGE remetem às populações parentais, onde a cor branca representa origem europeia, preta representa origem africana, indígena representa nativos americanos, amarela representa origem asiática e cor parda representa a mistura entre populações parentais. De acordo com o censo do IBGE de 2010, baseado em auto percepção de cor de pele, a população do Rio Grande do Sul é constituída por 81,4% de brancos, 5,0% de negros, 13,3% de pardos e 0,3% de amarelos ou indígenas (IBGE, 2010).

No primeiro artigo da tese – *Self-Assessment of Color Categories and Its Relationship with HLA Profiling in Brazilian Bone Marrow Donors* –, avaliamos a correspondência do perfil HLA dentro e entre grupos étnicos baseado na informação genética HLA e na informação de autodeclaração de cor de pele. A correspondência entre marcadores informativos de ancestralidade (*Ancestry Informative Markers*, AIMs) e etnia (baseada na autopercepção de cor de pele) tem sido bastante estudada em populações brasileiras. Diferentes AIMs podem ser empregados neste tipo de estudo, como SNPs (Leite *et al.*, 2011; Lins *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2003), *indels* (Parra *et al.*, 2003; Pena *et al.*, 2011; Cardena *et al.*, 2013), microssatélites forenses (Pimenta *et al.*, 2006) e região hipervariável do DNA mitocondrial (Cardena *et al.*, 2013). De modo geral, estes estudos apresentam disparidades entre autopercepção de etnia e ancestralidade genética em populações brasileiras, indicando que em populações altamente miscigenadas a

autodeclaração de etnia baseada em cor de pele não é uma ferramenta eficiente para a caracterização da população. Ainda, Cardena e colaboradores (2013) reportam que a etnia autodeclarada fornece indiretamente importante informação cultural e socioeconômica do indivíduo. No mesmo sentido, Leite e colaboradores (2011) indicam que o *status* socioeconômico estava significativamente associado à cor autodeclarada em seu estudo.

No nosso estudo utilizamos polimorfismos do sistema HLA como marcadores genéticos, e os resultados obtidos são concordantes aos resultados obtidos em estudos prévios entre autopercepção étnica e ancestralidade genética (Parra *et al.*, 2003; Pimenta *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2011; Lins *et al.*, 2011; Cardena *et al.*, 2013). Devido a características como a alta variabilidade genética e o forte desequilíbrio de ligação, os genes HLA têm sido usados como marcadores genéticos em estudos de ancestralidade (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011), e dentre os genes HLA clássicos, o *locus* HLA-A é mais sensível à processos demográficos por ser menos propenso à ação da seleção balanceadora (Sanchez-Mazas *et al.*, 2013; Inotai *et al.*, 2015). De acordo com nossos resultados, o sistema HLA é um melhor indicador de ancestralidade que a auto avaliação baseada em cor de pele. No nosso trabalho utilizamos genes HLA como marcadores de ancestralidade e incluiu mais de 70 mil indivíduos nas análises.

Apesar da autopercepção de etnia baseada em cor de pele não ser uma ferramenta eficiente para a caracterização da população, as frequências alélicas apresentaram variação entre os grupos étnicos. Por outro lado, o haplótipo tipicamente caucasiano A*01~B*08~DRB1*03 foi detectado em todas as categorias testadas – incluindo os grupos autoidentificados nas cores preta, parda e amarela, ainda que em menores frequências –, reforçando o indicativo da mistura entre grupos da população. Em 2014, Ruiz-Linares e colaboradores observaram que indivíduos autodeclarados como pretos apresentavam cerca de 40% de ancestralidade genética europeia, enquanto que os autodeclarados pardos apresentavam cerca de 70% de ancestralidade genética europeia.

Populações miscigenadas podem favorecer o surgimento de novos haplótipos. Interessantemente, dois haplótipos apresentaram frequência mais alta no grupo de cor parda, categoria que representa a mistura entre etnias, do que nos demais grupos. O primeiro é o haplótipo A*31~B*39~DRB1*08, que não está descrito nas populações parentais utilizadas no estudo, existindo apenas o registro em outra população brasileira (Castelli *et al.*, 2010). O segundo é o haplótipo A*02~B*15~DRB1*07, que apresentou frequência no grupo de cor parda muito semelhante à descrita para a população açoriana

(Spínola *et al.*, 2005). O Rio Grande do Sul tem forte influência da colonização açoriana em sua população, principalmente na região de Porto Alegre, que compõe substancialmente o *dataset* utilizado neste estudo.

Ainda neste estudo, avaliamos a probabilidade de correspondência HLA dentro e entre os grupos autoidentificados como brancos e pretos. Nossos resultados indicaram que é mais provável um indivíduo autodeclarado preto encontrar outro indivíduo com HLA correspondente no grupo todo – incluindo brancos e pretos –, do que apenas dentro do seu grupo. Para o grupo de indivíduos autodeclarados brancos é mais provável um indivíduo encontrar outro indivíduo com HLA correspondente dentro do seu grupo do que considerando o grupo todo. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que, considerando o sistema HLA, populações Europeias são menos polimórficas do que populações Africanas (Beatty *et al.*, 1995).

No segundo artigo da tese – *The HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in a large dataset of South Brazil bone marrow donors from Rio Grande do Sul* – investigamos a variação molecular HLA no Rio Grande do Sul buscando identificar possíveis diferenças regionais dentro do estado. Investigações acerca da diversidade genética nos genes HLA e diferenças genéticas regionais entre populações utilizando registros de doadores de medula óssea têm sido realizadas ao longo do tempo em países como França (Lonjou *et al.*, 1995), Itália (Rendine *et al.*, 1998), Alemanha (Schmidt *et al.*, 2010), Suíça (Buhler *et al.*, 2012), Polônia (Schmidt *et al.*, 2013), Canadá (Quebec) (Buhler *et al.*, 2015), Hungria (Inotai *et al.*, 2015), Portugal e Espanha (Península Ibérica) (Romòn *et al.*, 2016). No Brasil, frequências alélicas e haplotípicas dos genes HLA já foram descritas em algumas regiões, como em Pernambuco (Nigam *et al.*, 2004), no Piauí (Carvalho *et al.*, 2013), em São Paulo (Ayo *et al.*, 2015), na cidade de Curitiba-PR (Ruiz *et al.*, 2005) e comparações regionais foram realizadas em um estudo envolvendo amostras de todas as regiões do Brasil (Fabreti-Oliveira *et al.*, 2014).

Estes estudos auxiliam na caracterização genética das populações. Lonjou e colaboradores (1995), por exemplo, demonstraram através da análise de haplótipos dos genes HLA-A, -B e -DRB1 de doadores de medula óssea na França, que a região da Provença é mais diversa haplotipicamente do que a região da Bretanha. Resultados como estes podem ajudar a direcionar campanhas de captação de doadores de medula óssea em regiões com maior diversidade genética, buscando uma maior representatividade no seu registro de doadores. De maneira semelhante, Rendine e colaboradores (1998) analisaram

as frequências alélicas dos genes HLA-A e -B do registro de doadores de medula óssea da Itália. Seus resultados apontam que a Sardenha apresenta uma grande diferenciação genética em comparação com as outras regiões que, por sua vez, também diferenciam-se entre si, como as regiões centro-sul e centro-norte. Os autores sugerem que as regiões mais ao sul, por apresentar maior heterogeneidade genética, têm maior probabilidade de contribuir com doadores com fenótipos que ainda não estão presentes no registro de doadores de medula óssea italiano.

Na Alemanha, a avaliação da diversidade genética dos genes HLA nas diferentes regiões do país revelou três agrupamentos principais: noroeste, leste e sul, sendo a região sul a que apresenta maior diversidade genética (Schmidt *et al.*, 2010). Na província de Quebec (Canadá) as análises revelaram que apesar da baixa diversidade genética HLA encontrada, a variação genética está correlacionada com a geografia (Buhler *et al.*, 2015). Entretanto, nem sempre são encontradas grandes diferenças genéticas no sistema HLA de algumas populações. Em um estudo realizado na Polônia, por exemplo, as diferenças encontradas entre as regiões foram muito pequenas, não sendo suficientes, portanto, para a recomendação de esforços de recrutamento de doadores em regiões específicas (Schmidt *et al.*, 2013).

Além de permitir detectar diferenças regionais, esse tipo de estudo permite também identificar traços históricos e culturais. No estudo de Buhler e colaboradores (2012), por exemplo, onde os autores apresentam a diversidade genética HLA na Suíça, foi encontrada uma relação genética entre as populações concordante com dados históricos e linguísticos. De maneira semelhante, uma relação genética entre províncias que compartilham um *background* linguístico em comum foi observado na Península Ibérica, sugerindo uma influência significativa da diversidade cultural (linguística) na Espanha e em Portugal (Romòn *et al.*, 2016). Inotai e colaboradores (2015) realizaram um estudo de diversidade HLA em uma população de ciganos húngaros e os compararam com outras populações ciganas da Europa. Seus resultados indicam que as diferentes populações ciganas europeias compartilham uma origem comum, mas se diferenciaram geneticamente como consequência do efeito fundador e da rápida deriva genética. Ao analisar a população húngara não-cigana, os autores encontraram semelhanças a populações geograficamente próximas na Europa Central. Estes resultados enfatizam a habilidade do polimorfismo HLA em detectar sinais da história demográfica e do povoamento humano (Inotai *et al.*, 2015).

No Brasil, Fabreti-Oliveira e colaboradores (2014) utilizaram amostras de 551 doadores de medula óssea das cinco regiões do Brasil – Centro-Oeste, Nordeste, Norte, Sudeste e Sul – em alta resolução para HLA-A, -B, -C, -DRB1 e DQB1. Como esperado, o trabalho indica uma composição genética heterogênea da população brasileira, com frequências alélicas e haplotípicas muito distintas entre as regiões brasileiras. Em Pernambuco, um trabalho realizado apenas com HLA de Classe I apresentou resultados condizentes com as evidências antropológicas da origem da população de Pernambuco (Nigam *et al.*, 2004). Carvalho e colaboradores (2013), ao analisar dados genéticos HLA no Piauí, também encontraram dados que coincidem com a história do povoamento do estado.

Bortolotto e colaboradores (2011) apresentaram dados referentes à frequência de alelos e haplótipos HLA para a população do Rio Grande do Sul em uma amostra composta por 5 mil doadores de medula óssea oriundos da mesorregião metropolitana de Porto Alegre. Neste trabalho os autores compararam as frequências alélicas encontradas com frequências de outras regiões do Brasil, bem como fizeram comparações dentro da própria amostra, dividida em autodeclarados brancos, pardos (mestiços) e pretos. As frequências alélicas e haplotípicas encontradas por Bortolotto e colaboradores (2011) são compatíveis com as frequências encontradas para todo o estado, e também estratificado em grupos étnicos autodeclarados, no nosso primeiro artigo (capítulo 4 - *Self-Assessment of Color Categories and Its Relationship with HLA Profiling in Brazilian Bone Marrow Donors*) e também com as frequências encontradas no segundo artigo na microrregião de Porto Alegre (capítulo 5 - *The HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in a large dataset of South Brazil bone marrow donors from Rio Grande do Sul*), onde as frequências também foram calculadas de acordo com grupos étnicos baseados em autodeclaração de cor de pele.

Em seu trabalho, Bortolotto e colaboradores (2011) compararam as frequências alélicas dos 10 alelos mais frequentes em cada *locus* (HLA-A, -B e -DRB1) com amostras de diferentes regiões do Brasil. Na maioria das comparações não foram encontradas diferenças significativas. Entretanto, quando as frequências alélicas foram comparadas entre diferentes etnias na mesma amostra, foram encontradas diferenças significativas em alguns alelos entre brancos *vs* pretos, mas não entre brancos *vs* pardos e pretos *vs* pardos. Similarmente, nossas análises não revelaram estrutura regional significativa no nosso

trabalho, mas foi encontrada estrutura quando testados grupos étnicos (capítulo 5, *appendix S6*, página 89).

Porém, as diferenças não são tão claras quando realizamos comparações F_{ST} par-a-par em quatro microrregiões com tamanho amostral suficiente para autodeclarados brancos e pretos (Campanha Ocidental, Caxias do Sul, Pelotas e Porto Alegre). As populações compostas por brancos e pretos de cada microrregião foram reamostradas 1000 vezes em amostras de 100 indivíduos, e então submetidas ao teste de F_{ST} . Pelotas foi a região com maior diferenciação entre brancos e pretos (99,7% para HLA-A), enquanto que Campanha Ocidental e Caxias do Sul (65,5% e 45% para HLA-A, respectivamente) apresentaram menor diferenciação (capítulo 5, *table S4*, página 59). Os resultados distintos observados quando comparados autodeclarados brancos e pretos de diferentes regiões, como Pelotas e Caxias do Sul, por exemplo, corroboram os achados publicados no primeiro artigo da tese (capítulo 4), em que a autodeclaração baseada em cor de pele não é um bom indicador de ancestralidade. Ainda, HLA-A exibiu maiores diferenças entre as populações compostas por brancos e pretos, seguido de HLA-B e HLA-DRB1. Este resultado está de acordo com a proposição de que o *locus* HLA-A é mais sensível aos processos demográficos (como a deriva genética) do que os outros genes HLA clássicos por ser menos propenso à seleção balanceadora (capítulo 5, *table S2*, página 56; Sanchez-Mazas *et al.*, 2013; Inotai *et al.*, 2015).

No nosso trabalho, avaliamos e comparamos a diversidade genética HLA entre as regiões administrativas do Rio Grande do Sul em uma amostra com mais de 97 mil indivíduos. Segundo o IBGE, estado está subdividido em 7 mesorregiões e 35 microrregiões, sendo esta divisão útil na elaboração de políticas públicas. Nossos resultados não indicaram correlação entre a variação genética HLA e a divisão regional oficial do estado. Quando comparada com as populações parentais e com dados históricos, a população rio-grandense apresenta maior similaridade genética com suas populações parentais correspondentes. Por exemplo, regiões do sudeste, sudoeste e região metropolitana apresentaram maior similaridade com as populações parentais portuguesas incluídas no estudo para comparação, enquanto que as regiões centrais, nordeste e noroeste estão mais proximamente relacionadas com populações parentais alemãs e italianas. É importante ressaltar que microrregiões do estado possuíam tamanho amostral bastante desigual, o que poderia afetar os resultados. Assim, foi realizado um processo de reamostragem com robusta validação, a fim de evitar vieses nas comparações

populacionais. A caracterização da diversidade genética HLA no Rio Grande do Sul apresentada neste trabalho contribui para o entendimento da história demográfica do estado, bem como pode ser útil para o desenvolvimento de estratégias de recrutamento de doadores de medula óssea mais efetivas.

Finalmente, no terceiro artigo da tese – Análise da estrutura genética espacial HLA e sua correlação com doenças autoimunes no Rio Grande do Sul – realizamos análise espacial e georreferenciamento de dados genéticos HLA e de doenças autoimunes no estado. Através da análise de componentes principais sobre as frequências alélicas dos genes HLA-A, -B e -DRB1 e da interpolação dos pontos amostrados, foi possível propor um mapa com a estrutura genética HLA para cada *locus* no estado. A estrutura apresentada é muito semelhante aos mapas das regiões culturais do Rio Grande do Sul, proposto por Neto e Bezzi (2008), onde é possível diferenciar as diferentes regiões de colonização do estado. Além disso, apresentamos a distribuição dos dados de internação para doenças autoimunes – artrite reumatoide, esclerose múltipla e doença de Crohn. Análises de *cluster* relevaram regiões *hot spot* para cada doença incluída no estudo. Resultados como este podem ser relevantes na ação de agentes públicos com a finalidade de investigar e compreender que fatores podem estar contribuindo para este desfecho.

Ainda neste trabalho, realizamos análise de correlação entre as frequências alélicas HLA e os dados de internação de doenças autoimunes. Sete alelos HLA apresentaram correlação positiva e significativa com as doenças autoimunes testadas, porém apenas uma correlação (HLA-B*08 e RA) manteve significância estatística após correção para múltiplos testes. Interessantemente, a correlação entre o alelo HLA-B*08 e um tipo específico de RA – tipo anticorpos anti-proteínas citrulinadas negativas – já havia sido estabelecida por Han e colaboradores (2014).

O uso de informações em grandes bancos de dados como o REDOME e o DATASUS aliado à ferramentas de georreferenciamento pode auxiliar na identificação de marcadores úteis em genética de populações que possam conferir resistência ou susceptibilidade a doenças. O mapeamento genético de populações tem grande relevância econômica na formulação de campanhas e políticas de saúde pública, e seu uso pode contribuir para informar e educar profissionais e público, dar mais poder à tomada de decisões em todos os níveis, e auxiliar no planejamento e ajuste de ações clínicas e de custo-efetivas, monitorar e analisar mudanças.

Nesta pesquisa apresentamos extensivos dados referentes à caracterização HLA da população rio-grandense levando em consideração dados históricos e geográficos. Os resultados aqui apresentados podem ter utilidade na otimização de campanhas de recrutamento de medula óssea bem como contribui com o entendimento do contexto histórico e demográfico do estado do Rio Grande do Sul. As estratégias e ferramentas utilizadas nesta pesquisa poderão servir como base para futuros estudos em outras populações.

Referências Bibliográficas

Ayo CM, da Silveira Camargo AV, Xavier DH, Batista MF, Carneiro OA, Brandão de Mattos CC *et al.* (2015) Frequencies of allele groups HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 in a population from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Int J Immunogenet* 42(1):19-25.

Beatty PG, Mori M, Milford E (1995) Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. *Transplantation* 60:778-783.

Benacerraf, B e McDevitt HO (1972) Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*, 175:273-279.

Bisso-Machado R (2006) Negros, mas nem tão africanos. Monografia de bacharelado em Ciências Biológicas. UFRGS.

Bone Marrow Donors Worldwide: Number of donors. Disponível em: www.bmdw.org. Acesso em: dezembro de 2016.

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* 73:180-185.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. REDOME - Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea. Disponível em: redome.inca.gov.br. Acesso em dezembro de 2016.

Buhler S e Sanchez-Mazas A (2011) HLA DNA sequence variation among human populations: molecular signatures of demographic and selective events. *PLoS One* 6(2):e14643.

Buhler S, Nunes JM, Nicoloso G, Tiercy JM, Sanchez-Mazas A (2012) The heterogeneous HLA genetic makeup of the Swiss population. *PLoS One* 7(7):e41400.

Buhler S (2007) Etude du polymorphisme moléculaire des gènes HLA de classes I et II à l'échelle mondiale: analyse de la diversité nucléotidique dans les populations. Geneva, Switzerland: Department of Anthropology, University of Geneva. Tese de doutorado.

Buhler S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Richard L (2015) HLA-A, B and DRB1 genetic heterogeneity in Quebec. *Int J Immunogenet* 42:69-77.

Buus S (1999) Description and prediction of peptide-MHC binding: the 'human MHC project'. *Curr Opin Immunol* Apr 11(2):209-13.

Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, *et al.* (2013) Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One* 8:e62005.

Carvalho MG, Tsuneto LT, Moita Neto JM, Sousa LC, Sales Filho HL, Macêdo MB *et al.* (2013) HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies in Piauí's volunteer bone marrow donors enrolled at the Brazilian registry. *Hum Immunol* 74(12):1598-1602.

- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, *et al.* (2010) Evaluation of computational methods for the reconstruction of HLA haplotypes. *Tissue Antigens* 76:459-466
- Currat M, Poloni ES, Sanchez-Mazas A (2010) Human genetic differentiation across the Strait of Gibraltar. *BMC Evol Biol* 10:237.
- Dausset J (1954) Leuco agglutinins and blood transfusion. *Vox sanguinis* 4:190-194.
- Dausset J (1958) Iso-leuco-anticorps. *Acta haematologica*, 20:156-166.
- Dausset J (1984) The birth of MAC. *Vox sanguinis* 46(4):235-237.
- Delarbre C, Jaulin C, Kourilsky P, Gachelin G (1992) Evolution of the major histocompatibility complex: a hundred-fold amplification of MHC class I genes in the African pigmy mouse *Nannomys setulosus*. *Immunogenetics* 37:29-38
- du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S *et al.* (2005) New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 52(4):1063–1068
- 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* 84(2):187-197.
- Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H (2004) Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 104(7):1923-1930.
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ (2009) Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 10(4):241-51.
- Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G (2013) High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood* 122(18):3220-3229.
- Gorer, PA (1936) The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group A serum. *J Genet* 32:17–31.
- Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A *et al.* (2010) Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA* 303(16):1617-24.
- Gratwohl A, Baldomero H, Gratwohl M, Aljurf M, Bouzas LF, Horowitz M, *et al.* (2013) Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study. *Haematologica* 98(8):1282-90.
- Guernier V, Hochberg ME, Guégan JF (2004) Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLoS Biol* 2, e141.

Guerreiro-Junior VF (2007) Do Porto dos Casais a Porto Alegre: A trajetória demográfica e evolutiva de uma cidade revelada através de marcadores genéticos uniparentais. Dissertação de mestrado. UFRGS.

Haino M, Hayashida H, Miyata T, Shin EK, Matsuda F, Nagaoka H, Matsumura R, Takashi S, Fukita Y, Fujikura J, Honjo T (1994) Comparison and evolution of human immunoglobulin VH segments located in the 39 0.8-megabase region: Evidence for unidirectional transfer of segmental gene sequences. *J Biol Chem* 269:2619–2626.

Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC (2010) Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15. *Neurology* 74:1905-1910.

Heinemann FM (2009) HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology. *Transfus Med Hemother* 36(4):273-278.

Hernandez-Frederick CJ, Giani AS, Cereb N (2014) Identification of 2127 new HLA class I alleles in potential stem cell donors from Germany. *Tissue Antigens* 83(3):184-189.

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr *et al.* (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 12:889-99.

Hünemeier T, Carvalho C, Marrero AR, Salzano FM, Junho Pena SD, Bortolini MC (2007) Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. *Am J Phys Anthropol* 133(2):854-67.

Hurley CK, Fernandez Vina M, Setterholm M (2003) Maximizing optimal hematopoietic stem cell donor selection from registries of unrelated adult volunteers. *Tissue Antigens* 61(6):415-424.

IBGE: Pesquisa Nacional Por amostra de domicílios e contagem da população. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.

INCA - Tópicos em transplante de células-tronco hematopoéticas / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2012. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/topicos_transplantes.pdf
Acesso em dezembro de 2016

Inotai D, Szilvasi A, Benko S *et al.* (2015) HLA genetic diversity in Hungarians and Hungarian Gypsies: complementary differentiation patterns and demographic signals revealed by HLA-A, -B and -DRB1 in Central Europe. *Tissue Antigens* 86:115-121.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2007) *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença.* 6ª Ed. Artmed, Porto Alegre.

Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H *et al.* (2009) Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 458:641–645.

Kelley-Hedgpeth A, Lloyd-Jones DM, Colvin A, Matthews KA, Johnston J, Sowers MR, Sternfeld B, Pasternak RC, Chae CU; SWAN Investigators (2008) Ethnic differences in C-reactive protein concentrations. *Clin. Chem* 54:1027-1037.

Khor CC, Chau TN, Pang J, Davila S, Long HT, Ong RT, Dunstan SJ, Wills B, Farrar J, Van Tram T *et al.* (2011) Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. *Nat Genet.* 43:1139-1141

Klein, J (1986) Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley & Sons, New York.

Klein J, Satta Y, O'hUigin C, Takahata N (1993) The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 11:269-295.

Klein J, Sato A (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343(10):702-709.

Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z (2013) Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* (2):170-179.

Leite TK, Fonseca RM, de França NM, *et al.* (2011) Genomic ancestry, self-reported "color" and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One* 6:e27162.

Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, *et al.* (2011) Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol* 21:240-245.

Lonjou C, Clayton J, Cambon-Thomsen A, Raffoux C (1995) HLA -a, -b, -dr haplotype frequencies in France - implications for recruitment of potential bone marrow donors. *Transplantation* 60:375-383.

Majhail NS, Farnia SH, Carpenter PA, Champlin RE, Crawford S, Marks DI *et al.* (2015) Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:1863-1869.

Malfroy L, Roth MP, Carrington M, Borot N, Volz A, Ziegler A, Coppin H (1997) Heterogeneity in rates of recombination in the 6-Mb region telomeric to the human major histocompatibility complex. *Genomics* 43:226-231

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, *et al* (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 75:291-455

Marrero AR (2006) História genética dos gaúchos: dinâmica demográfica do sul do Brasil. Tese de doutorado. UFRGS.

Marrero AR, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Júnior WA, Bortolini MC (2005)

Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* 17(4):496-506.

Meyer D, Single RM, Mack SJ, Erlich HA, Thomson G (2006) Signatures of demographic history and natural selection in the human major histocompatibility complex Loci. *Genetics* 173:2121-2142.

Meyer D e Thomson T (2001) How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Annals of Human Genetics* 65(1):1-26.

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):1048-52.

Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S *et al.*; Japan Marrow Donor Program (2010) Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood* 115(23):4664-4670.

Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, Jones MC, Horton R, Hunt SE, Scott CE *et al.* (2003) The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 425(6960):805-811.

Nédélec Y, Sanz J, Baharian G, Szpiech ZA, Pacis A, Dumaine A *et al.* (2016) Genetic Ancestry and Natural Selection Drive Population Differences in Immune Responses to Pathogens. *Cell* 167(3):657-669.

Ness RB, Haggerty CL, Harger G, Ferrell R (2004) Differential distribution of allelic variants in cytokine genes among African Americans and White Americans. *Am J Epidemiol.* 160:1033-1038.

Nigam P, Dellalibera E, Mauricio-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.

Oh H, Loberiza FR Jr, Zhang MJ, Ringdén O, Akiyama H, Asai T, Miyawaki S, Okamoto S, Horowitz MM, Antin JH *et al.* (2005) Comparison of graft-versus-host-disease and survival after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in ethnic populations. *Blood* 105(4):1408-1416.

Okin D e Medzhitov R (2012) Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol* 22:R733-R740.

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.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, *et al.* (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:177-182.

- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, *et al.* (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6:e17063.
- Pennington R, Gatenbee C, Kennedy B, Harpending H, e Cochran G (2009) Group differences in proneness to inflammation. *Infect Genet Evol* 9:1371-1380.
- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Hansen JA (2003) Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Tissue Antigens* 61(1):1-11.
- Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Woolfrey AE, Hansen JA (1998) Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* 92(10):3515-3520.
- Petersdorf EW (2016) Mismatched unrelated donor transplantation. *Semin Hematol* 53(4):230-236.
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, *et al.* (2006) Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 62:190-195.
- Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guegan JF, Guernier V, Balloux F (2005) Pathogendriven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr Biol* 15:1022-1027.
- Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, *et al.* (2009) Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 5:e1000369
- Rendine S, Borelli I, Barbanti M, Sacchi N, Roggero S, Curtioni ES (1998) HLA polymorphisms in Italian bone marrow donors: a regional analysis. *Tissue Antigens* 52:135-146.
- René C, Lozano C, Eliaou JF (2016) Expression of classical HLA class I molecules: regulation and clinical impacts. *HLA* 87(5):338-49.
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE (2015) The IPD and IPD-IMGT/HLA Database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research* 43:D423-431.
- Romón I, Montes C, Ligeiro D, Trindade H, Sanchez-Mazas A, Nunes JM, Buhler S (2016) Mapping the HLA diversity of the Iberian Peninsula. *Hum Immunol* 77(10):832-840.
- Ruiz TM, da Costa SM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, Da Graca Bicalho M (2005) Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Parana, Brazil. *Transplant Proc* 37:2293-2296.
- Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, *et al.* (2014) Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and selfperception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* 10:e1004572.

Salzano FM (2004) Interethnic variability and admixture in Latin America – social implications. *Rev Biol Trop* 52:405-415.

Sanchez-Mazas A (2001) African diversity from the HLA point of view: influence of genetic drift, geography, linguistics, and natural selection. *Hum Immunol* 62:937-948.

Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, Rajalingam R, Dugoujon JM, Mack SJ, Thorsby E (2011) Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* 133(2):143-64.

Sanchez-Mazas A, Lemaître, J-F, Currat M (2012) Distinct evolutionary strategies of human leucocyte antigen loci in pathogen-rich environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1590):830-839.

Sanchez-Mazas A e Meyer D (2014) The relevance of HLA sequencing in population genetics studies. *J Immunol Res.* 2014;2014:971818.

Sans M (2000) Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. *Hum Biol* 72:155-177.

Satta Y, O'hUigin C, Takahata N, Klein J (1994) Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7184-7188.

SBTMO - Diretrizes da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea 2012. Disponível em:
[www.sbtmo.org.br/userfiles/fck/Diretrizes_da_Sociedade_Brasileira_de_Transplante_de_Medula_%C3%93ssea_2012_ISBN_978-85-88902-17-6%20\(2\).pdf](http://www.sbtmo.org.br/userfiles/fck/Diretrizes_da_Sociedade_Brasileira_de_Transplante_de_Medula_%C3%93ssea_2012_ISBN_978-85-88902-17-6%20(2).pdf)
Acesso em dezembro de 2016.

Schmidt AH, Solloch UV, Baier D *et al.* (2010) 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* 76: 362-379.

Schmidt AH, Solloch UV, Pingel J *et al.* (2013) Regional HLA differences in Poland and their effect on stem cell donor registry planning. *PLoS One* 8:e73835.

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 JK (2009) The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 54(1):15-39.

Slatkin M, Muirhead CA (2000) A method for estimating the intensity of overdominant selection from the distribution of allele frequencies. *Genetics* 156:2119-2126.

Snell, GD (1981) Studies in histocompatibility. *Science* 213(4504):172-178.

Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, Thomson G (2008) Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte

antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol* 69:443-464.

Spínola H, Brehm A, Bettencourt B, *et al.* (2005) HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens* 66:217-230.

Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM *et al* (2004) Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res* 14:1176-1187.

Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A, Gyetvai A, Lakos G, Szanto S *et al* (2010) Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 9(3):140-143

Takahata N, Satta Y, Klein J (1992) Polymorphism and balancing selection at major histocompatibility complex loci. *Genetics* 130:925-938.

The MHC sequencing consortium (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401(6756):921-3.

Trowsdale J e Knight JC (2013) Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14:301-323.

van der Helm-van Mil AH, Wesoly JZ, Huizinga TW (2005) Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17(3):299-304

van der Woude D, Houwing-Duistermaat JJ, Toes RE, Huizinga TW, Thomson W, Worthington J *et al.* (2009) Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anticitrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60(4):916-923

Vandiedonck C e Knight JC (2009) The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8(5):379-394.

Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, *et al.* (2008) Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *PLOS Genetics* 4(3): e1000037.

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

Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S *et al.* (2003) Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res* 13(12):2621-2636.

Yoshino M, Xiao H, Jones EP, Kumánovics A, Amadou C, Fischer Lindahl K (1997) Genomic evolution of the distal Mhc class I region on mouse Chr 17. *Hereditas* 127:141-148

Anexo



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados

Título do Projeto

Perfil HLA na População do Rio Grande do Sul: Diversidade Genética e Potencial Impacto na Gestão de Transplantes de Medula Óssea	Cadastro no GPPG
--	------------------

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 18 de Julho de 2013.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Lavínia Schüller-Faccini	
Juliano André Boquett	
Tábita Hünemeier	
Marcelo Zagonel de Oliveira	