

---

# HISTOCOMPATIBILIDADE

**HISTOCOMPATIBILIDADE****010****A IMPORTÂNCIA DA PESQUISA DE ALOANTICORPOS HLA NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO-HEMATOPOÉTICA**Torres M<sup>1</sup>, Hamerschlag N<sup>1</sup>, Masaki V<sup>1</sup>, Kondo A<sup>1</sup>, Moraes ME<sup>2</sup>, Martinenez M<sup>2</sup>, Coultrato V<sup>2</sup>, Hue M<sup>3</sup>, Timoner B<sup>3</sup>, Bub C<sup>1</sup><sup>1</sup>Hospital Israelita Albert Einstein - São Paulo - SP<sup>2</sup>Fundação Amaral Carvalho - Jaú - SP<sup>3</sup>Laboratório JRM Investigações Imunológicas - Rio de Janeiro - RJ

**Introdução:** O significado clínico dos anticorpos anti-HLA foi pela primeira vez documentada por Terasaki e colaboradores (1965) que correlacionaram à presença de anticorpos pré-formados no soro do receptor com a perda do enxerto renal por rejeição. Os pacientes podem ser sensibilizados contra antígenos HLA devido transfusões sanguíneas, gestações ou transplantes prévios. A introdução de leucodepleção universal reduziu uma das fontes de aloimunização, mas tal procedimento não é amplamente utilizado no Brasil. Estudos em animais e humanos têm mostrado associação dos anticorpos doador específico (DSA) e falha na pega do enxerto (rejeição) no transplante de células-tronco hematopoética (TCTH). Recentes estudos do NMDP/CIBMTR descrevem a presença de anticorpos HLA em um terço dos pacientes candidatos a TCTH. Nos receptores com falência do enxerto, DSA foi detectado em 24% dos casos. A presença de DSA também apresentou associação estatisticamente significativa com uma piora da sobrevida global. **Objetivos:** Determinar a frequência dos aloanticorpos HLA e DSA nos receptores candidatos a TCTH no Hospital Albert Einstein e Fundação Amaral Carvalho. **Metodologia:** No período 2010 a 2012, a pesquisa de anticorpos HLA foi realizada em 161 pacientes (62% do sexo masculino e 38% do sexo feminino) candidatos a TCTH no Hospital Albert Einstein (SP) e na Fundação Amaral Carvalho (Jaú) com doadores não aparentados ou sangue de cordão umbilical. A metodologia utilizada foi o ensaio de fase sólida, plataforma luminex. As amostras foram avaliadas pelo teste de triagem utilizando os reagentes Labscreen (LSM12, One Lambda) e a identificação das especificidades dos anticorpos foi realizada utilizando os reagentes LABScreen® Single Antigen HLA Class I e II, One Lambda. A tipificação HLA-DPB1 foi realizada nos pacientes e doadores quando anticorpos anti HLA-DP eram identificados. **Resultados:** A pesquisa de anticorpos HLA foi negativa em 111 /161 (69%) dos pacientes, sendo 37 (33%) do sexo feminino e 74 (67%) do sexo masculino. Os anticorpos HLA foram detectados em 31% das amostras, sendo a sensibilização de 40% no sexo feminino e 26% no sexo masculino. Nos pacientes positivos, 22 (14%), apresentavam anticorpos HLA classe I, 8 (5%) classe II e 20 (12%) classe I e II. Os anticorpos doador específico foram detectados em 6/161 (3,7%) dos pacientes, sendo 66% dos casos anti HLA-DP. Em quatro pacientes com DSA foi possível selecionar outros doadores. Num dos pacientes do sexo feminino, que não havia outro doador disponível, foi realizada plasmáfereze previamente ao TCTH com redução significativa dos níveis de anticorpos. Em outra paciente, foi observada a redução de anticorpos após ser submetida a tratamento por quimioterapia. **Conclusão:** A pesquisa e identificação das especificidades dos anticorpos é uma estratégia que deveria ser considerada na seleção de doador no TCTH com doadores não aparentados e com incompatibilidades antigênicas ou alélicas. A frequência de 31% de anticorpos HLA encontrada nos pacientes está de acordo com a descrita na literatura e demonstra o risco de encontrarmos DSA nos pacientes candidatos a transplantes com incompatibilidades HLA, incluindo o locus HLA-DPB1.

**011****AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS DOS GENES HLA-A, HLA-B E HLA-DR NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE SÃO PAULO E RONDÔNIA.**Cita RF<sup>1,2</sup>, Junior CTM<sup>3</sup>, Franca MA<sup>2</sup>, Gigliotti CB<sup>2</sup>, Medeiros L<sup>2</sup>, Donadi EA<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil<sup>2</sup>Laboratório de Imunogenética, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos-SP, Brasil.<sup>3</sup>Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil

O conhecimento das frequências alélicas envolvendo genes HLA assume um papel relevante no contexto do transplante de órgãos sólidos e tecidos, quando se trata de se buscar um doador não relacionado para pacientes que não encontraram doador compatível em seu núcleo familiar. Uma classificação dos alelos mais frequentes por etnia pode encurtar a procura do doador ideal, pois a busca inicial pode ser efetuada dentro do próprio grupo étnico do paciente onde há, teoricamente, maiores chances dele encontrar um doador compatível. Além disso, o conhecimento dessas frequências permite estimar as reais chances de um paciente, em uma lista de espera, encontrar um doador que apresente uma maior compatibilidade HLA. O conhecimento da frequência e prevalência dos genes HLA, permitirá a compreensão da biologia da distribuição desses alelos em nossa população, além de possibilitar a comparação com outros grupos populacionais. A variabilidade genética do sistema HLA é útil na pesquisa imunológica para transplantes, a fim de minimizar a rejeição; no fornecimento de informações sobre susceptibilidade ou resistência genética a doenças; nos estudos antropológicos e de genética de populações. Este trabalho tem por objetivo avaliar as frequências de grupos de alelos dos genes que codificam os antígenos HLA-A, HLA-B e HLA-DR em amostras populacionais do estado de São Paulo e Rondônia. A coleta dos dados foi realizada no arquivo do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Câncer de Barretos, no ano de 2011. Para a execução deste trabalho foram selecionados 48.981 indivíduos não relacionados e saudáveis; dos quais, 20.823 pertencem ao estado de São Paulo, e 28.158 ao estado de Rondônia. A composição étnica da população estudada apresentou maior heterogeneidade nos indivíduos de Rondônia (brancos: 48,94%, pardos: 42,55%, negros: 8,25%, amarelos: 0,23% e indígenas: 0,03%), já em São Paulo os indivíduos brancos tiveram maior representatividade (brancos: 73,48%, pardos: 18,16%, negros: 7,49%, amarelos: 0,85% e indígenas: 0,02%). Os antígenos HLA mais frequentes no estado de Rondônia foram A02 (24,8%), A24 (9,5%), A03 (8,9%), A01 (8,7%), A68 (7%), B35 (11,4%), B44 (10,8%), B15 (9,9%), B51 (7,7%), B07 (7%), DR13 (13,4%), DR04 (12,7%), DR07 (12,5%), DR11 (10,8%) e DR03 (10,3%); e os antígenos HLA mais frequentes no estado de São Paulo foram A02 (25,2%), A01 (9,7%), A24 (9,7%), A03 (9,2%), A68 (6,1%), B35 (12,1%), B44 (10,5%), B15 (8,9%), B51 (8,5%), B07 (6,6%), DR11 (13,8%), DR13 (13,2%), DR07 (12,5%), DR04 (11,9%) e DR03 (10,3%). Avaliando a variabilidade genética entre os dois estados, a população de Rondônia apresentou 42 antígenos que não foram encontrados na população de São Paulo, enquanto esta, apenas 5; desta forma, estes dados são informativos para estabelecer estratégias mais eficazes na busca de um doador ideal, pois caracterizam a diferença na distribuição dos alelos dos genes HLA entre as duas regiões.

012

### CLINICAL RELEVANCE OF PRE-FORMED LUMINEX-DETECTED DONOR SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST HLA CLASS I ANTIGENS ON KIDNEY TRANSPLANTS PERFORMED WITH NEGATIVE COMPLEMENT DEPENDENT CYTOTOXICITY T AND B CROSSMATCHES

Holanda-Cavalcanti A<sup>1,2,3</sup>, Campos EF<sup>1,2,3</sup>, Grenzi PC<sup>2</sup>, Marco R<sup>2</sup>, Rampim GF<sup>2</sup>, Tedesco-Silva H<sup>3</sup>, Medina-Pestana JO<sup>1,3</sup>, Gerbase-Delima M<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista Medicina, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Immunogenetics Institute, AFIP São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Ramos, Hospital do Rim e Hipertensão, São Paulo, SP, Brazil

The purpose of this study was to determine the clinical relevance of pre-formed HLA donor specific antibodies (DSA) revealed by Luminex single antigen beads assay (SAB) in kidney transplantation (Tx) performed with negative T (CDC-AHG) and B (CDC) cross-matches. **Methods:** The study included 298 recipients (R) transplanted in a single center, between 2001 and 2006, with negative T and B CDC crossmatches and without any information regarding Luminex-detected antibodies (Ab). Stored pre-Tx sera of 165 R with ELISA PRA class I 0% and of 133 R with ELISA PRA class I  $\geq$  50% were screened with Labscreen Mixed (One Lambda) and the positive ones were further analyzed with the class I or classII SAB assays (One Lambda). In the SAB assay, reactions with MFI > 300 were recorded as positive and DSAs were defined as Abs against HLA-A, B or DR mismatches. Graft survival (GS) curves were constructed with Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test; Cox regression analysis was used to calculate risk of graft loss. **Results:** No difference in GS was detected among R with PRA ELISA and Luminex NEG (N=165), PRA ELISA  $\geq$  50% without DSA (N=44), and PRA ELISA  $\geq$  50% with DSA 300-1,500 MFI (N=19), whereas R with DSA > 1,500 MFI against HLA class I only (N=29) or class I and class II (N=33) presented a lower GS (p<0.001): 92.1% vs 75.8% at 12 months; 76.3% vs 51.6% at 96 months. We could not analyze the impact of isolated HLA class II DSA because only 8 R fell into this category. Class I DSA >1500 MFI conferred a relative risk of 4.4 for graft loss at one year and of 3.0 for late graft loss in recipients with functional kidneys at one year. In addition, R with functional grafts that were transplanted with DSA >1500 MFI presented significantly (p<0.01) lower estimated glomerular filtration rates (Cockcroft-Gault formula), at one month, one year, and five years post-transplant. **Conclusions:** Pre-transplant HLA class I DSAs with MFIs up to 1,500 do not affect Tx outcome, whereas DSAs with MFIs >1,500, although not associated with immediate graft loss, confer risk of long-term graft dysfunction and loss.

013

### ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO BASEADO EM FAMÍLIAS ENTRE OS ALELOS HLA E MICA E HANSENÍASE DA REGIÃO DE SANTO ANTÔNIO DO PRATA, BELÉM DO PARÁ.

Jarduli LR<sup>1</sup>, Alves HV<sup>1</sup>, Souza FC<sup>2</sup>, Marcos EVC<sup>2</sup>, Pereira AC<sup>2</sup>, Baptista IMFD<sup>2</sup>, Ramos GB<sup>3</sup>, Fava VM<sup>3</sup>, Mira MT<sup>3</sup>, Moraes MO<sup>4</sup>, Virmond MCL<sup>2</sup>, Visentainer JEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética - Departamento de Ciências Básicas e da Saúde - Universidade Estadual de Maringá - Maringá, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Lauro Souza Lima - Secretaria do Estado de Saúde - Bauru, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Curitiba, PR, Brasil.

<sup>4</sup>Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo intracelular *Mycobacterium leprae*. Inicialmente, a doença afeta a pele e o sistema nervoso periférico manifestando-se em diferentes formas clínicas, as quais têm como principal característica o tipo de resposta imunitária que o hospedeiro apresenta frente à micobactéria. Atualmente, no cenário mundial, o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking entre os países em números absolutos de casos de hanseníase. As regiões Norte e Centro-Oeste são consideradas hiperendêmicas e a região Nordeste apresenta alto parâmetro de endemicidade. O polimorfismo dos genes HLA e MICA pode gerar produtos diferentes que interagem entre si ou com receptores de alguns tipos celulares, alterando a resposta imune a agentes infecciosos. O objetivo deste trabalho foi investigar a associação genética dos alelos HLA e MICA na ocorrência de hanseníase, através de um estudo de famílias. O estudo consistiu de 51 famílias afetadas da região do Prata -PA, tipificados para os locos HLA-A, C, DRB1 e DQB1 e MICA. A genotipagem foi realizada pelo método PCR-SSO utilizando-se o kit LabType<sup>®</sup> SSO (One Lambda, CA, USA). A análise de associação foi baseada em famílias através do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) implementado no software FBAT 2.0.4. Os alelos HLA-A\*03/11 (P=0,041), HLA-C\*04 (P=0,025), HLA-DRB1\*16 (P=0,048), DQB1\*05 (P=0,004) e MICA\*002 (P=0,003) foram associados com a susceptibilidade à hanseníase, enquanto HLA-C\*12 (P=0,095), DRB1\*15/16 (P=0,055), e MICA\*008 (P=0,075) mostraram uma tendência à associação neste estudo de famílias da região Norte do Brasil. Os resultados do presente estudo confirmam a participação significativa dos alelos HLA-A\*03/\*11, HLA-C\*04, HLA-DRB1\*16, DQB1\*05 e MICA\*002 na susceptibilidade à hanseníase e sugere algumas associações que devem ser melhor investigadas: HLA-C\*1, DRB1\*15/\*16 e MICA\*008.

**Apoio Financeiro:** CNPq e LIG-UEM.

014

### IMPACT OF HLA MATCHING AND PRE-TRANSPLANT PANEL REACTIVE ANTIBODIES (PRA) ON THE OUTCOME OF KIDNEY TRANSPLANTS WITH DECEASED DONORS

Gerbase-Delima M<sup>1,2</sup>, Temin J<sup>2</sup>, Marco R<sup>2</sup>, Rampim GF<sup>2</sup>, Bellintani EC<sup>2</sup>, Dantas LV<sup>2</sup>, Medina-Pestana JO<sup>1,3</sup>, Campos EF<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista Medicina, São Paulo, SP

<sup>2</sup>Immunogenetics Institute, AFIP, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Ramos, Hospital do Rim e Hipertensão, São Paulo, SP, Brazil

The aim of this study was to assess the impact of HLA compatibility and of pre-transplant panel reactive antibodies (PRA) on the outcome of deceased donor kidney (DD) transplants (Tx). The analysis included 3,237 DD-Tx performed from January 1st, 2002, to December 31, 2011. More than 97% of the Tx were performed in a single institution and all histocompatibility tests, except for HLA typing of about 50% of the donors, were performed in a single laboratory. HLA typing was performed by PCR-SSP or PCR-SSO. PRA was determined by ELISA until 2007 and, from 2008 on, by Luminex-based methodology (One Lambda). All Tx were performed with negative T (CDC-AHG) and B (CDC) crossmatches (XM). Since 2008, the presence of donor specific antibodies (DSA) detected with Luminex-single antigen beads (SAB) was considered a contra-indication to the Tx, even in cases with negative T and B XM and, since August 2009, the cut-off for considering a contra-indication to the Tx was set at 1,500 MFI. Patient and graft (patient death or return to dialysis) survival curves were constructed with Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. All the calculations were performed using the database and software package of the official São Paulo State Regional Registry of Transplants. Patient and graft survivals

were superior ( $p < 0.001$ ) in transplants performed with 0 ( $n=231$ ) than with 1-6 ( $n=2,966$ ) HLA-A, B, DR mismatches (MM) (8-y patient survival: 83.6% vs 77.3%; 8-y graft survival: 78.1% vs 71.0%). Concerning HLA-DR MM, graft survival (GS) was superior ( $p < 0.001$ ) in cases of 0 ( $n=2293$ ) than of 1-2 MM ( $n=944$ ), but the effect disappeared during the 4th to the 5th year post-Tx. The impact of pre-TX PRA levels (0-5%; 6 to 79%, and 80-100%) on GS was assessed in Tx performed between Jan. 2002 to Dec 2007, when the PRA was performed with ELISA (ELISA period), and between Jan 2008 and Dec 2011, when the PRA was calculated based on the specificity of the Abs detected by Luminex-SAB and the results of DSA were taken into account in the decision to contra-indicate the Tx (Luminex period). In the ELISA-PRA period, patients with PRA 6-79% ( $n=92$ ) presented lower ( $p < 0.001$ ) graft survival than patients with PRA 0 to 5% ( $n=713$ ), being the 1-y GS 83.7% and 91.9%, respectively. Only 10 patients with PRA  $\geq 80\%$  were transplanted during this period and were not considered for analysis. In the Luminex-PRA period, no difference in graft survival was observed between patients with PRA 6-79% ( $n=333$ ) and 0-5% ( $n=1527$ ), being the 1-y GS 93.5% and 91.1%, respectively. A significantly ( $p < 0.001$ ) lower graft survival, however, was observed in recipients with PRA 80-100% ( $n=62$ ), when compared to those with PRA 6-79%, being the 1-y GS 88.7% and 93.5%, respectively. The results of this analysis support the value of HLA matching in DD kidney Tx and shows that avoiding Tx in R with Luminex detected DSA abolishes the risk of graft loss associated with PRA 6-79%, but apparently not the risk associated with PRA 80-100%.

## 015

### EFICIÊNCIA DA BUSCA DE DOADORES EM FAMÍLIAS ESTENDIDAS

Rapanello EG<sup>1</sup>, Ramos FS<sup>1</sup>, Peres VP<sup>1</sup>, Kiyamu AR<sup>1</sup>, Silva EF<sup>1</sup>, Saito MH<sup>1</sup>, Vergueiro CSV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Irmadade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

**Introdução:** A pesquisa estendida na família é uma forma de aumentar as chances de encontro de doador compatível ao paciente que necessita de um transplante de medula óssea (TMO). Estudos europeus indicam que há chance de sucesso em 7% na busca estendida. Os resultados encontrados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Paraná foram de 8,6% (3/35), segundo trabalho apresentado em 2010 onde foram estudadas 35 famílias estendidas por baixa resolução. **Objetivo:** Avaliar a chance de encontrar doadores aparentados em pesquisas nas famílias de pacientes com indicação de TMO sem doador compatível entre irmãos.

### CASUÍSTICA E MÉTODOS

**Crítérios de Inclusão:** Pacientes com indicação de TMO sem irmão compatível; Pacientes com encaminhamento médico e solicitação de busca estendida; Pacientes registrados no REREME para busca de doador não aparentado; Disponibilidade do paciente ou familiar de comparecer ao Hemocentro para uma entrevista e fornecer dados e suporte para busca familiar. **Crítérios de exclusão:** Falta de solicitação médica por escrito; Não ter família disponível para a busca. A pesquisa consiste na realização de tipificação HLA dos pais, irmãos, filhos e tios (1ª Etapa); sobrinhos (filhos dos tios haploidenticos) e primos 1º grau (2ª Etapa); primos 2º grau (3ª Etapa) e até dos avós. Foram consideradas tipificações HLA realizadas em nosso laboratório e laboratórios externos. O processo de pesquisa é feito da seguinte maneira: Agendamento de entrevista com profissional treinado para explicação do procedimento e coleta de dados; Conferência do laudo das tipificações HLA e análise de haplótipos por segregação do paciente e familiares; listagem de familiares por parentesco; Definição de estratégia de tipificação de acordo com a frequência dos haplótipos e

segregação mendeliana na família. Pesquisa de frequência destes haplótipos: site NMDP – National Marrow Donor Program ; Tipificação HLA dos familiares definidos pela estratégia (A, B e DRB1 por média resolução; Estudo de núcleo familiar, extensão da busca no ramo familiar de interesse (haploidentico) Criação de heredograma; Se doador compatível, tipificação HLA locus C + Classe II por alta resolução; Emissão de relatório. **Resultados:** Entre setembro/2007 a maio/2012 foram realizadas 61 buscas familiares. Para 61 pacientes, estudamos 1025 familiares (média de 16,9 indivíduos por família). Foram encontrados 11 possíveis doadores (18%): 1 pai 9x10, 1 mãe 9x10, 1 tio 10x10, 3 primos 1º grau (um 9x10, um 8x10 e um 7x10), 2 primos 2º grau (um 9x10 e um 8x10) e 3 avós (um 10x10, um 7x8 e um 5x6). **Discussão:** Há maior probabilidade de encontro de doador compatível em famílias com casamentos consanguíneos e nos pacientes que possuem haplótipo frequente na população. Os trabalhos de literatura indicam que nestes casos deve-se fazer busca estendida na família. Apenas um paciente poderia ser incluído na busca estendida se utilizássemos este critério (um tio compatível e casamento de avós consanguíneos). As famílias estudadas tinham em média 1,5 irmãos, que é a realidade das famílias da nossa região (em média menos de dois filhos por casal, segundo Censo 2010). Encontramos candidatos à doação de medula óssea para 18% dos pacientes, com núcleos familiares pequenos, sem haplótipos frequentes e sem casamentos consanguíneos (exceto um caso). O tempo médio de busca foi de 90 dias e o fator que mais influenciou no tempo foi o empenho familiar.

## 016

### ESTUDO DOS GENES KIR E DOS ALELOS HLA DE CLASSE I NO LINFOMA NÃO HODGKIN DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

Marangon AV<sup>1</sup>, Cardozo DM<sup>1</sup>, Aranha JFP<sup>1</sup>, Visentainer JEL<sup>2</sup>, Lieber SR<sup>1</sup>, Silva RF<sup>1</sup>, Guimarães F<sup>1</sup>, Souza CA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá

Os receptores Killer Immunoglobulin-like receptors (KIR) estão relacionados com a ativação e inibição das células Natural Killer (NK) que são especialmente importantes na resposta imune contra infecções virais e contra tumores. Os receptores KIR têm como ligantes as moléculas HLA de classe I e são codificados por genes altamente polimórficos localizados no cromossomo 19q13.4. Muitos estudos realizados nos últimos anos demonstram o envolvimento dos genes KIR na patogênese e progressão de diversas doenças. Entretanto, os efeitos desses genes em doenças hematológicas, tais como os linfomas, ainda são pouco conhecidos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel dos genes KIR e dos alelos HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) no linfoma não Hodgkin difuso de grandes células B (LNHDG-B). Foram incluídos no estudo 87 pacientes diagnosticados com LNHDG-B e 99 indivíduos saudáveis doadores voluntários de sangue e medula óssea. A tipagem dos genes KIR e dos loci HLA-A, -B e -C foram realizadas pela técnica de PCR-SSO, plataforma Luminex. A amplificação do DNA foi realizada com três grupos de iniciadores específicos para os éxons 3, 5 e 7-9 e o produto foi aplicado em gel de agarose a 2% com SYBR safe DNA gel Stain, para confirmar a amplificação. O produto amplificado foi hibridizado com microesferas ligadas a sondas específicas para os genes KIR e alelos HLA. As leituras das reações foram realizadas em citômetro de fluxo que utiliza a tecnologia Luminex e organizadas pelo programa de computador Labscan®. As amostras foram analisadas (programa HLA Fusion™ Research, One Lambda) quanto à presença e ausência dos genes KIR e HLA. As comparações das frequências gênicas foram analisadas pelo Teste Exato de Fisher. Valores de Odds Ratio com 95% de intervalo de confiança também foram calculados. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Graphpad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). O

genótipo KIR2DL2 /KIR2DL3 foi significativamente menos frequente nos pacientes que nos controles (25,3% versus 41,4%, respectivamente,  $P = 0,0305$ ;  $OR = 0,48$ ;  $IC95\% = 0,26-0,90$ ). Quanto aos alelos HLA, o grupo de alelos B\*44 também foi menos frequente nos pacientes quando comparado aos controles (10,6% versus 27,3%, respectivamente,  $P = 0,006$ ;  $OR = 0,31$ ;  $IC95\% = 0,14-0,70$ ). Sendo assim, os alelos HLA e os genes KIR talvez possam ter um papel no LNHDG-B e, esses dados precisam ser ampliados e confirmados em estudos futuros.

## 017

### LEUCEMIAS AGUDAS E FREQUÊNCIA DE ANTIGENOS HLA CLASSE II NO ESTADO DA BAHIA

Menezes EP<sup>1</sup>, Santos LCS<sup>1</sup>, Hora AS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hosp. Univ. Prof. Edgard Santos - UFBA

As leucemias são patologias caracterizadas por alterações no sistema hematopoético e podem ser classificadas em: Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Leucemia Mieloide Crônica (LMC), cujos diagnósticos estão baseados em achados clínicos, morfológicos e imunofenotípicos. O complexo principal de histocompatibilidade é a região do genoma humano com maior polimorfismo e têm sido amplamente estudado em diferentes grupos étnicos. A investigação do polimorfismo do sistema HLA pode contribuir para o entendimento da patogênese da doença e ajudar a definir marcadores de susceptibilidade. As frequências dos alelos HLA em indivíduos com LLA e LMA na população da Bahia e Sergipe ainda não foram determinadas. Nesse estudo foi avaliada a frequência alélica do gene HLA de classe II (DRB1\* e DQB1\*) em 310 indivíduos com diagnóstico de LLA (178) e LMA (132) residentes no Estado da Bahia e Sergipe, usando reação em cadeia de polimerase com prime sequência específica (PCR-SSP) e reação em cadeia de polimerase com oligonucleotídeos sequência específica (PCR-SSO). Nós observamos que os alelos DRB1\*11 (13,5%), DRB1\*13 (13,2%) e DRB1\*07 (12,1%) foram mais comuns para LLA. Os alelos DRB1\* mais comuns para LMA foram DRB1\*13 (17,0%), DRB1\*07 (14,8%) e DRB1\*04 (10,6%). Adicionalmente, identificamos que os alelos DQB1\* mais comuns para LLA foram DQB1\*05 (23,3%), DQB1\*06 (21,9%) e DQB1\*02 (21,3%) e os alelos DQB1\* mais comuns para LMA foram DQB1\*06 (24,2%), DQB1\*02 (22,3%) e DQB1\*05 (18,9%).

## 018

### FREQUÊNCIA ALÉLICA DE ANTIGENOS HLA CLASSE I E II NO ESTADO DA BAHIA.

Hora AS<sup>1</sup>, Santos LCS<sup>1</sup>, Menezes EP<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hosp. Univ. Prof. Edgard Santos - UFBA

A população brasileira é uma das mais geneticamente heterogêneas dos grupos populacionais estudados, resultado da contribuição migratória de três grandes grupos raciais: europeu, africano e ameríndio. De modo geral, essa população se diferencia em algumas regiões geográficas do país. Enquanto na região Sul, há um maior predominância de caucasianos europeus, sobretudo de alemães e italianos (Dornelles, Callegari-Jacques et al., 1999), na Região Norte há uma predominância de descendentes indígenas (Santos e Guerreiro, 1995). Na região Nordeste, onde miscigenação foi muito mais efetiva do que nas demais regiões do país (Salzano, 1997), o que torna praticamente impossível distinguir um indivíduo como pertencente a um dos três grupos étnicos, o que confere a esses indivíduos uma característica única quando comparados com outros grupos populacionais. Esse estudo teve como objetivo determinar as frequências alélicas de antígenos HLA classe I (HLA-A e -B) e

classe II (HLA-DR) em um grupo de indivíduos sadios (N=3681). Os antígenos HLA de classe I mais frequentes foram os antígenos HLA-A2 (24,3%), HLA-A30 (9,6%) e HLA-A68 (7,6%), HLA-B15 (11,2%), HLA-B35 (10,9%), HLA-B44 (10%) e HLA-B7 (7,5%). Em relação aos antígenos de classe II os mais frequentes foram HLA-DR13 (15,1%); HLA-DR7 (12,3%) e HLA-DR15 (12%).

## 019

### HLA, KIR, MICA, PARK2, AND CYTOKINE GENE FREQUENCIES IN A POPULATION FROM PARANÁ, SOUTHERN BRAZIL

Mazini PS<sup>1</sup>, Franceschi DS<sup>1</sup>, Rudnick CC<sup>1</sup>, Reis PG<sup>1</sup>, Sell AM<sup>1</sup>, Fava VM<sup>2</sup>, Mira MT<sup>2</sup>, Visentainer JEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná

In the current study, the aim was to study the polymorphism frequencies of genes encoding HLA, KIR, MICA, PARK and cytokine in healthy volunteers from Paraná, Southern Brazil. It were collected 289 DNA samples of volunteers with no history of HLA-associated diseases and other demographic parameters. HLA alleles, KIR and MICA genes were genotyped by PCR-SSO Luminex protocols. PARK2 -2599 polymorphism in intron was investigated by real time PCR, using the TaqMan 7500 platform. Genotyping using PCR-SSP was performed for: TNF -308/-238; IL2 -330/+166; IL6 -174; IFNG +874; TGFB1 +869/+915; and IL10 -592/-819/-1082. The allele and genotype frequency distribution in this population was in HW equilibrium. We observed for HLA class I: 21 allelic groups for locus A (N=284), 36 for locus B (N=285), 14 for locus C (N=284) and, that the most frequently alleles were: HLA-A\*02 (145; 25. 5%), HLA A\*24 (57; 10. 0%), HLA-A\*03 (56; 9. 9%), HLA-A\*01 (50; 8. 8%), and HLA-A\*29 (38; 6. 7%); HLA-B\*44 (74; 13. 0%), HLA-B\*35 (60; 10. 5%), HLA-B\*51 (48; 8. 4%), HLA-B\*15 (47; 8. 2%), HLA-B\*18 (47; 8. 2%), HLA-B\*07 (40; 7. 0%), and HLA-B\*08 (35; 6. 1%); HLA-C\*07 (139; 24. 5%), HLA-C\*04 (85; 15. 0%), HLA-C\*03 (4; 11. 3%), HLA-C\*05 (44; 7. 7%), HLA-C\*06 (44; 7. 7%) and HLA-C\*16 (40; 7. 0%). For locus HLA class II, we found 13 allelic groups for HLA-DRB1 (N=217), 6 for HLA-DQA1 (N=178) and 5 for HLA-DQB1 (N=184). The most frequently alleles were: HLA-DRB1\*13 (69; 15. 9%), DRB1\*11 (59; 13. 6%), DRB1\*03 (52; 12. 0%), DRB1\*07 (50; 11. 5), DRB1\*15 (48; 11. 1%), DRB1\*04 (42; 9. 7), and DRB1\*01 (38; 8. 8%); DQA1\*01 (171; 45. 7%) and DQA1\*05 (78; 20. 9%); DQB1\*03 (126; 33. 7%) and DQB1\*06 (104; 27. 8%). We observed 16 KIR genes in this population. KIR2DL1, KIR3DL1, KIR2DS4 and KIR2DP1 genes presented frequencies of 93. 8%, 94. 1%, 96. 9% and 97. 2%, respectively. KIR2DL3 showed a frequency of 89. 3%, and others were near to 50% or minor. We genotyped 201 individuals for MICA genes: MICA \*008 (113; 28. 1%), MICA \*002 (73; 18. 2%), MICA \*004 (48; 11. 9%) and MICA \*009 (42; 10. 4%). The main genotypes for PARK2 gene were: CT (99; 57. 9%), TT (60; 35. 1%) and CC (12; 7. 01%) in 171 individuals. In 240 samples the cytokine genotypes more frequently were: TNF -308 GG (177; 74. 1%); TNF -238 GG (192; 87. 7%); IFNG +874 TA (131; 54. 6%); IL6+174 GG or GC (219; 88. 0%); IL2 - 330 TG or GG (111; 50. 7%); IL2+166 GG (113; 51. 6%); IL10 -1082 -819 -592 GCC ATA or GCC ACC (108; 45. 0%) and TGFB1 +869 +915 TGTG or TGCG (168; 70. 6%). In conclusion, the knowledge about allelic gene frequencies in our region is important for the comprehension of the distribution of these systems, and for comparison to other populations.

020

### **AValiação DA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO NA GENOTIPAGEM HLA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA**

Rosa SEA<sup>1</sup>, Pereira EA<sup>1</sup>, Noguti EN<sup>1</sup>, Xavier DTS<sup>1</sup>, Moliterno RA<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratório Histogene<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá

A tipificação HLA no transplante de órgãos sólidos e de células-tronco hematopoiéticas pela metodologia PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligonucleotide) tem sido amplamente utilizada nos laboratórios de histocompatibilidade devido à facilidade no processamento e acurácia dos resultados. Esta técnica segue inúmeras etapas: identificação das amostras, conservação do material, extração do DNA genômico, ajuste na concentração do DNA, amplificação do loco-específico, corrida eletroforética, desnaturação do produto amplificado, hibridização com sondas específicas, revelação do produto hibridizado, leitura no equipamento LABScan, análise de dados no programa Fusion e liberação dos resultados. A extração do DNA genômico é parte fundamental deste processo, uma vez que, a qualidade do material obtido tem impacto no resultado final. Sendo assim, o presente trabalho se propôs a avaliar a eficiência de dois métodos de extração de DNA (kit A e kit B) medidos pela média de intensidade de fluorescência (MFI) dos controles positivos (exons 2 e 3) do loco A. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de 338 doadores voluntários de medula óssea de diversos hemocentros. O DNA genômico de 136 destas amostras foi obtido pelo kit A, enquanto que o restante (202 amostras) foi obtido pelo kit B de extração. Considerando que o valor mínimo aceitável de MFI para os exons 2 e 3 do loco A é de 1000, observamos que das 136 amostras processadas pelo kit A 32 (23,5%) apresentaram valor inferior a 1000. Enquanto que das 202 amostras processadas pelo kit B apenas 13 (6,4%) tiveram valor inferior a 1000. Os resultados demonstraram que o kit B apresentou uma maior eficiência quando comparado com o kit A e sugere que este seja o kit de escolha, uma vez que, possibilita a diminuição do número de repetições, do custo e do tempo de processamento.

021

### **AValiação DO GRAU DE SENSIBILIZAÇÃO CONTRA ANTÍGENOS HLA EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS DA REGIÃO NORTE E NOROESTE DO PARANÁ**

Xavier DTS<sup>1</sup>, Noguti EN<sup>1</sup>, Pereira EA<sup>1</sup>, Rosa SEA<sup>1</sup>, Moliterno RA<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratório Histogene<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá

Os anticorpos anti-HLA exercem um papel fundamental na rejeição hiperaguda e aguda do enxerto em transplantes de órgãos e de células. Na rejeição crônica, sua presença está relacionada com o tempo de sobrevida do enxerto. Sendo assim, a sensibilização dos pacientes representa um desafio tanto para o paciente quanto para toda a equipe médica envolvida, tornando-se um grande obstáculo para a busca de um melhor par doador-receptor compatível. O presente estudo realizou um levantamento dos resultados de Painel de Reatividade de Anticorpos (PRA) dos pacientes na fila para transplante renal atendidos pelo Laboratório Histogene de Maringá e verificou o grau de sensibilização contra os antígenos HLA. Nesta avaliação, foram obtidos os resultados de PRA de 420 pacientes na fila de espera para o transplante de rim pelo método de detecção de anticorpos usando beads revestidas por antígenos HLA (One Lambda®, Canoga Park, CA), LUMINEX (LabScan TM 100). A classificação quanto o grau de sensibilização contra antígenos, teve como base percentuais que correspondem as faixas de PRA 0%, 1% -

25%, 26% - 50%, 51% - 75% e 76% - 100%, tanto para anticorpos contra antígenos HLA Classe I quanto para os de Classe II. Nessa amostra 62% dos pacientes são do sexo masculino e 38% do sexo feminino. Sendo que, 59% e 70% dos pacientes não são sensibilizados para classe I e classe II, respectivamente. No grupo dos pacientes sensibilizados pelas moléculas de Classe I verificamos um maior grau de sensibilização na faixa de PRA 1% - 25% (19% dos pacientes), enquanto que para as moléculas de Classe II houve uma distribuição equitativa nos percentuais das amostras. A avaliação periódica do PRA dos pacientes tanto na fase pré-transplante como na pós-transplante é informativo no sentido de contribuir na melhor seleção do par doador-receptor, pois permite avaliar a quantidade e eventualmente as especificidades dos anticorpos anti-HLA e desse modo, acompanhar a evolução de uma crise de rejeição e adequar um tratamento preventivo ao paciente.

022

### **DETECÇÃO DE UM NOVO ALELO HLA-B\*15 EM UMA POPULAÇÃO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA NO ESTADO DO PARANÁ-BRASIL.**

Pereira EA<sup>1</sup>, Xavier DTS<sup>1</sup>, Noguti EN<sup>1</sup>, Rosa SEA<sup>1</sup>, Pereira NF<sup>2</sup>, Moliterno RA<sup>3</sup><sup>1</sup>Laboratório Histogene<sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá

O MHC (Major Histocompatibility Complex) é uma extensa região gênica que possui elevado grau de polimorfismo. Na espécie humana, esses genes recebem a denominação de sistema HLA (Human Leukocyte Antigen), e são agrupados em três regiões subdivididas em região de classe I, classe II e classe III, de acordo com a sua localização no braço curto do cromossomo 6. As moléculas HLA desempenham um papel importante na resposta imune, apresentando peptídeos à células do sistema imune que distinguem o próprio do não próprio. Na região de Classe I o grupo alélico HLA-B\*15 é amplo, nele se encontram descritos atualmente 296 alelos que codificam dez especificidades proteicas distintas. Dentre estes, onze alelos são nulos, um alelo questionável. Não foram descritos alelos de baixa expressão. Este resumo descreve um novo alelo HLA-B\*15, o qual identificado durante a primeira fase de triagem de Doadores Voluntários de Medula Óssea do estado do Paraná - Brasil. Este novo alelo HLA-B\*15 foi identificado em uma população de 31.826 Doadores Voluntários de Medula Óssea durante rotina de triagem do Laboratório Histogene de Maringá. Para a realização da genotipagem HLA foram coletadas amostras de 5 mL de sangue total em tubos de EDTA. Em seguida foi realizada a extração do DNA genômico pelo método de separação por coluna, utilizando o Kit Purilink®, seguindo o protocolo do fabricante. O DNA obtido foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando seqüência primer loco-específicos, seguido de hibridização, utilizando a técnica RSSO-LABType®OneLambda® baixa média resolução seguindo o protocolo do fabricante. Após hibridização, a leitura dos resultados foi realizada através da Plataforma LABScanTM100 seguido de análise no software HLA Fusion versão 2.0. Após análise, somente o loco HLA-A e HLA-DR apresentaram resultados conclusivos. Foi realizado um novo teste para o loco HLA-B utilizando o método PCR-SSP utilizando o kit Micro SSP TM Classe I e Classe II genérico, seguindo o protocolo do fabricante. Posterior a corrida eletroforética e análise dos resultados através do software HLA Fusion versão 2.0, o resultado foi inconclusivo. Em seguida a amostra foi encaminhada para análise ao Laboratório XMol de Curitiba, onde foram realizados vários testes pela técnica RSSO-LABType®com diferentes diluições da amostra de DNA, os quais mantiveram resultado inconclusivo, com a indicação da possibilidade de novo alelo. A amostra foi então encaminhada para a realização de SBT (sequence-based typing)

ao Laboratório de Imunogenética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Após o seqüenciamento de bases foi detectada a presença de uma mutação no códon 154 (substituição de G por A) no alelo HLA-B\*15:08, indicando a presença de um novo alelo. A mutação ocorrida foi do tipo silenciosa onde a substituição das bases G por A não implicou na alteração da codificação do aminoácido (GAG- Glu. . . GAA- Glu), não alterando assim a estrutura da molécula HLA expressa na superfície celular. A amostra será encaminhada para clonagem em cDNA, para confirmação do novo alelo. Ressalta-se assim a importância da investigação mais aprofundada de amostras de difícil tipificação na rotina de laboratórios de triagem de Doadores Voluntários de Medula Óssea, onde podem ser descobertos novos alelos HLA.

## 023

### DIVERSIDADE DOS LOCOS HLA CLASSE I (A E B) E CLASSE II (DRB1) EM UMA POPULAÇÃO MISTA DO PARANÁ

Reis PG<sup>1</sup>, Bettoni AC<sup>1</sup>, Ayo CM<sup>1</sup>, Mazini PS<sup>1</sup>, Sell AM<sup>1</sup>, Moliterno RA<sup>1</sup>, Visentainer JEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A população brasileira apresenta grande mistura racial e devido a diferenças no grau e padrão de miscigenação, a composição da nossa população pode variar consideravelmente de uma região para outra. Os Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) caracterizam-se por seu elevado grau de polimorfismo e distribuição variável entre os diferentes grupos populacionais. Assim, a definição do perfil imunogenético de cada região é essencial para estudos de frequência e a identificação das especificidades HLA entre os indivíduos se faz necessária. **Objetivo:** Realizar um levantamento das frequências alélicas e haplotípicas HLA-A, -B, e -DRB1 e calcular o desequilíbrio de ligação em uma população mista do estado do Paraná. **Métodos:** Foram analisadas amostras de doadores brancos e mulatos, não aparentados, cadastrados no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME) provenientes das regiões norte e noroeste do estado do Paraná. A genotipagem dos grupos alélicos HLA-A e -B foi realizada por PCR-SSO com metodologia Luminex (One Lambda®, CA, USA) em 675 indivíduos e dos alelos HLA-DRB1 foi realizada por PCR-SSOP HD (High Definition) com metodologia Luminex (One Lambda®, CA, USA) em 633 indivíduos. As frequências alélicas e haplotípicas, o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação foram determinados pelo software ARLEQUIN versão 3. 11. **Resultados:** A distribuição dos alelos HLA para os três locos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram observados 22 grupos alélicos para o loco HLA-A, sendo os mais frequentes HLA-A\*02 (27,59%), \*03 (9,79%), \*01 (9,56%), \*24 (9,42%), \*68 (6,15%) e \*11 (5,78%). Para o loco HLA-B, foram observados 35 grupos alélicos, e os de maior frequência foram: HLA-B\*35 (11,64%), \*44 (10,45%), \*51 (8,90%), \*15 (7,64%), \*7 (6,82%) e \*18 (6,37%). Os alelos HLA-DRB1 somaram 54 e os mais frequentes foram HLA-DRB1\*03:01 (8,92%), \*11:01 (8,37%), \*15:01 (6,16%), \*01:01 (6,00%) e \*13:01 (6,00%). Foram encontrados 399 haplótipos HLA-A/B possíveis, sendo que, HLA-A\*02/B\*51 (4,42%), A\*01/B\*08 (3,06%) e A\*02/B\*15 (2,83%) foram os de maior frequência. Foram observados 2893 haplótipos HLA-A/B/DRB1 possíveis e os mais frequentes foram HLA-A\*02/B\*51/DRB1\*07:01 (1,13%) e A\*02/B\*35/DRB1\*13:01 (1,02%). Os resultados obtidos para o desequilíbrio de ligação mostraram significância apenas para o haplótipo HLA-A\*01/B\*08 ( $p = 0,0002$ ;  $D' = 0,2893$ ). **Conclusão:** O conhecimento da diversidade dos alelos HLA em nossa região é importante para a compreensão da biologia de distribuição desse sistema e informativo para estudos populacionais. Estes dados ainda poderão contribuir na seleção dos doadores de transplante de órgãos e de medula óssea, na medicina forense e nos estudos de associação das variantes HLA com doenças.

## 024

### DISTRIBUIÇÃO DE ALELOS E HAPLÓTIPOS DE ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS LOCI A, B E DRB1 EM UMA AMOSTRA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA (DVMO) DO PIAUÍ.

Carvalho MG<sup>1</sup>, Filho HLAS<sup>1</sup>, Macêdo MB<sup>1</sup>, Barroso JRPM<sup>1</sup>, Sousa LCDM<sup>1</sup>, Araújo AS<sup>1</sup>, Silva AS<sup>1</sup>, Tsuneto LT<sup>2</sup>, Neto JMM<sup>1</sup>, Monte SJHD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá

O sistema HLA é altamente informativo em estudos de genética de populações, devido ao seu elevado polimorfismo e ao forte desequilíbrio de ligação entre alelos de locos próximos. Essas propriedades permitem que a tipificação HLA seja utilizada como um instrumento de investigação para caracterizar a composição genética de diferentes povos, uma vez que a frequência dos alelos HLA e o padrão de haplótipos são característicos de cada etnia e população. Isso é de grande relevância para os programas de transplante de órgãos e tecidos já que a seleção do doador é por "match"HLA. Assim, o objetivo foi descrever as frequências alélicas e haplotípicas dos DVMO do Piauí considerando que essa população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg. **Metodologia:** Foram estudados 21.943 DVMO tipados por PCR SSOPH, cadastrados no banco de dados do LIB-UFPI (Teresina-Brasil) entre 2004 e 2011. A análise de genética de população foi feita utilizando o software Arlequin versão 3. 11 pelo método de Guo e Thompson e algoritmo EM respectivamente para testar as premissas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e calcular as frequências haplotípicas. A análise multivariada desses dados estratificados por municípios foi feita por meio do método de Análise de Componente Principal. Os municípios que entraram no estudo continham no mínimo 10 doadores voluntários. **Resultados e Discussão:** Foram identificados 21 diferentes grupos alélicos no locus A, 32 em locus B e 13 em locus DRB1. Os cinco grupos alélicos mais frequentes de cada loco foram: HLA-A, A\*02 (25%), A\*24 (9%), A\*03 (8%), A\*01 (7%) e A\*30 (7%); HLA-B, B\*15 (11%), B\*35 (11%), B\*44 (10%), B\*51 (7%) e B\*07 (6%); HLA-DRB1, DRB1\*13 (14%), DRB1\*04 (13%), DRB1\*07 (12%), DRB1\*15 (10%) e DRB1\*03 (9%). Para os haplótipos, os três mais frequentes foram: A\*29 B\*44 DRB1\*07, A\*01 B\*08 DRB1\*03 e A\*03 B\*07 DRB1\*15. As oito primeiras componentes principais representam 51,3% da variabilidade total das 66 variáveis originais estudadas. Dez dos 52 municípios apresentaram um grande distanciamento gênico e esses estão localizados geograficamente nos extremos Norte e Sudeste do Estado. Esses resultados auxiliarão os programas de transplante de órgãos para definir a probabilidade de achar doador, definição de PRA calculado e referencial para busca de regiões piauienses pouco representadas no banco de DVMO.

## 025

### INTERFERÊNCIA DE CÉLULAS MATERNAS NA TIPAGEM HLA DE PACIENTE COM IMUNODEFICIÊNCIA COMBINADA SEVERA

Getz J<sup>1</sup>, Piovezan BZ<sup>1</sup>, Ramos MM<sup>1</sup>, Dornelles LN<sup>1</sup>, Lima ACM<sup>1</sup>, Quirga MR<sup>1</sup>, Melo MF<sup>1</sup>, Pereira NF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR

**Introdução:** Paciente com Imunodeficiência Combinada Severa (SCID) foi referido ao laboratório para busca de doador de células-tronco hematopoéticas. **Resultados:** tipagem HLA do irmão e dos pais mostrou resultados normais para os genes HLA-A, B, C, DRB1 e DQB1; mas os resultados do paciente foram inconclusivos para os locos B e C na tipagem de média resolução por SSO e na

alta resolução por sequenciamento direto do DNA (SBT) isolado de sangue periférico. A pesquisa de células maternas nesta amostra de sangue periférico do paciente, utilizando-se locos STR, mostrou presença de 62% de células oriundas da mãe. Após esta observação foi solicitada nova amostra do paciente, desta vez células de mucosa bucal. O genótipo HLA da mãe é A\*02:01 C\*08:02 B\*14:02 DRB1\*01:02 DQB1\*05:01/A\*02:01 C\*07:02P B\*07:02P DRB1\*01:02 DQB1\*05:01, e o do paciente, com amostra de swab bucal, é A\*01:01 C\*07:01P B\*08:01 DRB1\*03:01 DQB1\*02:01/A\*02:01 C\*08:02 B\*14:02 DRB1\*01:02 DQB1\*05:01. A interferência das células maternas na tipagem HLA do paciente, feita com DNA de sangue periférico, não impediu a obtenção de resultado para HLA-A, DRB1, DQB1 devido à homozigose da mãe nestes três locos. Entretanto, foi observado que nas posições heterozigotas do paciente, os picos do eletroferograma com maior intensidade de sinal eram referentes aos alelos de origem materna. Nos locos HLA-B e C os resultados foram inconclusivos devido à presença de três alelos diferentes. Isto foi observado no padrão de reatividade das sondas usadas na tipagem por SSO, onde aquelas conjugadas às microesferas 1, 23, 39, 41, 51, 69 e 75 (loco B) e 37 (loco C), específicas de sequências presentes nos alelos maternos não herdados B\*07:02P e C\*07:02P, mostraram reação positiva no DNA de sangue periférico e reação negativa no de swab bucal. A interferência das células maternas foi também observada na tipagem HLA-B e C por SBT. A comparação dos eletroferogramas das duas amostras mostrou que posições heterozigotas em sangue periférico são homozigotas em swab bucal, e posições heterozigotas em swab bucal quando analisadas em sangue periférico apresentam três picos correspondentes à presença de três bases diferentes. No loco B, a análise de swab bucal versus (vs) sangue periférico mostrou, respectivamente, os seguintes resultados: 103G vs G/T, 165G vs G/C, 272T/G vs T/G/A, 277A vs A/G, 280A vs A/C, 282C vs C/A, 283A vs A/G, 412A vs A/G, 477G vs G/C, 486C vs C/G, 539T/A vs T/A/G, 559A vs A/G, 560C vs C/A, 605C vs C/A, 618G vs G/T, 693C vs C/T. No loco HLA-C, o pico homozigoto na posição 368 (A) em swab bucal tornou-se heterozigoto em sangue periférico (A/C). As bases de DNA extras, identificadas no SBT de sangue periférico, são compatíveis com a presença dos alelos maternos não herdados. **Conclusão:** O relato deste caso demonstra a importância de utilizar amostra biológica adequada para obter um resultado de tipagem HLA correto nos pacientes com SCID. Esta é uma doença grave, caracterizada pela disfunção combinada de linfócitos T e B, para a qual o tratamento indicado é o transplante de células-tronco hematopoéticas. Considerando-se que muitos destes pacientes apresentam quimerismo em sangue periférico, pela presença de linfócitos T maternos, deve-se solicitar amostra biológica alternativa para o isolamento de DNA e realização da tipagem HLA, sendo as células de mucosa bucal adequadas para este tipo de procedimento.

## 026

### EPHLA CONVERTER - UM WEBSITE PARA AUTOMAÇÃO DA INFERÊNCIA DO HLA DE ALTA RESOLUÇÃO.

Barroso JRPM<sup>1</sup>, Monte SJH<sup>1</sup>, Silva AS<sup>1</sup>, Carvalho MG<sup>1</sup>, Araújo AS<sup>1</sup>, Filho HLAS<sup>1</sup>, Macêdo MB<sup>1</sup>, Sousa LCDM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí

Definir HLA em alta resolução é importante para transplante de medula óssea entre indivíduos não aparentados e para análise de compatibilidade em pacientes sensibilizados aguardando transplante de órgãos sólidos facilitando identificação dos "mismatches" aceitáveis, utilizando o algoritmo HLA-Matchmaker, recentemente automatizado no software EpHLA (Sousa, Sales Filho et al., 2011). Contudo, custos elevados e falta de acesso ao método impedem que a tipificação HLA de alta resolução seja rotineiramente aplicada a todos os pacientes sensibilizados contra antígenos HLA. Usualmente, técnicas de média resolução geram tipagens que definem apenas grupo alé-

lico (2 primeiros dígitos) e a lista de possibilidades de alelos dentro desse grupo (código NMDP), onde o alelo do paciente está contido. Utilizando dados de frequências alélicas descritos em populações de referência é possível inferir alelos HLA (alta resolução) a partir da tipagem em média. No presente trabalho, descreveremos o programa web EpHLA Converter que permite inferir HLA em alta resolução a partir da tipagem em média e baixa resolução e que foi recentemente integrado ao programa EpHLA. **Metodologia:** O programa EpHLA Converter, desenvolvido em linguagem Phyton, utiliza dados de tipagem HLA em média ou baixa resolução em buscas a bancos de dados públicos e retorna as tipagens HLA de alta resolução mais prováveis em uma determinada população. Os bancos de dados públicos consultados são o "ImMunoGeneTics program" (IMGT) e o "National Marrow Donor Program" (NMDP). No primeiro, o EpHLA Converter checka a validade de todos os alelos de alta resolução retornados (Marsh, Albert et al., 2010). No NMDP o EpHLA Converter decodifica o código NMDP em alelos e as respectivas frequências por etnias da população americana (Mayers, Gragert et al., 2007), permitindo ao usuário escolher o melhor alelo para o caso. No processo de inferência da tipagem de alta resolução, o EpHLA Converter utiliza como entrada os seguintes dados fornecidos pelo usuário: (i) população de referência; (ii) locus HLA; (iii) grupo alélico e; (iv) código NMDP. Como resultado, o programa EpHLA Converter lista os alelos em alto nível ordenados por frequência. **Resultados e Discussão:** Utilizamos o EpHLA Converter para inferir os alelos mais prováveis de um paciente para o locus A. A média resolução foi A\*02:BXYG, A\*02:WHG. Considerando apenas o grupo alélico, ele seria considerado homozigoto. Utilizando o segmento hispânico da população americana como referência, a tipagem HLA em alta resolução de maior frequência encontrada pelo EpHLA Converter foi A\*02:01 e A\*02:02. Considerando que o código WHG contempla apenas os alelos A\*02:02 / A\*02:47, isso elimina a possibilidade de homozigotidade para A\*02:01. De fato, a tipagem por alta resolução confirmou heterozigotidade: A\*02:01 e A\*02:02. Essa automação viabilizará inferir alelos HLA mais prováveis a partir de tipagens em baixa e média resolução. MAIERS, M. et al. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. Hum Immunol [S. I.], v. 68, n. 9, p. 779-88, Sep 2007. MARSH, S. G. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. Tissue Antigens [S. I.], v. 75, n. 4, p. 291-455, Apr 2010. SOUSA, L. C. D. M. et al. EpHLA: An innovative and user-friendly software automating the HLA-Matchmaker algorithm for antibody analysis. Transpl Immunol [S. I.], v. 25, n. 4, p. 210-6, Dec 2011.

## 027

### DESCRIÇÃO DE TRÊS NOVOS ALELOS HLA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Moraes ME<sup>1</sup>, Campiotto S<sup>2</sup>, Motta CH<sup>2</sup>, Souza TS<sup>1</sup>, Martinez MR<sup>3</sup>, Hue MI<sup>1</sup>, Martinez M<sup>3</sup>, Pontes GN<sup>2</sup>, Romero M<sup>1</sup>, Torres M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>JRM-Investigação Imunológicas - Rio De Janeiro, RJ

<sup>2</sup>LIG-Laboratório De Imunogenética - São Paulo - SP

<sup>3</sup>Fundação Amaral Carvalho - Jau - São Paulo - SP

**Introdução:** Concomitante ao incremento do número de tipificações HLA para o Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula (REDOME) em diversos grupos raciais, houve um aumento da identificação de novos alelos na nossa população. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é descrever a identificação de 3 novos alelos HLA dos loci A, B e DRB1, identificados durante a tipificação de doadores e pacientes do REDOME. **Material e Método:** Inicialmente, o método utilizado para a tipificação HLA foi o PCR-SSO (One Lambda, Inc), utilizando-se a plataforma Luminex. Na presença de padrões de hibridização anômalos com reações falso positivas (FP) ou falso negativas (FN); os testes foram confirmados por PCR-SSO (InnoLiPA - Innogenetics) e por sequenciamento (SBT), utilizando-se os reagentes comerciais da Life Technologies e Abbott. Os alelos dos

locos A e DRB1 foram sequenciados separadamente utilizando-se os reagentes da Protans e o loco B pela Life Technologies. **Resultados:** O novo alelo do loco A, HLA-A\*23, quando inicialmente testado por Luminex, apresentou uma reação FN com a "bead"12, que reconhece a sequência de aminoácidos 63E-GK66. Por InnoLiPA, as reações FN com a sonda 7 e FP com a sonda 8 detectaram alterações do padrão de hibridização nessa mesma região entre os codons 62 a 65 (sonda 7) e 66 a 70 (sonda 8). Esse novo alelo, denominado inicialmente HLA-A\*23:01:01v, apresentava duas substituições de nucleotídeos quando comparado ao A\*23:01:01. Uma, na posição 265, onde o G foi substituído por C (códon 65. 1, G GG -> C GG), resultando numa troca de aminoácidos, onde a Glicina foi substituída pela Arginina (G -> R) e a outra, no nucleotídeo 270, onde o A foi substituído por um T (códon 66. 3, AAA -> AAT), resultando em troca de aminoácidos: Lysina sendo substituída por Asparagina (K -> N). O outro, do loco B, quando testado por Luminex, apresentou um resultado sem solução e, quando solicitada a reanálise com 3 reações falsas, os padrões analisados identificavam HLA-B\*49 e B\*35. Repetido por InnoLiPA, foi detectada uma reação FP na sonda 28 (códon 72-77) e reações FP e FN nas sondas 47 e 52 que identificavam as sequências de nucleotídeos entre os códons 113 a 116 e 115 a 116, respectivamente. Por SBT, esse alelo denominado HLA-B\*35:49v difere do HLA-B\*35:49 por duas substituições de nucleotídeos, uma no exon 2, posição 220 onde T -> G (códon 74. 1, T AC -> G AC), resultando em troca de aminoácido de Tirosina para Ácido Aspártico (Y->D), outra, no exon 3, nucleotídeo 347, onde C -> T (códon 116. 2, TC C -> TT C), resultando em troca de aminoácido de Serina para Fenilalanina (S -> F). O terceiro novo alelo, do loco DRB1, foi detectado diretamente por SBT quando solicitada uma Tipificação confirmatória (CT) para um paciente do REDOME. A diferença entre essa variante de DRB1\*15:01:01 foi uma substituição no nucleotídeo 155, códon 23. 2, onde o G foi substituído por C (CG G -> CC G), resultando na troca de aminoácido de Arginina para Prolina (R -> P). **Conclusão:** Os padrões não usuais de hibridização devem sempre ser levados em consideração, porque, mesmo em se tratando de apenas uma sonda FN ou FP, ela pode traduzir o padrão de um novo alelo, e, nesse caso, é imprescindível a confirmação por outras metodologias, incluindo o SBT. A denominação oficial designada pelo Comitê Oficial de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (WHO) desses novos alelos é: HLA-A\*23:51, B\*35:198 e DRB1\*15:76.

## 028

### DESCRIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GRUPO ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS DOS LOCI HLA-A, -B E -DRB1 EM POPULAÇÃO PARANAENSE COM ANESTRALIDADE ORIENTAL

Zeck SC<sup>1</sup>, Costantino PR<sup>1</sup>, Bicalho MG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - UFPR

O Sistema HLA (Human leukocyte antigens), devido ao seu elevado polimorfismo e ao desequilíbrio de ligação entre alelos de diferentes loci, é altamente informativo em estudos de genética de populações. O conhecimento da frequência grupo alélica e haplotípica pode contribuir para o planejamento da busca de doadores não aparentados de medula óssea. Este estudo tem por objetivo ampliar o conhecimento sobre a diversidade HLA na população paranaense descendente de orientais.

A amostra é constituída de 1681 doadores voluntários de medula óssea oriundos, quase que em sua totalidade, do Estado do Paraná, genotipados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da UFPR. A escolha dos doadores foi realizada com base na autodeclaração como pertencente ao grupo-étnico oriental. O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico utilizando a técnica salting-out e/ou kits comerciais (EZ-DNA, iPREP® Purelink® gDNA Blood Kit, ou Biopur® Spin). A caracterização dos grupos de

alelos dos loci HLA-A, -B e -DRB1 foi feita pelo método de PCR-SSOP, empregando-se o Kit LABType® RSSOP (One Lambda, CA, USA) para baixa resolução. Os dados foram formatados utilizando-se o programa CONVERT v. 1. 31 (GLAUBITZ, 2004) e adicionados ao programa ARLEQUIN v. 3. 11 (EXCOFFIER et al., 2005) para o cálculo das frequências alélicas e para estimar as frequências haplotípicas pelo método da máxima verossimilhança. Os grupos alélicos observados com maior frequência foram: HLA-A\*02 (24,1%), e -A\*24 (22,2%); HLA-B\*35 (10,4%) e -B\*15 (10,1%); HLA-DRB1\*04 (17,3%) e -DRB1\*15 (13,3%). Os haplótipos mais frequentes foram A\*24-B\*52-DRB1\*15 (4,1%) e A\*33-B\*44-DRB1\*13 (2,1%).

Espera-se que os dados obtidos no presente trabalho sejam informativos para estudos populacionais, bem como para a busca de doadores não aparentados de medula óssea. Estudos dessa natureza são esclarecedores sobre a população brasileira, possibilitando uma melhor avaliação do componente genético de populações descendentes de oriental.

## 029

### ASSOCIAÇÃO ENTRE HLA-DRB1 \* E INFECÇÃO POR HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE

Corrêa BM<sup>1</sup>, Lopes EPA<sup>2</sup>, Albuquerque MFPM<sup>2</sup>

<sup>1</sup>HLA Diagnóstico  
<sup>2</sup>UFPE

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi determinar a associação genotípica dos alelos de classe II dos antígenos leucocitários humanos (HLA) presentes no locus DRB1\* entre doadores de sangue da Fundação Hemope (Brasil), infectados e imunizados pelo vírus da hepatite B (HBV). **Métodos:** estudo caso-controle foi realizado com um grupo de indivíduos infectados pelo HBV e um grupo controle composto de indivíduos imunizados na proporção de 1:4. Amostras de sangue foram coletadas para a tipagem HLA do locus DRB1\*. Análises univariada e multivariada foram realizadas para a avaliação de associações entre as variáveis categóricas pelo teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher. **Resultados:** Um total de 320 doadores de sangue foram analisados [241 homens (75%) e 79 do sexo feminino (25%) com idade média de 39 anos]. O grupo de casos consistiu de 64 doadores infectados pelo HBV e o grupo controle foi composto de 256 doadores imunes ao HBV. A análise multivariada estratificada por sexo revelou que o alelo DRB1\*09 foi associado com os doadores infectados do sexo masculino (p = 0,016) e do alelo DRB1\*08 foi associado com os doadores infectados com idade entre 39 anos ou mais jovens (p = 0,031). **Conclusões:** Os resultados do presente estudo revelam que doadores de sangue mais jovens e doadores de sangue do sexo masculino que exibem, respectivamente, os alelos DRB1\*08 e DRB1\*09 são mais suscetíveis à cronificação da infecção pelo HBV.

## 030

### DISTRIBUIÇÃO DE ALELOS E HAPLÓTIPOS DE ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS LOCI A, B E DRB1 EM UMA AMOSTRA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA (DVM) DO RIO GRANDE DO NORTE.

Macêdo MB<sup>1</sup>, Hemonorte<sup>2</sup>, Carvalho MG<sup>1</sup>, Neto JMM<sup>1</sup>, Tsuneto LT<sup>3</sup>, Silva AS<sup>1</sup>, Sousa LCDM<sup>1</sup>, Barroso JRPM<sup>1</sup>, Araújo AS<sup>1</sup>, Monte SJH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí

<sup>2</sup>Governo do Estado do Rio Grande do Norte

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá

O sistema HLA é altamente informativo em estudos de genética de populações, devido ao seu elevado polimorfismo e ao forte desequilíbrio de ligação entre alelos de locos próximos. Essas propriedades

permitem que a tipificação HLA seja utilizada como um instrumento de investigação para caracterizar a composição genética de diferentes povos, uma vez que a frequência dos alelos HLA e o padrão de haplótipos são característicos de cada etnia e população. Isso é de grande relevância para os programas de transplante de órgãos e tecidos já que a seleção do doador é por "match"HLA. Assim, o objetivo foi descrever as frequências alélicas e haplotípicas dos DVMO do Rio Grande do Norte considerando que essa população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg. **Metodologia:** Foram estudados 12.793 DVMO tipados por PCR SSOPH, cadastrados no banco de dados do LIB-UFPI (Teresina-Brasil) entre 2004 e 2011. A análise de genética de população foi feita utilizando o software Arlequin versão 3.11 pelo método de Guo e Thompson e algoritmo EM respectivamente para testar as premissas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e calcular as frequências haplotípicas. A análise multivariada desses dados estratificados por municípios foi feita por meio do método de Análise de Componente Principal. Os municípios que entraram no estudo continham no mínimo 10 doadores voluntários. **Resultados e Discussão:** Foram identificados 21 diferentes grupos alélicos no locus A, 35 em locus B e 13 em locus DRB1. Os cinco grupos alélicos mais frequentes de cada loco foram: HLA-A, A\*02 (25%), A\*24 (10%), A\*01 (9%), A\*03 (8%) e A\*68 (7%); HLA-B, B\*44 (11%), B\*35 (11%), B\*15 (10%), B\*51 (8%) e B\*07 (6%); HLA-DRB1, DRB1\*13 (16%), DRB1\*04 (14%), DRB1\*07 (12%), DRB1\*01 (10%) e DRB1\*11 (9%). Para os haplótipos, os três mais frequentes foram: A\*01 B\*08 DRB1\*03, A\*29 B\*44 DRB1\*07 e A\*02 B\*44 DRB1\*04. As seis primeiras componentes principais representam 53% da variabilidade total das 66 variáveis originais estudadas. Oito dos 33 municípios apresentaram um grande distanciamento gênico. Esses resultados auxiliarão os programas de transplante de órgãos para definir a probabilidade de achar doador, definição de PRA calculado e referencial para busca de regiões do Rio Grande do Norte pouco representadas no banco de DVMO.

### 031

#### A IMPORTÂNCIA DA TIPIFICAÇÃO HLA-DQ NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA CELÍACA

Bub C<sup>1</sup>, Roz S<sup>1</sup>, Gregorio S<sup>1</sup>, Lima L<sup>1</sup>, Val FC<sup>1</sup>, Vinick A<sup>1</sup>, Rosseto E<sup>2</sup>, Manguiera C<sup>2</sup>, Torres M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Histocompatibilidade - Laboratório de Patologia Clínica - Hospital Israelita Albert Einstein - São Paulo - SP

<sup>2</sup>Setor de Imunologia - Laboratório de Patologia Clínica - Hospital Israelita Albert Einstein - São Paulo - SP

**Introdução:** O diagnóstico da doença celíaca pode ser realizado segundo um complexo algoritmo de testes que engloba desde exames sorológicos, biópsia endoscópica do trato gastro-intestinal e tipificação do heterodímero HLA-DQ2 e/ou -DQ8 (o heterodímero HLA-DQ2 é codificado pela combinação dos alelos HLA-DQA1\*05:01 ou HLA-DQA1\*05:05 com DQB1\*02. Já o heterodímero HLA-DQ8 pela combinação dos alelos HLA-DQA1\*03:01 ou HLA-DQA1\*03:02 com DQB1\*03:02). Contudo, o HLA-DQ2 e -DQ8 não é específico para a doença celíaca, pois ele é detectado em 30% da população em geral, dados que não foram analisados exclusivamente na população brasileira. Por vezes, este diagnóstico se torna difícil, uma vez que na biópsia a atrofia das vilosidades intestinal pode ser irregular, e pode estar presente numa variedade de outras doenças. Neste contexto, quando há biópsia duvidosa ou dificuldade na realização de biópsias seriadas, a associação dos testes sorológicos positivos e pesquisa do heterodímero DQ2 e/ou DQ8 se faz importante. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é investigar se a pesquisa HLA-DQ2 ou -DQ8, quando positiva e associada a testes sorológicos (anti-endomísio, anti-transglutaminase IgA e anti-gliadina IgA e IgG) também positivos, colabora para o diagnóstico da doença celíaca quando a biópsia intestinal é duvidosa ou ausente. **Material e Métodos:** Foram ana-

lisadas 388 amostras que deram entrada nos setores de Imunologia e Histocompatibilidade do Laboratório de Patologia Clínica do HIAE durante o período de setembro de 2009 a maio de 2011 para pesquisa do heterodímeros, HLA-DQ2 e -DQ8, assim como para detecção de anti-transglutaminase, anti-gliadina e anti-endomísio. A tipificação HLA-DQA1 e -DQB1 foi realizada por PCR-SSO (One Lambda, Inc.). Os exames sorológicos anti-gliadina e anti-transglutaminase tecidual Ig-A e Ig-G realizados por método imunoenzimático, já os anticorpos anti-endomísio Ig-A por imunofluorescência indireta. Calculamos a frequência desta tipagem HLA nesta população e sua correlação entre os exames sorológicos, quando algum destes fossem positivos. **Resultados:** A frequência do heterodímero HLA-DQ2 ou DQ8 foi de 63% (244/388). Do total de amostras selecionadas, 31 (8%) apresentaram pelo menos um dos exames sorológicos positivos e o DQ2 e/ou DQ8 estava presente em 62% (19/31). Quando anti-endomísio presente (6/31), 100% dos casos apresentavam um dos heterodímeros positivos. A anti-transglutaminase foi positiva em 16/31 e anti-gliadina 21/31. Nestes dois subgrupos, o HLA-DQ2 ou DQ8 foi positivo em 88% (14/16) e 53% (11/21) das amostras, respectivamente. **Discussão:** A positividade do heterodímero HLA-DQ2 e -DQ8 foi estatisticamente significativa quando os exames sorológicos anti-endomísio e anti-transglutaminase também eram positivos. O presente estudo não considerou dados clínicos e acompanhamento seriado de biópsia intestinal o que poderia complementar nas análises dos dados obtidos. Nossos dados demonstraram que a tipificação do HLA classe II é muito útil, quando associado aos exames sorológicos, no diagnóstico da doença celíaca quando a biópsia de intestinal se apresenta duvidosa.

### 032

#### CONSIDERAÇÕES SOBRE EFEITO GVL E O PERFIL KIR-2DL1, KIR2DL2 E KIR3DL1 DO DOADOR E ALOTIPOS LIGANTES HLA-C1, -C2 E HLA-BW4 DO PACIENTE EM DUAS FAMÍLIAS DO HEG, CURITIBA, PR.

Poerner F<sup>1</sup>, Resende GYT<sup>1</sup>, Munhoz EC<sup>2</sup>, Bicalho MG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Do Paraná

<sup>2</sup>Hospital Erasto Gaertner

A variabilidade dos genes KIR (quanto a repertório, alelos e expressão celular) e seus ligantes HLA tem sido foco de estudo e interesse por parte de clínicos transplantadores que buscam alternativas para o tratamento de algumas formas de leucemia, tais como a LMA e LLA. O critério da seleção da dupla doador/paciente para o transplante de CTH, na análise do perfil KIR-ligante da dupla doador paciente, busca encontrar um cenário de interações entre células NK do doador e células leucêmicas do paciente para que este possa se beneficiar do efeito do enxerto versus leucemia (GvL). No presente estudo analisamos a presença dos genes inibidores KIRDL1, KIR2DL2 e KIR3DL1 do doador da dupla selecionada - segundo o critério clássico da compatibilidade HLA- e a presença de seus alotipos ligantes HLA-C2,HLA-C1 e HLA-Bw4 no paciente, respectivamente. Essa análise foi realizada em duas famílias de pacientes portadores de LMA, do Hospital Erasto Gaertner (HEG), em Curitiba-PR, que fizeram o transplante de CTH com resultados de diferentes. Essa mesma análise estendeu-se para outros membros da família que foram também HLA e KIR genotipados, como parte dos exames pré-transplante realizados no LIGH-UFPR. Com o foco na busca por um cenário favorável à atividade citotóxica das células NK dirigidas às células leucêmicas do paciente, analisamos as interações no sentido genótipo-KIR do doador ligante-HLA paciente. Família DRM-06/08: o paciente potencialmente poderia se beneficiar do efeito GvL com o doador selecionado pelas seguintes razões: a) as interações de inibição entre KIR inibidores e seus ligantes não ocorreriam pois tanto KIR-2DL1 e KIR3DL1 estão ausentes no doador selecionado, enquanto

seus alótipos ligantes HLA-C2 e Bw4 estão presentes em células do paciente. Somando-se à presença do receptor de ativação KR2DS1 no doador, que apesar da ligação de baixa afinidade com alótipos HLA-C2, esse conjunto de interações sinalizaria para um cenário mais propício ao efeito GvL. Na mesma família, o outro irmão do paciente, apesar da identidade HLA, no que se refere às interações KIR-ligante apresentaria um cenário de interações onde prevaleceria um sinal de inibição da atividade citotóxica das células NK. Na família DRM07/08 as interações de inibição entre KIR2DL1 presente em células NK do doador e alótipos do grupo HLA-C2 presentes em células do paciente sinalizaria para um cenário de inibição da atividade citotóxica e o paciente poderia não se beneficiar do efeito GvL. Apesar da complexidade da análise das interações e considerando-se que as moléculas HLA de Classe I estabelecem um diálogo entre Linfócitos T e células NK, o LIGH estabeleceu em sua rotina do pré-transplante, avaliar também o perfil KIR-ligante da dupla doador-paciente buscando encontrar o equilíbrio delicado que pudesse resultar em ativação adequada das células imunes, afim de que o paciente possa se beneficiar do efeito GvL e também não correr o risco de apresentar a GvHD (doença do enxerto versus hospedeiro) que comprometesse a pega e o sucesso do CTH.

### 033

#### ANÁLISE DA COMPATIBILIDADE HLA E DA FONTE DE DOADORES DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DO SERVIÇO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA DO HIAE

Torres M<sup>1</sup>, Alonso E<sup>1</sup>, Pereira S<sup>1</sup>, Kondo A<sup>1</sup>, Gregório S<sup>1</sup>, Pinheiro F<sup>1</sup>, Ribeiro A<sup>1</sup>, Hamerschlag N<sup>1</sup>, Kutner JM<sup>1</sup>, Bub C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Israelita Albert Einstein - São Paulo - SP

**Introdução:** A compatibilidade HLA entre receptor e doador é um dos principais fatores para o sucesso do Transplante de Células-Tronco Hematopoética (TCTH). O transplante com doador alogênico e haplo-idêntico são alternativas para os receptores que não encontram o doador ideal, genótipo idêntico. A seleção do doador com compatibilidade alélica HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 é a preferencial. Os critérios para seleção SCUP são a dose celular e compatibilidade HLA antigênica nos locos A e B e compatibilidade alélica no locus DRB1. O ideal é a compatibilidade 6x6, mas é aceitável compatibilidade 4x6. **Objetivo:** O objetivo desse trabalho foi avaliar a origem do sangue de cordão umbilical e dos doadores de medula óssea não aparentado e verificar o nível de compatibilidade entre o receptor e doador. **Material e Método:** As informações da fonte de células, origem do doador e os resultados das tipificações HLA de uma amostragem de 83 TCTH com doadores não aparentados ou alternativos, realizados no Hospital Albert Einstein, no período de 2009 a 2012, foram obtidas do banco de dados do setor de busca e seleção de doadores do Serviço de Transplante de Medula Óssea do HIAE. **Resultados:** A fonte de célula dos transplantes analisados foi SCUP (59%), medula óssea (37%) e doador haplo-idêntico (4%). No total de 49 SCUP, as unidades foram provenientes do banco de sangue de cordão umbilical do HIAE (20%), INCA (2%), NMDP (28%), NYBC (26%), CRIR (8%), Espanha (6%) e de outros bancos internacionais (10%). A compatibilidade entre receptor e doador SCUP foi 6x6 em 8%, 5x6 em 39% e 4x6 em 53%. Nas unidades nacionais, não foi encontrada nenhuma compatibilidade 6x6 e a maioria (60%) com compatibilidade 4x6. Nas unidades internacionais, foram selecionadas 10% com compatibilidade 6x6, 50% com compatibilidade 5x6 e 40% com compatibilidade 4x6. Nos 31 receptores que receberam medula óssea com compatibilidade HLA classe I antigênica ou alélica e classe II alélica, 61% dos doadores foram do registro Nacional (REDOME). Na análise de 23 receptores considerando compatibilidade alélica classe I e II, 48% dos doado-

res foram REDOME, 35% do registro alemão (DEDKM), 13% do NMDP e 4% de outros registros internacionais. A compatibilidade 10x10 alélica foi encontrada em 87%. Nos 3 (13%) casos com compatibilidade 9x10, as incompatibilidades foram nos locos C e DQB1. **Conclusão:** A inclusão da busca da compatibilidade alélica classe I reduziu em 13% o número de doadores de origem nacional. A maioria dos pacientes que foram transplantados com doador SCUP apresentavam haplótipos menos frequentes ou presença de alelos raros, que dificultaram o encontro de doador 10x10. Os haplótipos dos pacientes que encontraram doadores no banco alemão são constituídos de haplótipos descritos como caucasóides ou hispânico, sendo necessário análises complementares junto ao registro nacional, visando identificar a causa da ausência do doador nacional. O aumento de unidades do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário Brasileiro permitirá a seleção de unidades mais compatíveis e reduzir o número de unidades internacionais.

### 034

#### IMPLANTAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO PARA METODOLOGIA SSO

Kiyamu AR<sup>1</sup>, Ramos FS<sup>1</sup>, Rapanello EG<sup>1</sup>, Peres VP<sup>1</sup>, Silva EF<sup>1</sup>, Saito MH<sup>1</sup>, Vergueiro CSV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Irmadade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

**Introdução:** A metodologia SSO, introduzida nos laboratórios de imunogética trouxe benefícios por possibilitar o aumento do número de exames e por ampliar a resolução da tipificação, introduzindo a resolução média e por vezes alta resolução nas tipificações do locus DRB1\*. O aumento do número de exames implica em ajustes da rotina laboratorial para monitorar os processos, a consequência da introdução de nova metodologia é que não só aumentam as amostras manuseadas, como aumenta a probabilidade de erro. Assim, com a introdução do SSO introduzimos uma metodologia de controle de qualidade interno (CQI) ajustado para nova demanda. O CQI é obrigatório para todas as metodologias laboratoriais (normas RDC nº61 de 1º de Dezembro de 2009 e Portaria nº1312 de 30 de Novembro de 2000), porém cada laboratório pode estabelecer sua metodologia. **Objetivo:** Descrever os resultados obtidos no CQI, utilizado na monitorização da metodologia de tipificação HLA por SSO. **Material e Métodos:** São introduzidas 3 amostras previamente tipificadas, chamadas "amostra referência" para cada 96 amostras extraídas em placa. As amostras referência serão incluídas na tipificação HLA-ABDR por média resolução sempre na mesma posição da placa, poços 1A e7C (amostra de referência 1); poços 5A e11C (amostra de referência 2), poços 9A e3C (amostra de referência 3). Disposição utilizada de modo a possibilitar a identificação precoce de troca de amostras no decorrer de todo processo analítico e consequente troca de resultados no pós analítico. Os resultados são comparados entre cada dupla de amostra, estando em conformidade, a placa é liberada pelo CQI. Se não houver conformidade, os resultados não são liberados até que todo processo tenha sido revisto. **Resultados:** Foram analisados os resultados de 149 placas SSO, correspondentes à 447 tipificações para HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1. A avaliação foi realizada através da comparação das tipificações de cada amostra controle, onde foi obtido uma conformidade de 95% (07/149). As sete placas cujo resultado obtido não foi o esperado tiveram problema em uma das amostras do controle e para um único locus cada. Foram 5 HLA -DRB1 e 2 HLA- B, as amostras apresentavam valores menores aos estabelecidos para a validação, ou seja, baixa contagem de beads ou controle interno de amplificação do (s) exons abaixo de 1.000. Esses resultados apresentavam um grupo de alelos diferentes aos da amostra referência, alguns raros. Os testes foram repetidos, os resultados comparados e aprovados. **Conclusão:** A introdução do controle de qualidade interno na metodologia SSO permitiu monitorar o processo, identificar problemas e corrigi-los antes da libe-

ração de resultados, sem comprometimento da rotina. Garantia da qualidade tem custo e requer envolvimento e alinhamento de todos os participantes do processo. Quanto maior a rotina do laboratório, maior a necessidade de investir em controle de qualidade. Acreditamos e sugerimos que a metodologia SSO, que é empregada para exames em larga escala, em especial de doadores voluntários de medula óssea, tenha uma estratégia específica de CQI.

**035**

### **DESCRIÇÃO DE ALELOS HLA RAROS EM BRASILEIROS DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA IDENTIFICADOS POR ANÁLISE MOLECULAR**

Mattar SB<sup>1</sup>, Silva JS<sup>1</sup>, Bicalho MG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná

O Brasil ainda não possui um estudo de frequência alélica HLA bem definido para sua população, isso ocorre devido a vários fatores, principalmente devido a grande diversidade étnica da população. Alguns alelos considerados raros pelo NMDP (National Marrow Donor Program) tem apresentado uma frequência maior na população brasileira. Um alelo é definido como raro quando sua frequência alélica em determinada população em estudo é inferior a 0,002%. Esta informação é relevante para os testes de histocompatibilidade, pois devido a grande diversidade alélica deste gene muitos resultados ambíguos são obtidos pelas metodologias de tipificação HLA tradicionais e geralmente envolvem alelos raros contra alelos frequentes. O Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR realiza a genotipagem de doadores voluntários de medula óssea para cadastro no banco nacional (REDOME) e tem se dedicado ao estudo da frequência destes alelos em seu banco de doadores. A rotina laboratorial é realizada primeiramente pela metodologia de hibridização de sondas sequencia-especificas (LABType®SSOP Kits - One Lambda, USA) e quando um alelo raro é encontrado o resultado da tipificação é confirmado pelo sequenciamento do DNA (SBT - AlleleSEQR Core Kit, Atria Genetics, USA). A confirmação do alelo raro detectado é reportado ao site [www. Allelefreqencies. net](http://www.Allelefreqencies.net). Até Março de 2012 o LIGH possuía em seu banco 106 537 indivíduos, não aparentados, cadastrados, sendo suas genotipagens avaliadas para o cálculo da frequência alélica. Comparando os dados de frequência alélica aos do NMDP, observou-se que o alelo HLA-A\*02:52 apresentou frequência de 0,03473% (setenta e quatro indivíduos) enquanto que os alelos HLA-B\*37:07 , -B\*39:37 , -B\*44:20 apresentaram a mesma frequência de 0,002816% (seis indivíduos cada) enquanto os alelos HLA-DRB1\*13:56 , -DRB1\*13:60 , -DRB1\*14:13 , -DRB1\*15:11 apresentaram frequências de 0,009386% (vinte indivíduos), 0,002347% (cinco indivíduos), 0,010794% (vinte e três indivíduos) e 0,008448% (dezoito indivíduos) respectivamente. Os dados obtidos mostram que alguns alelos, como por exemplo, os acima citados e considerados raros em outras populações mundiais são frequentes em nossa população, resultado da história da composição genética da população brasileira. Por esta razão cuidados devem ser tomados na liberação de resultados baseando-se no "critério do alelo raro", muitas vezes utilizado para resolver ambigüidades genotípicas. Há que se considerar que nem sempre esse alelo será um alelo raro em nossa população, ressaltando-se a importância dos estudos sobre frequências alélicas HLA na população brasileira e seu impacto na liberação dos laudos de tipagem HLA.