

CAROLINA SENS ABUÁZAR

ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES DA REGIÃO MHC EM UMA
AMOSTRA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA

Curitiba

2008

CAROLINA SENS ABUÁZAR

ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES DA REGIÃO MHC EM UMA
AMOSTRA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Genética, do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Valéria Sperandio Roxo.

Aluna: Carolina Sens Abuázar

Curitiba

2008

Dedico aos meus pais, Emir e Salete e ao meu namorado Francisco Cariri, pelo carinho e compreensão durante estes dois anos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dr^a. Valéria Sperandio Roxo, por toda atenção oferecida durante estes dois anos de trabalho em conjunto.

À professora Dr^a. Maria da Graça Bicalho, pelo suporte tanto científico quanto financeiro para a realização deste projeto.

À minha banca de acompanhamento, professora Dr^a. Maria Luiza Petzel-Erler e Dr^a. Noemi Farah.

Aos membros da banca, Dr^a. Karin Braun-Prado e Dr^a. Daniela Pavoni, pelas sugestões e contribuições para o trabalho.

À Liana Alves de Oliveira, por todo apoio na realização da parte prática do projeto.

A todos os funcionários do Departamento de Genética, em especial à Anilda pela operação do aparelho MEGABace durante as genotipagens.

À Pablo Sandro Santos, pelo grande apoio científico.

A todos os colegas do laboratório LIGH, em especial à Marina, Fernanda, Bia, Cibele, Clineu e Alessandro.

A todos os colegas do Departamento de Genética, especialmente aos colegas da minha turma de mestrado.

À minha família que sempre esteve presente e me deu muito apoio em todos os momentos, tanto bons quanto ruins, ao longo destes dois anos.

Ao meu amado Francisco Cariri, que apesar de fisicamente longe, sempre esteve muito presente.

À DEUS, pois sem Ele nada disso seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Microssatélites.....	1
1.2. A região MHC.....	5
1.2.1. Definição.....	5
1.2.2. Histórico do MHC e descoberta do sistema gênico HLA.....	5
1.2.3 Organização genômica do MHC Humano.....	8
1.3. Microssatélites na região MHC.....	14
1.4. Sistema HLA e transplantes.....	15
1.5. Desequilíbrio de ligação.....	16
1.6. Microssatélites da região MHC em desequilíbrio de ligação com genes <i>HLA</i>	20
1.7. Microssatélites analisados neste estudo.....	21
2. OBJETIVOS	26
3. JUSTIFICATIVAS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Caracterização da amostra.....	28
4.2. Extração de DNA.....	28
4.3. Tipagem dos <i>loci HLA -B, -DRB1 e -DQB1</i>	28
4.4. Análise dos microssatélites.....	30
4.5. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS	37
5.1 Freqüências alélicas e genotípicas.....	37
5.1.1. Microssatélites da Região MHC de classe II.....	37

5.1.2. Microssatélites da Região MHC de classe III.....	40
5.1.3. Microssatélites da Região MHC de classe I.....	43
5.2 Freqüências haplotípicas.....	47
5.2.1. Microssatélites da Região MHC de classe II.....	48
5.2.2. Microssatélites da Região MHC de classe III.....	48
5.2.3. Microssatélites da Região MHC de classe I.....	49
5.3 Comparação entre populações.....	55
5.4 Microssatélites e desequilíbrio de ligação com genes HLA.....	62
5.4.1. Análise do desequilíbrio de ligação com o haplótipo estendido dos genes HLA de classe II (<i>HLA-DRB1</i> e <i>HLA-DQB1</i>).....	73
6. DISCUSSÃO.....	75
6.1 Freqüências alélicas e genotípicas.....	75
6.2 Comparação com outros estudos populacionais.....	76
6.3 Freqüências haplotípicas e desequilíbrio de ligação.....	78
7. CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anos, cidades e organizadores dos Encontros Internacionais de Histocompatibilidade (<i>HLA workshops</i>).....	7
Tabela 2. Unidade de repetição, número de alelos e valores de PIC para os microsatélites investigados neste estudo.....	24
Tabela 3. Estudos populacionais já realizados com os microsatélites investigados neste trabalho.....	24
Tabela 4. Seqüências de oligonucleotídeos (forward e reverse) e tamanho de fragmentos de bases esperados após a amplificação por PCR.....	31
Tabela 5. Concentrações dos reagentes nas PCRs.....	32
Tabela 6. Temperaturas e tempo de ciclagem.....	33
Tabela 7. Freqüências alélicas do marcador <i>D6S2874</i>	37
Tabela 8. Freqüências alélicas do marcador <i>DQCAR</i>	39
Tabela 9. Freqüências alélicas do marcador <i>D6S273</i>	40
Tabela 10. Freqüências alélicas do marcador <i>D6S2792</i>	42
Tabela 11. Freqüências alélicas do marcador <i>STR-MICA</i>	43
Tabela 12. Freqüências alélicas do marcador <i>D6S2810</i>	44
Tabela 13. Freqüências alélicas do marcador <i>HLABC-2CA</i>	46
Tabela 14. Freqüências Haplotípicas de <i>D6S2874</i> com <i>DQCAR</i>	48
Tabela 15. Freqüências Haplotípicas de <i>D6S273</i> com <i>D6S2792</i>	49
Tabela 16. Freqüências Haplotípicas de <i>STR-MICA</i> com <i>D6S2810 (MIB)</i>	50
Tabela 17. Freqüências Haplotípicas de <i>STR-MICA</i> com <i>HLABC-2CA</i>	51
Tabela 18. Freqüências Haplotípicas de <i>D6S2810</i> com <i>HLABC-2CA</i>	51
Tabela 19. Haplótipos envolvendo alelos de microsatélites e grupos alélicos do gene <i>HLA-B</i>	52

Tabela 20. Haplótipos envolvendo alelos de microssatélites e alelos do gene <i>HLA-DRB1</i>	53
Tabela 21. Haplótipos envolvendo alelos de microssatélites e alelos do gene <i>HLA-DQB1</i>	54
Tabela 22. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de <i>D6S2874</i>	55
Tabela 23. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de <i>DQCAR</i>	56
Tabela 24. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de <i>D6S273</i>	57
Tabela 25. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de <i>D6S2792</i>	58
Tabela 26. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de <i>STR-MICA</i>	59
Tabela 27. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de <i>D6S2810</i>	60
Tabela 28. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de <i>HLABC-2CA</i>	61
Tabela 29. Desequilíbrio de ligação para haplótipos estendido <i>HLA-DRB1/DQB1</i>	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escorregamento da DNA polimerase.....	2
Figura 2. O processo de permuta desigual.....	3
Figura 3. Representação do reconhecimento do complexo HLA-peptídeo pela célula T.....	8
Figura 4. Estrutura de uma molécula HLA de classe I.....	10
Figura 5. Via simplificada de processamento de antígeno para apresentação por molécula HLA de classe I.....	10
Figura 6. Estrutura da molécula HLA de classe II.....	12
Figura 7. Via simplificada de processamento de antígeno para apresentação por molécula HLA de classe II.....	12
Figura 8. Representação esquemática do cromossomo 6 humano, com as regiões do complexo de Histocompatibilidade (MHC) e o sistema gênico HLA.....	13
Figura 9. Localização dos microssatélites investigados neste estudo.....	25
Figura 10. Exemplo de visualização dos resultados no programa <i>Fragment Profiler version 1.2</i> (GE Healthcare).....	34
Figura 11. Picos do marcador ET-400 (GE healthcare).....	34

Figura 12. Freqüências genóticas de <i>D6S2874</i>	38
Figura 13. Freqüências genóticas de <i>DQCAR</i>	39
Figura 14. Freqüências genóticas de <i>D6S273</i>	41
Figura 15. Freqüências genóticas de <i>D6S2792</i>	42
Figura 16. Freqüências genóticas de <i>STR-MICA</i>	43
Figura 17. Freqüências genóticas de <i>D6S2810</i>	45
Figura 18. Freqüências genóticas do marcador <i>HLA-BC2CA</i>	47
Figura 19. Referência das cores para figuras 20 a 37.....	62
Figura 20. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2874</i> e <i>HLA-B</i>	63
Figura 21. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2874</i> e <i>HLA-DRB1</i>	63
Figura 22. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2874</i> e <i>HLA-DQB1</i>	64
Figura 23. Desequilíbrio de ligação entre <i>DQCAR</i> e <i>HLA-B</i>	65
Figura 24. Desequilíbrio de ligação entre <i>DQCAR</i> e <i>HLA-DRB1</i>	65
Figura 25. Desequilíbrio de ligação entre <i>DQCAR</i> e <i>HLA-DQB1</i>	66
Figura 26. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S273</i> e <i>HLA-B</i>	67
Figura 27. Desequilíbrio de ligação de <i>D6S273</i> e <i>HLA-DRB1</i>	67

Figura 28. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S273</i> e <i>HLA-DQB1</i>	67
Figura 29. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2792</i> e <i>HLA-B</i>	68
Figura 30. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2792</i> e <i>HLA-DRB1</i>	69
Figura 31. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2792</i> e <i>HLA-DQB1</i>	69
Figura 32. Desequilíbrio de ligação entre <i>STR-MICA</i> e <i>HLA-B</i>	70
Figura 33. Desequilíbrio de ligação entre <i>STR-MICA</i> e <i>HLA-DRB1</i>	70
Figura 34. Desequilíbrio de ligação entre <i>STR-MICA</i> e <i>HLA-DQB1</i>	71
Figura 35. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2810</i> e <i>HLA-B</i>	72
Figura 36. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2810</i> e <i>HLA-DRB1</i>	72
Figura 37. Desequilíbrio de ligação entre <i>D6S2810</i> e <i>HLA-DQB1</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

GVHD	Graft versus Host Disease (Doença do enxerto versus hospedeiro- DECH)
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)
KDa	Kilodaltons
LIGH	Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
Msat	Microsatélites
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PIC	Polymorphic information content (Conteúdo de informação polimórfica)
REDOME	Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea
REREME	Registro Nacional dos Receptores de Medula Óssea
SSR	Simple Sequence Repeats (Repetições de seqüências simples)
SSOP	Sequence-specific Oligonucleotide Probes (Sondas de oligonucleotídeos seqüência- específicos)
SSP	Sequence-specific Priming (Primers seqüência-específicos)

STR	Short Tandem Repeats (seqüências curtas de repetições em <i>tandem</i>)
TCR	T Cell Receptor (Receptor de células T)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose tumoral)

RESUMO

Microssatélites são seqüências de DNA com repetições curtas, de 1 a 6 pares de bases, que ocorrem em *tandem* e estão distribuídas por todo o genoma. Podem apresentar um alto grau de polimorfismo e há grande evidência na literatura de que muitos deles sejam bons marcadores genéticos. Neste trabalho, foram investigados 7 microssatélites da região MHC em uma amostra composta por indivíduos caucasóides da cidade de Curitiba e região metropolitana. Foram descritas as freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos microssatélites assim como o desequilíbrio de ligação entre os alelos destes marcadores e os alelos ou grupos alélicos dos genes *HLA-B*, *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*. Os microssatélites mais polimórficos foram encontrados próximos ao gene *HLA-B*, na região MHC de classe I, sugerindo uma evolução mais rápida desta região. A comparação com outros estudos populacionais demonstrou diferenças nas freqüências alélicas, as quais podem ser devidas ao longo tempo de divergência entre essas populações, juntamente com a ação da deriva genética. Além disso, a comparação entre as freqüências alélicas possibilitou a inferência de fluxo gênico entre populações euro-brasileiras e populações indígenas. Os resultados indicam a existência de desequilíbrio de ligação entre alelos de microssatélites e alelos ou grupos alélicos dos genes *HLA*. O desequilíbrio de ligação foi mais fortemente observado nas proximidades dos genes *HLA* clássicos. Os resultados deste estudo trazem informações a respeito de haplótipos HLA, podendo ser úteis para a prática laboratorial.

ABSTRACT

Microsatellites are short tandem repeats of 1-6bp DNA fragments, which are found all over the genome. Many of them are highly polymorphic and may be good markers for genetic studies. In this study, we investigated 7 microsatellites of the MHC region in a sample composed of Caucasoid individuals from the region of Curitiba and surrounding districts. Allelic, genotypic and haplotypic frequencies are described as well as the linkage disequilibrium between alleles of these microsatellites and alleles of the *HLA* genes: *HLA-B*, *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1*. The most polymorphic microsatellites were found close to *HLA-B* gene, in the MHC class I region, suggesting that this region may be subject to a faster pace of evolution. Comparisons with other population studies showed differences in the allelic frequencies, which may be due to the long time of divergence between these groups, associated with the effect of genetic drift. Moreover, the comparison of the allelic frequencies suggested possible gene flow between Euro-Brazilian populations and Amerindians. Strong linkage disequilibrium was observed between alleles of microsatellites and *HLA* genes, specially in the vicinity of classic *HLA* genes. This study contributes with important information on HLA haplotypes, which may be useful in laboratory routine.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microssatélites

Desde 1970, tem sido verificada a presença de elementos repetidos no genoma de eucariotos. Estes elementos, que coletivamente recebem a denominação de VNTR's (*variable number of tandem repeats*), podem ser classificados, segundo o tamanho em: minissatélites (seqüências mais longas de repetições) e microssatélites (seqüências mais curtas de repetições) (FOISSAC *et al.*, 2001).

Os microssatélites (Msat), também conhecidos como *short tandem repeats* (SRT) ou *simple sequence repeats* (SSR) são repetições de 1 a 6 pares de bases, sendo que o número dessas repetições varia até, aproximadamente, cem vezes. Segundo LI *et al.* (2002), entre os dinucleotídeos, as repetições de bases CA ocorrem com freqüência duas vezes maior do que as repetições AT e são três vezes mais freqüentes do que as repetições AG. As seqüências GAG e AAT parecem ser as repetições de trinucleotídeos mais comuns.

Os microssatélites apresentam padrão co-dominante de herança mendeliana, um alto grau de polimorfismo e altas taxas de mutação, que variam de 10^{-3} a 10^{-6} por *locus* (FOISSAC *et al.*, 1997). Estas mutações ocorrem freqüentemente durante a replicação, na qual há um ganho ou perda de repetições, geralmente de apenas uma repetição por vez, por um mecanismo denominado escorregamento (*slippage*) da DNA polimerase (figura 1). Outro mecanismo proposto para explicar a origem das repetições dos microssatélites é a permuta desigual, em que são trocados segmentos entre cromossomos homólogos de maneira desigual, resultando em deleções ou expansões (figura 2) (FOISSAC *et al.*, 2001).

O polimorfismo de um microssatélite depende da variação no número de repetições, do número de alelos, dos valores de heterozigosidade e diversidade gênica. Uma importante medida de quantificação é o conteúdo de informação polimórfica (PIC), descrito por Botstein *et al.* (1980), o qual é um indicador da

capacidade informativa de um marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Seu cálculo depende do número de alelos, das suas freqüências e do tamanho da amostra. Segundo a classificação de Botstein *et al.* (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Para FOISSAC *et al.* (1997), uma região que contém microssatélites é considerada um bom marcador molecular, quando apresenta um número de alelos superior a 5 e seu PIC está acima de 0,75.

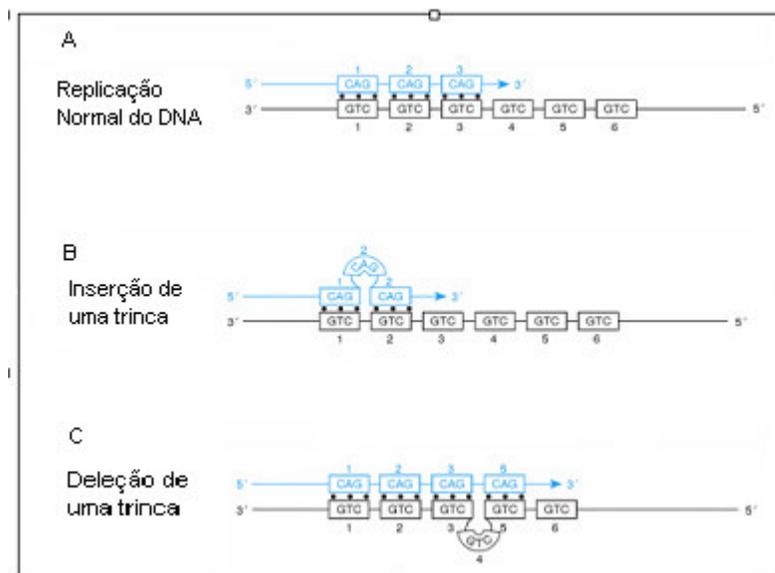


Figura 1. Escorregamento da DNA polimerase. A figura ilustra: (A) o processo normal de replicação; (B) o escorregamento da DNA polimerase para trás, o que leva ao surgimento de inserções; e (C) o escorregamento da DNA polimerase para frente, o que origina deleções. Fonte: STRACHAN e READ, 1999. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hmg.figgrp.1097>. Acesso em 3 de dezembro de 2006.

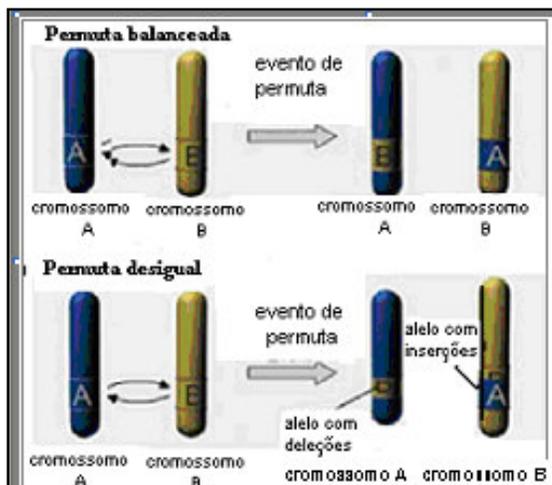


Figura 2. O processo de permuta desigual. A figura ilustra cromossomos homólogos em permuta. Quando ocorre um processo desigual na troca de segmentos, são geradas inserções e deleções. Fonte: HOPES WEBSITE. A Layperson's Guide to Huntington's Disease. Disponível em <[http:// www.stanford.edu/group/hopes/](http://www.stanford.edu/group/hopes/)>. Acesso em: 3 de dezembro de 2006.

Segundo FOISSAC *et al.* (2000), os microssatélites estão distribuídos aleatoriamente no genoma humano. Observa-se porém uma sub-representação nas regiões codificadoras (LANDER *et al.*, 2001), onde os microssatélites parecem não estar distribuídos aleatoriamente (LI *et al.*, 2004). Constituem-se em bons marcadores genéticos, especialmente devido à sua abundância, seu alto grau de polimorfismo e à simplicidade nos métodos de tipagem.

Alguns estudos indicam que microssatélites possam apresentar relevância funcional na regulação da transcrição gênica. Segundo KASHI *et al.* (1997), o nível de transcrição *in vivo* de alguns genes estaria relacionado ao número de repetições dos microssatélites.

Devido à alta taxa de mutações, os microssatélites podem ser regiões muito instáveis e tal instabilidade tem sido encontrada em neoplasias, o que sugere que os microssatélites possam apresentar um importante papel no desenvolvimento de tumores. Alguns estudos sugerem que a instabilidade de microssatélites esteja relacionada ao câncer colorretal (KLOOR *et al.*, 2005; CAMPBELL *et al.*, 1994). Expansões progressivas de seqüências CAG, em regiões responsáveis pela

codificação de receptores do hormônio androgênio, têm sido associadas a um aumento do câncer de próstata (KAISHI *et al.*, 1997).

A expansão das repetições de microssatélites pode estar associada a síndromes genéticas, originadas devido a repetições em *tandem* de trinucleotídeos. A doença de Huntington e a doença de Kennedy são exemplos de patologias com este tipo de mutações. Nestes casos, ocorrem problemas patológicos porque tais repetições de nucleotídeos acabam gerando a produção de proteínas com um aumento correspondente no número de aminoácidos (especialmente glutamina e alanina) (FOISSAC *et al.*, 2001; KASHI *et al.*, 2006). Estudos sobre doenças neurodegenerativas indicam que as repetições de trinucleotídeos possam exercer um efeito fenotípico, existindo correlação entre número de repetições e idade de surgimento da doença assim como seu grau de severidade (KASHI *et al.*, 1997) Outro estudo reportou que indivíduos portadores de muitas repetições CAG em regiões responsáveis pela codificação do receptor de dopamina D4 (D4DR) tinham maiores chances de desenvolver esquizofrenia e distúrbios bipolares (O'DONOVAN *et al.*, 1996).

A análise de microssatélites pode ser aplicada a diversas áreas tais como: estudos de genética de populações; análises de ligação; genética médica; estudos de evolução; e biologia forense. Devido ao grande número de microssatélites distribuídos pelo genoma e a rapidez na sua análise, procedimentos de tipagem destes marcadores têm sido aplicados na medicina forense (FOISSAC *et al.*, 2000), assim como também em testes de paternidade (VESELINOVIC *et al.*, 2006). Além disso, o estudo de microssatélites representa uma importante ferramenta no mapeamento genético e em estudos que pretendam investigar predisposição a doenças (GOURRAUD *et al.*, 2004).

A caracterização de microssatélites entre as populações humanas, associada à análise de DNA mitocondrial, tem sido utilizada em estudos sobre a origem dos homens modernos (JORDE *et al.*, 1995). O uso de microssatélites pode auxiliar na verificação do nível de semelhança entre seres humanos e outros primatas. Como exemplo, pode-se citar os microssatélites presentes no *locus* do fator de necrose tumoral (*TNF*), os quais são informativos quando são

comparadas espécies relacionadas, podendo fornecer uma ferramenta interessante em estudos filogenéticos (CROUAU-ROY *et al.*, 1996).

1.2. A Região MHC

1.2.1. Definição

O MHC (*Major Histocompatibility Complex*) ou Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) é uma região presente no genoma de todos os vertebrados estudados até o presente. Nesta região, encontram-se genes altamente polimórficos e polialélicos, os quais codificam moléculas de superfície celular, relacionadas com a resposta imune. Os genes do MHC são expressos de forma co-dominante. Em seres humanos este complexo gênico encontra-se no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3 e abrange o sistema gênico HLA (*Human Leucocyte Antigens* ou Antígenos Leucocitários Humanos). As moléculas HLA são de importância fundamental na apresentação de antígenos aos linfócitos T (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Dessa forma, para que linfócitos T reconheçam antígenos, é necessário que estes sejam processados na forma de peptídeos e apresentados por moléculas HLA. Com o auxílio das moléculas HLA, os linfócitos T são capazes de reconhecer a presença de um agressor extracelular (como, por exemplo, fungos, bactérias extracelulares); invasores intracelulares (como em infecções virais) ou alterações celulares (tais como as neoplasias).

1.2.2. Histórico do MHC e a descoberta do sistema gênico HLA

O MHC foi inicialmente identificado como o *locus* responsável pela codificação de produtos intimamente relacionados com a rejeição imediata de transplantes entre linhagens de camundongos endogâmicos (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Os trabalhos de Peter Gorer e George Snell, realizados nos

anos 30, descreveram um *locus*, presente no genoma de camundongos, que determinava a aceitação ou a rejeição de tecidos transplantados de uma linhagem de camundongos para outra. Este *locus* foi descrito no cromossomo 17 e denominado de *H-2* (HANSEN *et al.*, 1993).

Os genes responsáveis pelo reconhecimento de um enxerto como semelhante ou diferente do hospedeiro foram chamados de genes de histocompatibilidade. As diferenças entre o próprio e o não-próprio foram atribuídas ao polimorfismo existente para os alelos dos genes de histocompatibilidade (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Em 1954, Jean Dausset observou que muitos pacientes que apresentavam rejeição de rins transplantados ou reação a transfusões de sangue possuíam anticorpos capazes de aglutinar antígenos presentes em leucócitos do sangue ou do órgão do doador (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Estes pacientes eram, portanto, capazes de aglutinar leucócitos de outros indivíduos. Dausset então concluiu que as transfusões e transplantes provocavam nos receptores a produção de anticorpos contra os leucócitos dos doadores (DAUSSET, 1954).

O soro que reage contra as células de outros indivíduos é chamado de anti-soro e contém aloanticorpos que reagem com os aloantígenos. Como em humanos a presença de aloantígenos foi identificada inicialmente em leucócitos, estes receberam a designação de antígenos leucocitários humanos (*HLAs*- Human Leucocyte Antigens) (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Em 1958 Dausset identificou o primeiro antígeno HLA humano, o qual foi denominado de “Mac”, correspondente ao atual antígeno HLA-A2 (DAUSET, 1958).

A partir dos anos 60, iniciou-se uma série de workshops internacionais, com o objetivo de trocar informação e conhecimento a respeito do sistema HLA. Em 1964, na Carolina do Norte (EUA), ocorreu o primeiro Encontro Internacional de Histocompatibilidade. A lista dos encontros Internacionais de Histocompatibilidade pode ser visualizada na tabela 1.

Durante quase 20 anos após a descoberta dos genes *HLA*, a sua única função ainda era atribuída aos processos de rejeição em transplantes. Tal fato intrigava os estudiosos da área, pois sendo o transplante um processo não natural

ao organismo, não haveria razões para que um grande conjunto de genes fosse preservado durante o processo evolutivo. No entanto, nos anos 60 e 70, descobriu-se, novamente através de pesquisas com camundongos de linhagens endogâmicas, que o sistema HLA era fundamental para todas as respostas imunológicas a antígenos protéicos. Portanto, o efeito da histocompatibilidade que este sistema gênico confere aos vertebrados é uma forma de “efeito colateral” do seu papel biológico principal de apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T (ABBAS e LICHTMAN, 2005) (figura 3).

Com o advento das técnicas moleculares nos anos 80, a diversidade da região MHC, e conseqüentemente do sistema HLA, foi melhor compreendida, possibilitando maiores informações sobre os genes deste sistema além de permitir a descoberta dos chamados genes *HLA* não clássicos. O uso das técnicas moleculares na tipagem HLA tornou possível o seqüenciamento das regiões codificadoras das moléculas HLA, permitindo a identificação de alelos deste sistema gênico.

Tabela 1. Anos, cidades e organizadores dos Encontros Internacionais de Histocompatibilidade (*HLA workshops*)

HLA WORKSHOPS			
Ano	Ordem	Cidade	Organizador(es)
1964	1	Durham – EUA	Bernard Amos
1965	2	Leiden – Holanda	Jon J. van Rood
1967	3	Turim – Itália	Ruggero Ceppellini
1970	4	Los Angeles – EUA	Paul Terasaki
1972	5	Evian – França	Jean Dausset
1975	6	Arhus – Dinamarca	F. Kissmeyer-Nielsen
1977	7	Oxford – Inglaterra	Walter Bodmer
1980	8	Los Angeles – EUA	Paul Terasaki
1984	9	Munique – Alemanha e	Ekkehard Albert e
		Viena – Áustria	Wolfgang Mayr
1987	10	Nova Iorque – EUA	Bo Dupont
1991	11	Yokohama – Japão	Kimiyoshi Tsuji
1996	12	St. Malo e Paris – França	Dominique Charron
2002	13	Victoria – Canadá	Bo Dupont e John A. Hansen
2005	14	Melbourne – Austrália	James McCluskey

Fonte: INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKING GROUP (2005).

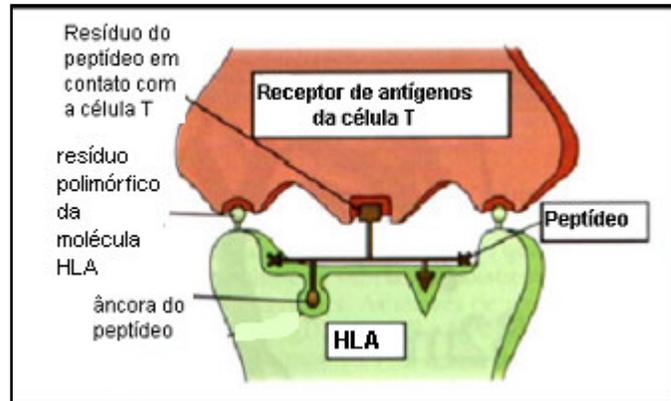


Figura 3. Representação do reconhecimento do complexo HLA-peptídeo pela célula T. O esquema demonstra uma molécula HLA (em verde) ligando e exibindo um peptídeo (em preto) e um receptor de células T (em vermelho), reconhecendo dois resíduos polimórficos da molécula HLA e um resíduo peptídico. Fonte: ABBAS e LICHTMAN, 2005.

1.2.3. Organização Genômica do MHC humano

Em humanos, o MHC localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), estendendo-se por aproximadamente 4.000 kb e contém um grande número de genes envolvidos em respostas do sistema imune (SHIINA *et al.*, 2004). Devido à grande proximidade entre os genes da região MHC e à baixa taxa de permuta entre eles (4%), a combinação de alelos de diferentes *loci* de um único cromossomo costuma ser herdada em conjunto através de uma unidade, denominada de haplótipo. Assim cada indivíduo possui dois haplótipos, um de origem materna e outro de origem paterna (ABBAS e LICHTMAN, 2005). O complexo gênico MHC é dividido em três regiões: Classe I, Classe II e Classe III.

- Classe I:

A região de classe I encontra-se situada na porção mais telomérica do MHC, estendendo-se por cerca de 1.800 kb. Esta região apresenta mais de 122 *loci* e cerca de 41 deles são genes que se expressam e transcrevem algum produto

funcional (SHIINA *et al.*, 2004). Os genes *HLA* de classe I são divididos em clássicos: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*; e não clássicos: *HLA-E*, *-F* e *-G* (KLEIN e SATO 2000 a). Nesta região, há também os *loci HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*, os quais são considerados pseudogenes (CAMPBELL *et al.*, 1993).

As moléculas *HLA* de classe I são heterodímeros que se expressam na membrana de praticamente todas as células nucleadas. São formadas por duas cadeias polipeptídicas: cadeia alfa, com cerca de 44 mil Daltons, constituída por três subdomínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), seguidos por uma porção transmembrânica hidrofóbica e uma cauda citoplasmática hidrofílica; e cadeia beta (chamada de beta-2-microglobulina ou $\beta 2m$), com cerca de 12 mil Daltons, a qual é monomórfica. As duas cadeias associam-se através de uma ligação não covalente. Enquanto a cadeia alfa é codificada por genes localizados no cromossomo 6, a cadeia beta é codificada por um gene presente no cromossomo 15. A estrutura tridimensional das moléculas de classe I apresenta uma fenda de ligação para peptídeos, formada por $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (figura 4). A maior parte do polimorfismo entre as moléculas de classe I ocorre nesta região, o que permite que o sítio de ligação ao peptídeo varie de acordo com o produto alélico (KLEIN e SATO, 2000a).

Os peptídeos, acoplados à fenda da molécula de classe I, tornam-se alvo de reconhecimento pelo TCR (T Cell Receptor ou receptor de linfócitos T) dos linfócitos TCD8+. Uma célula sem infecção e de crescimento normal apresenta constantemente peptídeos próprios aos linfócitos TCD8+. Porém, estes só são ativados quando reconhecem um peptídeo como estranho, como por exemplo, nas infecções virais, e o resultado é a morte celular da célula infectada ou alterada (ABBAS e LICHTMAN, 2005) (figura 5).

Os *loci HLA* de classe I têm um grande número de alelos. De acordo com os dados da página eletrônica do Instituto de Pesquisa Anthony Nolan, disponível em <<http://www.anthonymolan.org.uk/HIG/index.html>>, até setembro de 2007, conheciam-se 630 alelos do *locus HLA-A*, 979 alelos *HLA-B*, 338 alelos *HLA-C*, 9 alelos *HLA-E*, 21 alelos *HLA-F* e 31 alelos *HLA-G*.

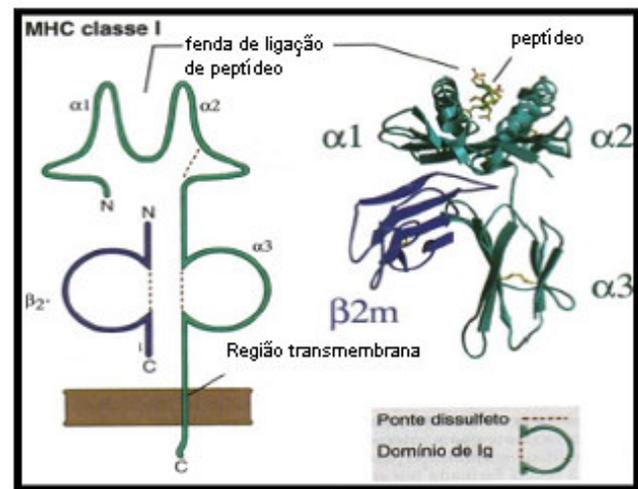


Figura 4. Estrutura de uma molécula HLA de classe I. Fonte: ABBAS e LITCHMAN, 2005.

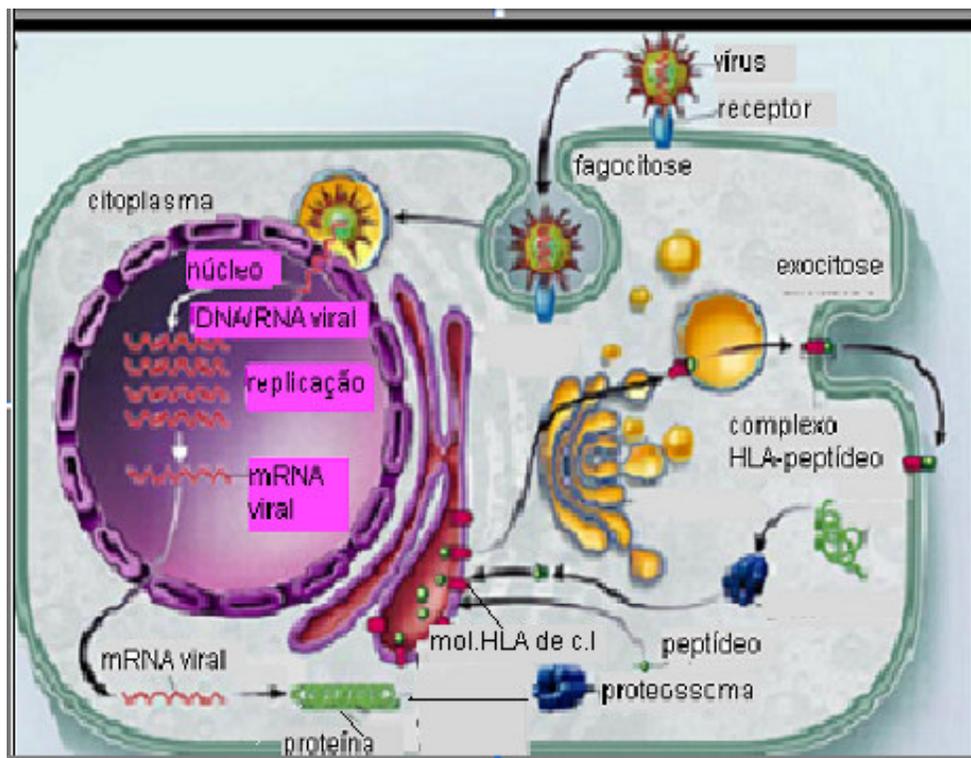


Figura 5. Via simplificada de processamento de antígeno para apresentação por molécula HLA de classe I. Fonte: KLEIN e SATO, 2000(b).

- Classe II

Situa-se na região mais centromérica do MHC, estendendo-se por cerca de 700 kb. Já foram descritos 34 *loci* nesta região. Os genes *HLA* desta região codificam moléculas HLA de classe II, e são divididos em clássicos: *HLA-DQ*, *-DP* e *-DR*; e não clássicos: *HLA-DM* e *-DO* (KLEIN e SATO, 2000a).

As moléculas HLA de classe II são heterodímeros constituídos por duas cadeias polipeptídicas: as cadeias alfa (subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e a beta ($\beta 1$ e $\beta 2$), as quais são seguidas por uma porção transmembrânica hidrofóbica e uma cauda intracelular hidrofílica. A cadeia alfa varia de 32 a 34 mil Daltons enquanto a cadeia beta de 29 a 34 mil Daltons e associam-se também de forma não covalente. Ambas as cadeias são codificadas por genes *HLA* localizados no cromossomo 6 e a sua interação forma a fenda de ligação a antígenos (figura 6). O polimorfismo se concentra mais na cadeia β , porém as duas subunidades são codificadas por genes polimórficos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

As cadeias α e β são codificadas por genes diferentes. A nomenclatura desses genes é designada por A ou B, segundo a codificação de cadeias alfa ou beta, respectivamente. Por exemplo, *HLA-DRA* codifica cadeias alfa e *HLA-DRB* codifica cadeias beta (KLEIN e SATO, 2000a).

As moléculas HLA de classe II apresentam peptídeos aos linfócitos auxiliares TCD4+ e têm expressão restrita a células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Tais peptídeos são derivados de microorganismos e proteínas extracelulares (ABBAS e LICHTMAN, 2005) (figura 7).

A maioria dos *loci HLA* da região II também apresenta muitos alelos. Os dados do Instituto Anthony Nolan (atualizados em setembro de 2007) indicam: 3 alelos *HLA-DRA*, 633 alelos *HLA-DRB*, 34 alelos *HLA-DQA1*, 90 alelos *HLA-DQB1*, 24 alelos *HLA-DPA1*, 128 alelos *HLA-DPB1*, 4 alelos *HLA-DMA*, 7 alelos *HLA-DMB*, 12 alelos *HLA-DOA* e 9 alelos *HLA-DOB*.

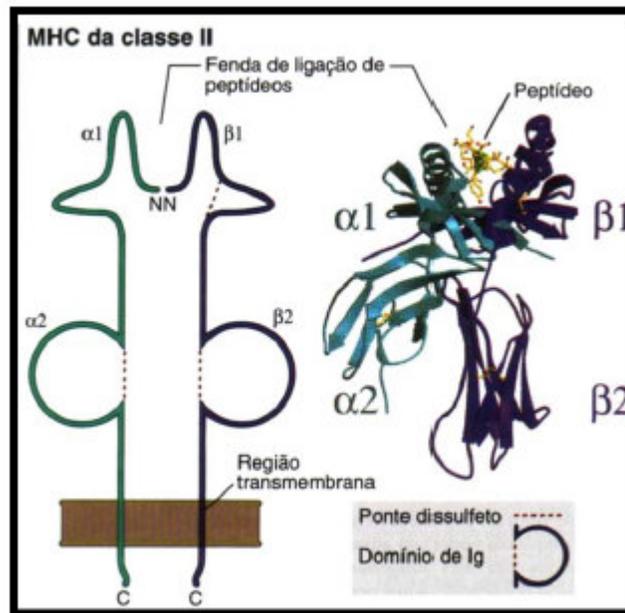


Figura 6. Estrutura da molécula HLA de classe II. Fonte: ABBAS e LICHTMAN (2005).

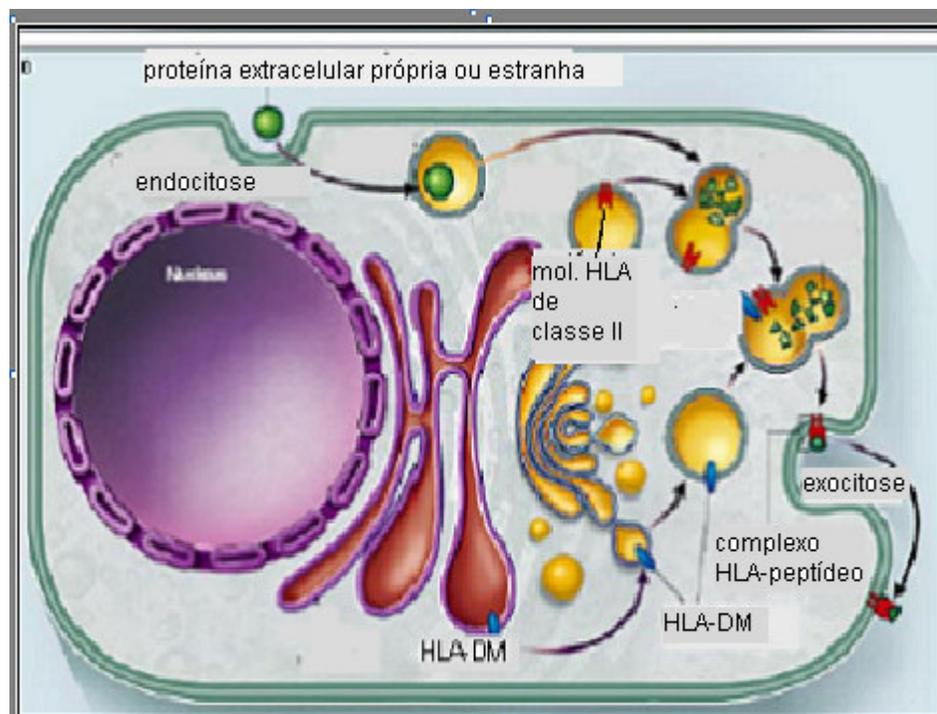


Figura 7. Via simplificada de processamento de antígeno para apresentação por molécula HLA de classe II. Fonte: KLEIN E SATO, 2000(b).

- Classe III

A região de classe III localiza-se entre as regiões de classe I e II e estende-se por cerca de 900 kb, codificando mais de 70 polipeptídeos diferentes (HAUPTMANN e BAHRAM, 2004). Segundo SHIINA *et al.* (2004), esta é uma região com alta densidade gênica, apresentando cerca de um gene a cada 14.500 bases. Na região de classe III, encontram-se os genes que codificam moléculas de citocinas (TNF, $LT\alpha$ e $LT\beta$) (GRUBIC *et al.*, 2006) e moléculas ligadas aos componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B) (ABBAS e LICHTMAN, 2005). A figura 8 é uma representação esquemática da região MHC humana, compreendendo o sistema gênico HLA.

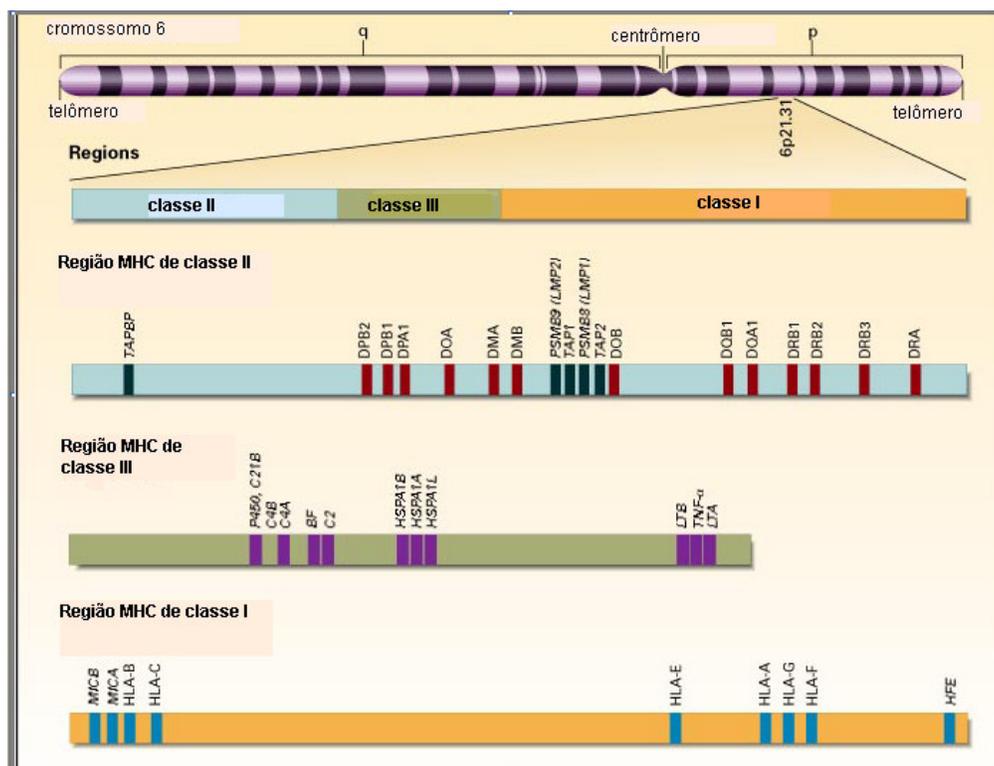


Figura 8. Representação esquemática do cromossomo 6 humano, com as regiões do complexo de Histocompatibilidade (MHC) e o sistema gênico HLA. Em laranja, está representada a região de classe I, em azul a região de classe II e em verde a região de classe III. Fonte: KLEIN e SATO, 2000(a).

1.3. Microssatélites na região MHC

A presença de marcadores microssatélites na região MHC tem sido descrita desde 1991 (FOISSAC *et al.*, 1997). Até o momento já foram encontrados mais de 350 microssatélites nesta região ou em torno dela (GOURRAUD *et al.*, 2004). As repetições apresentam predominância de bases CA, verificadas em 64% de repetições de dinucleotídeos. O grau de polimorfismo dos microssatélites é muito alto e o número alélico varia de 2 a 20, com média de 9,5 alelos para os *loci* analisados na região MHC.

Como já foi mencionado, o uso de microssatélites pode estender-se a várias áreas. Muitos estudos utilizando microssatélites da região MHC procuram uma maior compreensão dos mecanismos de susceptibilidade a doenças, tanto imunes quanto infecciosas, localizando e quantificando genes ou regiões envolvidos nesse processo (JAWAHEER *et al.*, 2002). Algumas das patologias que podem ser estudadas com a utilização de microssatélites são: esclerose múltipla (FAVOROVA *et al.*, 2006); doença de Behçet (NISHIYAMA *et al.*, 2006); artrite reumatóide (AGRAWAL *et al.*, 2005); diabetes mellitus (VALDES *et al.*, 2005); lúpus eritematoso sistêmico (SCHOTTE *et al.*, 2005); asma e hemocromatose (GOURRAD *et al.*, 2004).

Os microssatélites da região MHC podem também ser utilizados em estudos de genética de populações. Os microssatélites do *locus TNF* foram os primeiros microssatélites desta região a serem utilizados em estudos de populações européias (JONGENEEL *et al.*, 1991). Uma outra aplicação é a caracterização de regiões de recombinação no MHC (CULLEN *et al.*, 2002).

Finalmente, a tipagem dos microssatélites pode ser utilizada como uma estratégia adicional, acrescentando informações a respeito de haplótipos HLA, auxiliando e proporcionando um refinamento da tipagem dos genes *HLA* (LI *et al.*, 2004).

1.4 Sistema HLA e transplantes

Transplante é o processo de retirada de células, de tecidos ou órgãos, chamados de enxerto, e sua inserção em um indivíduo diferente. O enxerto que ocorre entre indivíduos diferentes da mesma espécie é denominado de aloenxerto. Porém, uma grande limitação ao êxito dos transplantes é a resposta imune entre receptor ao doador, a qual pode resultar em rejeição quando o enxerto é reconhecido como estranho (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A necessidade de se entender melhor o impacto do sistema HLA na sobrevivência de órgãos e tecidos transplantados motivou o desenvolvimento rápido do conhecimento sobre os genes e proteínas deste sistema. Os produtos antigênicos das moléculas HLA são os principais determinantes da rejeição ou aceitação de órgãos e tecidos em transplantados (SANTOS, 2005). As moléculas que são reconhecidas como estranhas são os aloantígenos. Os linfócitos que reagem com os aloantígenos são denominados de alorreativos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

O transplante de medula óssea consiste em um enxerto de células tronco hematopoiéticas. É clinicamente indicado para o tratamento de defeitos adquiridos pelo sistema hematopoiético ou pelo sistema imune e em casos de doenças malignas de medula óssea e tumores sólidos disseminados (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Porém, se houver reconhecimento antigênico entre as células enxertadas e o organismo que as recebeu, o enxerto produzirá constantemente células reativas e hostis aos tecidos do hospedeiro (SANTOS, 2005). Assim, ocorre a chamada doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), ou em inglês *Graft versus host disease* (GVHD), a qual é causada pela reação de células T maduras no inóculo da medula com aloantígenos do hospedeiro (LI *et al.*, 2004).

Indivíduos que expressam as mesmas moléculas HLA apresentam maior probabilidade de aceitação de enxertos do que aqueles que expressam moléculas diferentes entre si. Desta forma, quanto maior a semelhança HLA entre doadores e receptores, maior o sucesso dos transplantes (SANTOS, 2005). Com o objetivo de verificar a compatibilidade entre doadores e receptores, são realizados vários

testes laboratoriais tais como: a tipagem sanguínea ABO, tipagem HLA, triagem em busca de anticorpos anti-HLA pré-formados (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Devido ao fato do sistema HLA ser poligênico, polimórfico e polialélico, a probabilidade de dois indivíduos não-consangüíneos apresentarem os mesmos grupos alélicos é baixa e a probabilidade de apresentarem os mesmos alelos é ainda menor. Foram então organizados, em vários países do mundo, a partir dos anos 80, registros nacionais de voluntários que se cadastram como possíveis doadores de células-tronco hematopoiéticas. No Brasil, os dados dos doadores de medula óssea são cadastrados no Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea (REDOME).

1.5 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação é verificado quando certos alelos em diferentes *loci* ocorrem em conjunto com uma freqüência maior ou menor do que a esperada pelo acaso. Em outras palavras, é um fenômeno que diz respeito à não independência de alelos de diferentes *loci*, ou seja, a uma associação não aleatória (ARDLIE *et al.*, 2002). Segundo a definição de VOGEL e MOTULSKY (2000), o desequilíbrio de ligação acontece quando a freqüência de um dado haplótipo difere da freqüência haplotípica esperada, a qual é obtida através do produto das freqüências dos alelos que constituem o haplótipo.

Como exemplo, podemos considerar dois alelos **a** e **b**, provenientes de dois *loci* diferentes (A e B) ligados, e com freqüências de **p_a** e **p_b** respectivamente. Assumindo-se livre recombinação entre eles, espera-se que sua freqüência combinada **p_{ab}** (a freqüência do haplótipo **ab**) possa ser expressa por:

$$p_{ab} = p_a p_b$$

Quando são observados resultados diferentes disso, diz-se que tais alelos encontram-se em desequilíbrio de ligação. Para expressar o valor do desequilíbrio, utiliza-se geralmente a expressão:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - p_a p_b$$

Onde Δ_{ab} (ou D) é a medida do desvio do desequilíbrio de ligação e seu valor depende das freqüências alélicas, as quais podem variar entre 0 e 1.

LEWONTIN (1964) sugeriu normalizar a medida de Δ , dividindo-a pelo seu máximo teórico, através da seguinte fórmula:

$$\Delta'_{ab} = \Delta_{ab} / \Delta_{ab} \text{ máx}$$

onde o valor de $\Delta_{ab} \text{ máx}$ pode ter um dos dois valores:

- o maior de $(p_a p_b, (1 - p_a)(1 - p_b))$, se $\Delta_{ab} < 0$

ou

- o menor de $((1 - p_a)p_b, p_a(1 - p_b))$, se $\Delta_{ab} \geq 0$

Δ'_{ab} (ou D') traz informação a respeito da magnitude do desequilíbrio em relação ao maior valor que este pode assumir. Pode atingir valores entre $-1,00$ e $+1,00$. Valores negativos indicam repulsão entre os alelos em questão (ocorrem juntos menos freqüentemente que o esperado) e os positivos indicam acoplamento (ocorrem juntos mais freqüentemente que o esperado). O valor zero indica ausência de desequilíbrio de ligação. No presente estudo, Δ' ou D' foi a medida de desequilíbrio de ligação utilizada para a análise dos resultados.

Entre os fatores que influenciam o desequilíbrio de ligação, pode-se mencionar:

- **As taxas de recombinação:** existem regiões do genoma com altas taxas de recombinação (onde o desequilíbrio é menor) e regiões com baixas taxas de recombinação (onde desequilíbrio é maior). Assim, o desequilíbrio de ligação está associado à taxa de recombinação, a qual depende da

distância entre os segmentos (conforme PROBST, 2000; VOGEL e MOTULSKY, 2000).

- **As inversões:** têm um grande efeito sobre o desequilíbrio de ligação, pois podem levar a uma diminuição do potencial de recombinação, podendo, portanto, aumentar o desequilíbrio (YU *et al.*, 2001).
- **A mistura relativamente recente de populações:** o desequilíbrio de ligação pode ser criado quando populações em equilíbrio de ligação, porém heterogêneas em relação às suas frequências haplotípicas, se misturam. Tal mistura, por ser recente, ainda não permitiu que se atingisse uma distribuição aleatória dos alelos (equilíbrio) (conforme PROBST, 2000; VOGEL e MOTULSKY, 2000).
- **Deriva genética:** a ação da deriva é especialmente mais intensa em populações de menor tamanho e pode levar a perda de determinados haplótipos, influenciando em um aumento do desequilíbrio de ligação (ARDLIE *et al.*, 2002).
- **Crescimento populacional:** um rápido crescimento populacional diminui o desequilíbrio de ligação através da redução do efeito da deriva genética (ARDLIE *et al.*, 2002).
- **Seleção Natural:** algumas combinações de alelos podem trazer vantagem seletiva a seus portadores e, portanto, são preservadas. Uma forma da ação da seleção natural pode também ocorrer através de um efeito carona, no qual um haplótipo inteiro que flanqueia uma determinada variante favorável pode rapidamente atingir uma alta frequência, aumentando, portanto, o desequilíbrio de ligação na região (ARDLIE *et al.*, 2002).

- **Co-evolução dos genes:** dois ou mais *loci* podem estar co-evoluindo. Nesses casos a taxa de recombinação entre eles diminui através da presença de pontos frios de permuta, aumentando o desequilíbrio de ligação (conforme PROBST, 2000).
- **Conversão gênica:** um evento de conversão gênica diminui o desequilíbrio de ligação, sendo sua ação equivalente ao de dois eventos de recombinação muito próximos (ARDLIE *et al.*, 2002).

A análise do desequilíbrio de ligação em humanos é um tópico de grande interesse. A análise do desequilíbrio de ligação no sistema HLA pode ser muito útil na investigação de associações desse sistema gênico com doenças de etiologia genética (VOGEL e MOTULSKY, 2000). Segundo JONATHAN *et al.* (2001), para o entendimento do desequilíbrio de ligação em humanos é necessária uma maior compreensão da demografia humana através do estudo histórico das mudanças no tamanho das populações, assim como da estrutura das mesmas.

O desequilíbrio de ligação em humanos vem sendo muito investigado através do Projeto Internacional HapMap (disponível em <<http://www.hapmap.org>>). Este projeto pretende desenvolver um mapa haplotípico do genoma humano (HapMap). O projeto iniciou-se em outubro de 2002, com o objetivo de identificar e catalogar diferenças genéticas, encontradas no genoma humano. Tal projeto representa uma colaboração entre cientistas do Japão, Estados Unidos, Canadá, China, Nigéria e Reino Unido. Já foram analisados mais de um milhão de SNPs (single nucleotide polymorphisms) provenientes de 269 amostras de DNA, de quatro populações (Nigéria, Japão, China e Estados Unidos).

1.6. Microssatélites da região MHC em desequilíbrio de ligação com genes HLA

Alelos de microssatélites da região MHC apresentam um forte desequilíbrio de ligação com alelos dos *loci HLA* clássicos (FOISSAC *et al.*, 2000; FOISSAC *et al.*, 2001). Muitos haplótipos HLA tais como (*HLA-A1-B8-DR3*, *HLA-30-B18-DR3*, *HLA-A29-B44-DR7* e *HLA-A2-B44-DR4*) apresentam forte desequilíbrio de ligação com alelos do microssatélites. Sugere-se portanto que os microssatélites participem dos haplótipos estendidos em termos de estrutura, evolução e função da região MHC, apresentando uma considerável variação de acordo com o *locus* e os haplótipos analisados (FOISSAC *et al.*, 2001).

Segundo RHODES e TROWSDALE (1999), em estudos de predisposição a doenças, os haplótipos *DRB1*0301-DQB1*0201* (associado a diabetes tipo I), *DRB1*0401-DQB1*0302* (associado a diabetes tipo I e artrite reumatóide) e *DRB1*1501-DQB1*0602* (associada à esclerose múltipla e narcolepsia) apresentam desequilíbrio de ligação com alelos de microssatélites. Em um outro trabalho sobre diabetes mellitus, IDE *et al.* (2005), estudando uma população da região do Colorado (Estados Unidos), reportaram desequilíbrio de ligação entre o alelo *D6S273*143* e *HLA-B08*, *HLA-Cw7* e *HLA-A1* ($D' = 0,89$, $D' = 0,77$ e $D' = 0,62$, respectivamente). O estudo encontrou valores menores de D' , quando analisado o desequilíbrio entre o alelo *D6S2223*177* e *HLA-B8* ($D' = 0,44$).

MALKKI *et al.* (2005), estudando desequilíbrio de ligação entre microssatélites e *loci HLA* em indivíduos norte-americanos, reportaram forte desequilíbrio, com valores de p altamente significativos entre: *D6S265* e *D6S510* com o *locus HLA-A* ($D' = 0,86$ e $D' = 0,87$, respectivamente); *D6S2810* e *D6S2811* como o *locus HLA-B* ($D' = 0,89$ e $D' = 0,85$, respectivamente); *D6S2883* e *D6S2876* com o *locus HLA-DRB1* ($D' = 0,82$ e $D' = 0,90$, respectivamente); e *D6S2876* com o *locus HLA-DQB1* ($D' = 0,81$).

GRUBIC *et al.* (2006), em um estudo da população croata, reportaram um alto desequilíbrio de ligação entre: *D6S2793*212* e *HLA-B*07*; *TNFA*115* e *HLA-B*18*; e *D6S2927*217* e *HLA-B51*. GRIMALDI *et al.* (1996), em um estudo sobre a

população basco-francesa, verificaram que o microssatélite *D6S2810 (MIB)* está fortemente ligado ao *locus HLA-B*. Na região MHC de classe II, o alelo *DQCAR*103* foi encontrado em forte desequilíbrio com vários alelos do gene *HLA-DQB1*, em estudo sobre populações de origens europeia, africana, asiática e mexicana (MACAUBAS *et al.*, 1995).

FOISSAC *et al.* (2001), em revisão sobre microssatélites, relataram uma forte associação de três dos microssatélites que serão abordados neste estudo, *D6S2810 (MIB)*, *D6S2792 (TNFa)* e *DQCAR* com genes *HLA*, fornecendo mais de 90% da informação haplotípica de *HLA-A, -B, -DR e -DQ*.

A análise do desequilíbrio de ligação permite prever se um determinado alelo de microssatélite apresenta segregação preferencial com variantes alélicas de genes *HLA*. Portanto, este tipo de tipagem pode ampliar o conhecimento a respeito dos haplótipos do sistema *HLA*.

1.7. Microssatélites analisados neste estudo

Para este estudo foram selecionados os seguintes microssatélites: *D6S2874 (TAP1CA)*, *DQCAR*, *D6S273*, *D6S2792 (TNFa)*, *STR-MICA*, *D6S2810 (MIB)* e *HLABC-2CA*. Informações a respeito das unidades e número de repetições, número de alelos e conteúdo de informação polimórfica (PIC) podem ser visualizadas na tabela 2. Outros estudos populacionais realizados com estes microssatélites estão descritos na tabela 3. A localização dos microssatélites deste estudo pode ser visualizada na figura 9.

- ***D6S2874 (TAP1CA)***

D6S2874 está localizado na região de classe II do MHC, no íntron 3 do gene *TAP1*, o que faz com que este microssatélite também seja conhecido como *TAP1-CA* (FOISSAC *et al.*, 2001).

- **DQCAR**

DQCAR está localizado entre os genes *HLA-DQA1* e *-DQB1*, a 2 kb de *HLA-DQB1* e a 10 kb de *HLA-DQA1*. Este microssatélite apresentou mais de 10 alelos em desequilíbrio com haplótipos *HLA-DRB1* e *-DQB1* (MACAUBAS *et al.*, 1995). LIN *et al.* (1997) reportaram um forte desequilíbrio de ligação entre o microssatélite *DQCAR* e o locus *HLA-DQB1*. Os resultados destes estudos revelam que *DQCAR* possa ser um útil marcador, adicionando informações sobre haplótipos envolvendo genes MHC de classe II e também ajudando na determinação de haplótipos associados à susceptibilidade/resistência a determinadas doenças.

- **D6S273**

Este microssatélite está localizado na região de classe III do MHC, na região da super família *Hsp70* e do gene *G6D* (FOISSAC *et al.*, 2001).

- **D6S2792 (TNFa)**

O locus para o fator de necrose tumoral humano (*TNF*) está localizado no Complexo Principal de Histocompatibilidade entre genes de classe III e *HLA-B* e tem sido reconhecido como um mediador essencial na resposta inflamatória. *D6S2792*, também conhecido como *TNFa*, é um microssatélite localizado no locus *TNF*, a 3,5kb do gene *TNF-β*. Assim como muitos microssatélites do locus *TNF*, apresenta um alto grau de polimorfismo (GRUBIC *et al.*, 2006). WITT *et al.* (1999) reportaram que pacientes podem apresentar problemas pós-operatórios menos graves quando a compatibilidade entre doadores e receptores é previamente verificada com a adição da tipagem de microssatélites do locus *TNF* aos loci *HLA*

de classe I e II, normalmente tipados. Segundo este estudo a verificação da compatibilidade para variantes do microssatélite *D6S2792* entre doadores e receptores pode diminuir a ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro e aumentar a sobrevida dos pacientes.

- ***STR-MICA***

Este microssatélite está localizado na região de classe I do MHC, no éxon 5 do gene *MICA* e as repetições (GCT) codificam alaninas na proteína MICA. Para este marcador, a nomenclatura dos alelos é designada conforme o número das repetições (GCT): *STR-MICA*A4* (4 repetições); *STR-MICA*A5* (5 repetições); *STR-MICA*A5.1* (variação do alelo A5, devido à inserção de uma base G, fazendo com que umas das repetições seja GGCT e levando a uma modificação na matriz de leitura); *STR-MICA*A6* (6 repetições) e *STR-MICA*A9* (9 repetições) (OTA *et al.*, 1997).

- ***D6S2810 (MIB)***

O marcador *D6S2810*, também conhecido como *MIB*, foi primeiramente descrito por GRIMALDI *et al.* (1996), em um estudo sobre a população basco-francesa. Está localizado a 2,5 kb do gene *HLA-B* e a 10 kb do gene *MICA*.

- ***HLABC-2CA***

Este microssatélite está localizado na região de classe I do MHC, entre os genes *HLA-B* e *HLA-C*. Apresenta uma diversidade muito grande, o que é refletido na existência de um grande número de alelos. BELTRAME (2005) descreveu a existência de 24 alelos para este marcador

Tabela 2. Unidade de repetição, número de alelos e valores de PIC para os microssatélites investigados neste estudo.

Loco	UR	NR	NA	PIC
<i>D6S2874 (TAP1CA)</i>	CA	*	7	0,62
<i>DQCAR</i>	CA	CA ₁₁ -CA ₂₄	10	0,79
<i>D6S273</i>	CA	*	6	0,76
<i>D6S2792 (TNFa)</i>	CA	CA ₆ -CA ₁₈	12-14	0,86
<i>STR-MICA</i>	GCT	GCT ₄ -GCT ₉	5	0,69-0,75
<i>D6S2810 (MIB)</i>	CA	CA ₇ -CA ₂₃	12	0,82
<i>HLABC-2CA*</i>	CA	*	*	*

UR: unidade de repetição; NR: número de repetições; NA: número de alelos; PIC: conteúdo de informação polimórfica (FOISSAC *et al.*, 2000). * Informação não disponível.

Tabela 3. Estudos populacionais já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho

Locus	Estudos	Locus	Estudos
<i>D6S2874</i>	euro-brasileira (1); indígenas (2)	<i>D6S2792(TNFa)</i>	croatas (8); finlandeses (3); coreanos (10)
<i>D6S273</i>	euro-brasileira (1); indígenas (2); finlandeses (3)	<i>HLABC-2CA</i>	euro-brasileira (1); indígenas (2)
<i>STR-MICA</i>	euro-brasileira (1); indígenas (2); chineses (4,5); coreanos (6) ; italianos (7); croatas (8);	<i>DQCAR</i>	finlandeses (3); croatas (11); americanos de origem: européia, africana, mexicana e asiática (12).
<i>D6S2810 (MIB)</i>	basco-franceses (9); finlandeses (3)		

(1) BELTRAME (2005); (2) OLIVEIRA (2007); (3) KARELL *et al.*, (2000); (4) FENG *et al.*, (2004); (5) TIAN *et al.*, (2006); (6) PYO *et al.*, 2003 (7) BOLOGNESI *et al.*, 2001; (8) GRUBIC *et al.*, 2006; (9) GRIMALDI *et al.*, (1995); (10) KIM *et al.*, 1999 (11) GRUBIC *et al.*, 2000; (12) MACAUBAS *et al.*, 1995.

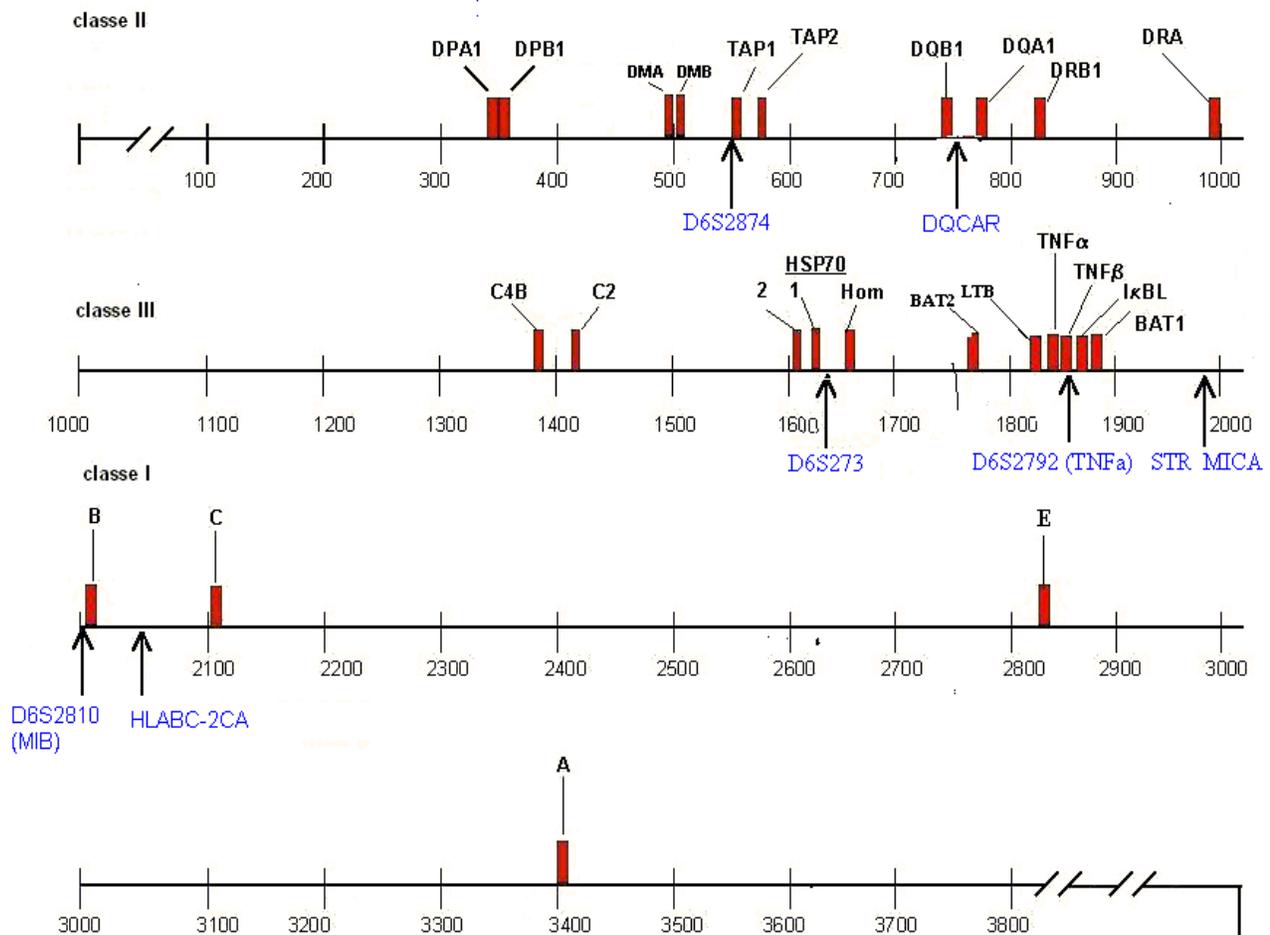


Figura 9. Localização dos microssatélites investigados neste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

- Analisar os microssatélites *D6S2874*, *DQCAR*, *D6S273*, *STR-MICA*, *D6S2810*, *D6S2792* e *HLABC-CA2*, localizados na região MHC, verificando sua relevância como marcadores de haplótipos HLA em uma amostra de indivíduos caucasóides de Curitiba e região Metropolitana, cadastrados como doadores voluntários de medula óssea.

2.2. Objetivos Específicos:

- Realizar a tipagem dos microssatélites na amostra mencionada.
- Calcular as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos microssatélites analisados.
- Verificar a conformidade das distribuições genotípicas dos microssatélites estudados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Calcular o desequilíbrio de ligação entre os microssatélites estudados e alelos dos *loci HLA-DRB1* e *HLA-DQB1* e grupos alélicos do *locus HLA-B*.
- Comparar, quando possível, os dados deste estudo com os resultados observados em outros estudos populacionais.

3. JUSTIFICATIVAS

O estudo de novos marcadores polimórficos, facilmente tipáveis, pode trazer maiores informações sobre haplótipos *HLA*. Neste contexto, os microssatélites são uma ferramenta de alto potencial. As técnicas associadas à análise de microssatélites (PCR e eletroforese) são simples e rápidas, possibilitando a tipagem de várias amostras por um baixo custo em comparação com a tipagem de alelos *HLA* de classe I e II.

A presença de desequilíbrio de ligação, já verificada por vários estudos, entre genes *HLA* e microssatélites da região MHC, sugere que estes possam ser bons marcadores de haplótipos específicos. Portanto, o conhecimento do desequilíbrio de ligação característico entre alelos de diferentes *loci*, pode vir a ser uma ferramenta muito útil na rotina laboratorial de tipagem *HLA*, especialmente no auxílio para o esclarecimento de ambigüidades encontradas nas tipagens.

Os microssatélites estudados foram escolhidos por apresentarem forte desequilíbrio de ligação com genes *HLA*, previamente reportado por outros estudos. FOISSAC., *et al* (2001) sugerem que a combinação de *DQCAR*, *D6S2810 (MIB)* e *D6S2792 (TNFa)* possa fornecer mais de 90% da informação haplotípica para *loci HLA*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da Amostra

A amostra é constituída por indivíduos caucasóides da cidade de Curitiba e região metropolitana, doadores voluntários de medula óssea, cadastrados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH). Foi previamente tipada em baixa resolução para o *locus HLA-B* e em média/alta resolução para os *loci HLA-DRB1* e *HLA-DQB1* pela equipe de rotina do laboratório LIGH. O número de indivíduos tipados variou para cada microssatélite estudado, entre 228 e 289 indivíduos.

Este trabalho faz parte do projeto de pesquisa “Detecção de Marcadores moleculares relevantes no prognóstico e aceitação do alo-enxerto” e encontra-se aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.2. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada através do método *salting-out*, que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos e precipitação do DNA com etanol (JOHN *et al.*, 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr, 1991).

4.3. Tipagem dos *loci HLA-B, -DRB1 e -DQB1*.

A tipagens do gene *HLA-B* (em baixa resolução) e dos genes *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1* (em média/alta resolução) foram previamente realizadas pela equipe de rotina do laboratório LIGH. As possíveis ambigüidades encontradas estão

descritas nos anexo 1 e 2. Os procedimentos de tipagens foram realizados conforme descrito abaixo:

- **Tipagem HLA em baixa resolução**

A tipagem em baixa resolução, para a definição dos grupos alélicos, é realizada através do método PCR-SSOP reverso (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes*), empregando a tecnologia Luminex. Esta tecnologia consiste em um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas identificadas por cores que representam diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas num citômetro de fluxo. Microesferas representantes de uma determinada cor, contêm em sua superfície apenas oligonucleotídeos-sonda de mesma seqüência, sendo assim, diferentes microesferas podem ser trabalhadas em um único tubo, substituindo o formato multi-poços convencional. Nesse método de PCR-SSOP reverso, a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinizados. Então, os produtos marcados são desnaturados e hibridizados em um único tubo com as sondas acopladas às microesferas. Finalmente, faz-se a marcação com estreptavidina conjugada com ficoeritrina e a leitura da reação.

- **Tipagem em média/alta resolução**

A tipagem em alta resolução é realizada através da técnica de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-sequence Specific Primer*), utilizando kits *Micro SSP™ Allele Specific HLA Class II*, fabricado por One Lambda Inc. A tipagem em média/alta resolução permite a definição dos alelos de cada gene.

Os procedimentos de tipagem foram realizados segundo as especificações do fabricante. Os kits SSP utilizados são elaborados em placas para PCR de 96 poços, sendo que cada placa tipa de duas a seis amostras, dependendo do grupo alélico.

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose (2,5%) e tampão TBE 1X (Trizma base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 0,01 M em pH 8,0) e a coloração é realizada com brometo de etídeo. Os géis são então fotografados durante exposição à luz ultravioleta. A análise das tipagens é realizada manualmente com o auxílio de uma folha de análise fornecida juntamente com o *kit* e também através do *software HLA Visual* versão 2.0, que permite uma análise combinada dos dados de tipagem obtidos pela técnica de SSOP e de SSP.

4.4 Análise dos microssatélites

A tipagem dos microssatélites foi realizada com base em um método semi-automatizado, no qual as regiões dos microssatélites selecionados foram amplificadas por PCR, através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluorescência. Os segmentos amplificados, depois de desnaturados, foram submetidos à corrida eletroforética, juntamente com um marcador de peso molecular ET-400 (GE Healthcare) no aparelho seqüenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare), no qual foram separados por tamanho e após analisados através do programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare). A seqüência e cor de marcação dos oligonucleotídeos iniciadores assim como os tamanhos dos fragmentos esperados através da amplificação por PCR estão descritos na tabela 4.

Os microssatélites *D6S273* e *D6S2874* foram amplificados em conjunto através de reações de multiplex, já previamente padronizadas por OLIVEIRA (2007). Neste tipo de PCR, duas ou mais regiões são amplificadas simultaneamente pela adição de diversos pares de oligonucleotídeos iniciadores. Os demais microssatélites foram amplificados separadamente. As condições de PCR de cada reação encontram-se descritas nas tabelas 5 e as temperaturas e tempo de ciclagem na tabela 6.

Tabela 4- Seqüências de oligonucleotídeos (forward e reverse) e tamanho de fragmentos de bases esperados após a amplificação por PCR.

<i>Locus</i>	Oligonucleotídeo iniciador (<i>forward</i>)	Oligonucleotídeo iniciador (<i>reverse</i>)	Tamanhos dos fragmentos (pb)
¹ <i>D6S2874</i> (<i>TAP1CA</i>)	5'-gctttgatctccccctc-3' (FAM - azul)	5'-ggacaatatttgctcctgagg-3'	185-215
² <i>DQCAR</i>	5'-gaaacatatattaacagagacagacaaa-3' (HEX- verde)	5'-catttctctcctatcactcata-3'	99 -127
³ <i>D6S273</i>	5'-ggagaagtgagtatttctgc-3' (HEX - verde)	5'-accaaactcaaatttctgg-3'	139-163
⁴ <i>D6S2792</i> (<i>TNFa</i>)	5'-gcctctagatttcaccagccaca-3' (VIC-verde)	5'-cctctctcccctgcaacacaca-3'	97-127
⁵ <i>STR_MICA</i>	5'-ccttttttcagggaagtgc-3' (HEX - verde)	5'-ccttaccatctccagaaactgc-3'	180 - 200
⁶ <i>D6S2810</i> (<i>MIB</i>)	5'-ctaccatgaccccctcccc-3' (FAM- azul)	5'-ccacagtctctatcagtcca-3'	326-360
⁷ <i>HLABC-2CA</i>	5'-tgggcaatgagtcctatgac-3' (FAM - azul)	5'-tgccatttggccctaaatgc-3'	90 - 130

Tabela 5. Concentrações dos reagentes nas PCRs.

Reagentes (Concentração inicial)	Concentração final (na PCR)						
	<i>D6S2874*</i> (<i>TAP1CA2</i>)	<i>DQCAR</i>	<i>D6S273*</i>	<i>D6S2792</i> (<i>TNFA</i>)	<i>STR-MICA*</i>	<i>D6S2810</i> (<i>MIB</i>)	<i>HLAB-2CA</i>
Tampão (10X)	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
dNTP (2,5mM)	0,25 mM	0,25mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	2,5mM	1,5 mM	2,5 mM	1,5 mM	2,5 mM	1,5 mM
Taq.Pol (5U/ul)	0,25 U	0,25 U	0,25 U	0,25U	0,25 U	0,25 U	0,25U
DNA (20ng/μl)	6 ng/μl	6 ng/μl	6 ng/μl	6 ng/μl	5 ng/μl	6 ng/μl	4 ng/μl
Oligonucleotídeos Iniciadores (primers)	0,22 μM	0,5 μM	0,68 μM	0,5 μM	0,2 μM	0,6 μM	2 μM

Tabela 6. Temperaturas e tempo de ciclagem.

Microsatélites	Temperatura e tempo de ciclagem				
	Incubação	Desnaturação*	Anelamento*	Extensão*	Extensão Final
<i>D6S2874 (TAP1CA2)</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	55°C-30 seg	72°C- 1 min	72°C-40 min
<i>D6S273</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	55°C-30 seg	72°C- 1 min	72°C-40 min
<i>STR-MICA</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	54,5°C-30 seg	72°C- 1 min	72°C-40 min
<i>D6S2810 (MIB)</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	48°C-30 seg	72°C- 1 min	72°C-40 min
<i>D6S2792 (TNFa)</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	55°C-30 seg	72°C- 1 min	72°C-40 min
<i>HLABC-2CA</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	60°C-30 seg	72°C- 1 min	72°C-40 min
<i>DQCAR</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	55°C-30 seg	72°C- 1 min	72°C-40 min

* As etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram realizadas em um número total de 30 ciclos.

Após a PCR, as regiões amplificadas foram submetidas à corrida eletroforética no aparelho MegaBACE 1000. Para tanto, foi preparada uma solução com TWEEN e o marcador de peso molecular ET-400 (GE Healthcare). Para cada amostra foram colocados 0,3 µl do marcador, 7,7 µl de TWEEN 0,02X e 2 µl do produto de PCR. A placa contendo tais reagentes foi então desnaturada por 3 minutos a 94°C e colocada diretamente no gelo para manter a desnaturação. A injeção no MegaBACE foi feita a 3 KV por 80 segundos e a corrida a 8 KV por 80 minutos. Os microsatélites podem ser injetados juntos no MegaBACE desde que seja evitada possíveis sobreposições de microsatélites cujo produtos de PCR tenham tamanho similar e além disso tenham sido marcados com a mesma fluorescência. A figura 10 ilustra um exemplo de visualização dos

resultados através do programa *Fragment Profiler*. O marcador de peso molecular ET-400 apresenta 20 picos, cada um correspondendo a um tamanho de pares de base, previamente definido (figura 11).

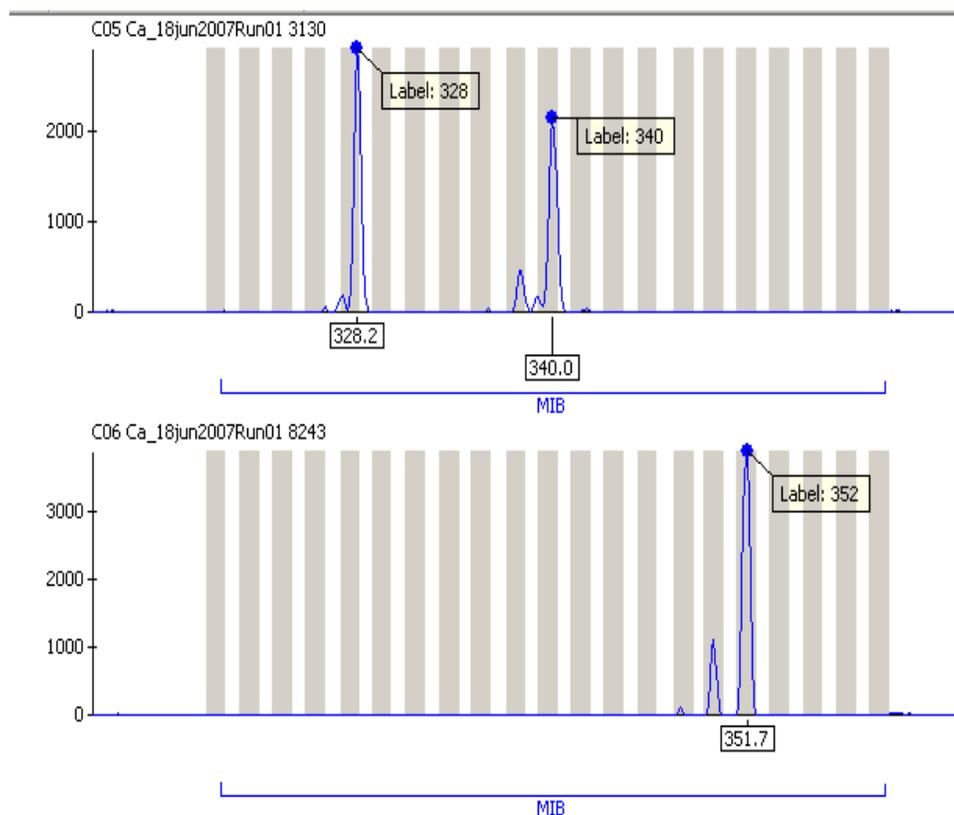


Figura 10. Exemplo de visualização dos resultados no programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare).

Nota. Na figura acima, estão representados, respectivamente, um indivíduo heterozigoto (alelos 328 e 340) e um homozigoto (alelo 352) para o microsatélite *D6S2810* (MIB).

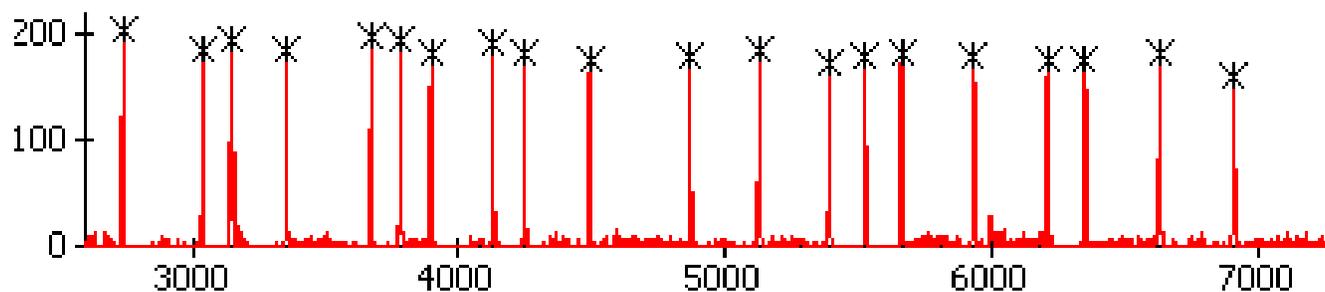


Figura 11. Picos do marcador ET-400 (GE healthcare).

Nota. Os picos representam oligonucleotídeos de tamanhos conhecidos: 60, 90, 100, 120, 150, 160, 170, 190, 200, 220, 250, 270, 290, 300, 310, 330, 350, 360, 380 e 400 pb, respectivamente.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As freqüências genotípicas foram obtidas por contagem direta. A distribuição das freqüências genotípicas foi comparada com a esperada segundo o teorema de Hardy-Weinberg, através do método de GUO e THOMPSON (1992), utilizando-se para isso o programa computacional ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). As freqüências alélicas foram calculadas também através da utilização do programa computacional ARLEQUIN versão 3.11, sendo obtidas a partir da seguinte fórmula:

$$f_{al} = n/2N$$

onde:

- f_{al} : freqüência alélica (ou freqüência de determinado grupo alélico)
- n : freqüência absoluta de um alelo ou grupo alélico na amostra
- N : número de indivíduos na amostra. O N é multiplicado por 2 pois cada indivíduo é portador de duas cópias alélicas de cada gene.

A diversidade de cada microssatélite foi quantificada pelo número de alelos observados, pela heterozigosidade observada (porcentagem de indivíduos heterozigotos) e pela diversidade gênica (heterozigosidade esperada), que consiste na proporção esperada de indivíduos heterozigotos para as freqüências alélicas observadas. Tais parâmetros também foram calculados utilizando-se o pacote de programas Arlequin v. 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

As comparações com outros estudos populacionais foram realizadas através do teste exato de Fisher, com auxílio do programa RXC (MILLER, 1997) sendo adotado como limite de significância $p=0,05$.

As freqüências haplotípicas foram obtidas a partir do método da máxima verossimilhança, utilizando-se o algoritmo da maximização da expectativa (EM), de acordo com o que foi descrito por EXCOFFIER e SLATKIN (1995). O método de máxima verossimilhança consiste em estimar freqüências haplotípicas aleatórias e a partir delas computar a verossimilhança de se obter as freqüências

genotípicas esperadas assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir das freqüências haplotípicas geradas. A cada passo, a verossimilhança aumenta. Tal método foi empregado através do uso do programa ARLEQUIN versão 3.11. Neste trabalho foram reportadas apenas os haplotípicos com freqüências iguais ou superiores a 2%.

Quando a freqüência haplotípica observada difere da esperada, ou seja, do produto das freqüências alélicas individuais, diz-se que os alelos estão em desequilíbrio de ligação. O cálculo do desequilíbrio de ligação, assim como seu nível de significância ($p=0,05$), foi também feito através do uso do programa ARLEQUIN. O grau de significância do desequilíbrio de ligação foi avaliado através do teste exato de Fisher, em tabelas de contingência 2x2.

5. RESULTADOS

5.1 Freqüências alélicas e genóticas

São mostrados para cada microssatélite: os resultados das freqüências alélicas e genóticas; o valor de p para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg; e os valores (em porcentagem) referentes à heterozigosidade observada e à diversidade gênica (heterozigosidade esperada). A partir deste momento, foi utilizada apenas a nomenclatura oficial e os microssatélites foram comentados na ordem em que aparecem no cromossomo, a partir da região centromérica.

5.1.1. Microssatélites da região MHC de classe II

- *D6S2874*

Foram tipados 289 indivíduos para este microssatélite e 6 alelos foram observados, com tamanhos variando entre 191 a 207 pb. As freqüências alélicas estão descritas na tabela 7 e o alelo mais freqüente foi *D6S2874*191*. Foram encontrados 13 genótipos diferentes e os mais comuns podem ser observados na figura 12. As freqüências genóticas estão de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW}=0,94$). Tanto a heterozigosidade observada quanto a diversidade gênica atingiram o valor de 62,0%.

Tabela 7. Freqüências alélicas do marcador *D6S2874*.

Alelos de <i>D6S2874</i>	Freqüências alélicas (%)
191	44,0 ± 2,0
193	43,2 ± 2,0
201	2,5 ± 0,6
203	4,2 ± 0,8
205	1,4 ± 0,4
207	4,7 ± 0,9

■ Alelo mais freqüente

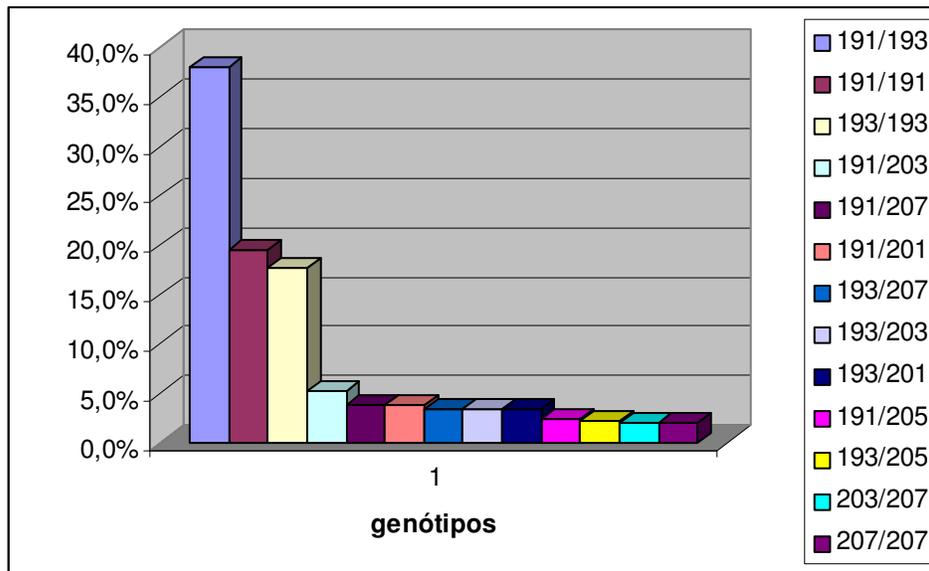


Figura 12. Frequências genóticas de *D6S2874*

Nota: São mostrados apenas genótipos com frequência igual ou superior a 2%.

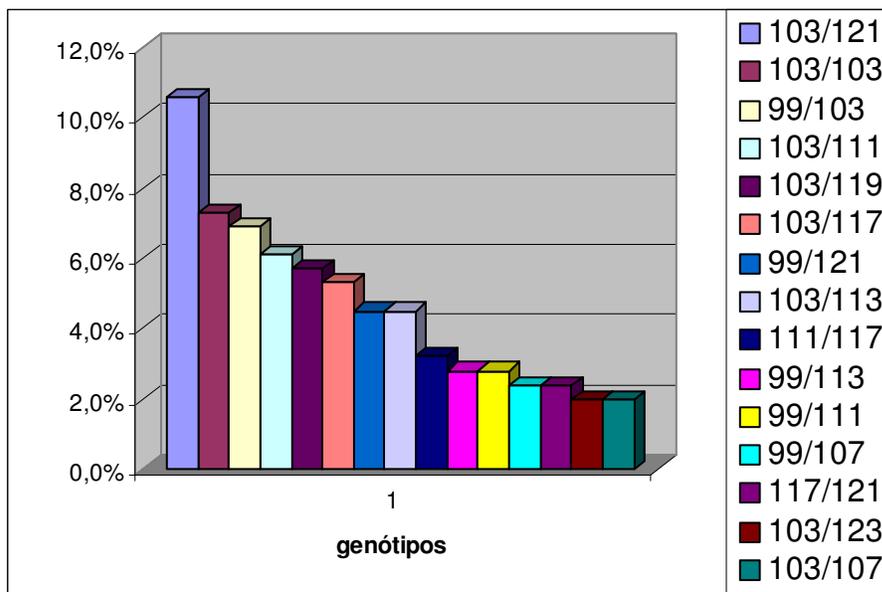
- *DQCAR*

Foram genotipados 245 indivíduos para este marcador, sendo observados 12 alelos com tamanhos entre 99 a 123 pb. As frequências alélicas são mostradas na tabela 8 e o alelo mais freqüente foi *DQCAR*103*. O alelo *DQCAR*101* não foi observado. Foram encontradas 46 combinações genóticas diferentes e as mais comuns podem ser observadas na figura 13. As frequências genóticas estão de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW}=0,28$). A heterozigosidade observada foi de 86,1% e a diversidade gênica de 84%.

Tabela 8. Freqüências alélicas do marcador *DQCAR*

Alelos de <i>DQCAR</i>	Freqüências alélicas (%)
99	13,5 ± 1,5
103	30,6 ± 2,1
105	0,8 ± 0,4
107	4,0 ± 0,9
109	0,3 ± 0,1
111	11,0 ± 1,4
113	8,0 ± 1,2
115	1,4 ± 0,5
117	8,4 ± 1,3
119	5,7 ± 1,0
121	13,6 ± 1,5
123	2,7 ± 0,7

■ Alelo mais freqüente

**Figura 13.** Freqüências genotípicas de *DQCAR*.

Nota: São mostrados apenas genótipos com freqüência igual ou superior a 2%.

5.1.2. Microsatélites da região MHC de classe III

- *D6S273*

Foram tipados 281 indivíduos para este microsatélite. Observou-se 7 alelos, com tamanhos entre 147 e 159 pb. As freqüências alélicas são mostradas na tabela 9 sendo *D6S273*155*, o alelo mais freqüente. Foram encontrados 26 genótipos diferentes e os mais comuns podem ser visualizados na figura 14. As freqüências genóticas estão segundo as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW}=0,61$). A heterozigosidade observada foi de 77,5% e a diversidade gênica de 79,1%.

Tabela 9. Freqüências alélicas do marcador *D6S273*.

Alelos de <i>D6S273</i>	Freqüências alélicas(%)
147	7,8 ± 1,1
149	5,7 ± 0,9
151	21,0 ± 1,7
153	24,5 ± 1,7
155	30,0 ± 1,9
157	3,7 ± 0,8
159	7,3 ± 1,1

■ Alelo mais freqüente

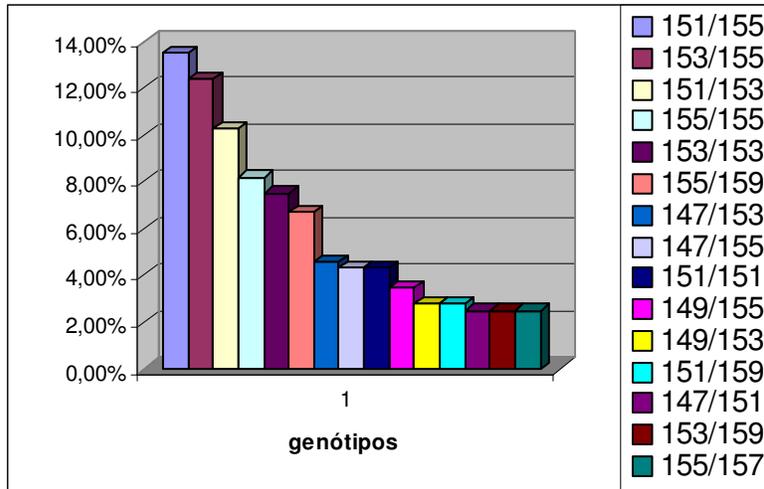


Figura 14. Frequências genotípicas de *D6S273*

Nota: São mostrados apenas os genótipos com frequência igual ou superior a 2%.

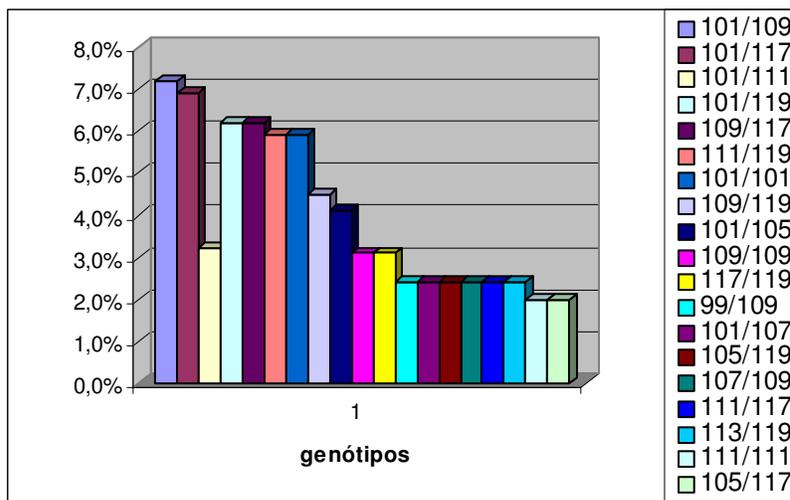
- *D6S2792*

Foram tipados 281 indivíduos para este marcador, sendo 14 alelos observados, com tamanhos entre 99 a 125 pb. As frequências alélicas estão descritas na tabela 10 e o alelo mais comum foi *D6S2792*101*. Ao total, foram encontradas 51 combinações genotípicas diferentes, sendo que as mais frequentes podem ser visualizadas na figura 15. As frequências genotípicas estão de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW}=0,21$). A heterozigiosidade observada foi de 86,4 % e a diversidade gênica de 85,4%.

Tabela 10. Frequências alélicas do marcador *D6S2792*.

Alelos de <i>D6S2792</i>	Frequências alélicas (%)
99	1,7 ± 0,5
101	25,1 ± 1,8
103	1,9 ± 0,5
105	6,2 ± 1,0
107	6,4 ± 1,0
109	16,2 ± 1,5
111	11,7 ± 1,3
113	0,7 ± 0,3
115	1,0 ± 0,4
117	13,0 ± 1,4
119	13,5 ± 1,4
121	0,4 ± 0,1
123	1,4 ± 0,5
125	0,8 ± 0,4

■ Alelo mais freqüente

**Figura 15.** Frequências genotípicas do marcador *D6S2792*

Nota: São mostrados apenas os genótipos com frequência igual ou superior a 2%.

5.1.3. Microsatélites da região MHC de classe I

- *STR-MICA*

Foram genotipados 255 indivíduos para este marcador. As frequências alélicas são apresentadas na tabela 11, sendo *STR-MICA**A5.1 o alelo mais frequente. Todas as combinações genótípicas possíveis (15) foram encontradas e as mais comuns podem ser observadas na figura 16. As frequências genótípicas estão de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW}=0,83$). Os valores da heterozigosidade observada e da diversidade gênica foram de 77,6% e 76,8%, respectivamente.

Tabela 11. Frequências alélicas do marcador *STR-MICA*.

Alelos de <i>STR-MICA</i>	Frequências alélicas (%)
A4	7,6 ± 1,1
A5	14,6 ± 1,6
A5.1	29,2 ± 2,0
A6	27,8 ± 1,9
A9	20,8 ± 1,8

■ Alelo mais frequente

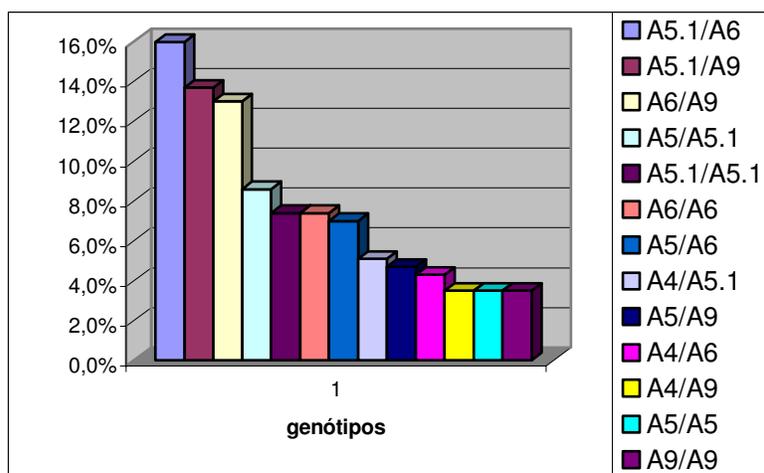


Figura 16. Frequências genótípicas de *STR-MICA*.

Nota: São mostrados apenas os genótipos com frequência igual ou superior a 2%.

- *D6S2810*

Foram genotipados 228 indivíduos para este microssatélite e 14 alelos foram encontrados com tamanhos entre 328 a 360 pb. No entanto, não foram observados os alelos *D6S2810*330/332/336*. As freqüências alélicas estão descritas na tabela 12 e o alelo mais freqüente foi *D6S2810*338*. Ao total, foram encontrados 63 genótipos diferentes, sendo os mais comuns descritos na figura 17. As freqüências genótípicas estão distribuídas de acordo com o esperado em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW} = 0,17$) e a heterozigosidade observada foi de 90,1% e a diversidade gênica de 88,2%.

Tabela 12. Freqüências alélicas do marcador *D6S2810*.

Alelos de <i>D6S2810</i>	Freqüências alélicas (%)
328	11,4 ± 1,5
334	10,6 ± 1,4
338	22,4 ± 1,9
340	2,4 ± 0,7
342	0,9 ± 0,4
344	3,7 ± 0,9
346	2,6 ± 0,7
348	4,7 ± 1,0
350	12,1 ± 1,5
352	13,4 ± 1,5
354	7,2 ± 1,2
356	4,6 ± 0,9
358	3,7 ± 0,8
360	0,3 ± 0,1

■ Alelo mais freqüente

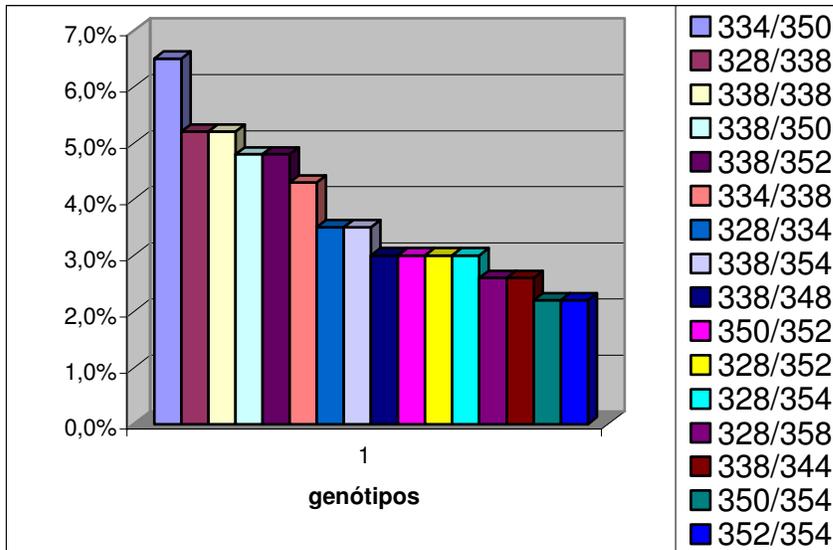


Figura 17. Frequências genotípicas de *D6S2810* (MIB).

Nota: São mostrados apenas os genótipos com frequência igual ou superior a 2%.

- *HLABC-2CA*

Foram tipados 249 indivíduos e observados 21 alelos, com tamanhos entre 95 até 135 pb. As frequências alélicas são mostradas na tabela 13, sendo *HLABC-2CA*109* o alelo mais freqüente. Foram encontradas 120 combinações genotípicas e as mais comuns podem ser visualizadas na figura 18. Ocorreu um desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW}=0,048$). A heterozigosidade observada foi de 90,8% e a diversidade gênica de 93,0%.

Tabela 13. Freqüências alélicas de *HLABC-2CA*

Alelos de <i>HLABC-2CA</i>	Freqüências alélicas (%)
95	2,5 ± 0,6
97	0,7 ± 0,3
99	0,3 ± 0,1
101	7,0 ± 1,0
103	2,2 ± 0,6
105	7,3 ± 1,1
107	2,2 ± 0,6
109	12,4 ± 1,4
111	7,0 ± 1,1
113	11,0 ± 1,3
115	2,6 ± 0,7
117	3,6 ± 0,8
119	3,4 ± 0,8
121	5,2 ± 1,0
123	9,4 ± 1,1
125	6,2 ± 1,0
127	8,2 ± 1,1
129	5,2 ± 1,0
131	1,6 ± 0,5
133	1,2 ± 0,4
135	0,8 ± 0,4

■ Alelo mais freqüente

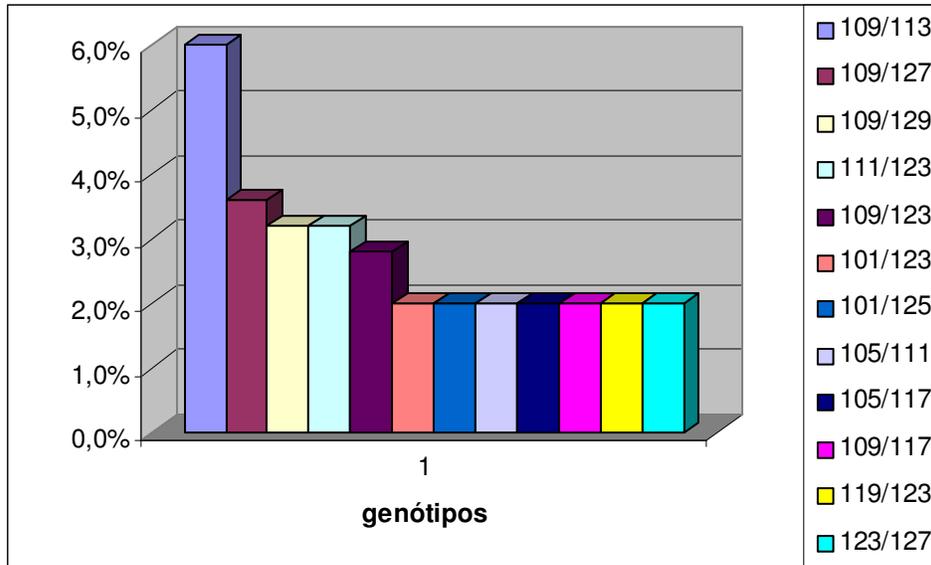


Figura 18. Frequências genotípicas de *HLABC-2CA*.

Nota: São mostrados os genótipos com frequência igual ou superior a 2%.

5.2 Frequências Haplótípicas

Primeiramente foi realizado o cálculo das frequências haplotípicas produzidas através da combinação dos microssatélites localizados nas regiões II, III e I do MHC, respectivamente. As tabelas 14 a 18 mostram apenas os haplótipos com frequência igual ou superior a 2% para cada uma das combinações.

Em um segundo momento, foram analisados os haplótipos produzidos pela combinação entre os alelos dos microssatélites estudados e os genes *HLA-B*, *DRB1* e *DQB1*. Tais haplótipos podem ser observados nas tabelas 19 a 21. Novamente, são mostrados apenas os haplótipos com frequências iguais ou superiores a 2%.

5.2.1. Microsatélites da Região de Classe II

- *D6S2874/DQCAR*

Foram encontrados 49 haplótipos diferentes, sendo que *D6S2874*191-DQCAR*103* foi a combinação mais freqüente. A soma dos haplótipos mais comuns foi de 74,0% (tabela 14).

5.2.2. Microsatélites da região MHC de classe III

- *D6273/D6S2792*

Para essa combinação de microsatélites foram encontrados 60 haplótipos diferentes sendo *D6S273*155-D6S2792*101* o mais comum. Os haplótipos mais frequentes totalizaram 74,6% (tabela 15).

Tabela 14. Freqüências Haplotípicas de *D6S2874* com *DQCAR*

Haplótipos de <i>D6S2874-DQCAR</i>	Freqüências Haplotípicas (%)
191-103	16,8 ± 2,1
191-111	5,2 ± 1,2
191-113	3,6 ± 1,0
191-117	2,3 ± 0,9
191-119	3,1 ± 1,0
191-121	7,0 ± 1,4
193-99	11,6 ± 1,6
193-103	13,0 ± 1,8
193-109	2,2 ± 0,2
193-117	4,3 ± 1,1
193-121	4,9 ± 1,2

■ Haplótipo mais frequente

Tabela 15. Freqüências Haplotípicas de *D6S273* com *D6S2792*.

Haplótipos de <i>D6S273-D6S2792</i>	Freqüências Haplotípicas (%)
147-109	2,5 ± 0,7
149-111	3,2 ± 0,8
151-101	4,9 ± 1,1
151-109	5,1 ± 1,1
151-111	5,0 ± 1,1
151-119	2,1 ± 0,8
153-101	3,7 ± 1,0
153-107	2,2 ± 0,7
153-109	6,2 ± 1,2
153-117	8,1 ± 1,3
153-119	2,1 ± 0,8
155-101	9,8 ± 1,5
155-105	3,5 ± 0,9
155-117	2,1 ± 0,7
155-119	8,0 ± 1,3
159-101	6,1 ± 1,1

5.2.3. Microsatélites da região MHC de classe I

- *STR-MICA/D6S2810*

Para a combinação entre os microsatélites *STR-MICA* e *D6S2810*, foram encontrados 44 haplótipos diferentes. O mais freqüente foi *STR-MICA*A6-D6S2810*338* e a soma dos mais comuns atingiu 79,1% (tabela 16).

- *STR-MICA/HLABC-2CA*

Para a combinação entre os microssatélites *STR-MICA* e *HLABC-2CA*, foram encontrados 76 haplótipos diferentes, sendo *STR-MICA*A5.1-HLABC-2CA*113* o mais freqüente. A soma dos mais comuns totalizou 52,1% (tabela 17).

- *D6S2810/HLABC-2CA*

Foram encontrados 109 haplótipos diferentes para essa combinação. O mais freqüente foi *D6S2810*352-HLABC-2CA*109* e a soma dos comuns atingiu 31,6% (tabela 18).

Tabela 16. Freqüências Haplotípicas de *STR-MICA* com *D6S2810* (MIB).

Haplótipos de <i>STR-MICA-D6S2810</i>	Freqüências Haplotípicas (%)
<i>A4-352</i>	3,1 ± 0,9
<i>A5-328</i>	6,7 ± 1,3
<i>A5-344</i>	3,5 ± 0,9
<i>A5-350</i>	2,0 ± 0,7
<i>A5.1-338</i>	9,7 ± 1,5
<i>A5.1-352</i>	8,2 ± 1,4
<i>A5.1-358</i>	3,4 ± 1,0
<i>A6-328</i>	3,1 ± 0,9
<i>A6-334</i>	4,5 ± 1,1
<i>A6-338</i>	10,3 ± 1,6
<i>A6-350</i>	6,9 ± 1,3
<i>A9-334</i>	3,8 ± 1,0
<i>A9-346</i>	3,1 ± 0,8
<i>A9-350</i>	2,8 ± 0,8
<i>A9-354</i>	5,5 ± 1,2
<i>A9-356</i>	2,5 ± 0,8

■ Haplótipo mais freqüente

Tabela 17. Frequências Haplotípicas de *STR-MICA* com *HLABC-2CA*.

Haplótipos de <i>STR-MICA-HLABC-2CA</i>	Frequências Haplotípicas (%)
<i>A5-111</i>	3,7 ± 0,9
<i>A5-121</i>	2,3 ± 0,7
<i>A5.1-105</i>	2,3 ± 0,7
<i>A5.1-109</i>	6,7 ± 1,2
<i>A5.1-113</i>	7,6 ± 1,2
<i>A5.1-125</i>	2,6 ± 0,8
<i>A5.1-127</i>	2,8 ± 0,8
<i>A6-101</i>	5,8 ± 1,1
<i>A6-105</i>	2,5 ± 0,8
<i>A6-127</i>	2,5 ± 0,8
<i>A9-109</i>	3,6 ± 0,8
<i>A9-123</i>	4,1 ± 1,0
<i>A9-127</i>	2,0 ± 0,7
<i>A9-129</i>	3,6 ± 0,9

■ Haplótipo mais frequente

Tabela 18. Frequências Haplotípicas de *D6S2810* e *HLABC-2CA*

Haplótipos de <i>D6S2810-HLABC-2CA</i>	Frequências Haplotípicas (%)
<i>328-123</i>	2,0 ± 0,7
<i>334-105</i>	3,0 ± 0,8
<i>338-101</i>	5,0 ± 1,1
<i>338-113</i>	7,4 ± 1,3
<i>344-111</i>	2,4 ± 0,7
<i>350-111</i>	2,0 ± 0,7
<i>350-123</i>	2,3 ± 0,7
<i>352-109</i>	7,5 ± 1,3

■ Haplótipo mais frequente

Tabela 19. Haplótipos envolvendo alelos de microssatélites e grupos alélicos do gene *HLA-B*.

<i>HLA-B</i>	MICROSSATÉLITES													
	<i>D6S2874</i>	Freq.(%)	<i>DQCAR</i>	Freq.(%)	<i>D6S273</i>	Freq.(%)	<i>D6S2792</i>	Freq.(%)	<i>STR-MICA</i>	Freq.(%)	<i>D6S2810</i>	Freq.(%)	<i>HLABC-2CA</i>	Freq.(%)
07	191	5,9	103	6,9	155	8,0	119	7,7	A5.1	7,6	338	8,7	113	7,2
07	193	4,0												
08	193	7,9	99	9,1	159	6,1	101	8,3	A5.1	7,8	352	7,2	109	7,9
13	191	2,0			149	2,1	111	2,6	A5.1	2,5	338	2,2		
14	191	2,0	103	2,5	151	3,3	101	3,3	A6	3,7	334	4,2	105	2,1
14	193	2,5												
15	191	2,5	103	4,4	151	2,6	101	3,3	A5	5,5	328	6,3		
15					155	2,3	109	2,3	A5.1	2,1				
18	193	2,1			153	2,1			A4	4,3	352	2,6		
35	191	8,7	103	3,2	153	7,2	101	2,8	A5	2,9	350	2,9	121	3,4
35	193	5,0	107	2,0	155	5,8	107	3,0	A9	10,5	354	4,6	129	3,8
35			121	3,6			109	3,0			356	2,3		
35							117	3,9						
38											334	2,4		
39			117	2,0	151	2,3	109	2,4	A9	2,7				
40	191	2,8	111	3,2	153	2,3			A5	3,4	344	2,8	111	2,4
40									A5.1	2,3				
44	191	7,2	103	2,6	151	5,5	105	3,1	A5.1	5,1	338	9,3	101	4,5
44	193	4,8	117	2,1	153	2,7	111	5,5	A6	7,8	358	3,5	105	3,4
44			121	2,6	155	4,1								
49									A6	2,3				
51	191	2,8	121	4,2	153	3,4	101	2,5	A6	8,4	350	7,4		
51	193	5,1			155	3,5								
57									A9	2,3	346	2,4		
outros		34,7		51,6		36,7		46,3		18,8		31,2		65,3

Tabela 20. Haplótipos envolvendo alelos de microssatélites e alelos do gene *HLA-DRB1*

<i>HLA-DRB1</i>	MICROSSATÉLITES													
	<i>D6S2874</i>	Freq.(%)	<i>DQCAR</i>	Freq.(%)	<i>D6S273</i>	Freq.(%)	<i>D6S2792</i>	Freq.(%)	<i>STR-MICA</i>	Freq.(%)	<i>D6S2810</i>	Freq.(%)	<i>HLABC-2CA</i>	Freq.(%)
0101	191	5,1	103	5,0	153	3,0	107	2,7	A9	5,4	354	2,8	129	2,5
0101					155	3,4								
0102	193	2,1	103	2,5	151	3,0	101	2,4	A6	2,6	334	2,9		
0301	191	2,5	99	12,6	153	2,3	101	9,5	A5.1	9,1	352	7,8	109	8,1
0301	193	10,6			155	2,1								
0301					159	6,7								
0401			111	2,1					A5.1	2,8				
0404			111	2,5										
0411	191	2,4	111	2,7	147	2,3	109	2,4	A5	3,2	344	2,7	111	2,3
0701	191	8,5	113	5,1	149	3,0	111	7,6	A5.1	2,4	334	2,1	101	3,5
0701	193	3,0	121	2,5	151	5,4			A6	8,8	338	7,9	127	2,9
0802			117	2,5	151	2,4	109	2,3	A9	2,3				
1101	193	5,1	121	4,7	153	3,8	101	2,2	A6	4,0	350	2,8		
1101					155	2,6								
1104			121	3,6	153	2,3					352	2,2		
1301	191	3,0	103	7,5	153	3,0	109	2,5	A5.1	2,5	328	2,7		
1301	193	3,3			155	3,1								
1302	193	2,5	103	3,1					A6	2,0				
1401			107	2,3					A9	2,3				
1501	191	6,3	103	8,3	155	7,5	119	7,1	A5.1	7,4	338	7,2	113	5,7
1501	193	3,3												
Outros		42,3		33,0		44,1		61,3		45,2		58,9		75,0

Tabela 21. Haplótipos envolvendo alelos de microssatélites e alelos do gene *HLA-DQB1*

<i>HLA-DQB1</i>	MICROSSATÉLITES													
	<i>D6S2874</i>	Freq.(%)	<i>DQCAR</i>	Freq.(%)	<i>D6S273</i>	Freq.(%)	<i>D6S2792</i>	Freq.(%)	<i>STR-MICA</i>	Freq.(%)	<i>D6S2810</i>	Freq.(%)	<i>HLABC-2CA</i>	Freq.(%)
0201	193	9,0	99	11,5	159	6,1	101	8,9	A5.1	7,8	352	7,1	109	2,3
0202	191	8,3	113	5,3	149	2,7	111	6,9	A5.1	2,3	338	7,4	127	2,5
0202			121	2,7	151	4,6			A6	7,5				
0301	191	8,5	117	4,3	151	3,7	101	4,5	A5	3,9	338	2,6	101	2,2
0301	193	9,0	119	3,4	153	9,0	105	2,6	A5.1	4,0	350	5,7	109	3,6
0301		6,6	121	9,5	155	4,9	109	4,6	A6	6,6	352	2,8	123	2,2
0301		3,6	123	2,1			117	4,8	A9	3,6				
0302	191	4,0	111	10,1	147	3,3	101	2,1	A5	4,3	328	2,6	111	2,1
0302	193	3,2			155	3,1	109	2,4	A5.1	2,6	344	2,5	123	2,2
0302									A9	2,7				
0402	193	3,0	117	3,5	151	3,1	109	2,9	A9	4,2				
0501	191	7,5	103	9,5	151	2,6	101	4,2	A5.1	2,0	334	2,8		
0501	193	3,8			153	3,1	107	2,9	A6	3,0	354	3,1		
0501					155	4,5			A9	5,8				
0503			107	2,5					A9	2,4				
0602	191	6,0	103	9,0	155	6,8	119	6,5	A5.1	6,6	338	6,3	113	4,1
0602	193	2,6												
0603	191	2,7	103	8,3	153	2,9	109	2,3	A5	2,7	328	2,3		
0603	193	2,6			155	2,8			A5.1	2,7				
outros		19,6		18,3		36,8		44,4		25,3		54,8		78,8

5.3. Comparação entre populações

Sempre que possível, os resultados obtidos, referentes às frequências alélicas, foram comparados com os de outros estudos populacionais.

- *D6S2874*

Os resultados foram comparados com dados de uma população indígena e com uma população caucasóide (euro-brasileira), também proveniente do sul do Brasil. O valor de p foi significativo apenas na comparação com a população de origem indígena (tabela 22).

Tabela 22. Frequências alélicas e valores de p para a comparação entre populações de *D6S2874*

Alelos	Populações		
	A (n=289)	GND ¹ (n=84)	BRA ² (n=117)
191	44,0	16,1	44,4
193	43,2	38,7	41,0
201	2,5	45,2	1,3
203	4,2	0,0	6,8
205	1,4	0,0	2,5
207	4,7	0,0	4,0
p		<10 ⁻⁶	0,31

GND: Guarani Nãndeva; BRA: população euro-brasileira; A: população deste estudo; n: número de indivíduos; ¹OLIVEIRA, 2007; ²BELTRAME, 2005.

- Alelo mais frequente em cada população.
- Diferença significativa.

- *DQCAR*

Os resultados referentes às frequências alélicas deste marcador foram comparados com dados das seguintes populações: croata; e de populações norte

americanas de diferentes origens (européia, africana, mexicana e asiática) (tabela 23). Os valores de p foram sempre significativos, com exceção da comparação com a população norte americana caucasóide, de origem européia.

Tabela 23. Freqüências alélicas e valores de p para a comparação entre populações de *DQCAR*.

Alelos	Populações					
	A (n=245)	Croatas ¹ (n=148)	Caucasianos ² (n=80)	Africanos ² (n=70)	Mexicanos ² (n=56)	Asiáticos ² (n=54)
99	13,5	9,9	12,5	12,9	5,4	9,3
103	30,6	41,4	38,8	47,1	21,4	22,2
105	0,8	0,3	1,2	1,4	0,0	0,0
107	4,0	11,0	3,8	1,4	7,1	24,1
109	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
111	11,0	10,9	11,2	5,7	23,2	9,3
113	8,0	3,0	8,8	8,6	1,8	16,6
115	1,4	0,0	1,2	1,4	5,4	9,3
117	8,4	5,5	5,0	17,2	8,9	5,5
119	5,7	5,1	2,5	2,9	5,4	0,0
121	13,6	12,6	13,8	1,4	19,6	3,7
123	2,7	0,0	1,2	0,0	1,8	0,0
p		<10⁻⁶	0,69	<10⁻⁶	<10⁻⁴	<10⁻⁶

A: população deste estudo; n:número de indivíduos; ¹GRUBIC *et al.*, 2000; ²MACAUBAS *et al.*, 1995.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Diferença significativa.

- *D6S273*

Os resultados foram comparados com dados de uma população indígena e novamente com a população euro-brasileira (tabela 24). O valor de p foi

estatisticamente significativo para a comparação com a população de origem indígena.

Tabela 24. Freqüências alélicas e valores de p para a comparação entre populações de *D6S273*.

Alelos	Populações		
	A (n=281)	GND ¹ (n=84)	BRA ² (n=117)
147	7,8	33,3	7,6
149	5,7	0,6	6,8
151	21,0	22,0	19,1
153	24,5	33,3	32,6
155	30,0	9,5	24,6
157	3,7	0,0	3,0
159	7,3	1,3	6,3
p		<10⁻⁶	0,34

GND: Guarani Nandeva; BRA: população euro-brasileira; A -população deste estudo; n: número de indivíduos; ¹ OLIVEIRA, 2007; ² BELTRAME, 2005.

- Alelo mais freqüente em cada população.
- Diferença significativa.

- *D6S2792*

As freqüências alélicas deste marcador foram comparadas aos dados referentes às populações croata (GRUBIC *et al.*, 2006) e coreana (KIM *et al.*, 2000). O alelo *D6S2792*97*, presente nestes dois estudos utilizados para comparação, aqui não foi observado. Sugere-se então que ocorreu uma variação na determinação dos tamanhos dos alelos, provavelmente devido aos diferentes métodos de tipagem. Desta forma para a comparação, foram considerados como correspondentes os alelos *D6S2792*97* (presente nas populações croata e coreana) e *D6S2792*99*, observado neste estudo. Existe, portanto, uma variação de dois pares de bases entre os alelos (tabela 25). Os valores de p foram estatisticamente significativos para as duas comparações.

Tabela 25. Freqüências alélicas e valores de p para a comparação entre populações de *D6S2792*.

Alelos	Populações		
	A n= 281	Croata ¹ n=152	Coreana ² n=133
99 (97)	1,7	0,9	3,8
101 (99)	25,1	16,11	19,2
103 (101)	1,9	1,9	0,4
105 (103)	6,2	5,9	1,1
107 (105)	6,4	7,8	1,9
109 (107)	16,2	12,8	33,8
111 (109)	11,7	9,8	8,6
113 (111)	0,7	0,0	0,4
115 (113)	1,0	3,6	2,6
117 (115)	13,0	22,3	11,7
119 (117)	13,5	11,5	10,9
121 (119)	0,4	0,0	0,8
123 (121)	1,4	6,5	4,1
125 (123)	0,8	0,3	0,4
127 (125)	0,0	0,0	0,4
p		<10⁻⁶	<10⁻⁶

A: população deste estudo, n: número de indivíduos; ¹ GRUBIC *et al.*, 2006; ² KIM *et al.*, 2000.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Diferença significativa.

Nota: Em () os tamanhos de alelos em pb, reportados pelos estudos utilizados para a comparação.

- *STR-MICA*

As freqüências alélicas deste microssatélite foram comparadas com os dados de diversas populações (tabela 26). Todos os valores de p para as comparações foram estatisticamente significativos, com exceção novamente da comparação com população euro-brasileira.

Tabela 26. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de *STR-MICA*.

Alelos	População					
	A (n=245)	BRA ¹ (n=117)	Italianos ² (n=101)	Croatas ³ (n=176)	KIV ⁴ (n=130)	Chineses ⁵ (n=106)
A4	7,6	11,0	14,0	17,3	0,8	13,2
A5	14,6	11,7	13,6	10,2	34,5	28,8
A5.1	29,2	27,0	31,6	27,5	0,0	26,4
A6	27,8	28,0	27,2	26,0	2,4	14,6
A9	20,8	22,3	13,6	19,0	40,1	17,0
A10	0,0	0,0	0,0	0,0	22,2	0,0
p		0,48	0,03	10⁻⁶	10⁻⁶	0,01

A: população deste estudo; BRA: população euro-brasileira; KIV: Kaingang de Ivaí; n:número de indivíduos; ¹BELTRAME, 2005; ²BOLOGNESI *et al.*, 2001; ³GRUBIC *et al.*, 2006; ⁴OLIVEIRA, 2007; ⁵FENG *et al.*, 2004.

- Alelo mais freqüente em cada população.
- Diferença significativa

- *D6S2810(MIB)*

As frequências alélicas obtidas nesse estudo foram comparadas com GRIMALDI *et al.* (1996) (tabela 27). Novamente percebeu-se uma falta de correspondência entre o tamanho dos alelos, a qual provavelmente ocorreu devido às diferentes técnicas de tipagem adotadas, como já previamente mencionado para o marcador *D6S2792*. Assim, é provável que o alelo *D6S2810*326* do trabalho de GRIMALDI *et al.* (1996) seja o alelo *D6S2810*328* deste estudo, assim como o alelo *D6S2810*332* seja o mesmo alelo aqui observado como *D6S2810*334*, existindo uma variação de dois pares de base entre as duas análises. A dúvida, porém, persistiu em relação ao alelo *D6S2810*338*, que deveria corresponder ao alelo *D6S2810*336* de GRIMALDI *et al.* (1996). Entretanto, tal alelo não foi observado em ambos os estudos. Considerando que *D6S2810*338* é o mais freqüente para este estudo e que *D6S2810*334* é o alelo

mais freqüente em GRIMALDI *et al.* (1996), inferiu-se a existência de uma possível correspondência entre estes dois alelos. O valor de p para a comparação foi estatisticamente significativo.

Tabela 27. Freqüências alélicas e valor de p para comparação entre populações de *D6S2810*.

Alelos	Populações	
	A n=228	Bascos Franceses ¹ n=74
<i>D6S2810*328(326)</i>	11,4	19,5
<i>D6S2810*334(332)</i>	10,6	4,7
<i>D6S2810*338(334)</i>	22,4	30,4
<i>D6S2810*340(338)</i>	2,4	6,9
<i>D6S2810*342(340)</i>	0,9	2,0
<i>D6S2810*344(342)</i>	3,7	8,8
<i>D6S2810*346(344)</i>	2,6	0,0
<i>D6S2810*348(346)</i>	4,7	1,3
<i>D6S2810*350(348)</i>	12,1	6,0
<i>D6S2810*352(350)</i>	13,4	11,4
<i>D6S2810*354(352)</i>	7,2	2,7
<i>D6S2810*356(354)</i>	4,6	3,3
<i>D6S2810*358(356)</i>	3,7	3,0
<i>D6S2810*360(358)</i>	0,3	0,0
p		<10⁻⁵

A: população deste estudo, n: número de indivíduos; ¹GRIMALDI *et al.*, 2005.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Diferença significativa.

Nota: Em () os tamanhos de alelos em pb, reportados pelo estudo utilizados para a comparação.

- *HLABC-2CA*

As freqüências alélicas do marcador *HLABC-2CA* foram comparadas aos dados de uma população indígena e da população euro-brasileira (tabela 28). Apenas a comparação com o grupo indígena foi estatisticamente significativa.

Tabela 28. Frequências alélicas e valores de p para comparação entre populações de *HLABC-2CA*.

Alelos	Populações		
	A (n=289)	GND ¹ (n=84)	BRA ² (n=117)
91	0,0	18,1	0,4
95	2,5	0,0	3,8
97	0,7	0,0	0,4
99	0,3	0,0	0,0
101	7,0	1,2	3,8
103	2,2	1,2	1,7
105	7,3	0,6	6,3
107	2,2	1,8	1,4
109	12,4	13,9	11,2
111	7,0	15,1	5,9
113	11,0	7,2	13,0
115	2,6	0,6	5,6
117	3,6	12,7	3,5
119	3,4	0,0	2,1
121	5,2	9,0	7,0
123	9,4	10,2	9,4
125	6,2	4,2	6,6
127	8,2	0,6	8,8
129	5,2	3,6	3,1
131	1,6	0,0	2,4
133	1,2	0,0	1,7
135	0,8	0,0	0,7
137	0,0	0,0	0,4
141	0,0	0,0	0,4
151	0,0	0,0	0,4
p		<10⁻⁶	0,76

GND: Guarani Nandeva; BRA: população euro-brasileira; A: população deste estudo; n: número de indivíduos;

¹ OLIVEIRA, 2007; ² BELTRAME, 2005

■ Alelo mais freqüente em cada população

■ Diferença significativa.

5.4 Microssatélites e Desequilíbrio de ligação com genes *HLA*

O desequilíbrio de ligação foi calculado com base nos resultados das tipagens dos microssatélites deste estudo e dos genes *HLA* (*HLA-B*, *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*), já previamente tipados (ver item 4.3).

As figuras 20 a 37 ilustram os valores obtidos para o cálculo do desequilíbrio de ligação e foram baseadas no trabalho de SANTOS (2005). Para significado das cores, olhar a figura 19. São descritas apenas as associações com valores de p estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$). Em relação às associações haplotípicas em acoplamento (com valores de D' positivos), foram mostradas apenas aquelas que apresentaram frequências iguais ou acima de 2% na população deste estudo (tabelas 19 a 21).

O microssatélite *HLABC-2CA* foi excluído da análise de desequilíbrio de ligação porque o valor de p , para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, ficou abaixo do limiar de 0,05.

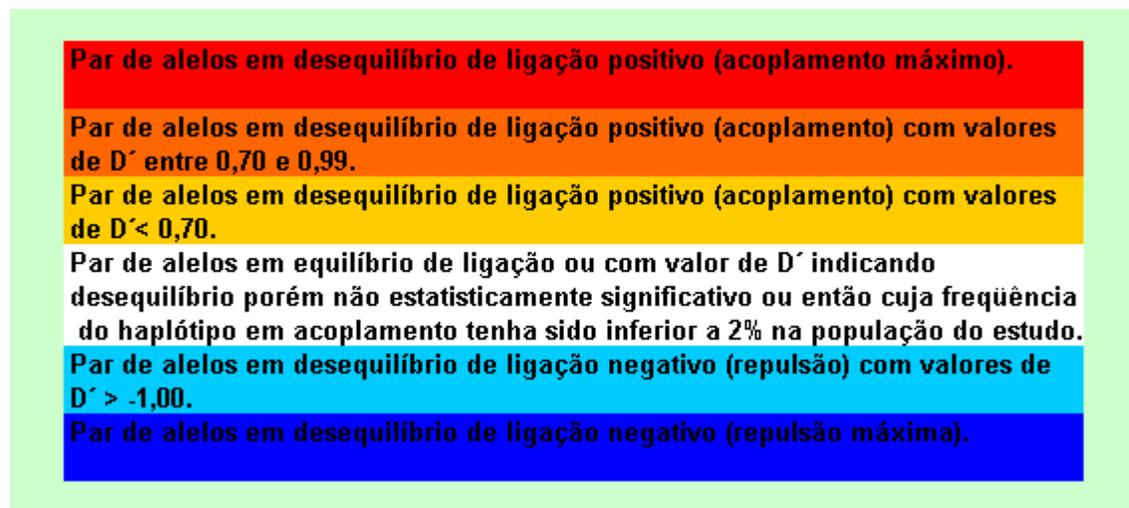


Figura 19. Referência das cores para figuras 20 a 37.

- *D6S2874*

Este microssatélite apresentou fraco desequilíbrio de ligação com os genes *HLA-B*, *-DRB1* e *-DQB1*, observado através de poucos pares de alelos em desequilíbrio com valores de p significativos (figuras 20 a 22). Não foi observada nenhuma associação haplotípica em acoplamento máximo ($D' = 1,00$) e os valores mais altos valores de D' ocorreram entre: *D6S2874*191-HLA-B13* ($D' = 0,86$); *D6S2874*193-HLA-B08* ($D' = 0,79$); *D6S2874*191-HLA-DRB1*0101* ($D' = 0,53$); *D6S2874*193-HLADRB1*0301* ($D' = 0,64$); *D6S2874*193-HLADRB1*1101* ($D' = 0,74$); *D6S2874*193-HLA-DQB1*0201* ($D' = 0,68$); *D6S2874*191-HLA-DQB1*0202* ($D' = 0,67$). Foram observadas associações em repulsão máxima ($D' = -1,00$), entre as quais pode-se citar: *D6S2874*203-HLA-B35*; *D6S2874*207-HLA-B44*; *D6S2874*193-HLA-DRB1*1503*; *D6S2874*203-HLA-DQB1*0301*.

	07	08	13	14	15	18	27	35	37	38	39	40	41	42	44	45	48	49	50	51	52	53	55	56	57	58
191	Yellow	Cyan	Orange					Yellow							Yellow					Cyan			Dark Blue			
193		Orange	Cyan				Dark Blue					Cyan														
201																										
203								Dark Blue																		
205																										
207															Dark Blue											

Figura 20. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2874* e *HLA-B*.

	0101	0102	0301	0401	0402	0403	0405	0407	0408	0411	0701	0801	0802	1001	1101	1102	1104	1301	1302	1303	1401	1402	1501	1502	1503	1601	1602	
191	Yellow		Cyan							Yellow	Yellow	Cyan			Cyan					Cyan				Yellow				Dark Blue
193	Cyan		Yellow						Dark Blue	Cyan	Cyan				Orange											Dark Blue		Dark Blue
201																												
203																												
205																												
207																												

Figura 21. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2874* e *HLA-DRB1*.

	0201	0202	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0503	0601	0602	0603	0604	0609
191														
193														
201														
203														
205														
207														

Figura 22. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2874* e *HLA-DQB1*.

- *DQCAR*

Este marcador apresentou mais forte desequilíbrio de ligação com os genes *HLA-DRB1* e *-DQB1*, em comparação ao observado para o *locus HLA-B* (figuras 23 a 25). Foram observadas três associações em acoplamento máximo ($D' = 1,00$): *DQCAR*103-HLA-DRB1*1301*; *DQCAR*111-HLA-DRB1*0411*; e *DQCAR*103-HLA-DQB1*0603*. Outras associações haplotípicas em acoplamento, com altos valores de D' ocorreram entre: *DQCAR*99-HLA-B08* ($D' = 0,97$); *DQCAR*99-HLA-DRB1*0301* ($D' = 0,96$); *DQCAR*103-HLA-DRB1*0102* ($D' = 0,88$); *DQCAR*103-HLA-DRB1*1302* ($D' = 0,9$); *DQCAR*107-HLA-DRB1*1401* ($D' = 0,91$); *DQCAR*121-HLA-DRB1*1104* ($D' = 0,87$); *DQCAR*99-HLA-DQB1*0201* ($D' = 0,98$); *DQCAR*103-HLA-DQB1*0501* ($D' = 0,84$); *DQCAR*103-HLA-DQB1*0602* ($D' = 0,90$); *DQCAR*107-HLA-DQB1*0503* ($D' = 0,91$); e *DQCAR*111-HLA-DQB1*0302* ($D' = 0,98$); Além disso, foram observados muitos pares de alelos em repulsão máxima ($D' = -1,00$), entre os quais pode-se citar: *DQCAR*99-HLA-B15/B44*; *DQCAR*103/111/113-HLA-B08*; *DQCAR*113-HLA-DRB1*0301*; *DQCAR*121-HLA-DRB1*0101*; *DQCAR*99-HLA-DQB1*0202/0302*; *DQCAR*103-HLA-DQB1*0201/0301/0302*.

	07	08	13	14	15	18	27	35	37	38	39	40	41	42	44	45	48	49	50	51	52	53	55	56	57	58
99																										
103																										
105																										
107																										
109																										
111																										
113																										
115																										
117																										
119																										
121																										
123																										

Figura 23. Desequilíbrio de ligação entre *DQCAR* e *HLA-B*.

	0101	0102	0301	0401	0402	0403	0405	0407	0408	0411	0701	0801	0802	1001	1101	1102	1104	1301	1302	1303	1401	1402	1501	1502	1503	1601	1602
99																											
103																											
105																											
107																											
109																											
111																											
113																											
115																											
117																											
119																											
121																											
123																											

Figura 24. Desequilíbrio de ligação entre *DQCAR* e *HLA-DRB1*.

	0201	0202	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0503	0601	0602	0603	0604	0609
99														
103														
105														
107														
109														
111														
113														
115														
117														
119														
121														
123														

Figura 25. Desequilíbrio de ligação entre *DQCAR* e *HLA-DQB1*.

- *D6S273*

Este marcador está em desequilíbrio de ligação mais pronunciado com o *locus HLA-B* (figura 26) e mais fraco com os alelos dos *loci* HLA de classe II (figuras 27 e 28). Não ocorreram associações haplotípicas em acoplamento máximo e os valores mais altos de D' foram observados entre: *D6S273*149-HLA-B13* ($D'=0,91$); *D6S273*151-HLA-B14* ($D'=0,73$); *D6S273*151-HLA-B39* ($D'=0,76$); *D6S273*159-HLA-B08* ($D'=0,83$); *D6S273*151-HLA-DRB1*0102* ($D'=0,85$); *D6S273*159-HLA-DRB1*0301* ($D'=0,85$); *D6S273*159-HLA-DQB1*0201* ($D'=0,85$).

Entre as associações em repulsão máxima, estão: *D6S273*147-HLA-B07*; *D6S273*151-HLA-B07/B08/B18*; *D6S273*153-HLA-B13*; *D6S273*147-HLA-DRB1*1501*; *D6S273*151-HLA-DRB1*0101*; *D6S273*159-HLA-DRB1*0701*; *D6S273*147-HLA-DQB1*0602*; *D6S273*151-HLA-DQB1*0201*.

	07	08	13	14	15	18	27	35	37	38	39	40	41	42	44	45	48	49	50	51	52	53	55	56	57	58
147	Dark Blue														Dark Blue					Dark Blue						
149			Orange												Dark Blue											
151	Dark Blue	Dark Blue		Orange	Yellow	Dark Blue		Cyan			Orange	Cyan			Yellow											
153	Cyan	Cyan	Dark Blue	Cyan		Yellow		Yellow																	Dark Blue	
155	Yellow	Cyan		Cyan		Cyan				Dark Blue	Dark Blue								Dark Blue							
157								Dark Blue																		
159		Orange						Dark Blue							Dark Blue											

Figura 26. Desequilíbrio de ligação entre *D6S273* e *HLA-B*.

	0101	0102	0301	0401	0402	0403	0405	0407	0408	0411	0701	0801	0802	1001	1101	1102	1104	1301	1302	1303	1401	1402	1501	1503	1601	1602	
147										Yellow					Dark Blue									Dark Blue			
149											Yellow																
151	Dark Blue	Orange	Cyan	Dark Blue							Yellow		Yellow					Dark Blue						Cyan			
153	Yellow	Dark Blue									Cyan				Yellow		Yellow	Dark Blue						Cyan			
155	Yellow	Cyan	Cyan							Dark Blue	Cyan	Dark Blue					Yellow	Dark Blue						Yellow			
157											Dark Blue				Dark Blue												
159			Orange								Dark Blue				Dark Blue												

Figura 27. Desequilíbrio de ligação entre *D6S273* e *HLA-DRB1*.

	0201	0202	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0503	0601	0602	0603	0604	0609
147			Cyan	Yellow							Dark Blue			
149		Yellow					Dark Blue							
151	Dark Blue	Yellow				Yellow						Dark Blue		
153		Cyan	Yellow	Cyan								Yellow		
155	Cyan	Cyan				Cyan					Yellow			Dark Blue
157			Dark Blue											
159	Orange	Dark Blue	Dark Blue											

Figura 28. Desequilíbrio de ligação entre *D6S273* e *HLA-DQB1*.

- *D6S2792*

Assim como o marcador descrito anteriormente, *D6S2792* apresentou desequilíbrio de ligação mais pronunciado com o gene *HLA-B* (figura 29) e mais fraco desequilíbrio com *HLA-DRB1* e *DBQ1* (figuras 30 e 31). Novamente não foram encontradas associações em acoplamento máximo e os valores mais altos de D' foram observados entre: *D6S2792*101-HLA-B08* ($D'=0,94$); *D6S2792*101-HLA-B14* ($D'=0,87$); *D6S2792*109-HLA-B39* ($D'=0,77$); *D6S2792*111-HLA-B13* ($D'=0,92$); *D6S2792*119-HLA-B07* ($D'=0,80$); *D6S2792*101-HLA-DRB1*0102* ($D'=0,71$); *D6S2792*109-HLA-DRB1*0411* ($D'=0,75$); *D6S2792*101-HLA-DQB1*0201* ($D'=0,70$).

Entre as associações em repulsão máxima, encontram-se: *D6S2792*109-HLA-B14*; *D6S2792*111-HLA-B08/B35*; *D6S2792*117-HLA-B08*; *D6S2792*119-HLA-B08/B15*; *D6S2792*109-HLA-DRB1*1501*; *D6S2792*111-HLA-DRB1*0301*; *D6S2792*109-HLA-DQB1*0602*; *D6S2792*117-HLA-DQB1*0201*; *D6S2792*119-HLA-DQB1*0201*.

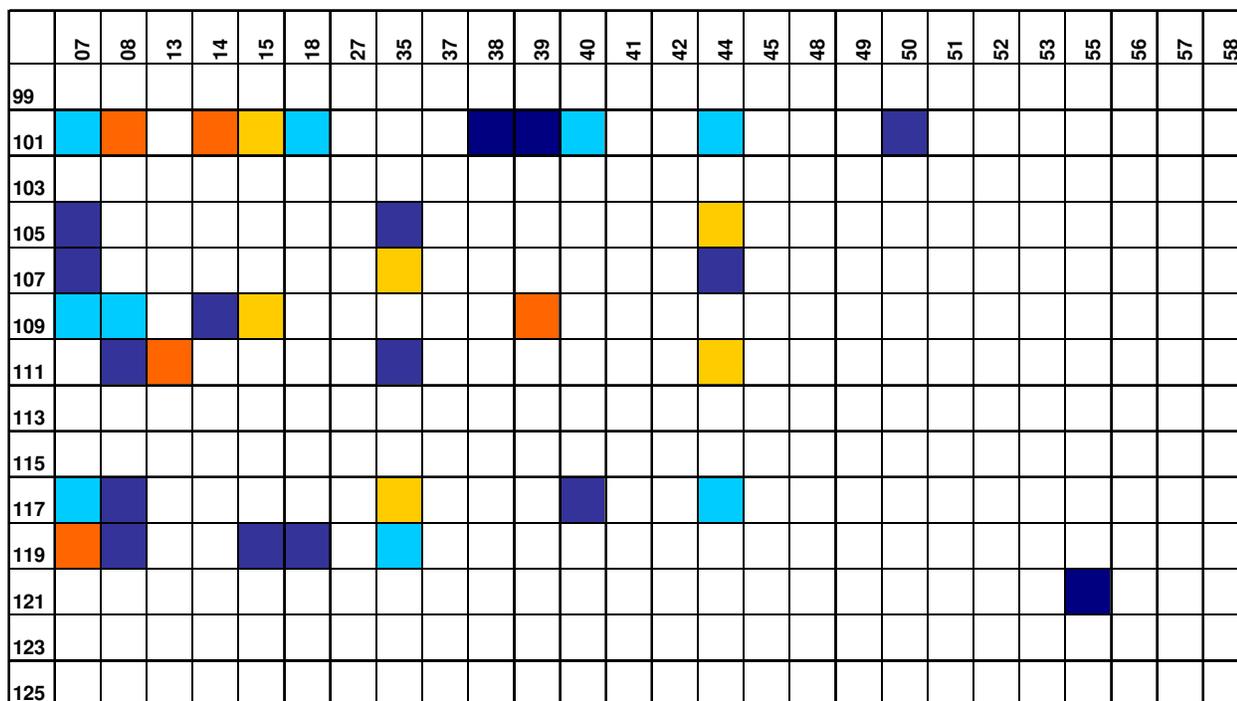


Figura 29. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2792* e *HLA-B*.

	0101	0102	0301	0401	0402	0403	0405	0407	0408	0411	0701	0801	0802	1001	1101	1102	1104	1301	1302	1303	1401	1402	1501	1502	1503	1601	1602	
99																												
101		Orange	Yellow							Dark Blue	Cyan		Dark Blue						Cyan					Cyan				
103																												
105			Dark Blue																									
107	Yellow		Dark Blue																									
109			Cyan							Orange	Cyan		Yellow						Yellow					Dark Blue				
111			Dark Blue								Yellow																	
113																												
115																												
117			Cyan																									
119			Cyan																					Yellow				
121																												
123																												
125																												

Figura 30. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2792* e *HLA-DRB1*.

	0201	0202	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0503	0601	0602	0603	0604	0304	0609
99															
101	Orange	Cyan				Cyan	Yellow					Cyan			
103															
105			Yellow												
107	Dark Blue						Yellow								
109	Cyan	Cyan	Yellow	Yellow		Yellow	Cyan			Dark Blue	Yellow				
111	Dark Blue	Yellow	Cyan				Cyan								
113															
115															
117	Dark Blue		Yellow									Dark Blue			
119	Dark Blue		Cyan												
121															
123															
125															

Figura 31. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2792* e *HLA-DQB1*.

- *STR-MICA*

Para este microssatélite, as freqüências haplotípicas evidenciam um forte desequilíbrio com *HLA-B* (figura 32), em relação ao observado para *HLA-DRB1* e *-DQB1* (figuras 33 e 34). Estão em acoplamento máximo: *STR-MICA*A5.1-HLA-B13*; *STR-MICA*A6-HLA-B49* e *STR-MICA*A9-HLA-B39/B57*. Outras associações haplotípicas em acoplamento com altos valores de D' ocorreram entre: *STR-MICA*A5.1-HLA-B07* ($D' = 0,81$); *STR-MICA*A5.1-HLA-B08* ($D' = 0,90$); *STR-MICA*A6-HLA-B14* ($D' = 0,87$); *STR-MICA*A6-HLA-B51* ($D' = 0,76$); *STR-MICA*A5-HLA-DRB1*0411* ($D' = 0,85$); *STR-MICA*A6-HLA-DRB1*0102* ($D' = 0,79$); *STR-MICA*A9-HLA-DRB1*1401* ($D' = 0,79$); *STR-MICA*A9-HLA-DQB1*0503* ($D' = 0,8$).

Foram observados muitos pares de alelos em repulsão máxima, entre os quais, pode-se citar: *STR-MICA*A5.1-HLA-B14/B18*; *STR-MICA*A6-HLA-B08/B13/B15*; *STR-MICA*A9-HLA-DRB1*0301/1501*; *STR-MICA*A5.1-HLA-DQB1*0303*; *STR-MICA*A9-HLA-DQB1*0201/0602*.

	07	08	13	14	15	18	27	35	37	38	39	40	41	42	44	45	48	49	50	51	52	53	55	56	57	58
A4																										
A5																										
A5.1																										
A6																										
A9																										

Figura 32. Desequilíbrio de ligação entre *STR-MICA* e *HLA-B*.

	0101	0102	0301	0401	0402	0403	0405	0407	0408	0411	0701	0801	0802	1001	1101	1102	1104	1301	1302	1303	1401	1402	1501	1502	1503	1601	1602
A4																											
A5																											
A5.1																											
A6																											
A9																											

Figura 33. Desequilíbrio de ligação entre *STR-MICA* e *HLA-DRB1*.

	0201	0202	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0503	0601	0602	0603	0604	0609
A4														
A5														
A5.1														
A6														
A9														

Figura 34. Desequilíbrio de ligação entre *STR-MICA* e *HLA-DQB1*.

- *D6S2810*

Este marcador também apresentou mais forte desequilíbrio com *HLA-B* (figura 35) do que com *HLA-DRB1* e *-DQB1* (figuras 36 e 37). Estão em acoplamento máximo: *D6S2810*334-HLA-B14*; *D6S2810*334-HLA-B38*; e *D6S2810*334-HLA-DRB1*0102*. Outras associações haplotípicas em acoplamento e com altos valores de D' foram observadas entre: *D6S2810*328-HLA-B15* ($D'=0,75$); *D6S2810*338-HLA-B07* ($D'=0,78$); *D6S2810*338-HLA-B13* ($D'=0,78$); *D6S2810*344-HLA-B40* ($D'=0,76$); *D6S2810*346-HLA-B57* ($D'=0,91$); *D6S2810*350-HLA-B51* ($D'=0,80$); *D6S2810*358-HLA-B44* ($D'=0,93$); *D6S2810*344-HLA-DRB1*0411* ($D'=0,72$).

Algumas das associações em repulsão máxima foram observadas entre: *D6S2810*338-HLA-B08/B15/B51*; *D6S2810*350-HLA-B07/B15/B44*; *D6S2810*352-HLA-B07/15/44*; *D6S2810*328-HLA-DRB1*0101/1101/1501*; *D6S2810*338-HLA-DQB1*0201*; *D6S2810*350-HLA-DQB1*0302/0602*.

	07	08	13	14	15	18	27	35	37	38	39	40	41	42	44	45	48	49	50	51	52	53	55	56	57	58
328		Blue			Orange			Blue							Blue											
334	Cyan	Blue		Red				Cyan		Red					Blue						Blue					
338	Orange	Blue	Orange	Blue	Blue			Cyan				Blue			Yellow						Blue					
340																										
342																										
344												Orange														
346																									Orange	
348																										
350	Blue				Blue			Yellow							Blue						Orange					
352	Blue	Orange			Blue	Yellow									Blue											
354	Blue							Yellow							Blue											
356								Yellow																		
358															Orange											
360																										

Figura 35. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2810* e *HLA-B*.

	0101	0102	0301	0401	0402	0403	0405	0407	0408	0411	0701	0801	0802	1001	1101	1102	1104	1301	1302	1303	1401	1402	1501	1502	1503	1601	1602	
328	Blue														Blue			Yellow					Blue					
334		Red	Blue																									
338	Cyan		Cyan								Yellow						Blue	Blue					Yellow					
340																												
342																												
344									Orange																			
346																												
348																												
350											Cyan				Yellow								Blue					
352			Yellow								Cyan				Blue		Yellow											
354	Yellow		Blue																									
356																												
358																												
360																												

Figura 36. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2810* e *HLA-DRB1*.

	0201	0202	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0503	0601	0602	0603	0604	0609
328														
334														
338														
340														
342														
344														
346														
348														
350														
352														
354														
356														
358														
360														

Figura 37. Desequilíbrio de ligação entre *D6S2810* e *HLA-DQB1*.

5.4.1. Análise do desequilíbrio de ligação com o haplótipo estendido dos genes *HLA* de classe II (*HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*)

O desequilíbrio de ligação foi também calculado entre os alelos dos microssatélites estudados e o haplótipo estendido formado pelos genes *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*. A tabela 29 mostra a quais alelos de microssatélites estão associados os haplótipos mais comuns na população caucasóide da região sul do Brasil, baseados em PROBST (2000). São mostrados apenas valores de desequilíbrio de ligação positivos com $D' \geq 0,50$, $p \leq 0,05$ e cuja frequência tenha sido igual ou superior a 2% na população deste estudo.

Tabela 29. Desequilíbrio de ligação para haplótipos estendido *HLA-DRB1/DQB1*

Haplótipos <i>HLA-DRB1/-DQB1</i>	<i>D6S2874</i>	D´	Freq. (%)	<i>DQCAR</i>	D´	Freq. (%)	<i>D6S273</i>	D´	Freq. (%)	<i>D6S2792</i>	D´	Freq. (%)	<i>STR-MICA</i>	D´	Freq. (%)	<i>D6S2810</i>	D´	Freq. (%)
0101-0501	191	0,54	5,3	103	0,75	5,3							A9	0,73	5,2			
0102-0501							151	0,85	2,9	101	0,73	2,4	A6	0,80	2,7	334	0,90	2,8
0301-0201							159	0,89	5,5				A5.1	0,61	7,5	344	0,71	
0411-0302	191	0,58	2,0	111	0,90	2,0				109	0,72	2,1	A5	0,89	2,2	344	1,00	2,4
0701-0202	191	0,69	7,9	105	0,63	7,9				111	0,54	6,4	A6	0,55	2,4			
0701-0202				113	0,55	4,5												
0802-0402										109	0,56	2,4	A9	0,67	2,7			
1104-0301							153	0,63	2,6									
1301-0603				103	1,00	2,5												
1401-0503													A9	0,80	2,5			
1501-0602				103	1,00	6,0	155	0,65	7,3	119	0,68	6,3	A5.1	1,00	7,0	338	0,67	7,0

6. DISCUSSÃO

6.1 Freqüências alélicas e genotípicas

A análise das freqüências alélicas e genotípicas permite inferir sobre o grau de polimorfismo dos microssatélites. Os marcadores mais polimórficos foram os que apresentaram um maior número de alelos e de genótipos, sendo que nenhum deles com uma freqüência elevada. Além disso, tais marcadores apresentaram altos valores para a heterozigosidade observada e diversidade gênica.

O marcador mais polimórfico foi *HLABC-2CA*, localizado na região MHC de classe I. Apresentou o maior número de alelos (21) e também de genótipos (120), sendo que a combinação genotípica mais comum (*HLABC-2CA*109/113*) teve freqüência inferior a 5%. A heterozigosidade observada e a diversidade gênica atingiram os índices mais altos, entre os marcadores estudados (90,8% e 93,0%, respectivamente). É importante também ressaltar que este foi o único *locus* em que as freqüências genotípicas não estiveram de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Uma possibilidade para explicar tal desvio é a de que, por apresentar um grande número de alelos (21), talvez o número amostral (249 indivíduos tipados) ainda tenha sido pequeno para que este *locus* atingisse o equilíbrio neste estudo. Sendo assim, seria necessário aumentar o número amostral para calcular com maior precisão a distribuição das freqüências genotípicas.

Ainda na região de classe I, nas proximidades do *locus HLA-B*, o marcador *D6S2810 (MIB)* apresentou grande número de alelos (14) e também de genótipos (63), tendo a combinação genotípica mais comum (*D6S2810*334/350*) freqüência inferior a 7%. Os valores para heterozigosidade observada e diversidade gênica foram também altos (90,1% e 88,2%, respectivamente). Na região MHC de classe II, o microssatélite *DQCAR*, próximo ao gene *HLA-DQB1*, também apresentou um número relativamente grande de alelos (12) e de genótipos (46) assim como altos valores de heterozigosidade observada e diversidade gênica (86,1% e 84%,

respectivamente). Desta forma, sugere-se que estes marcadores também apresentem alto grau de polimorfismo.

O microssatélite com menor grau de polimorfismo foi *D6S2874*. Para este marcador observou-se um baixo número de alelos (6), dentre os quais dois com freqüências relativamente altas (*D6S2874*191* e *D6S2874*193*, com 44% e 43,2%, respectivamente); e um baixo número de combinações genotípicas (apenas 13), sendo a mais comum (*D6S2874*191/193*) com freqüência próxima a 40%. Os valores de heterozigosidade observada e diversidade gênica foram também mais baixos em relação aos encontrados para os demais marcadores deste estudo (62,0% para as duas medidas).

OLIVEIRA (2007) reportou que microssatélites da região de classe I são mais polimórficos. Tais microssatélites podem estar em regiões sob a ação de seleção natural balanceadora, a qual gera um aumento de diversidade para os *loci* localizados nas proximidades (SLATKIN, 1995).

MALKKI *et al.*, 2005, reportou que marcadores localizados próximos a genes *HLA* clássicos possuem maior grau de polimorfismo, especialmente aqueles nas proximidades do *locus HLA-B*. Os resultados desse estudo estão de acordo com esta hipótese, já que os marcadores *D6S2810* e *HLABC-2CA* estão localizados muito próximos ao gene *HLA-B* e *DQCAR* localiza-se próximo ao gene *HLA* clássico *HLA-DQB1*. Assim, é realmente provável que microssatélites próximos a genes *HLA* clássicos sejam mais polimórficos, o que sugere uma evolução mais rápida dessas regiões, provavelmente ocorrendo de forma mais intensa para a região MHC de classe I.

6.2 Comparação com outros estudos populacionais

A comparação das freqüências alélicas observadas neste estudo com as de outras análises populacionais revela que a maioria das diferenças ocorreu devido a variações nas freqüências alélicas entre os grupos. Porém, em poucos casos foi observada a presença ou ausência de alelos em uma ou outra população.

Para o microssatélite *DQCAR*, os alelos *DQCAR*125* e *DQCAR* 127*, raros em outras populações tais como européia, africana, mexicana e croata também não estiveram presentes nesse estudo. O alelo *DQCAR*101* não foi observado assim como nas demais populações utilizadas para comparação. O alelo mais freqüente, *DQCAR*103*, foi também o mais comum na população croata (GRUBIC *et al.*, 2000), assim como também em populações dos Estados Unidos de origem européia e africana (MACAUBAS *et al.*, 1995). A comparação com a população dos Estados Unidos de origem européia não apresentou valores estatisticamente significativos. Uma hipótese para tal semelhança é a de que o tempo de divergência entre essas duas populações ainda não tenha sido suficiente para a existência de grandes diferenças nas freqüências alélicas.

Para o marcador *D6S2792 (TNFa)*, o alelo mais freqüente foi *D6S2792*101*, o que diferiu do encontrado para as populações croata (GRUBIC *et al.*, 2006) e coreana (KIM *et al.*, 2000), porém está em conformidade com os dados referentes a outras populações caucasóides de origem européia (CROUAU-ROY *et al.*, 1993).

Em relação ao microssatélite *STR-MICA*, foram encontrados 5 alelos, que são comuns em populações caucasóides. Os alelos mais comuns foram *STR-MICA*A5.1* e **A6*, observados na maioria das populações caucasóides, porém com variações nas freqüências alélicas (OTA *et al.*, 1997). Os alelos *STR-MICA*A7* e *STR-MICA*A10* já foram descritos, porém são raros, sendo que *A10* foi encontrado apenas em populações chinesas (TIAN *et al.*, 2006) e em indígenas, tais como Guarani M'byá e Kaingang de Ivaí (OLIVEIRA, 2007). Tais alelos não foram observados no presente estudo.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas com o estudo de BELTRAME (2005), na comparação das freqüências alélicas dos microssatélites *D6S2874*, *D6S273*, *STR-MICA* e *HLABC-2CA*, devido ao fato de ambas as amostras serem provenientes da mesma região do Brasil (população euro-brasileira). Por outro lado, os resultados encontrados para a comparação com outros grupos populacionais tais como a população croata, coreana e indígena foram estatisticamente significativos ($p \leq 10^{-6}$) indicando uma real

diferença para os microssatélites analisados. É provável que essas populações tenham divergido há tempo suficiente para o surgimento de maiores diferenças em regiões com uma alta taxa de mutação, tais como os microssatélites. Além disso, a ação de fatores evolutivos, especialmente a deriva genética pode ter contribuído significativamente para as diferentes frequências alélicas encontradas.

As diferenças com os grupos indígenas refletem o fato de que populações urbanas, com as deste trabalho, geralmente representam a mistura de várias populações, frequentemente apresentando uma maior diversidade em relação a populações isoladas, tais como os Ameríndios. É interessante comentar que as comparações com grupos ameríndios permitem sugerir a existência de fluxo gênico entre populações euro-brasileiras e indígenas. Tal fato foi reportado por OLIVEIRA (2007) e também observado neste estudo, onde alguns alelos de microssatélites são muito comuns em uma população e muito pouco frequentes em outra. Este é o caso do alelo *D6S2874*201*, com frequência de 45,2% na população indígena de Guarani Nãndeva (OLIVEIRA, 2007), de 1,3% na população euro-brasileira de BELTRAME (2005) e 2,5% na população deste estudo. Tal alelo pode ter entrado na população brasileira através de fluxo gênico com populações indígenas, conforme sugerido por OLIVEIRA (2007). Para verificar tal hipótese, foram analisados os genótipos dos indivíduos que apresentam o alelo *D6S2874*201*. Dos 12 indivíduos analisados, 4 possuem o haplótipo *DRB1*0411-DQB1*0302* e outros 4 o haplótipo *DRB1*1602-DQB1*0301*, os quais são raros ou inexistentes em populações de origem não ameríndias (SOTOMAIOR *et al.*, 1998).

6.3 Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação

As frequências haplotípicas refletiram o que foi observado nas frequências alélicas. De maneira geral, os microssatélites mais diversos apresentaram maior número de haplótipos, com frequências mais baixas, assim como os menos diversos apresentaram menor número de haplótipos, com maior frequência.

Assim, a combinação de *D6S2810 (MIB)* com *HLABC-2CA* foi a que gerou o maior número de haplótipos (109), sendo o mais comum com frequência de 7,5%.

D6S2874 foi o marcador que apresentou o menor valor de desequilíbrio de ligação com genes *HLA*, o que é observado através de muitas associações não estatisticamente significantes ou de associações significativas, porém, com valores D' abaixo de 0,70. Além disso, poucos pares de alelos estiveram em repulsão máxima (figuras 20 a 22). A comparação com outros estudos populacionais foi difícil, especialmente devido à escassez de análises populacionais sobre tal marcador. OLIVEIRA (2007) descreve este microssatélite para populações indígenas, porém a sua inferência de desequilíbrio de ligação não compreende associações entre alelos dos microssatélites e alelos ou grupos alélicos dos genes *HLA*, o que dificulta a comparação com o presente estudo.

DQCAR é um microssatélite cuja localização é de muita importância devido à grande proximidade com os genes *HLA* de classe II clássicos, em especial *HLA-DQB1*. Nesse estudo *DQCAR* apresentou valores mais altos de desequilíbrio de ligação com genes *HLA* de classe II em relação aos demais microssatélites estudados, ocorrendo muitas associações em acoplamento com valores de $D' \geq 0,70$ e muitos pares de alelos em repulsão máxima ($D' = -1,00$). Muitas associações encontradas são comparáveis com as observadas em outros estudos. Todos os pares de alelos em acoplamento com os loci *HLA-DRB1* e *DQB1* (figuras 24 a 25), com exceção das associações entre *DQCAR*117-HLA-DRB1*0802*, *DQCAR*117-HLA-DQB1*0402*, *DQCAR*121-HLA-DQB1*0202* e *DQCAR*123-HLA-DQB1*0301* foram também reportados em desequilíbrio de ligação e com frequências acima de 2%, por um estudo sobre a população croata (GRUBIC *et al.*, 2000). Em um estudo sobre populações dos Estados Unidos de origens européia, africana, asiática e mexicana (MACAUBAS *et al.*, 1995), foram também observadas em desequilíbrio de ligação positivo todas as associações aqui descritas em acoplamento com o locus *HLA-DQB1*, com exceção dos pares de alelos: *DQCAR*113-HLA-DQB1*0202* e *DQCAR*121-HLA-DQB1*0202*. Neste mesmo estudo foi observado o alelo *DQCAR*103* em acoplamento máximo com alelos dos grupos *HLA-DQB1*05* ou *06* em todas as etnias acima mencionadas.

Tais resultados conferem com os dados aqui reportados, onde foi observado acoplamento máximo entre *DQCAR*103-HLA-DQB1*0603* ($D' = 1,00$) e forte desequilíbrio entre este mesmo alelo de *DQCAR* e *HLA-DQB1*0602* ($D' = 0,90$) e *HLA-DQB1*0502* ($D' = 0,84$). O mesmo ocorreu para o alelo *DQCAR*99*, encontrado em acoplamento máximo com o grupo alélico *HLA-DQB1*02* em todas as etnias do estudo de MACAUBAS *et al.* (1995), sendo que, na presente análise, a associação entre *DQCAR*99-HLA-DQB1*0201* atingiu $D' = 0,98$. Porém, é interessante mencionar que o alelo *DQCAR*99* esteve em repulsão máxima com outro alelo de *HLA-DQB1*02* (*HLA-DQB1*0202*).

É interessante observar que *HLA-DQB1*0202* e *HLA-DQB1*0301* estiveram associados a mais de um alelo de *DQCAR*. Tal associação ocorreu com quatro alelos de tamanhos longos deste microssatélite, *DQCAR** (113,117,119,121 e 123). Acredita-se que alelos de maior tamanho possam mais facilmente adquirir deleções ou mutações, originando novos alelos e, portanto, gerando maior diversidade para os haplótipos que os contêm (MACAUBAS *et al.*, 1995; GARZA *et al.*, 1996). Alguns estudos sugerem que os alelos de tamanho menor sejam estabilizados por uma substituição de nucleotídeos, a qual é responsável por um encurtamento da seqüência ininterrupta de bases CA. Entretanto, tal evento não ocorreria com alelos de maior tamanho, permitindo que eles continuassem a apresentar seqüências CA relativamente longas e perfeitas, e com grande capacidade de mutação (MACAUBAS *et al.*, 1995; PEARSON *et al.*, 1998; e BOLOGNESI *et al.*, 2001).

A diversidade das associações entre *DQCAR* e *HLA-DQB1*0202* e *HLA-DQB1*0301* pode também estar relacionada a eventos de recombinação haplótipo-dependentes na região MHC de classe II. Tais eventos permitiram que determinados grupos alélicos dos genes *HLA-DQB1*, tais como *02 e *03 apresentassem mais pontos de recombinação com marcadores das proximidades. Assim, há maiores possibilidades de recombinação com o microssatélite *DQCAR*, gerando, portanto, haplótipos com maior diversidade, porém com menor desequilíbrio de ligação. Por outro lado, haplótipos, envolvendo os grupos alélicos de *HLA-DQB1*05* e *06* permaneceram mais conservados, apresentando um único

alelo de *DQCAR* a eles associado. Tal hipótese é também descrita por outros estudos (GRUBIC *et al.*, 2000; MACAUBAS *et al.*, 1995) é também novamente observada neste trabalho através das associações entre: *DQCAR*113/121* e *HLA-DQB1*0202*; *DQCAR*117/119/121/123* e *HLA-DQB1*0301*; e da forte associação entre *DQCAR*103* e os alelos *HLA-DQB1*0501/0602/0603*.

O microssatélite *D6S273* está em moderado desequilíbrio de ligação com o locus *HLA-B*, com associações em acoplamento com valores de $D' \geq 0,70$, assim como pares de alelos em repulsão máxima (figuras 26 a 28). Novamente pela escassez de trabalhos sobre este marcador, disponíveis na literatura, não foi possível a comparação dos resultados de desequilíbrio de ligação de *D6S273* com outros estudos populacionais.

O marcador *D6S2792* está em moderado desequilíbrio de ligação com o locus *HLA-B*, com algumas associações em acoplamento com valores de $D' \geq 0,70$, assim como alguns pares de alelos em repulsão máxima (figuras 29), porém em mais fraca associação com os genes *HLA* de classe II (figuras 30 e 31). As seguintes associações haplotípicas aqui observadas, com frequências acima de 2%, e com $D' \geq 0,70$: *D6S2792*101-HLA-B14*; *D6S2792*101-HLA-B15*; *D6S2792*105-HLA-B44*; *D6S2792*107-HLA-B35*; *D6S2792*111-HLA-B13*; *D6S2792*119-HLA-B07*, foram também reportadas em desequilíbrio em outras populações caucasóides (GRIMALDI *et al.*, 1996 e GRUBIC *et al.*, 2006). Por outro lado, pares de alelos em acoplamento e com valores de p estatisticamente significativos, reportados pelos estudos utilizados para a comparação, não foram observados na presente análise: *D6S2792*101-HLA-B27/B57*; *D6S2792*103-HLA-B51*; e *D6S2792*109-HLA-B27*. Na comparação com um estudo sobre a população coreana (KIM *et al.*, 2000), a única semelhança ocorreu para *D6S2792*111-HLA-B13*.

O microssatélite *STR-MICA* apresentou acentuado desequilíbrio de ligação com o locus *HLA-B* e esteve mais fracamente associado aos genes *HLA* de classe II (figuras 32 a 34). O forte desequilíbrio de ligação com *HLA-B* é provavelmente devido à proximidade entre estes dois loci e à provável baixa taxa de recombinação na região. As associações haplotípicas aqui observadas, com

freqüências acima de 2%, e com $D' \geq 0,70$: *STR-MICA*A4-B18*; *STR-MICA*A5.1-HLA-B07*; *STR-MICA*A5.1-HLA-B08*; *STR-MICA*A5.1-B13*; *STR-MICA*A6-HLA-B-B51*; *STR-MICA*A9-HLA-B39*, *STR-MICA*A9-HLA-B57*, foram também reportadas em acoplamento e com altos valores de D' por um estudo sobre a população italiana (BOLOGNESI, *et al.*, 2001) e por outro sobre a população croata (GRUBIC *et al.*, 2006). Por outro lado, associações em acoplamento *STR-MICA*A4-B27*; *STR-MICA*A5-HLA-B35*; *STR-MICA*A5.1-HLA-B44*, encontradas nos dois estudos utilizados para a comparação, não foram observadas ou não foram significativas para esta análise. Na comparação com populações de origem chinesa (FENG *et al.*, 2004 e TIEN *et al.*, 2006), foram encontradas ainda maiores diferenças no padrão de desequilíbrio de ligação entre *STR-MICA* e *HLA-B*. Em comum para estes três estudos, foi encontrada apenas a associação entre: *STR-MICA*A6-HLA-B51*.

O microssatélite *D6S2810 (MIB)* encontra-se em mais acentuado desequilíbrio de ligação com o *locus HLA-B* em relação ao encontrado para os genes *HLA* de classe II (figuras 35 a 37), o que novamente pode ser explicado por sua grande proximidade com esse gene, ainda maior do que a observada para *STR-MICA*, e a provável baixa taxa de recombinação na região. Foram feitas comparações com os dados sobre a população basca-francesa (GRIMALDI *et al.*, 1996). As associações em acoplamento, com alto D' e com freqüências acima de 2%, similares nos dois estudos, ocorreram apenas entre: *D6S2810*328-HLA-B15*; *D6S2810*338-HLA-B07*; *D6S2810*338-HLA-B44*; *D6S2810*350-HLA-B51*; *D6S2810*352-HLA-B08*. Infelizmente, não foi possível a comparação dos resultados entre diferentes grupos raciais, devido novamente à falta de estudos populacionais sobre este marcador. Tais comparações poderiam trazer maior informação a respeito do padrão de desequilíbrio de ligação entre *D6S2810* e *HLA-B* nas diferentes etnias.

É interessante comentar que o grupo alélico *HLA-B35* ocorreu com 3 alelos de *D6S2810* (350, 354, 356), sendo que para nenhuma dessas associações D' ultrapassou o valor de 0,60, porém tais resultados foram estatisticamente significativos. Associações deste tipo também ocorreram no estudo de GRIMALDI

et al. (1996) entre os grupos alélicos *HLA-B35* e *D6S2810* (350, 352, 354 e 356) e novamente com baixos D' , porém estatisticamente significativos. De maneira geral, tais associações são observadas com alelos de maior tamanho, ou seja, com maior número de repetições. Assim, como já foi reportado para *DQCAR*, sugere-se que alelos de microssatélites que tenham maiores números de repetições apresentem menor desequilíbrio de ligação com *loci* próximos em comparação a alelos com menores números de repetições.

Os resultados apontam na direção da existência de um desequilíbrio de ligação mais forte nas proximidades dos genes *HLA* clássicos, o que foi observado através da ligação de *STR-MICA* e *D6S2810* a *HLA-B* e de *DQCAR* aos genes *HLA-DRB1* e *DQB1*. Tal desequilíbrio mais pronunciado nas proximidades aos genes *HLA* clássicos pode estar indicando uma co-evolução entre esses *loci* (OLIVEIRA, 2007). Além disso, como já foi mencionado, essas regiões estariam apresentando uma evolução mais rápida, ou seja, um acúmulo mais rápido de mudanças, o que aumenta o desequilíbrio de ligação com os *loci* ao redor. Tal fato é especialmente mais acentuado na região MHC de classe I, onde foram encontrados marcadores muito polimórficos além de acentuado desequilíbrio de ligação com o *locus HLA-B*.

As informações aqui obtidas podem contribuir para trabalhos futuros sobre genética de populações, além de auxiliar em estudos sobre predisposição de doenças ligadas aos genes *HLA*, quando uma breve caracterização do perfil *HLA* da amostra seja necessário.

Muitos estudos populacionais sobre microssatélites da região MHC sugerem que estes possam auxiliar na seleção da dupla doador-receptor em transplantes de medula óssea e em alguns casos sugere-se até uma futura aplicação destes marcadores como substitutos da tipagem *HLA*. Entretanto, baseando-se nos resultados do presente estudo, pode-se dizer que o uso de microssatélites serviria apenas como informação adicional nas tipagens, pois oferece dados a respeito de haplótipos *HLA*. Porém, a tipagem *HLA* não pode ser substituída pelas dos microssatélites, especialmente nos casos de transplantes de medula óssea, em que uma tipagem *HLA* precisa é imprescindível. Para tanto,

seria necessário encontrar marcadores que apresentassem vários alelos que sempre ocorressem juntos a alelos de genes *HLA* e vice-versa.

No entanto, como já foi mencionada, a tipagem de microssatélites pode trazer informações a respeito de haplótipos *HLA*, apresentando, portanto, uma possível aplicabilidade na rotina laboratorial. Tais informações podem vir a auxiliar na resolução de algumas ambigüidades encontradas nas tipagens *HLA* (Anexo 1), especialmente as de baixa resolução. Como exemplo, pode-se citar a ambigüidade do locus *HLA-B* de número 3, citada no anexo 1 (08*14/*13*14), Neste caso, em um dos cromossomos tem-se maior certeza quanto à presença do grupo alélico *HLA-B14* e a dúvida ocorre em relação ao outro cromossomo entre *HLA-B08* ou *HLA-B13*. Para esta ambigüidade a tipagem do microssatélite *D6S2810* poderia ser esclarecedora. Supondo que o resultado da tipagem para este marcador fosse *D6S2810*334/338*. Segundo os valores de desequilíbrio de ligação calculados por este estudo, o alelo *D6S2810*334* está em acoplamento máximo com os grupos alélicos *HLA-B14* e *HLA-B38*. Porém, como a tipagem *HLA* apontou a presença do grupo *HLA-B14*, tal resultado de *D6S2810* aumenta a probabilidade de que em um dos cromossomos esteja o haplótipo *D6S2810*334-HLA-B14*. A presença do alelo *D6S2810*338* diminui a probabilidade de que no outro cromossomo esteja o haplótipo *D6S2810*338-HLA-B08*, pois, tais variantes estão repulsão máxima segundo os valores de desequilíbrio de ligação calculados. Seria provável, portanto, no outro cromossomo, a presença dos haplótipos *D6S2810*338-HLA-B13* ou *D6S2810*338-HLA-B07* ou *D6S2810*338-HLA-B44*, os quais apresentaram valores de D' em acoplamento segundo este estudo. Como a tipagem prévia dos genes *HLA* excluiu a possibilidade da presença de *HLA-B07* e de *HLA-B44*, tal resultado na tipagem de *D6S2810* poderia ser esclarecedor na direção de *HLA-B13*, aumentando a probabilidade de que o indivíduo tipado pertença aos grupos *HLA-B13* e *HLA-B14*. Certamente, há mais exemplos em que tipagem dos microssatélites deste estudo possa auxiliar na solução de ambigüidades em baixa resolução do locus *HLA-B*.

É importante, entretanto, mencionar que a tipagem dos microssatélites seria realizada apenas após a tipagem dos genes *HLA*, evitando em alguns casos a

repetição de um novo exame quando existirem ambigüidades. Ainda em relação a ambigüidades, ressalta-se que quando exames de doadores e /ou receptores de transplantes de medula óssea apresentarem ambigüidades, especialmente as de alta resolução, as tipagens devem ser repetidas ou então se recorrer ao seqüenciamento para esclarecer as possíveis dúvidas, devido às razões já mencionadas acima.

Por último, os valores de desequilíbrio de ligação podem ser muito aplicáveis, porém é importante lembrar que oferecem uma informação de natureza probabilística a respeito da associação entre dois alelos, podendo, na prática ocorrerem associações diferentes das esperadas segundo o valor de desequilíbrio calculado.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram analisados microssatélites da região MHC, investigando sua relevância como marcadores de haplótipos HLA específicos. *D6S2874*, localizado na região MHC de classe II, foi o microssatélite com menor grau de polimorfismo enquanto que *HLABC-2CA* e *D6S2810*, localizados na região MHC de classe I, apresentaram maior grau de polimorfismo. Tais resultados reforçam a idéia de que a região MHC de classe I possa estar evoluindo mais rapidamente, o que se reflete no alto grau de polimorfismo dos microssatélites desta região.

Algumas diferenças nas freqüências alélicas encontradas na comparação com outros estudos populacionais foram estatisticamente significativas, com exceção da comparação feita com a população americana caucasóide de origem européia e da população caucasóide do sul do Brasil. O resultado das comparações sugere que tais populações possam ter divergido há tempo suficiente para o surgimento de diferenças significativas em *loci* com altas taxas de mutação, tais como os microssatélites. Além disso, a ação da deriva genética deve ter sido importante neste processo. Ainda, a comparação com outros estudos inferiu a possibilidade de fluxo gênico entre populações indígenas e euro-brasileiras. Tal fato fica evidenciado, por exemplo, através do alelo *D6S2874*201*, o qual apresenta alta freqüência na população indígena de Guarani Nandeva e baixa freqüência na população deste estudo. Este alelo parece ocorrer na maioria das vezes com haplótipos HLA de origem ameríndia, tais como *DRB1*0411-DQB1*0302* e *DRB1*1602-DQB1*0301*, o que reforça a idéia de fluxo gênico.

O desequilíbrio de ligação foi mais forte próximo aos genes *HLA* clássicos. Uma possível justificativa é a proximidade física entre os *loci* analisados, mas tal desequilíbrio pode também estar indicando uma co-evolução entre eles, além da possível ação da seleção natural e da deriva genética nestas regiões.

Finalmente, os resultados deste estudo podem ser importantes na prática laboratorial, oferecendo informações adicionais sobre os haplótipos HLA, as quais

podem ser úteis no esclarecimento de ambigüidades, especialmente as de baixa resolução.

BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. O complexo principal de Histocompatibilidade. In: **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 65-81.

AGRAWAL, C.; RAGHAV, S.K.; GUPTA, B.; DAS, R.H.; CHATURVEDI, V.P.; GOSWAMI, K.; DAS, H.R. Tumor necrosis factor-alpha microsatellite polymorphism association with rheumatoid arthritis in Indian patients. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 36,n.5, p.555-559, 2005.

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. Disponível em: <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>> Acesso em: 13 de dezembro de 2007.

ARDLIE, K.G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of Linkage Disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews.Genetics**, London, v. 3, p. 299-309, 2002

BELTRAME, M. H. ; OLIVEIRA, L. A. ; PETZL-ERLER, M. L. . Marcadores microsatélites em populações humanas. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.(13., 2005, Curitiba). **Livros de resumos...** Curitiba : UFPR/PRPPG, 2005.

BOLOGNESI, E.; D'ALFONSO, S.; ROLANDO, V.; FASANO, M.E.; PRATICO, L.; RICHIARDI-MOMIGLIANO, P. MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.28, p.523-530, 2001.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK,M.; DAVIS, R.W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.

CAMPBELL, R.; MILNER, C.M. MHC genes in autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 5, p.887-893, 1993.

CAMPBELL, D.; FIELD, M.;MCARDLE, C.; COOKE, T.; GALLAGHER, G. Polymorphism at the tumor necrosis factor locus: a marker of genetic predisposition to colorectal cancer. **Cancer research**, Baltimore, v. 343, p.293-294, 1994.

CARRINGTON, M.; DEAN, M. A polymorphic dinucleotide repeat in the third intron of TAP1. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.3, p.218, 1994.

CROAU-ROY, B.; BOUZEKRI, N.; CARCASSI, C.; CLAYTON, J.; CONTU, L.; CAMBON-THOMSEN, A. Strong association between microsatellites and *HLA-B, DR* haplotype (BR18-DR3): Implication for microsatellite evolution. **Immunogenetics**, New York, v. 43, p. 255-260, 1996.

CROUAU-ROY, B.; BRIANT, L.; BOUISSOU, C et al. Tumor Necrosis factor microsatellites in four European populations. **Human Immunology**, New York, v.38, p.213-216, 1993.

CULLEN, M.; PERFETTO, S.P.; KLITZ, W.; NELSON, G.; CARRINGTON, M. High resolution patterns of meiotic recombination across the human major histocompatibility complex. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.71, p.759-76, 2002.

DANCHIN, E.; VITIELLO, V.; VIENNE, A.; RICHARD, O.; GOURET, P.; McDERMOTT, M. F.; PONTAROTTI, P. The major histocompatibility complex origin. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 198, p. 216-232, 2004.

DAUSSET, J. Leuco agglutinins and blood transfusion. **Vox sanguinis**, Oxford, v. 4, p. 190-194, 1954.

DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. **Acta haematologica**, Warszawa, v. 20, p. 156-166, 1958.

EXCOFFIER; LAVAL, L.G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FAVOROVA, O.O.; FAVOROV, A.V.; BOIKO, A.N; ANDREEWSKI, T.V; SUDOMOINA, M.A.; ALEKSEENKOV, A.D.; KULAKOVA, O.G.; GUSEV, E.I.; PARMIGIANI, G.; OCHS, M.F. Three allele combinations associated with multiple sclerosis. **BMC Medical Genetics**, London, v.26, p.7-63, 2006.

FENG, M.L.; GUO, X.J.; ZHANG, J.Y.; XIE, J.H.; CHEN, LU, Q.; YANG, J.H.; JI, Y.; QIAN, K.C. Study on the haplotypes of MICA and MICB microsatellites and HLA-B locus in the Guangzhou Han population. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.64, p.281-285, 2004.

FOISSAC, A.; FORT, M.L.; GIRALDO, P.; ABBAL, M.; RAFLOUX, C.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: Potential applications in bone marrow transplantation. **Immunological Reviews**, New York, v. 29, p.2374-2375, 1997.

FOISSAC, A.; CROUAU-ROY, B.; FAURÉ, S.; THOMSEN, M.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the *HLA* region: an overview. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 49, p. 197-214, 1997.

FOISSAC, A.; SALHI, M.; CAMNON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: 1999 update. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 55, p. 477-509, 2000.

FOISSAC, A.; FORT, M.; ABBAL, M.; RAFLOUX, C.; MOINE, A.; BENZA, J.C.; BIGNO, J.D.; MERCIER, P.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: HLA prediction and strategies for bone marrow donor strategies. **Transplantations Proceedings**, New York, v. 33, p. 492, 2001.

FRIGERIO, S.; CUISANI, E.; POZZI, A.; SILVANI, A.; SALMAGGI, A.; BOIARDI, A. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism in Italian glioblastoma patients. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, New York, v.109, p.172-174, 1999.

GARZA, J.C.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Microsatellite alleles frequencies in human and chimpanzee genome: linkage disequilibrium and sequence analysis. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.5, p.1131-1137, 1996.

GOURRAUD, P. A.; MANO, S.; BARNETCHE, T.; CARRINGTON, M.; INOKO, H.; CAMBON-THOMSEN, A. Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 64, p. 543-555, 2004.

GRIMALDI, M.C.; CLAYTON, J.; PONTAROTTI, P.; CAMBON-THOMSEN, A.; COUAU-ROY, B. New highly polymorphic microsatellite marker in linkage disequilibrium with *HLA-B*. **Human Immunology**, New York, v. 51, p. 89-94, 1996.

GRUBIC, Z.; ZUNEC, R.; CRKVENAC, K.; CECUK-JELICIC, E.; KASTELAN, A. Distribution of Alleles at DQCAR Microsatellite locus in the Croatian Population. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v.41, p.298-302, 2000.

GRUBIC, Z.; STINGL, K.; ZUNEC, R.; CAR, H.; CECUK-JELICIC, E.; BRKLJACIC-KERHIN, V. Linkage disequilibria between human leucocyte antigen-B and closely linked microsatellites in the Croatian population. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.69, p.86-94, 2006.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Alexandria, v. 48, p. 361-372, 1992.

HANSEN T. H.; CARRENO, B. M.; SACHS, D. H. The Major Histocompatibility Complex. In: WE, P. (Ed). **Fundamental Immunology**. 3. ed. New York : Raven Press, 1993. p. 577-628.

HAUPTMANN, G.; BAHRAM, S. Genetics of the central MHC. **Current Opinion on Immunology**, London, v. 16, n. 5, p. 668-672, 2004.

HOPES WEBSITE. **A Layperson's Guide to Huntington's Disease**. Disponível em <<http://www.stanford.edu/group/hopes/>> Acesso em: 3 de dezembro de 2006.

IDE, A.; BABU, S.R.; ROBLES, D.T.; WANG,T.; ERLICH,H.A.; BUGAWAN,T.L; REWERS, M.; FAIN, P.R.; EISENBARTH, G.S. "Extended" A1, B8, DR3 Haplotype Shows Remarkable Linkage Disequilibrium but Is Similar to

Nonextended Haplotypes in Terms of Diabetes Risk. **Diabetes(New York)**, v.54, p.1879-1883, 2005.

INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKING GROUP. **A Brief History of the International Histocompatibility Workshops**. Disponível em <<http://www.ihwg.org/history/history.htm>> Acesso em:3 de dezembro de 2006.

JAWAHEER, D.; LI, W.; GRAHAM, R. Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.71, p.585-94, 2002.

JONGENEEL, C.V.; BRIANT, L.; UDALOVA, I.A.; SEVIN, A.; NEDASPASOV, S.A.; CAMBON-THOMSEN, A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to the extended *HLA* haplotypes. **Immunology**, Oxford, v. 88, p. 9717-9721,1991.

JOHN, S.W.M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. **Nucleid Acids Research**, London, p. 408, 1990.

JONATHAN, K.; PRZEWORSKI, P.; PRZEWORSKI, M. Linkage Disequilibrium in Humans: Models and Data. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.69, p.1-14, 2001.

JORDE, L.B.; BAMSHD, M.J.; WATKINS, W.S. Origins and affinities of modern humans: a comparison of mitochondrial and nuclear genetic data. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 57, p. 523-538, 1995.

KAISHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as source of quantitative genetica variation. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.13. p.74-78, 1997.

KARELL, K.; KLINGER, N.; HOLOPAINEN, P.; LEVO, A.; PARTANEN, J. Major histocompatibility complex (MHC)-linked microsatellite markers in a founder population. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.56, p.45-51, 2000.

KASHI, Y.; KING, D.G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.22, p.253-259, 2006.

KIM, H.K.; HOON, H.; CHOI, H-B.; PYO, C-W.; KIM, C-C.; KIM, T-G. Distribution of seven polymorphic markers and haplotypes within the human TNF gene cluster in Koreans. **Human Immunology**, New York, v.61, p.1274-1280, 2000.

KLEIN J., SATO, A.; The HLA system. First of two parts. *Advances in immunology*. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 343, n.10, p.702-709, 2000a.

KLEIN J., SATO, A.; The HLA system. Second of two parts. Advances in immunology. **New England Journal of Medicine**, Oxford, v. 343, n.10, p. 782-786, 2000b.

KLOOR, M.; BECKER, C.; BENNER, A.; WOERNER, S.M.; GEBERT, J.; FERRONE, S.; VON KNEBEL DOEBERITZA, M. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. **Cancer Research**, Baltimore, v.65, n.14, p.6418-24, 2005

LAHIRI, D.K.; NURNBERGUER, J.I. JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Studies**, Oxford, v. 19, p. 5444, 1991.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZGUGH, W.; FUNKIE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEADFORD, A.; HOWLAND, J.; KANNAN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K. International Human Genome Sequence Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, London, v.409, p.860-921, 2001.

LEWONTIN, R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. **Genetics**, Austin, v. 49, p.49-67, 1964.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n.12, p. 2453-2465, 2002.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v.21, n.6, p. 991-1007, 2004.

LI, S.; KAWATA, H.; KATSUYAMA, Y.; OTA, M.; MORISHIMA, Y.; MANO, S.; KULSHI, J.K.; NARUSE, T.; OKO, H. Association of polymorphic MHC microsatellites with GVH, survival and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA *loci*. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.63, p.362-368, 2004.

LIN, L.; JIN, L.; KIMURA, A.; CARRINGTON, M.; MIGNOT, E. DQ microsatellite association studies in three ethnic groups. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.50, p.507-520, 1997.

MACAUBAS, C.; HALLMAYER, J.; KALIL, J.; KIMURA, A.; YASUNAGA, S.; GRUMET, F.C.; MIGNOT, E. Extensive Polymorphism of a (CA)_n microsatellite located in the *HLA-DQA1/DQB1* class II region. **Human Immunology**, New York, v. 42, p. 209-220, 1995.

MALKKI, M.; SINGLE, R.; CARRINGTON, M.; THOMSON, G.; PETERSDORF, E. MHC microsatellite diversity and linkage disequilibrium among common HLA-A, HLA-B, DRB1 haplotypes: implications for unrelated donor hematopoietic transplantation and disease association studies. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.66, p.114-124, 2005.

MILLER, M.P. **RXC**: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer. Arizona : Northern Arizona University, Department of Biological Sciences, 1997.

NEDOSPASOV, S.; UDALOVA, I.; KUPRASH, D.; TURRETSKAYA, R. DNA sequence polymorphism at the TNF locus. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.147, p.1053-1059, 1991.

NISHIYAMA, M.; TAKAHASHI, M.; MANAKA, K.; SUZUKI, S.; SAITO, M.; NAKAE, K. Microsatellite polymorphisms of the MICA gene among Japanese patients with Behcet's disease. **Canadian Journal of Ophthalmology**, Montreal, v.41, n.2, p.210-5, 2006.

O'DONOVAN, M.C., GUY, C., CRADDOCK, N., MURPHY, K.C., CARDNO, A.G., JONES, L.A., OWEN, M.J., MCGUFFIN, P. Expanded CAG repeats in schizophrenia and bipolar disorder. **Nature Genetics**, New York, v.10, p. 380-381, 1996.

ONE LAMBDA, INC. **Micro SSP™ DNA typing trays for in vitro diagnostic use.summary and explanation**. Disponível em <<http://www.onelambda.com>> Acesso em: 3 de dezembro de 2006.

OLIVEIRA, L.A. **Diversidade populacional de microssatélites do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em populações indígenas do Paraná e do Mato Grosso do Sul**. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; MIZUKI, N.; ANDO, H.; FURIHATA, K.; ONO, S.; PIVETTI-PEZZI, P.; TABBARA, K.F.; PALIMERIS, G.D.; NIKBIN, B.; DAVATCHI, F.; CHAMS, H.; GENG, Z.; BAHRAM, S.; INOKO, H. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi, Arabian, Greek and Italian. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.49, p. 448-454, 1997.

PEARSON, C.E.; EICHLER, E.E.; LORENZETTI, D.; KRAMER, S.F.; ZOGHBI, H.Y.; NELSON, D.L.; SINDEN, R.R. Interruptions in the triplet repeats of SCA1 and FRAXA reduce the propensity and complexity of slipped strand DNA (S-DNA) formation. **Biochemistry (Washington)**, v.37, n.8, p.2701- 2708, 1998.

PROBST, C.M. **Análise da variabilidade dos genes HLA de classe II na população paranaense**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PROJETO INTERNACIONAL HAPMAP. **A Haplotype Map of the Human Genome**. Disponível em <<http://www.hapmap.org>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2006.

PYO, C.W.; HUR, S.S.; KIM, Y.K.; CHOI, H.B.; KIM, T.Y.; KIM, T.G. Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population. **Human Immunology**, New York, v.64, p.378-384, 2003.

RHODES, D.A.; TROWSDALE, J. Genetics and molecular genetics of the MHC. **Reviews in Immunogenetics**, Copenhagen, v.1, p.21-31, 1999.

SANTOS, P.S.C. **Análise de desequilíbrio de ligação e de freqüências haplotípicas HLA-A, HLA-B E HLA-DRB1 na amostra de doadores voluntários de medula óssea do LIGH**. Curitiba, 2005. Trabalho de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCHOTTE, H.; WILLEKE, P.; TIDOW, N.; DOMSCHKE, W.; ASSMANN, G.; GAUBITZ, M.; SCHULTER, B. Extended haplotype analysis reveals an association of TNF polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus beyond HLA-DR3. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.34, n.2, p.114-21, 2005.

SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J.K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 64, p.631-649, 2004.

SLATKIN, M. Linkage disequilibrium in growing and stable populations. **Genetics**, Austin, v. 137, p. 331-336, 1994.

SLATKIN, M. Hitchhiking and associative over-dominance at a microsatellite locus. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.12, p.473-480, 1995.

SOTOMAIOR, V.S.; FAUCZ, F.R.; SCHAFHAUSER, C.; JANZEN-DUCK, M.; BOLDT, A.B.; PETZL-ERLER, M.L. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles and haplotypes in two Brazilian Indian tribes: evidence of conservative evolution of HLA-DQ. **Human Biology**, Detroit, v.70, p.789-797, 1998.

STRACHAN, T.; READ, A.T. **Human Molecular Genetics**. 2.ed.. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1999. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hmg.figgrp.1097>>. Acesso em 3 de dezembro de 2006.

TIAN, W.; LI, L.X.; WANG, F.; LUO, Q.Z.; YAN, M.Y.; YU, P.; GUO, S.S.; CAO, Y. MICA-STR, HLA-B haplotypic diversity and linkage disequilibrium in the Hunan Han population of southern China. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.33, p.241-245, 2006.

VALDES, AM.; THOMSON, G.; GRAHAM, J.; ZARGHAMI, M.; MCKENEY, B.; KOCKUM, I.; SMITH, A.; LATHROP, M.; STEENKISTE, A.R.; DORMAN, J.S.; NOBLE, J.A.; HANSEN, J.A.; PUGLIESE, A.; LERNMARK, A. D6S265*15 marks a DRB1*15, DQB1*0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus. **Diabetologia**, Berlin, v.48, n.12, p.2540-3, 2005.

VESELINOVIC, I. Microsatellite DNA analysis as a tool for forensic paternity testing (DNA paternity testing). **Medicinski Pregled**, Novi Sad, v. 59. n.5, p.241-243, 2006.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. **Genética Humana** : problemas e abordagens. 3 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000.

WITT,C.; MOGHADDAM, P.H.; VAN DER MEER, R.; TRIMBOLI, F.; OTTINGER, H.; CHRISTIANSEN, F.; GIPHART, M. Matching for *TNF* microsatellites is strongly associated with matching for other non-HLA MHC Sequences in unrelated bone marrow donor-recipient pairs. **Human Immunology**, New York, v. 60, p. 862-866, 1999.

YU A.; ZHAO C.; FAN Y.; JANG W.; MUNGALL AJ.; DELOUKAS P.; OLSEN A.; DOGGETT NA.; GHEBRANIOUS N.; BROMAN KW.; WEBER JL. Comparisons of human genetic and sequence-based physical maps. **Nature**, London, v. 409, p. 951–953, 2001.

Anexo 1. Listagem de ambigüidades mais freqüentes nas tipagens dos loci HLA-B, HLA-DRB1 e HLA-DQB1.

HLA-B

HLA-B	
1.	*07*39/*48*67
2.	*07*41/*40*42
3.	*08*14/*13*14
4.	*08*35/*08*53
5.	*13*49/*13*50
6.	*15*39/*15*38
7.	*35*44/*44*53
8.	*35*47/*47*53
9.	*35*51/*53*78
10.	*35*35/*35*40
11.	*35*48/*40*48
12.	*38*44/*39*44
13.	*40*44/*44*44
14.	*40*50/*40*49
15.	*44*49/*44*50
16.	*44*50/*45*49

HLA-DRB1 e HLA-DQB1

DRB1*	Possibilidades
0301	0328
0403	0450/0451
0405	0445
0701	0708/0709/0710N/0711
0801	0826
1101	1149
1104	1144
1301	1359
1302	1373
1501	1516/1517N/1518/1520/1522
1502	1514/1519
DQB1*	Possibilidades
0302	0328