

SOFTWARE XHLA – FERRAMENTA PARA SELEÇÃO DE RECEPTORES HIPERSENSIBILIZADOS: IMPLEMENTAÇÃO DA BASE DE DADOS DE FREQUÊNCIA ALÉLICA HLA DO NORDESTE BRASILEIRO

Marina Barguil Macêdo (Bolsista PIBIC-CNPq), Herton Luiz Alves Sales Filho (Bolsista PIBIC-UFPI), Luiz Cláudio Demes da Mata Souza (Co-orientador, CCN - UFPI), Semíramis Jamil Haddad do Monte (Orientadora, CCS - UFPI)

INTRODUÇÃO

O sistema HLA é altamente informativo em estudos de genética de populações, devido ao seu elevado polimorfismo e ao forte desequilíbrio de ligação entre alelos de loci próximos. Essas propriedades permitem que a tipificação HLA seja utilizada como um instrumento de investigação para caracterizar a composição genética de diferentes povos, uma vez que a frequência dos alelos HLA e o padrão de haplótipos são característicos de cada etnia e população. Isso é de grande relevância para os programas de transplante de órgãos e tecidos já que a seleção do doador é por “match” HLA.

Face a essas considerações, o presente trabalho se propôs a descrever as frequências alélicas e haplotípicas dos Doadores Voluntários de Medula Óssea, do Rio Grande do Norte considerando que essa população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

METODOLOGIA

Tomou-se como ponto de partida um banco de dados contendo os alelos dos três loci em estudo (A, B e DRB1), dados estes de potenciais doadores de medula óssea cadastrados em hemocentros do Rio Grande do Norte (RN) vinculados ao Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea - REDOME. A princípio, o banco contava com 12.983 cadastros, dos quais 10 tiveram que ser excluídos da amostra em virtude de apontarem para alelos não existentes. Com isso, restringiu-se o universo amostral para 12.973 cadastros.

O banco de dados estava inicialmente no formato de planilha Microsoft Excel versão 2007. Para poder ser processado pelo programa de uso livre Arlequin versão 3.5.1.2, os dados foram transpostos primeiramente para o Microsoft Bloco de Notas versão 5.1. A seguir, com o auxílio do programa de uso livre Convert versão 1.31, converteu-se o arquivo do Microsoft Bloco de Notas 5.1 para outro cuja extensão pudesse ser lida pelo Arlequin 3.5.1.2. Finalmente, o arquivo convertido foi submetido à análise do Arlequin 3.5.1.2.

Com os dados obtidos pelo Arlequin 3.5.1.2, pôde-se traçar um perfil alélico e haplotípico dos habitantes do RN. Para tal, ranquearam-se as frequências alélicas e haplotípicas mais frequentes da população, e se a submeteu a testes estatísticos que pudessem extrair mais informações a respeito da amostra averiguada, tais como a Análise de Componente Principal – PCA (do inglês Principal Component Analysis). Outros dados a que se deu relevância foram a existência de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o número de heterozigotos esperados e observados, os quais foram gerados pelo próprio Arlequin 3.5.1.2.

A Análise de Componente Principal se configura como um teste estatístico capaz de possibilitar a avaliação da distância genética entre diferentes populações, a partir da análise de seus perfis alélicos, haplotípicos, ou ambos. No âmbito do nosso estudo, tal teste foi notadamente útil ao permitir se estabelecer um paralelo entre a população do Rio Grande do Norte e outras populações cujos dados relativos às frequências alélicas dos loci HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 se encontravam disponíveis em bancos virtuais de acesso livre (mais precisamente, populações que tiveram seus dados compartilhados no website Allele Frequencies – www.allelefreqencies.net).

As populações elencadas para se traçar o comparativo foram: United States of America (USA) Caucasian population (pop) 1 (n = 1.070); USA African American pop 4 (n = 2.411); USA Hispanic pop 2 (n = 1.999); USA Asian pop 2 (n = 1.772); Portugal Lisbon (n = 17.420); Spain Murcia (n = 173); France Grenoble, Nantes and Rennes (n = 6.094); Zimbabwe Harare Shona (n = 230); e Azores (n = 105); em que n = número de indivíduos da amostra.

Escolhidas as amostras que iriam entrar na análise, esta foi executada pelo software Statistical Program for Social Sciences (SPSS) versão 19.0, o qual produziu resultados em valores numéricos. Para uma compreensão melhor e mais palpável dos resultados, submeteram-se os valores gerados ao software Origin versão 5.0, o qual converteu os números enquadrados em tabelas em gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1. Frequência alélica, em ordem decrescente de valor, referente aos loci A, B e DRB1 para o universo amostral de 12.973 cadastros provenientes do Rio Grande do Norte.

HLA-A	Fa (%)	HLA-B	Fa (%)	HLA-DRB1	Fa (%)
A*02	25,42%	B*44	11,25%	DRB1*13	15,54%
A*24	10,20%	B*35	10,76%	DRB1*04	14,04%
A*01	8,68%	B*15	9,71%	DRB1*07	12,05%
A*03	7,66%	B*51	7,72%	DRB1*01	10,03%
A*68	6,57%	B*07	6,48%	DRB1*11	9,82%
A*23	5,75%	B*14	5,67%	DRB1*15	9,44%
A*31	5,32%	B*40	5,61%	DRB1*03	8,88%
A*29	5,27%	B*08	4,21%	DRB1*08	7,03%
A*30	5,21%	B*58	3,97%	DRB1*14	4,31%
A*11	4,78%	B*18	3,79%	DRB1*16	3,57%
A*33	3,34%	B*39	3,18%	DRB1*10	2,23%
A*32	3,28%	B*50	2,87%	DRB1*09	1,67%
A*26	2,64%	B*53	2,81%	DRB1*12	1,40%
A*74	1,67%	B*49	2,77%		
A*25	1,26%	B*38	2,63%		
A*66	1,09%	B*57	2,29%		
A*34	0,95%	B*27	2,14%		
A*36	0,46%	B*52	1,95%		
A*80	0,31%	B*45	1,85%		
A*69	0,15%	B*42	1,60%		
A*43	0,01%	B*37	1,52%		
		B*13	1,24%		
		B*41	1,04%		
		B*48	0,93%		
		B*55	0,73%		
		B*81	0,54%		
		B*56	0,23%		
		B*47	0,20%		
		B*78	0,13%		
		B*82	0,05%		
		B*46	0,05%		
		B*73	0,02%		
		B*54	0,01%		
		B*67	0,01%		
		B*59	0,004%		

Fonte: Dados gerados pelo programa Arlequin 3.5, em 16/12/2011, às 20:14:40.

Legenda: Fa (%) – frequência alélica em termos percentuais.

TABELA 2. Frequência haplotípica, em ordem decrescente de valor, dos dez haplótipos mais freqüentes encontrados para o universo amostral de 12.973 cadastros provenientes do Rio Grande do Norte.

Haplótipo	Frequência (%)
A*01 B*08 DRB1*03	1,62%
A*29 B*44 DRB1*07	1,56%
A*02 B*44 DRB1*04	1,29%
A*02 B*44 DRB1*13	0,89%
A*03 B*07 DRB1*15	0,87%
A*23 B*44 DRB1*07	0,79%
A*02 B*14 DRB1*01	0,69%
A*02 B*07 DRB1*15	0,69%
A*02 B*40 DRB1*04	0,68%
A*24 B*35 DRB1*13	0,68%

Fonte: Dados gerados pelo programa Arlequin 3.5, em 16/12/2011, às 20:14:40.

TABELA 3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), número de Heterozigotos Observados, número de Heterozigotos Esperados, valor de P e Desvio Padrão no universo amostral de 12.973 cadastros provenientes do Rio Grande do Norte.

Locus	Obs. Het.	Exp. Het.	P-value	s.d.
A	0.88545	0.88983	0.12772	0.00014
B	0.93671	0.93833	0.11127	0.00016
DRB1	0.89008	0.89613	0.44853	0.00036

Fonte: Dados gerados pelo programa Arlequin 3.5, em 16/12/2011, às 20:14:40. *Legenda:* Obs. Het. – Heterozigotos Observados; Exp. Het. – Heterozigotos Esperados; P-value – valor de P; s.d. – Desvio Padrão.

De acordo com a análise proporcionada pelo programa Arlequin 3.5.1.2, os cinco alelos mais freqüentes do locus HLA-A na população do Rio Grande do Norte são o A*02 (25,42%), A*24 (10,20%), A*01 (8,68%), A*03 (7,66%) e A*68 (6,57%), como consta na TABELA 1. O perfil alélico do locus A indica, quando analisado como um todo, uma influência espanhola considerável na formação étnica dos norte-rio-grandenses, tendo em vista que, através da Análise de Componente Principal - PCA, se verificou grande proximidade entre as amostras Spain Murcia e do Rio Grande do Norte.

O perfil alélico em estudo também muito se assemelha ao da população de Hispânicos dos Estados Unidos da América - EUA, representado pela amostra USA Hispanic pop 2. Tal constatação já era previamente esperada e plenamente justificável, já que este grande grupo populacional é composto por latino-americanos cuja formação étnica obviamente apresenta pontos convergentes com a dos norte-rio-grandenses, a saber: uma contribuição européia, indígena e africana em proporções variadas, proporções estas cujo nível de relevância vem a compor um mosaico étnico característico da região estudada.

No que tange ao locus HLA-B, os cinco alelos mais freqüentes são o B*44 (11,25%), B*35 (10,76%), B*15 (9,71%), B*51 (7,72%) e o B*07 (6,48%), como se pode observar na TABELA 1 e na FIGURA 2. O perfil alélico de tal locus, à semelhança do que ocorreu em relação ao locus A, demonstrou, quando submetido ao PCA (vide FIGURA 5), uma forte proximidade genética entre as amostras do Rio Grande do Norte e USA Hispanic pop 2, a qual pode ser compreendida pelas razões já expostas.

No locus DRB1, os cinco alelos mais freqüentes foram o DRB1*13 (15,54%), DRB1*04 (14,04%), DRB1*07 (12,05%), DRB1*01 (10,03%) e DRB1*11 (9,82%). O Rio Grande do Norte ficou, no que tange à PCA do locus DRB1, em um meio-termo em relação aos portugueses, azorianos, franceses e caucasianos (EUA) e em relação aos hispânicos (EUA).

Por fim, é pertinente mencionar as frequências haplotípicas de nossa população. Os três haplótipos mais encontrados no RN, conforme a TABELA 2, foram: A*01 B*08 DRB1*03 (1,62%), A*29 B*44 DRB1*07 (1,56%) e A*02 B*44 DRB1*04 (1,29%).

Um dado de grande valor em estudos populacionais é o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o qual, estatisticamente, é demonstrado quando o valor de P é maior que 0,05. O universo amostral com que se operou se encontra em EHW em todos os loci (TABELA 3). Outra informação a ser destacada é que o número de heterozigotos esperado excede o observado em todos os loci, isto é, há um ligeiro excesso de homozigotos no banco.

CONCLUSÃO

Os resultados alcançados auxiliarão os programas de transplante de órgãos a definir a probabilidade de se encontrar doador e a definir o Painel Reativo de Anticorpos calculado (PRAc) adequado à realidade da população do RN.

Palavras-Chave: xHLA. PRA calculado. Frequência alélica.