

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
VINICIUS NAVEGA STELET

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE TIPAGEM HLA POR  
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO PARA IMPLEMENTAÇÃO  
NO LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA DO CEMO/INCA

RIO DE JANEIRO  
2018

VINICIUS NAVEGA STELET

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE  
TIPAGEM HLA POR SEQUENCIAMENTO  
DE NOVA GERAÇÃO PARA  
IMPLEMENTAÇÃO NO LABORATÓRIO DE  
IMUNOGENÉTICA DO CEMO/INCA

Volume 1

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós graduação de Mestrado  
Profissional para formação em Pesquisa  
Biomédica, Instituto de Biofísica, Universidade  
Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

RIO DE JANEIRO

2018

Stelet, Vinicius Navega

Avaliação de protocolos de tipagem HLA por sequenciamento de nova geração para implementação no laboratório de imunogenética do CEMO/INCA. / Vinicius Navega Stelet. – Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2018.

xi, 99 f.: il. ; 31 cm.

Orientadora: Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional para formação em Pesquisa Biomédica, 2018.

Referências bibliográficas: f. 70-71.

1. Teste de Histocompatibilidade. 2. Genes Classe I do Complexo de Histocompatibilidade (MHC). 3. Genes Classe II do Complexo de Histocompatibilidade (MHC). 4. Sequenciamento de Nucleotídeos em larga escala. 5. Transplantes. 6. Diagnóstico. Biomédica. – Dissertação. I. Abdelhay, Eliana Saul Furquim Werneck. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional para formação em Pesquisa Biomédica. III. Título.

**VINICIUS NAVEGA STELET**

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE  
TIPAGEM HLA POR SEQUENCIAMENTO  
DE NOVA GERAÇÃO PARA  
IMPLEMENTAÇÃO NO LABORATÓRIO DE  
IMUNOGENÉTICA DO CEMO/INCA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação de Mestrado Profissional para formação em Pesquisa Biomédica, Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aprovada em: Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de fevereiro de 2018

---

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay  
Instituto Nacional de Câncer

---

Dr. Turan Peter Urmenyi  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira  
Instituto Nacional de Câncer

## AGRADECIMENTOS

**Ao Senhor Jesus: Autor e Consumador de toda boa Obra! Que abre portas as quais ninguém pode fechar.**

À minha esposa, Giselle, cúmplice de todos os momentos. Suas palavras de motivação foram – e sempre são – combustível indispensável à concretização desta – e de todas – as minhas metas.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Eliana, por acreditar em meu potencial, dedicando ensinamentos, correções e direcionamentos assertivos que tornaram prazerosa a execução deste trabalho.

À equipe do laboratório de Imunogenética do INCA, cuja parceria tornou possível minhas ausências para experimentos, congressos, palestras, workshops... Melhor é serem dois do que um.

## RESUMO

STELET, Vinícius Navega. Avaliação de protocolos de tipagem HLA por sequenciamento de nova geração para implementação no laboratório de imunogenética do CEMO/INCA.. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado profissional para formação em pesquisa biomédica) – Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O aumento da demanda por tipagens de alta resolução para os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA) associado a um elevado polimorfismo desses genes são desafios para os laboratórios de Imunogenética. O padrão ouro – sequenciamento de Sanger - apresenta alto número de ambiguidades de tipagem e baixo número de amostras tipadas por corrida, tornando lenta a liberação de resultados. Sequenciadores de nova geração são alternativas por analisarem número maior de amostras e de genes HLA por corrida diminuindo incidência de ambiguidades. Para verificar a confiabilidade da tipagem HLA por sequenciamento de nova geração (NGS), testamos 4 protocolos em 3 plataformas NGS para implementação no laboratório de imunogenética do Instituto Nacional de Câncer. Submetemos, respectivamente, 12 e 32 amostras de DNA ao sequenciamento de 11 e 9 genes HLA nas plataformas Miseq (Illumina) e Ion S5 (ThermoFisher) conforme protocolos comerciais. Além disso, enviamos 384 a um serviço de tipagem HLA para 9 e 6 genes HLA nas plataformas MiSeq e PacBio, respectivamente. Calculou-se o número total de leituras, a cobertura, a mapeabilidade, o balanço alélico e o nível e tipo de erro de detecção de bases para determinar qual a melhor plataforma NGS. Problemas como contaminações, ambiguidades, - protocolos comerciais – e baixo rendimento – serviço de tipagem – foram observados. Comparando-se com Sanger, os protocolos NGS exibiram aumento no número de amostras, genes HLA e resolução de tipagem. As plataformas NGS geraram perfis diferentes de leituras. Ion S5 e Illumina apresentaram maior contagem de leituras e melhores níveis de mapeabilidade e cobertura. PacBio destacou-se no comprimento de suas leituras. MiSeq apresentou baixo nível de erro do tipo inserção/deleção. Portanto, na comparação com a tipagem por Sanger, protocolos NGS para tipagem HLA apresentam alto nível de concordância e ganhos quantitativos e qualitativos que favorecem sua adoção na rotina diagnóstica.

## ABSTRACT

High demand for human leukocyte antigen (HLA) genes high resolution typing in addition to the great polymorphism of these genes challenges Immunogenetics laboratories. Sanger sequencing presents a high number of typing ambiguities and low number of typed samples per run, slowing the release of results. Next generation sequencers (NGS) are alternatives by analyzing larger numbers of samples and HLA genes per run decreasing ambiguity rate. To verify the reliability of HLA typing by NGS, we tested 4 protocols on 3 NGS platforms for implementation in the immunogenetic laboratory of the National Institute of Cancer. We submitted, respectively, 12 and 32 DNA samples to the sequencing of 11 and 9 HLA genes on the Miseq (Illumina) and Ion S5 (ThermoFisher) platforms according to commercial protocols. In addition, we sent 384 samples to check two HLA typing services for 9 and 6 HLA genes on the MiSeq and PacBio platforms, respectively. The total number of readings, coverage, mappability, allelic balance, and the level and type of base detection error were determined to find the best NGS platform. Problems such as contaminations, ambiguities on commercial protocols, and low yield on typing service were observed. Comparing with Sanger, NGS protocols exhibited increased numbers of samples, HLA genes and typing resolution. The NGS platforms generated different profiles of readings. Ion S5 and Illumina presented higher reading counts and better levels of mappability and coverage meanwhile PacBio stood out because of the length of his readings. MiSeq presented lower insertion/deletion error level. Therefore, in comparison with Sanger typing, NGS protocols for HLA typing have a high level of agreement and quantitative and qualitative gains that favor their adoption in the diagnostic routine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Fluxograma contendo a estrutura regimental do INCA e sua subdivisão nos diversos níveis hierárquicos.	01
Figura 02:	Localização e a organização do complexo HLA no braço curto do cromossomo 6	08
Figura 03:	Distribuição da frequência de mutações nos domínios da proteína HLA-B.	10
Figura 04:	Distribuição da frequência de mutações nos domínios da cadeia beta da proteína HLA-DR.	11
Figura 05:	Representação gráfica das moléculas HLA de classe I e II.	13
Figura 06:	Nomenclatura de um alelo HLA.	15
Figura 07:	Evolução do custo por megabase e por genoma sequenciado ao longo dos anos em comparação com o lançamento das novas plataformas de sequenciamento.	20
Figura 08:	Linha de sequenciadores que utilizam o princípio CRT fabricados pela Illumina, a líder mundial no mercado de NGS.	21
Figura 09:	Fotografia dos TGS da Pacific Biosciences e do chip SMRT (à direita) onde ocorrem as reações de sequenciamento paralelo	23
Figura 10:	Ambiguidade na sequência de uma região do gene HLA-B	24
Figura 11:	Etapas do preparo da biblioteca de NGS do protocolo Illumina02.	34
Figura 12:	Etapas do preparo da biblioteca de NGS do protocolo Illumina02.	35
Figura 13:	Modelo de amplificação dos genes HLA adotado por Ion.	37
Figura 14:	Etapas do preparo da biblioteca de NGS do protocolo Ion.	38
Figura 15:	Etapas de preparo da SMRTbell sequenciada na plataforma Pacbio.	40
Figura 16:	Comparações efetuadas para os dados de métricas de qualidade dos 4 protocolos HLA testados.	42
Figura 17:	Plotagem das frequências das bases em termos percentuais para os protocolos NGS Illumina02, Ion e PacBio.	58
Figura 18:	Plotagem das frequências dos erros de inserção encontrados ao longo do gene para os protocolos NGS Illumina02, Ion e PacBio.	59



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Segregação dos genes HLA em clássicos e não clássicos, e de classe I e II.	08
Tabela 02:	Número de alelos e proteínas HLA já descritos.	09
Tabela 03:	Nome, genes HLA abrangidos, número de amostras testadas e fabricantes dos protocolos de tipagem HLA por NGS analisados.	31
Tabela 04:	Regiões dos genes HLA de classe I cobertas pelos protocolos de Sanger e de NGS testados.	32
Tabela 05:	Regiões dos genes HLA de classe II cobertas pelos protocolos de Sanger e de NGS testados.	32
Tabela 06:	Comparação dos valores de quantificação determinados por espectrofotometria e fluorimetria das amostras utilizadas no teste do protocolo Illumina02.	34
Tabela 07:	Comparação dos valores de quantificação determinados por espectrofotometria e fluorimetria das amostras utilizadas no teste do protocolo Ion.	36
Tabela 08:	Nível padrão dos filtros de qualidade aplicados pelo software NGSengine para avaliação de leituras e do alinhamento gerado para as plataformas NGS de tipagem HLA.	41
Tabela 09:	Variáveis utilizadas para verificar a qualidade das leituras geradas para cada protocolo NGS na tipagem de 6 genes HLA.	42
Tabela 10:	Tipagem HLA das 12 amostras submetidas ao protocolo Illumina02	44
Tabela 11:	Valores de Cobertura média (C) e porcentagem de bases com Q score acima de 30 encontrados pelo software Assign Trusight HLA para cada alelo tipificado pelo protocolo Illumina02	46
Tabela 12:	Tipagens obtidas pelo protocolo Ion para 9 genes	47
Tabela 13:	Mediana e respectivos 1º (Q1) e 3º (Q3) resumindo a distribuição das variáveis analisadas para os 4 protocolos NGS.	51
Tabela 14:	Frequências absoluta e relativa de valores de balanço alélico inferiores a 0,3 para cada protocolo entre os genes HLA classe I.	57
Tabela 15:	Frequências absoluta e relativa de valores de balanço alélico inferiores a 0,3 para cada protocolo entre os genes HLA classe II.	57
Tabela 16:	Tamanho absoluto (bases) e relativo das regiões UTR, éxons e introns de 11 genes HLA.	63

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 01:	Média do número total de leituras geradas por cada protocolo NGS para tipagem dos 6 genes HLA clássicos	52
Gráfico 02:	Porcentagem das leituras aprovadas para tipagem dos genes HLA geradas pelos diferentes protocolos NGS	52
Gráfico 03:	Comprimento médio das leituras geradas por cada protocolo NGS para os genes HLA classe I e II	54
Gráfico 04:	Cobertura média dos diferentes genes HLA por 3 protocolos NGS	54
Gráfico 05:	Média das coberturas mínima e máxima para os éxons 2 e 3 no protocolo Illumina01	55
Gráfico 06:	Balanço alélico para os 6 genes HLA clássicos por 3 protocolos NGS	55
Gráfico 07:	Distribuição das requisições de exames de tipagem HLA confirmatórios estratificados pela origem recebidos entre Janeiro de 2014 e Março de 2017.	60

**LISTA DE SIGLAS e ABREVIATURAS**

tRNA - ácido ribonucleico transportador  
ddNTP- di-desoxinucleotídeo trifosfatado  
dNTP - desoxinucleotídeo trifosfatado  
CEMO - Centro de Transplante de Medula Óssea  
CRT - *cyclic reversible termination*  
CTH - célula-tronco hematopoiética  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
EDTA - ácido etilenodiamotetracético  
H-2 - *histocompatibility locus 2*  
HLA - *human Leucocyte antigen*  
INCA - Instituto Nacional de Câncer  
L - *low*  
MHC - major Histocompatibility complex  
N - *null*  
ng - nanograma  
NGS - *next generation sequencing*  
nm - nanômetro  
NMDP- *National Marrow Donor Program*  
PCR - *polimerase chain reaction*  
pH - potencial hidrogeniônico  
REDOME - Registro de Doadores de Medula Óssea  
REREME - Registro de Receptores de Medula Óssea  
SGS - *second generation sequencing*  
SMRT - *single molecule real time sequencing*  
SNPs - *single nucleotide polymorphism*  
SSO - sequence-specific oligonucleotide  
TAE - Tris-acetato-EDTA  
TcR - *T-cell receptor*  
TCTH - transplante de célula tronco hematopoiética  
TGS - *third generation sequencing*  
ZMW - *zero mode waveguides*

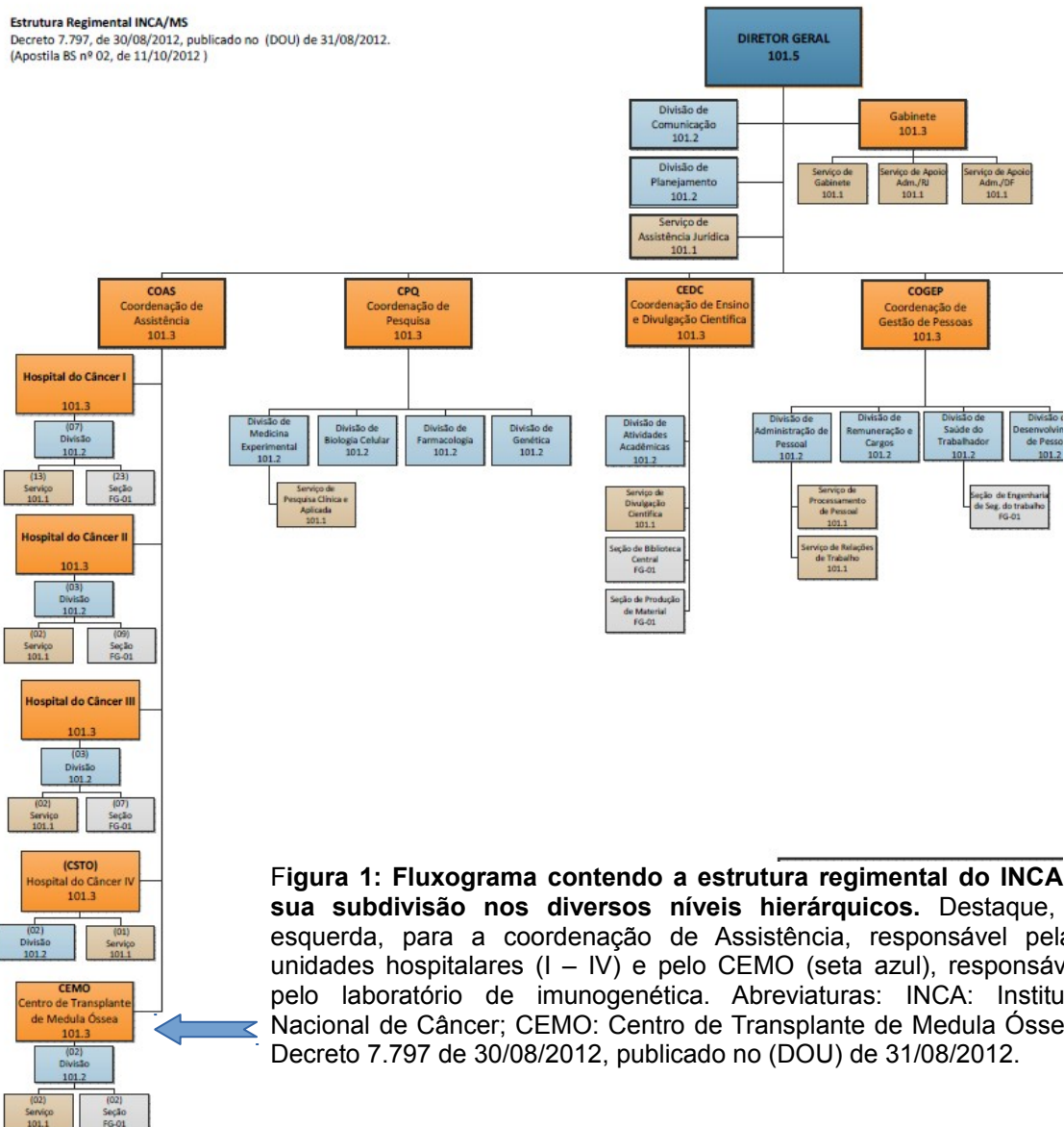
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 O laboratório de Imunogenética e suas atribuições	01
1.2 Um breve histórico	03
1.2.1 Os transplantes e o genoma	03
1.2.2 Os transplantes e o sistema imune	04
1.2.3 A descoberta do MHC humano	04
1.3 Os antígenos, não apenas leucocitários, humano	06
1.3.1 Estrutura dos genes HLA	06
1.3.2 Estrutura molecular das proteínas HLA	12
1.3.3 Função das moléculas HLA	12
1.3.4 O papel das proteínas HLA e os transplantes	14
1.3.5 Nomenclatura do sistema HLA	14
1.4 Níveis de resolução das tipagens HLA	16
1.4.1 Resolução alélica	16
1.4.2 Alta resolução	16
1.4.3 Média resolução	16
1.4.4 Baixa resolução	17
1.5 A tipagem HLA e a busca por um doador compatível	17
1.6 As plataformas de tipagem HLA	18
1.6.1 Sequenciamento de DNA clássico ou de Sanger	19
1.6.2 Uma nova geração de sequenciadores	19
1.6.3 Comparação de plataformas NGS	23
1.7 Plataformas de sequenciamento de DNA e a tipagem HLA	24
1.7.1 Protocolos comerciais de tipagem HLA por NGS	24
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivos específicos	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1 Isolamento e caracterização do material genômico	28
3.2 Seleção das amostras	28
3.3 Tipagem HLA pela plataforma de Sanger	29
3.4 Tipagem HLA pelas plataformas de sequenciamento de nova geração	30
3.4.1 Teste do protocolo comercial Illumina02	33
3.4.2 Teste do protocolo comercial Ion	35
3.4.3 Teste de um serviço internacional de tipagem HLA por NGS	38
3.4.4 Verificação da qualidade das leituras NGS	41
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
4.1 Tipagens geradas pelos protocolos comerciais	43
4.2 Tipagens geradas pelo laboratório Histogenetics	48
4.3 Análise da confiabilidade dos resultados obtidos por NGS	49
4.3.1 Comparação das tipagens obtidas por NGS com o padrão ouro	49
4.3.2 Verificação da qualidade das leituras NGS	50
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>72</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Laboratório de Imunogenética e suas atribuições

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) é o órgão auxiliar do Ministério da Saúde para desenvolvimento e coordenação de ações integradas em prevenção e controle do câncer. Ele é subdividido em 6 Coordenações, dentre elas a Coordenação de Assistência, responsável pelas 5 unidades hospitalares do Instituto, os Hospitais do Câncer I, II, III, IV e o Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), conforme demonstrado na figura 1.



O CEMO é a unidade do INCA especializada em transplantes de células-tronco hematopoéticas (CTH) para pacientes acometidos por neoplasias hematológicas, síndromes de falência medular, imunodeficiências e alguns tipos de tumores ou doenças genéticas. Em suas dependências são realizados em torno de 96 transplantes por ano, tanto autólogos – uso de CTHs do próprio paciente – como alogênicos – uso de CTH de um doador.

Além de realizar TCTHs entre indivíduos aparentados em suas dependências, o CEMO também contribui para os TCTHs do tipo não-aparentados realizados em todo o país. Ele coordena as Gerências de Busca – conhecida como REREME (registro de receptores de medula óssea) - e de Cadastro de Doadores de Medula Óssea – REDOME (Registro de Doadores de Medula Óssea). Estes dois serviços recebem cadastros tanto de pacientes com indicação para o TCTH (receptores) quanto de candidatos a doação de CTHs, respectivamente. O REDOME é o terceiro maior cadastro mundial desta natureza, com mais de 4 milhões de inscritos. Seus dados são cruzados com os dos pacientes do REREME e de outros registros mundiais na busca pelo melhor doador não-aparentado disponível para cada receptor.

Esta busca só é possível porque os inscritos no REDOME já contam com perfil genético parcialmente determinado (média resolução) para a região genômica HLA (*Human Leucocyte Antigen*), a mais importante em termos de sucessos de TCTHs.

Para dar apoio às atividades da triagem e avaliação prévias e posteriores ao enxerto de CTH, foi criada uma Divisão de Laboratórios dedicada aos transplantes realizados no CEMO. Ela é dividida em 6 grupos de trabalho (laboratórios) que desenvolvem exames de rotina e estratégias terapêuticas, além de realizar atividades de pesquisa, nas áreas de Biologia Molecular, Citogenética, Células-Tronco, Processamento e criopreservação, Imunologia e Imunogenética.

O Laboratório de Imunogenética atua na rotina de TCTHs aparentados do CEMO caracterizando o receptor e seus irmãos investigando atributos genéticos e humorais da região HLA. Após análise dos haplótipos familiares, um laudo final informa ao médico responsável a existência ou não de um doador aparentado compatível.

Além de contribuir para os transplantes realizados no CEMO, o laboratório de Imunogenética do INCA e outros laboratórios do país auxiliam na manutenção e renovação do REDOME e atendendo requisições internacionais de tipagem HLA confirmatória de doadores brasileiros. Em menor escala, solicitações de outros centros transplantadores da rede hospitalar federal do Rio de Janeiro, como o Hospital da Lagoa e o Hospital dos Servidores, também são atendidas.

Face a destacada relevância estratégica para a saúde pública a nível nacional e mundial, o Laboratório de Imunogenética do CEMO busca o domínio das estratégias mais eficientes para cumprimento de suas atribuições. Para entender melhor a importância e a maneira como determina-se a histocompatibilidade para TCTHs, é necessário apresentar um pouco a respeito da história e as características biológicas do grupo de genes tipificado nas análises de histocompatibilidade. Veremos que a história de sua descoberta permeia justamente seu relevante papel na rejeição de enxertos – órgãos ou tecidos transplantados. Eles são os genes do complexo principal de Histocompatibilidade (MHC) Humano, conhecidos como antígenos leucocitários humanos: HLA.

## **1.2 Um breve histórico**

### **1.2.1 Os transplantes e o genoma**

A troca ou reposição de partes do corpo humano já consta em registros do primeiro século depois de Cristo, versando sobre transplantes de pele autólogos para reparo de narinas danificadas (BARKER,2013). Entretanto, as primeiras evidências científicas sugerindo fatores associados ao sucesso ou fracasso dos transplantes começaram a surgir apenas no início do século XX, com os achados de Gorer e Snell (1948).

Seu trabalho conjunto levou à inédita descrição, em camundongos, de um gene associado aos transplantes que foi chamado H-2 (*histocompatibility locus 2*). Este locus apresentava papel principal em termos de histocompatibilidade de tecidos, haja vista os quadros mais severos de rejeição de transplantes estarem relacionados a diferenças entre o doador e o receptor nesta região do genoma murino.

### 1.2.2 Os transplantes e o sistema imune

No período final da segunda guerra mundial, Medawar estudou o comportamento de enxertos de pele em coelhos e humanos, trazendo evidências experimentais da participação do Sistema Imune na reação de rejeição a enxertos. Observou que sucessivos enxertos entre um mesmo par doador-receptor apresentavam velocidades de rejeição diferentes, sendo os enxertos mais tardios rejeitados mais precocemente que os primeiros. E concluiu que cada contato com as células do doador tornava o sistema imune do receptor mais sensibilizado (MEDAWAR,1944; GIBSON; MEDAWAR,1943).

Medawar passou a ser conhecido como o “Pai da Transplantação” e recebeu o Prêmio Nobel em 1960 por suas contribuições neste campo da Medicina (STARZL,1995).

### 1.2.3 A descoberta do MHC humano

Jean Dausset, partindo dos postulados de Gorer, Snell e Medawar, organizou um sistema de detecção e identificação de anticorpos pré-formados no soro de pacientes que sofreram muitas transfusões sanguíneas. Este soro era colocado em contato com uma série de populações (painel) de leucócitos de indivíduos sadios, buscando-se anticorpos contra antígenos destas células (THORSBY,2009; DAUSSET,1958).

A presença no soro do paciente de anticorpos contra os leucócitos do doador, era identificada por uma reação de aglutinação. Este resultado significava que aquele paciente fora sensibilizado previamente por antígenos semelhantes aos presentes nos leucócitos daquele doador. O que provou ser uma contraindicação para um possível transplante entre este par doador-receptor.

Dausset conseguiu isolar painéis de leucócitos que apresentavam uma taxa de aglutinação mais baixa que os demais chamando-os *Mac* (iniciais dos nomes dos 3 respectivos pacientes). Também identificou 6 soros de pacientes que não aglutinavam painéis de leucócitos *Mac* positivos, porém, aglutinavam outros.



Esse foi o primeiro relato de uma ferramenta diagnóstica capaz de separar amostras em dois grandes grupos: antígenos Mac positivos e antígenos Mac negativos (DAUSSET,1958).

Numa colaboração mundial para reunir os antígenos e anticorpos encontrados por outros pesquisadores, buscou-se uniformizar a nomenclatura e a metodologia para garantir a comparação e a reprodutibilidade das tipagens, Bernard Amos promoveu, em 1964, o primeiro Workshop Internacional de Histocompatibilidade. Neste encontro Paul Terazaki apresentou uma plataforma de tipagem sorológica destes antígenos: o teste de microlinfocitotoxicidade, que acabou sendo adotado por vários laboratórios, além de divulgar os resultados de um estudo associando a rejeição aguda no transplante renal e o resultado positivo para *reação cruzada* entre anticorpos do soro do receptor e leucócitos do doador (TERASAKI,1962,1963,1964).

Gatti *et al* (1968) conseguiram realizar os primeiros transplantes de medula óssea bem-sucedidos em humanos, escolhendo o melhor doador entre os familiares dos pacientes com base na tipagem HLA disponível para época.

Porém, apenas em 1975, o papel biológico destas moléculas que influem diretamente nos transplantes começou a ser descrito pelos experimentos de Zinkernagel *et al* (1975). Eles inocularam o vírus causador da meningite em camundongos e verificaram que a ativação dos linfócitos T depende tanto dos antígenos virais quanto dos antígenos da transplantação, também chamados de MHC.

Logo verificou-se que a principal função deste MHC seria sinalizar possíveis alterações fisiológicas nas células ao sistema imune. Portanto, o alto grau de polimorfismo observado nessas moléculas é uma forma de minimizar a possibilidade de não existir, numa população, indivíduos capazes de apresentar, via moléculas HLA, os antígenos de um patógeno novo aos linfócitos T. Aumentando-se, então, as chances de sobrevivência da espécie. (ZINKERNAGEL; DUNLOP; DOHERTY,1975).

A região do MHC humano é uma das mais estudadas e caracterizadas do genoma, o que rendeu, àqueles que lançaram seus fundamentos, dois prêmios Nobel em Fisiologia e Medicina: em 1980 - Dausset e Snell - e em 1996 - Doherty e Zinkernagel.

### **1.3 Os antígenos não apenas leucocitários Humanos**

Na literatura, encontramos duas siglas principais que designam os antígenos que são relacionados a histocompatibilidade: MHC e HLA.

HLA diz respeito às primeiras observações destas moléculas na membrana de leucócitos humano. Apesar destas células não serem as únicas que as expressam, a nomenclatura HLA persiste principalmente na literatura clínica, designando os genes e as moléculas relacionados ao processo de apresentação de antígeno aos linfócitos **T** em humanos.

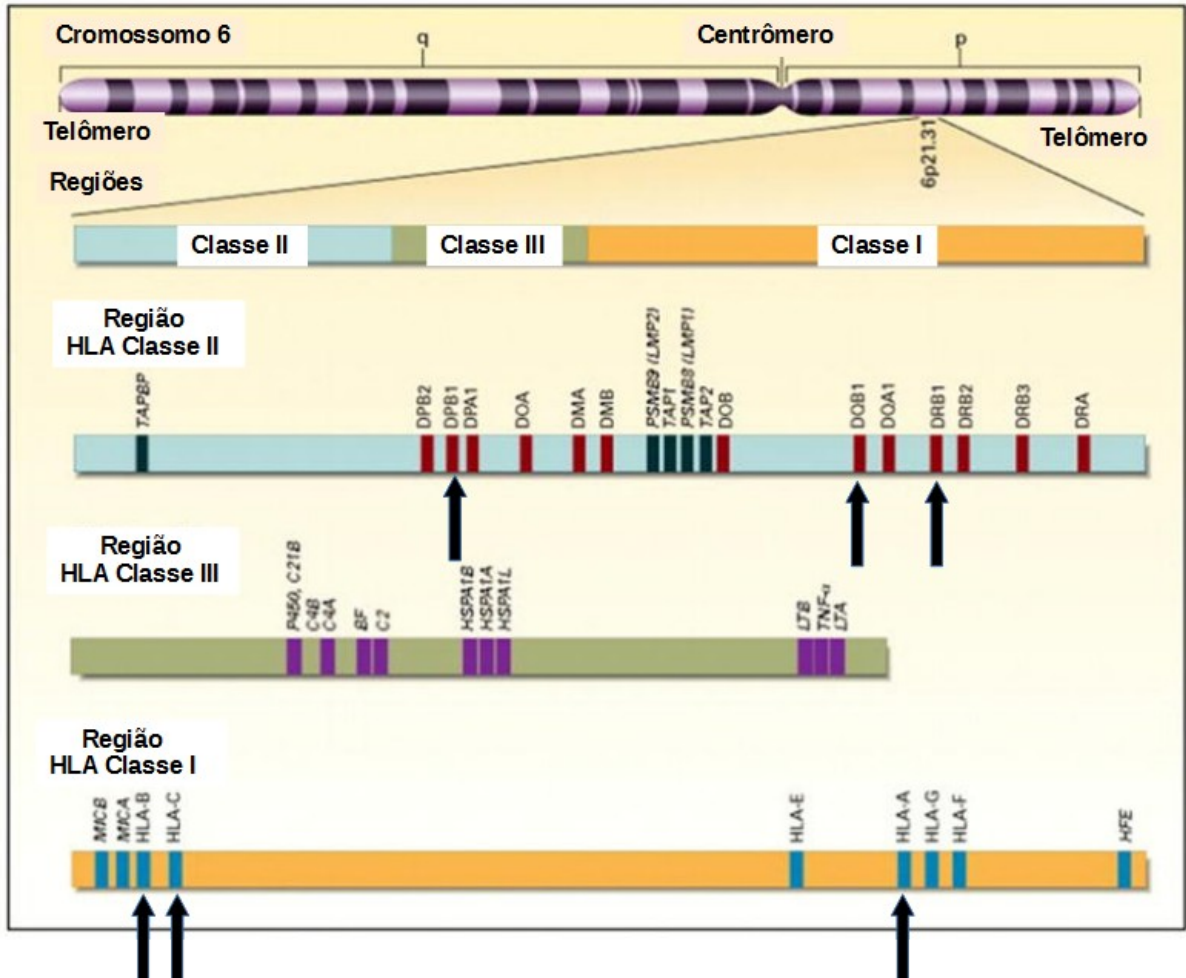
#### **1.3.1 Estrutura dos genes HLA**

O primeiro mapa do MHC humano foi publicado em 1991 (TROWSDALE; RAGOUSSIS; CAMPBELL,1991), e sofreu sucessivas atualizações até a versão atual (HORTON et al, 2004). A região do MHC humano compreende uma grande região genômica que ocupa 7,6 Mb do braço curto do cromossomo 6 e agrupa genes que codificam desde a síntese de tRNA, histonas e proteínas com domínio dedo de zinco até aqueles com papel imune mais evidente, como citocinas e as moléculas HLA propriamente ditas.

As regiões do MHC humano conhecidas como *supercluster* HLA classe I e o *cluster* HLA classe II (HORTON et al, 2004) abrigam os genes mais importantes na determinação dos perfis de histocompatibilidade para transplantes, em destaque na figura 02. Cada um destes dois grupos de genes pode ser subdividido em clássicos ou não clássicos, conforme a tabela 01.

Apesar dos HLAs não-clássicos também apresentarem um papel importante na modulação do sistema imune, como o efeito imunossupressor atribuído ao HLA-G (WLASIUK,2016), as divergências entre doador e receptor quanto aos HLAs clássicos parecem ser mais impactantes no desfecho dos transplantes de medula óssea (SASAZUKI *et al*,1998; PETERSDORF *et al*, 2001). Os genes HLA clássicos são expressos de maneira codominante e tem como principal característica o alto grau de polimorfismo, conforme podemos observar na tabela 02. Atualmente, são conhecidos mais de 15.000 alelos e 11.000 proteínas HLA, sendo o gene HLA-B o mais polimórfico do genoma humano.

A maioria das variantes identificadas são trocas de um nucleotídeo (SNP), porém, também há deleções, inserções e mutações de troca de quadro de leitura. Além disso, as variantes não ocorrem de maneira uniforme ao longo do gene, concentrando-se principalmente nos éxons codificantes do domínio de ligação ao peptídeo. Conforme as figuras 03 e 04, as regiões mais polimórficas nos genes HLA classe I são os éxons 2 e 3 e, nos genes de classe II, o éxon 2, com destaque para a cadeia beta (HLA-DRB1, HLA-DPB1 e HLA-DQB1).



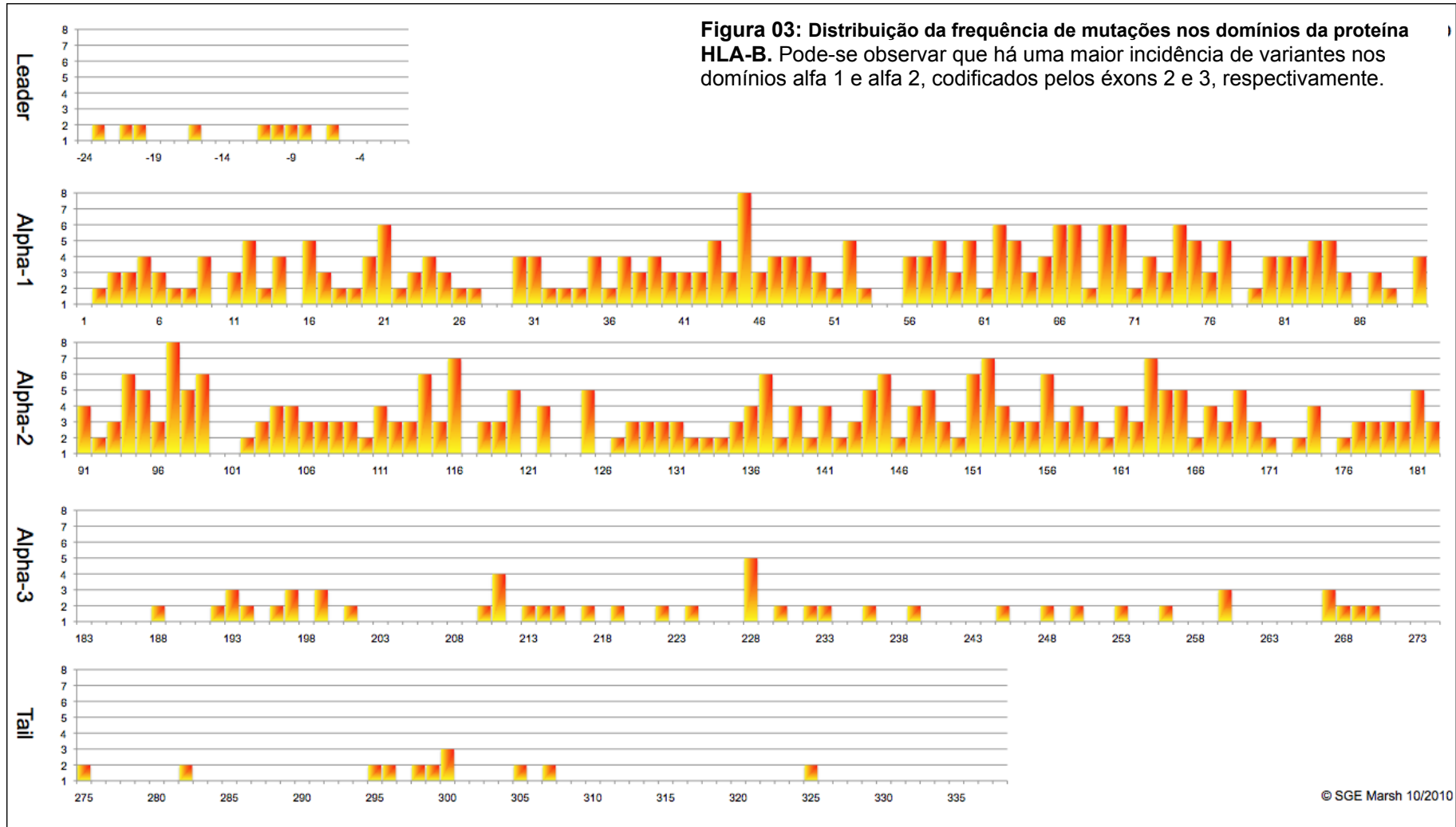
**Figura 02: Localização e a organização do complexo HLA no braço curto do cromossomo 6.** De cima para baixo, observam-se diversas visões ampliadas deste complexo. A primeira delas demonstra a separação dos genes em 3 grandes classes: I, II e III; a segunda, destaca os genes da região HLA classe II; a terceira, os genes HLA de classe III e a última, os genes HLA classe I. Setas indicam os principais genes HLA na determinação da histocompatibilidade. Adaptado de Klein (2000).

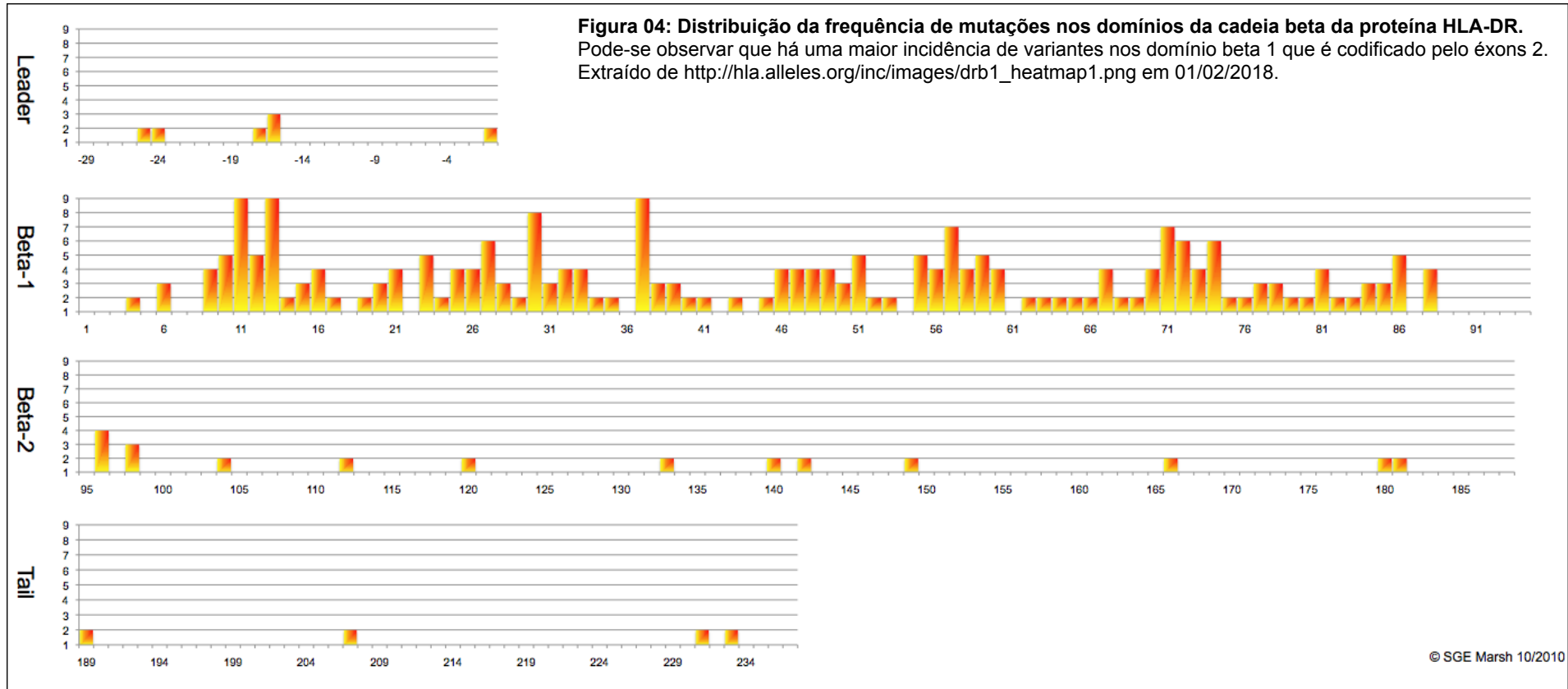
**Tabela 01: Segregação dos genes HLA em clássicos e não clássicos, e de classe I e II.** Os genes clássicos são aqueles com papel mais bem descrito nos processos fisiológicos de tolerância/rejeição ao enxerto de CTHs.

		Genes HLA	
		Clássicos	Não-clássicos
Classe	I	A, B, C	E, F, G
	II	DRA, DRB1, DQA, DQB1, DPA, DPB1, DRB3, DRB4, DRB5	DM, DO

**Tabela 02: Número de alelos e proteínas HLA já descritos.** Em negrito, os genes clássicos. Destaque para o maior polimorfismo observado nos genes HLA clássicos de classe I (A – C), bem como para aqueles que codificam a cadeia beta dos genes HLA de classe II (DRB, DQB, DPB). \* O gene HLA-B é o mais polimórfico do genoma humano. (IMGT/HLA *database*. Extraído em 21/12/2017).

Gene HLA	Classe	nº alelos		Nº de proteínas
		expressos	nulos	
<b>A</b>	I	3997	186	2792
<b>B</b>	I	4859*	147	3518
<b>C</b>	I	3290	131	2497
<b>DRA</b>	II	7	0	2
<b>DRB 1</b>				
<b>DRB 3</b>	II	145	4	119
<b>DRB 4</b>	II	66	7	52
<b>DRB 5</b>	II	54	3	48
<b>DQA1</b>	II	92	3	35
<b>DQB1</b>	II	1152	31	779
<b>DPA1</b>	II	56	0	26
<b>DPB1</b>	II	942	22	655
<b>E</b>	I	26	1	8
<b>F</b>	I	26	0	5
<b>G</b>	I	56	2	18
<b>DRB 2</b>	II	1	0	0
<b>DRB 6</b>	II	3	0	0
<b>DRB 7</b>	II	2	0	0
<b>DRB 8</b>	II	1	0	0
<b>DRB 9</b>	II	1	0	0
<b>DMA</b>	II	7	0	4
<b>DMB</b>	II	13	0	7
<b>DOA</b>	II	12	1	3
<b>DOB</b>	II	13	0	5





### **1.3.2 Estrutura molecular das proteínas HLA**

A molécula HLA é composta por duas cadeias de proteínas que podem apresentar-se como homodímeros constituídos de uma cadeia alfa e outra beta (HLAs classe II); ou heterodímeros, com uma cadeia alfa e uma cadeia beta2-microglobulina (HLAs classe I). Esta cadeia beta2-microglobulina apesar de desempenhar importante função estabilizadora da cadeia pesada não é considerada do grupo HLA. Portanto, para os HLA classe I, considera-se apenas a sequência da cadeia alfa.

Cada cadeia HLA pode ser subdividida nos seguintes domínios: cauda citoplasmática, transmembrana (que permite seu ancoramento na bicamada lipídica) e extracelular.

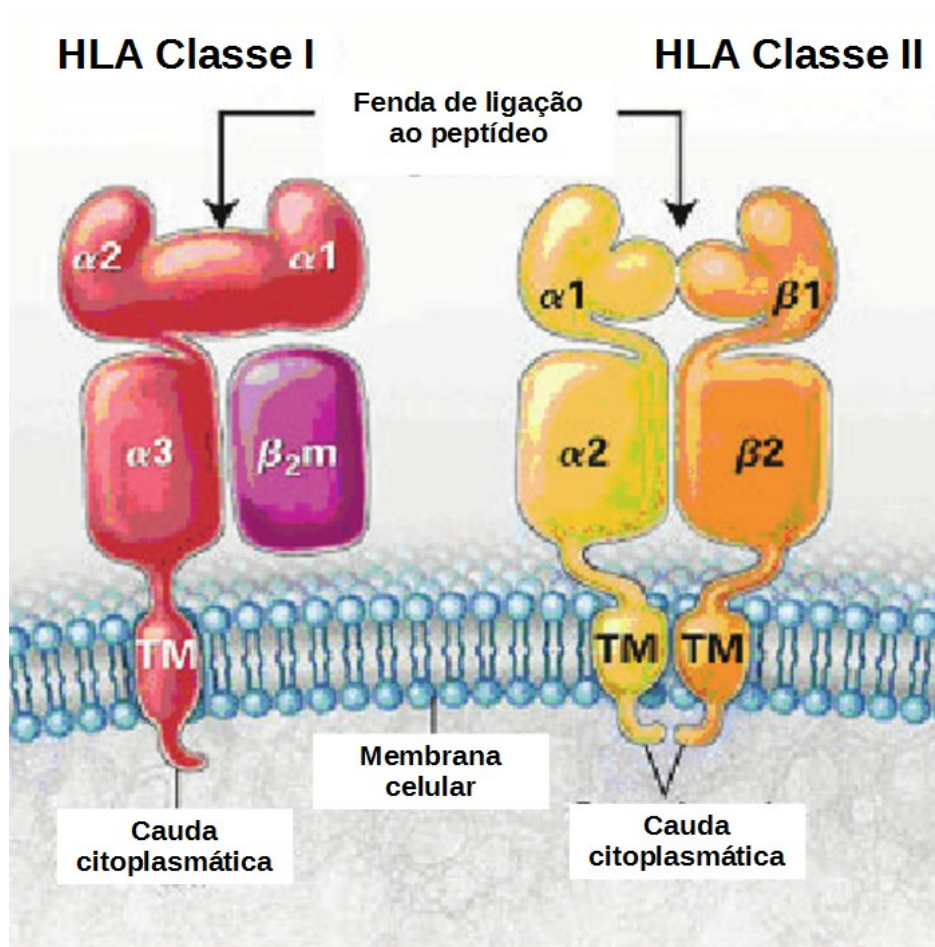
Do ponto de vista clínico e diagnóstico em histocompatibilidade, a porção extracelular da molécula parece ser a mais relevante, mais especificamente a região da fenda de ligação ao peptídeo, por ser a responsável pela apresentação do peptídeo e sinalização ao linfócito T.

Conforme a figura 05, nas moléculas de classe I, esta fenda é formada pelos domínios alfa 1 e alfa 2 da cadeia pesada; enquanto que na classe II, temos os domínios alfa 1 e beta 1 das cadeias alfa e beta, respectivamente.

### **1.3.3 Função das moléculas HLA**

A principal função das moléculas HLA clássicas é viabilizar a apresentação de peptídeos aos linfócitos T. De um lado, temos a célula apresentando, na sua membrana externa, moléculas HLA associadas a seus respectivos peptídeos; de outro, os linfócitos T que, através de seus receptores de célula T (TcR), “verificam” os complexos HLA-peptídeo. Se a ligação dos TcRs ao complexo HLA-peptídeo for de afinidade superior ao limiar de ativação, o linfócito passará por uma expansão clonal e poderá exercer sua atividade efetora.





**Figura 05: Representação gráfica das moléculas HLA de classe I e II.** À esquerda, a molécula HLA classe I com as cadeias pesada (vermelha) e leve - beta2 microglobulina (roxo). À direita, a molécula HLA classe II, composta de uma cadeia alfa (amarelo) e beta (laranja). Na porção extracelular, a parte mais importante da molécula, a fenda de ligação ao peptídeo, formada pelos domínios alfa 1 e 2 (HLA classe I) ou alfa 1 e beta 1 (HLA classe II). Finalmente, a cauda citoplasmática e a região transmembrana (TM) formam o restante da molécula. Adaptado de Klein (2000).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem os peptídeos de origem endógena, fruto do metabolismo daquela célula, apresentados via HLA de classe I. Quando estes linfócitos são ativados, geram uma resposta citotóxica levando à eliminação da célula. Os HLAs clássicos de classe I são encontrados na maioria das células nucleadas.

Em contrapartida, a população T CD4<sup>+</sup> reconhece antígenos do meio extracelular que são fagocitados, processados e apresentados via HLA de classe II pelas células apresentadoras de antígenos. Este linfócito ativado passa a liberar citocinas pró-inflamatórias estimulando a célula fagocítica e o próprio linfócito.

### **1.3.4 O papel das proteínas HLA e os transplantes**

Do ponto de vista da histocompatibilidade, o melhor enxerto (órgão ou tecido transplantado) é aquele que expressa as mesmas moléculas HLA já presentes no receptor. Nos transplantes de órgãos sólidos (rim, pulmão, coração), o novo órgão deverá ser preservado da ação de um sistema imune já bem estabelecido no organismo do receptor, que é tolerante ao perfil HLA do receptor.

Nos transplantes de medula óssea, por estarmos inserindo novos progenitores celulares e, logo, novas células do sistema imune no receptor, pode ocorrer um quadro de rejeição peculiar: a doença do enxerto contra o hospedeiro. Ela consiste na ação do novo sistema imune contra as células do receptor, provocando um quadro inflamatório generalizado que pode levar ao óbito. Portanto, buscar o melhor doador de medula óssea – aquele que não apresenta divergências quanto ao perfil HLA – é etapa crucial no sucesso destes transplantes.

Atualmente, conforme a estratégia de busca do doador, são empregadas diferentes estratégias de tipagem HLA gerando resultados em variados níveis de resolução.

### **1.3.5 Nomenclatura do sistema HLA**

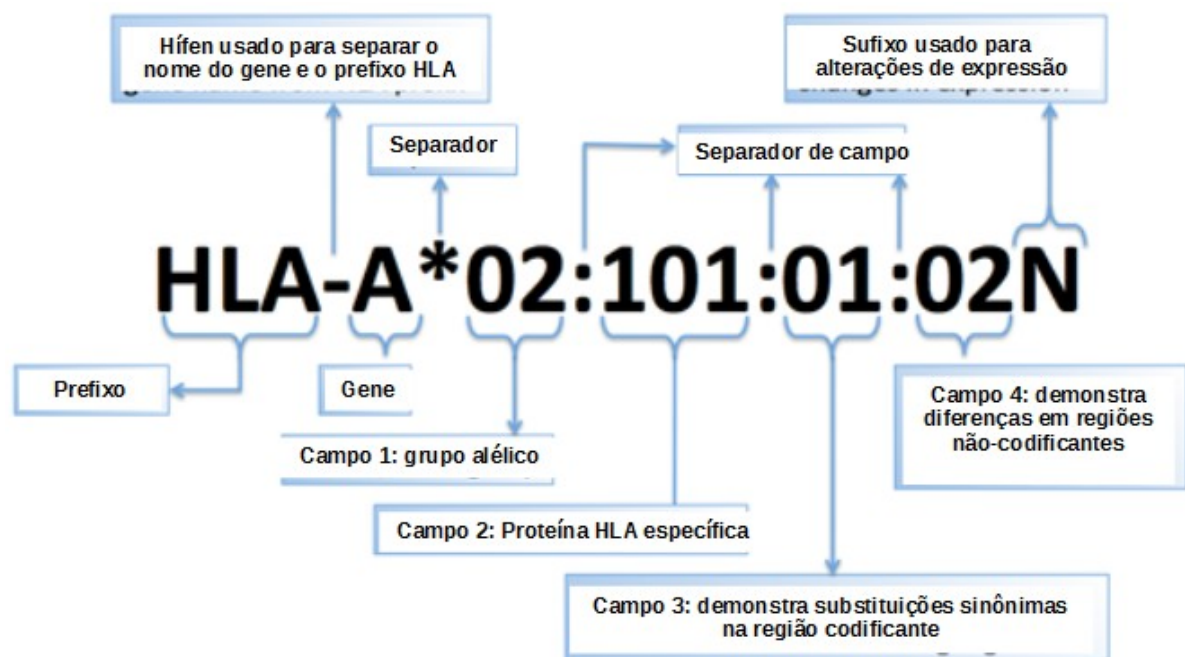
Conforme demonstrado na figura 06, o nome de cada alelo HLA é composto de um prefixo seguido de 2 a 4 campos numéricos separados por dois pontos, e, em alguns casos, um sufixo formado por uma letra. O prefixo é formado pela expressão “HLA”, um hífen e o nome do gene HLA em questão. O asterisco(\*) diferencia a nomenclatura do alelo para aquela da proteína HLA.

Os dois primeiros campos numéricos nomeando os alelos HLA são os mais importantes porque diferenciam uma cadeia proteica HLA de outra. O primeiro campo designa o grupo alélico, enquanto o segundo, o alelo dentro daquele grupo. Os outros dois campos numéricos – terceiro e quarto – não são obrigatórios, mas apenas utilizados quando descritos alelos que diferem da sequência referência por

possuírem variantes silenciosas em éxons – terceiro campo – ou mutações em regiões não codificantes – quarto campo.

Quanto ao uso dos sufixos, eles são empregados para denotar características do grau de expressão do alelo. Os sufixos mais comuns na rotina diagnóstica são “L” e “N” que correspondem a expressão baixa ou ausente do referido alelo, respectivamente.

Apesar da nomenclatura oficial prever a possibilidade de evidenciar diferenças sutis entre dois alelos, as estratégias diagnósticas mais empregadas têm grandes limitações que impedem determinar, com precisão, ambos alelos HLA em determinada amostra. Limitações metodológicas, como a análise com foco em apenas alguns éxons e as ambiguidades de fase inviabilizam o alcance do que chamamos de mais alto nível de resolução nas tipagens HLA.



© SGE Marsh 04/10

**Figura 06: Nomenclatura de um alelo HLA.** Como exemplo temos um dos alelos 101 (2º campo numérico), do grupo de alelos 02 (1º campo) do gene HLA-A (prefixo e gene). Este alelo foi nomeado por apresentar uma mutação numa região não codificante (4º campo) que, provavelmente, torna este alelo incapaz de sintetizar uma proteína, conforme descrito no prefixo N (nulo) acrescentado ao final. Adaptado de <<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>>. Consultado em 02/02/2018.

## **1.4 Níveis de Resolução das tipagens HLA**

### **1.4.1 Resolução Alélica**

Quando uma técnica de tipagem HLA consegue determinar com precisão os dois alelos para cada gene HLA, discernindo diferenças na sequência nucleotídica expressas até o último campo numérico possível, dizemos tratar-se de uma tipagem com resolução alélica. Estas plataformas são baseadas, geralmente, em sequenciamento de DNA. Obter tipagens a este nível de resolução requer o sequenciamento de todas as partes do gene (éxons, íntrons e regiões não-codificantes) (NUNES,2011).

### **1.4.2 Alta Resolução**

Quando uma estratégia de tipagem HLA é capaz de analisar - e distinguir - apenas as diferentes sequências que formam a fenda de ligação aos peptídeos nos alelos, dizemos que este é um resultado de alta resolução. Geralmente, para se alcançar este nível de resolução, deve-se sequenciar e determinar a fase dos éxons que codificam esta região da proteína, ou seja, éxons 2 e 3, nos alelos HLA classe I, e o éxon 2, para HLA classe II.

No resultado da tipagem usamos o nome do alelo de menor numeração, dentre aqueles possíveis, acrescido de um sufixo. Quando agrupamos alelos (não-nulos) que formam proteínas com aminoácidos da fenda semelhantes, empregamos o sufixo P. Quando a semelhança está na sequência nucleotídica que forma a fenda, usamos o sufixo G.

### **1.4.3 Média Resolução**

Dentre as plataformas já bem estabelecidas para diagnóstico HLA, aquelas com capacidade de analisar um maior número de amostras conseguem determinar com exatidão apenas o primeiro campo numérico (grupo alélico) acompanhado de um conjunto de possibilidades de alelos. Este tipo de tipagem HLA é enquadrada como de média resolução, geralmente formada pelo nome do alelo até o primeiro campo numérico, acrescido de um código de letras, chamado NMDP (*National Marrow*

*Donor Program*). Este código consiste em siglas de duas a cinco letras, que pode ser decodificada numa lista de possíveis alelos daquela amostra.

#### **1.4.4 Baixa Resolução**

Os resultados de tipagem HLA de baixa resolução são aqueles onde foi possível determinar apenas o grupo alélico do gene HLA tipificado. Apesar de ter sido amplamente utilizada pelos primeiros pesquisadores, foi praticamente abandonada pelos grandes laboratórios e registros mundiais, por trazer pouca informação face ao polimorfismo exuberante destes genes.

#### **1.5 A tipagem HLA e a busca por um doador compatível**

A busca pelo melhor doador de medula óssea tem início entre os irmãos do receptor da medula. O Laboratório de Imunogenética emprega duas plataformas de tipagem HLA por SSO (*sequence-specific oligonucleotide*) que fornecem resultados de média resolução para verificar a tipagem do paciente e seus irmãos para oito alelos (4 genes) HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 e HLA-DQB1) e identificar aquele(s) irmão(s) que compartilha(m) dos mesmos haplótipos do paciente, se for o caso. O resultado é reportado ao corpo clínico responsável.

Fracassando a busca por doadores aparentados, lança-se mão da base de dados do REDOME. Atualmente, os doadores cadastrados neste registro possuem apenas tipagem de média resolução para os genes HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1. Durante a busca por um doador compatível, aqueles identificados como possivelmente compatíveis à média resolução, tem, então, a tipagem HLA de média resolução para os genes HLA-C e HLA-DQB1 determinadas. Finalmente, novas amostras do receptor e do doador selecionado são encaminhadas para uma tipagem confirmatória por sequenciamento de DNA dos genes HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1 e HLA-DQB1, gerando resultados de alta resolução.

Como descrito, são necessárias várias etapas para determinar-se de maneira viável e segura o melhor doador não-aparentado disponível para um receptor de transplante de medula óssea. Para simplificar o processo, a inscrição dos doadores

no REDOME com tipagem para todos os genes HLA clássicos ao nível de alta resolução seria uma alternativa. Essa estratégia já tem sido adotada por alguns registros de doadores de medula em outros países. O registro chinês, somente entre fevereiro de 2011 e dezembro de 2012, incluiu 79.000 novos doadores no seu cadastro com tipagem de alta resolução dos genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 (ZHOU,2015). Desde 2015, o registro britânico passou a inscrever novos doadores com esse tipo de tipagem HLA, com 10.000 novas inscrições somente naquele ano. O Registro turco planeja inscrever anualmente 20.000 novos doadores com tipagem HLA pronta para análise final de histocompatibilidade frente aos receptores de medula óssea. Recentemente, o registro alemão publicou ter alcançado, em Junho de 2016, a marca de 2,7 milhões de amostras de doadores com tipagem HLA de alta resolução com aumento do número de amostras processadas por mês (de 30.000 para 110.000) e redução de mais de 50% nos custos (SCHOF,2017). Outros países como Estados Unidos, Suíça, Canadá e Cingapura também estão na lista de países que, atualmente, inscrevem doadores nos seus registros com tipagem HLA de alta resolução.

Este alto número de tipagens HLA de alta resolução foi alcançado com grandes investimentos nas plataformas de sequenciamento empregadas nos laboratórios de referência destes centros.

## **1.6 As plataformas de tipagem HLA**

No Brasil, atualmente, as diferentes etapas do processo de busca de doadores de medula demandam diversas técnicas de tipagem HLA que variam entre si conforme a resolução das tipagens que geram e a capacidade de processamento de amostras. Apesar do sequenciamento de DNA clássico gerar tipagens HLA de alta resolução, imprescindíveis no laudo final de histocompatibilidade, o baixo número de amostras capaz de ser analisado por ensaio torna inviável sua aplicação em larga escala. No Brasil, esta metodologia é empregada somente na fase final da busca por um doador compatível. Como alternativa, aplicam-se metodologias de tipagem HLA de menor resolução para as primeiras etapas da busca de potenciais doadores.

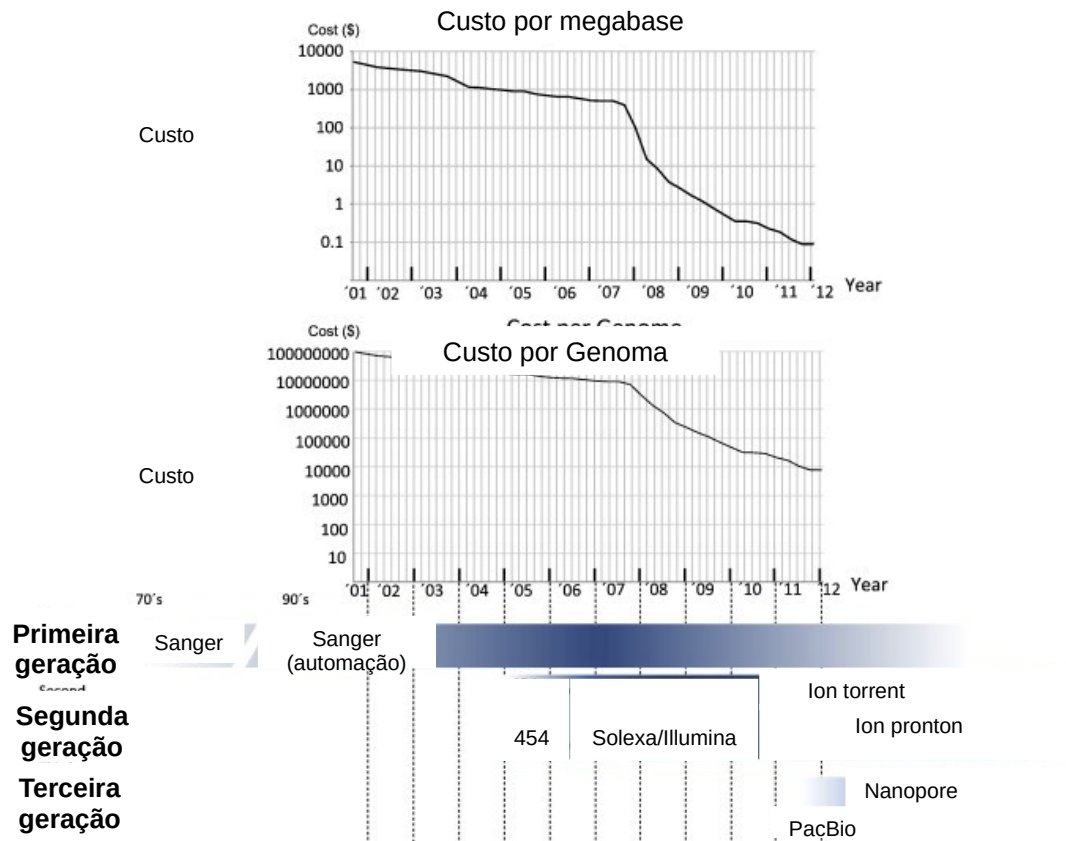
### **1.6.1 Sequenciamento de DNA clássico ou de Sanger**

O sequenciamento de DNA clássico foi proposto por Peter Sanger em 1977 como uma modificação da reação em cadeia da polimerase. Sanger aplicou desoxinucleotídeos (dNTPs) associados aos di-desoxi-nucleotídeos (ddNTPs), formas modificadas de dNTPs que não possuem o radical hidroxila ligado ao carbono 3'. Estas variantes, quando incorporadas à cadeia de DNA em síntese, inviabilizam a formação de novas ligações fosfodiéster. Esta estratégia de sequenciamento de DNA ficou conhecida como metodologia de terminação da síntese da cadeia de DNA (SANGER, 1977).

Entretanto, o sequenciamento de Sanger apresenta algumas limitações. Uma reação automatizada pode gerar no máximo 384 sequências de até 1000 bases de comprimento a uma taxa de 80-100 bases por hora. Variantes presentes em baixa frequência podem ser confundidas com o alto ruído inerente a esta técnica e o custo por base sequenciada é alto, conforme podemos verificar na figura 07. A fim de transpor tais barreiras, uma nova geração de sequenciadores, lançados a partir de 2004, tem revolucionado o campo da genômica, permitindo a geração de dados de sequenciamento de maneira massiva e paralela, reduzindo o tempo e os custos associados a estas reações.

### **1.6.2 Uma nova geração de sequenciadores de DNA**

Os principais fabricantes de sequenciadores de nova geração a Illumina® (*Mini-, Mi-, Next-, Hi-Seq*), a Thermo Fisher Scientific (Ion Torrent PGM® e Ion S5 ®) e a Pacific Bioscience (QUAIL, 2012). Devido a diferenças metodológicas entre elas, alguns autores classificam como de “primeira geração” o sequenciamento clássico proposto por Sanger, ao passo que dividem os equipamentos NGS em duas classes: segunda (SGS) e terceira geração de sequenciadores (TGS).








**Figura 07: Evolução do custo por megabase e por genoma sequenciado ao longo dos anos em comparação com o lançamento das novas plataformas de sequenciamento.** A partir de 2008, nota-se uma queda mais evidente no custo por megabase sequenciada e, conseqüentemente, por genoma.

Os protocolos SGS empregam a reação em cadeia da polimerase (PCR) na preparação da biblioteca de DNA a fim de amplificar o sinal detectado durante o sequenciamento. Já os TGSs são conhecidos por utilizar como molde na reação de sequenciamento até mesmo moléculas únicas de DNA.

O primeiro equipamento SGS foi lançado em 2004 pela 454 Life Sciences (MARGULIES,2005). Sua abordagem consiste na amplificação por PCR em emulsão de fragmentos únicos de DNA presos em microesferas. Em seguida, milhares destas esferas são carregadas numa placa de picotitulação contendo poços capazes de receber apenas uma esfera cada. O sequenciamento ocorre em todos os poços de maneira paralela, e a adição de base é detectada pela liberação do radical pirofosfato (pirossequenciamento) e a emissão de fluorescência.



Em 2006, a Solexa adquirida posteriormente pela Illumina, atual líder do mercado de NGS, lançou seu equipamento NGS baseado no princípio CRT (*cyclic reversible termination*) onde ciclos de adição de uma única base são executados. Numa lâmina de vidro, chamada *flow cell*, fragmentos de DNA contendo seqüências adaptadoras são retidas e amplificadas formando *clusters* (BENTLEY,2008). Estes agregados são sequenciados usando-se apenas nucleotídeos modificados capazes de impedir a extensão da cadeia temporariamente. Quando incorporados, eles são identificados por emitir fluorescência base específica sob a ação de um laser. Após o registro, o ciclo termina removendo-se o radical bloqueador e regenerando-se a hidroxila 3'. Atualmente, a Illumina disponibiliza uma vasta linha de sequenciadores para atender desde protocolos de sequenciamento com finalidade diagnóstica – sequenciamento de painel de genes e baixo volume de dados – até grandes estudos populacionais, conforme demonstrado na figura 08.

	 MiniSeq System	 MiSeq Series	 NextSeq Series	 HiSeq Series	 HiSeq X Series <sup>®</sup>
Aplicações	Sequenciamento de regiões -alvo, pequenos RNAs e painel de genes	Sequenciamento de pequenos genomas e painéis de genes	Sequenciamento de exomas, transcriptomas e ressequenciamento de regiões alvo	Sequenciamento de genomas em larga escala, exomas, transcriptomas	Sequenciamento completo de genomas humanos a nível populacional em larga escala
Dados gerados (Máximo)	7,5 Gb	15 Gb	120 Gb	1500 Gb	1800 Gb
Amplicons gerados (número)	25 milhões	25 milhões	400 milhões	5 bilhões	6 bilhões
Amplicons (tamanho máximo)	2 x 150 bp	2 x 300 bp	2 x 150 bp	2 x 150 bp	2 x 150 bp
Tempo de corrida	4 – 24hs	4 – 55hs	12 – 30hs	7 hs a 6 dias	Até 3 dias

**Figura 08: Linha de sequenciadores que aplicam o princípio CRT fabricados pela Illumina®, a líder mundial no mercado de NGS.** Da esquerda para a direita os equipamentos estão organizados em ordem crescente quanto à geração de dados e ao tempo por corrida, partindo de 7,5Gb e 4-24hs, respectivamente, até 1800Gb e 3 dias. Destaque para o MiSeq®, o equipamento da Illumina® mais estabelecido no mercado, que possui maior comprimento de seqüências geradas (2x 300bp).

O Ion Torrent foi lançado em 2010, usando uma abordagem semelhante ao 454, pois utiliza a PCR em emulsão de amostras imobilizadas em microesferas para a formação dos *clusters* de DNA que serão sequenciados. Entretanto, diferente de seu antecessor, que emprega detecção de nucleotídeos pela emissão de fótons, o Ion emprega um princípio mais simples e barato para detectar bases incorporadas pela DNA polimerase. Sua tecnologia de sequenciamento com semicondutores emprega microchips com sensores que detectam alterações na concentração de íons hidrogênio (pH). Estes prótons são liberados no meio reacional de maneira proporcional à adição de nucleotídeos durante a reação de sequenciamento. Nucleotídeos estes que não possuem radicais complementares (bloqueadores ou fluoróforos) e são infundidos no chip sequencialmente – um por vez – pelo equipamento.

O grande avanço introduzido por esta estratégia é dispensar o uso de nucleotídeos modificados e aparatos óticos, diminuindo o custo do equipamento e seus insumos bem como o tempo de corrida (ROTHBERG,2011). A Life/ThermoFisher disponibiliza, como a Illumina, plataformas voltadas para diagnóstico clínico, como o Ion PGM (*personal Genome machine*), e para aplicações que demandam maior volume de dados, como o Ion Proton. Recentemente, foi lançado no mercado o Ion S5, uma plataforma cuja operação é mais simples que a de seus antecessores.

A Nanofluidics, adquirida posteriormente pela Pacific Biosciences, desenvolveu a primeira estratégia capaz de sequenciar diretamente uma única molécula de DNA em tempo real, usando nucleotídeos marcados e chips SMRT (*single molecule real time sequencing*) dispensando amplificação prévia por PCR. Cada chip contém milhares de pequenos poços chamados ZMV (*zero mode waveguides*), onde são colocadas a amostra, uma enzima DNA polimerase fixa no fundo do poço, os nucleotídeos marcados e a uma câmera que registra num filme, em tempo real, as fluorescências emitidas pelos respectivos nucleotídeos adicionados (MOREY,2013).



**Figura 09: Fotografia dos TGS da Pacific Biosciences e do chip SMRT (à direita) onde ocorrem as reações de sequenciamento paralelo.** À esquerda, o primeiro modelo, PacBio RSII. No centro, seu contemporâneo, o PacBio Sequel, que promete um volume maior de dados por corrida maior que seu antecessor em 7x.

### 1.6.3 Comparação de plataformas NGS

Alguns trabalhos dedicaram-se a comparar o desempenho destes equipamentos constatando vantagens e desvantagens entre as diversas plataformas. Um estudo que comparou o desempenho do 454, do MiSeq e do Ion torrent PGM no sequenciamento de um genoma procarioto mostrou que, enquanto a cobertura ao longo do genoma é semelhante para as 3 plataformas, 454 produz a menor quantidade de dados por corrida porém as sequências de maior tamanho, em média 466 bases, seguido pelo MiSeq, com 214 bases e Ion Torrent com 195 bases. MiSeq apresentou os menores valores de erros tanto do tipo inserção/deleção quanto substituição de bases, seguido por 454 e Ion torrent. Entretanto, atualizações de reagentes do fabricante do Ion Torrent levaram a quedas de 3 a 4 vezes nas taxas de erro usando o kit de 100bp, o que demonstra que os protocolos NGS estão em constante aprimoramento (LOMAN,2012).

A principal vantagem da plataforma PacBio é o menor tempo de corrida e o maior tamanho das sequências geradas que, atualmente, já alcançou a marca de 10kb de comprimento médio, podendo mais da metade das sequências numa corrida alcançar 20kb. Entretanto, a baixa quantidade de dados gerados por corrida (0,5 - 1 bilhão de bases), a alta taxa de erro (11-15%) e o alto custo por base sequenciada são algumas das limitações desta plataforma (RHOADS,2015).

## 1.7 Plataformas de sequenciamento de DNA e a tipagem HLA

Atualmente, o grande desafio no desenho de protocolos de tipagem HLA para transplante de medula óssea é encontrar uma maneira viável de atingir-se o nível de resolução alélica. Isso significa solucionar numa única reação todas as possíveis ambiguidades. As principais barreiras encontradas pelo sequenciamento de Sanger para tipagem HLA são: (1) ocorrência de sequências heterozigotas que podem ser alinhada a mais de um par de alelos (figura 10; ambiguidade de fase ou Cis-trans); (2) não sequenciamento da região que solucionaria a ambiguidade; (3) ausência da informação completa da sequência de referência daquele alelo (ADAMS, 2004).

	Posição	5	5
		5	6
		9	0
B*070201	TGGAGGGC	GA	GTGCGTGGAG
B*0724	TGGAGGGC	CT	GTGCGTGGAG
B*3503	TGGAGGGC	CT	GTGCGTGGAG
B*3533	TGGAGGGC	GA	GTGCGTGGAG

**Figura 10: Ambiguidade na sequência de uma região do gene HLA-B.** O sequenciamento apenas do éxon 3 deste gene gera resultados semelhantes tanto para indivíduos com tipagem B\*07:02:01 B\*07:24 quanto B\*35:03 B\*35:33, ambos com as mesmas trocas de base nas mesmas posições (559 e 560). Adaptado de ADAMS, 2004.

Atualmente, o Laboratório de Imunogenética realiza a tipagem HLA de alta resolução utilizando um protocolo baseado na metodologia de Sanger que permite realizar a tipagem dos genes HLA clássicos de classe I e II (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) para apenas 6 amostras no sequenciador AB3500 *series*. A solução de ambiguidades é feita através do sequenciamento de outras regiões e/ou a comparação com resultados obtidos por outras técnicas.

### 1.7.1 Protocolos comerciais de tipagem HLA por NGS

Os protocolos de tipagem HLA por NGS mais empregados atualmente a nível mundial são aqueles oferecidos por empresas com notória tradição na fabricação de equipamentos NGS e na inovação e suporte em tipagem HLA.

Um dos maiores laboratórios de tipagem HLA no mundo, a Histogenetics, emprega um protocolo para a tipificação de 384 amostras simultaneamente ao nível de resolução de grupo G (analisando apenas os éxons mais polimórficos). Neste ensaio, além dos genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1, também HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5 e HLA-DPB1 são tipificados numa única rodada de sequenciamento no equipamento MiSeq (CEREB,2015). Em termos capacidade de geração de tipagens, comparando-se ambos protocolos (INCA/Sanger x Histogenetics/NGS), teríamos 60 alelos tipados pela estratégia INCA/Sanger (6 amostras x 10 alelos) contra 5376 pela plataforma Histogenetics/NGS (384 amostras x 14 alelos). A diferença entre ambos é de mais de 5000 tipagens por corrida.

Alternativamente, outros protocolos se utilizam de estratégias com foco na solução do maior número de ambiguidades possível. Para isso, sequenciam uma região maior dos genes HLA, incluindo éxons, íntrons e regiões não traduzidas, ao custo de sequenciar um menor número de amostras por corrida. Este é o caso dos protocolos fornecidos pelas empresas Illumina, One Lambda, GenDx, Omixon e Immucor.

Enquanto estas empresas disputam ativamente os mercados norte-americano e europeu de tipagem HLA por NGS, o mercado brasileiro ainda dá seus primeiros passos. Destaque-se o pioneirismo da Illumina®, que desde 2015 distribui seus produtos para HLA no país e, em 2016, realizou demonstrações de uma nova versão do seu protocolo.

Em contrapartida, outras empresas que possuem vasta tradição no campo da Imunogenética de Transplantes ainda não encontraram seu espaço no mercado brasileiro. A One Lambda®, empresa fundada em 1984, atualmente subsidiária da ThermoFisher, domina a maior parcela do mercado de tipagem HLA de média resolução brasileiro através de ser distribuidor local. Entretanto, seu produto para NGS, lançado no mercado americano em 2014, somente foi apresentado aos clientes no Brasil em Junho de 2017.

A GenDx, empresa com sede em Utrecht, Holanda, fundada em 2005 com foco em tipagem HLA por sequenciamento de Sanger, hoje dedica-se também ao desenvolvimento de protocolos NGS em 3 sequenciadores: Illumina, Ion torrent e PacBio. Além disso, comercializa seu software (NGSEngine) para análise dos resultados. Porém, no Brasil, apenas no fim de 2017 iniciou a demonstração dos seus protocolos no Brasil.

A Omixon, empresa fundada em 2011 com sede em Budapeste, Hungria, é a pioneira e líder no fornecimento de insumos para tipagem HLA em NGS. Seu protocolo (*Holotype* HLA) e seu software de análises (HLA Twin), lançados em 2014, são utilizados, atualmente, em mais de 20 laboratórios de hospitais em diversos países para sequenciamento dos genes HLA por NGS utilizando os sequenciadores Illumina. Entretanto, somente em agosto de 2017 firmou parceria com um distribuidor local para revenda e suporte de seus produtos no mercado brasileiro.

A Histogenetics é um laboratório que atua fornecendo o serviço de tipagem HLA a nível mundial, utilizando protocolos desenvolvidos *in-house*. Atualmente, é líder mundial na geração de tipagens HLA por sequenciamento de Sanger e NGS. Entretanto, ainda não oferece seus serviços ao mercado brasileiro.

Portanto, este trabalho busca avaliar diferentes protocolos e plataformas NGS para tipagem HLA disponíveis ou em vias de disponibilidade no Brasil. Com base nos resultados, determinar a melhor opção para implementação na rotina do laboratório de Imunogenética do INCA.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade, confiabilidade e a eficácia de protocolos de genotipagem HLA por NGS para as amostras do laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de Câncer.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Realizar a tipagem dos genes HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1, DPB1 por NGS;
- Comparar e verificar a concordância dos resultados obtidos pelas plataformas NGS com aqueles gerados pelo sequenciamento clássico;
- Comparar a qualidade dos dados gerados entre os diferentes protocolos e sequenciadores de nova geração;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento e caracterização do DNA genômico**

As amostras utilizadas foram isoladas de sangue periférico humano colhido em tubo contendo anticoagulante EDTA. Após serem recebidas no laboratório, as amostras de sangue são acondicionadas à temperatura de 4°C e, posteriormente, encaminhadas à rotina de extração de DNA automatizada (QiaSymphony, Qiagen®) conforme protocolo do fabricante. O sangue foi homogeneizado por 5 minutos e inserido diretamente no equipamento que encarrega-se de todas as etapas de extração, purificação e eluição do DNA genômico. O protocolo empregado consiste nas etapas de rompimento de membranas, inativação de nucleases com uso de proteinase K, ligação do DNA a partículas magnéticas de sílica, lavagem do sobrenadante e eluição do material isolado em 100µL ou 200µL de tampão fornecido pelo fabricante.

Ao término da extração, 2µL de cada amostra foram utilizados para determinar-se a qualidade do material extraído (concentração e pureza) por espectrofotometria (Nanodrop8000, Thermo Scientific). Antes do início das medições, aplicou-se 2µL do tampão de eluição como medida de referência (“branco”) para correção das medidas de absorvância efetuadas a 260nm e 280nm. Os dados referentes a concentração e a razão da absorvância a 260nm e a 280nm foram calculados pelo software do equipamento e associados ao cadastro da amostra.

#### **3.2 Seleção das amostras**

Dentre as mais de 90.000 amostras de DNA armazenadas no laboratório, selecionou-se todas aquelas que possuíam solicitação de tipagem HLA de alta resolução recebida no laboratório entre 01 de janeiro de 2011 e 31 de agosto de 2016. Destas 1383 amostras, que possuíam tipagem por sequenciamento de Sanger de algum gene HLA, foram filtradas 1299 delas que tinham a tipagem completa, ou seja, para os genes HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1. Além disso, foram escolhidas



apenas as amostras com valores de razão 260/280 entre 1,6 (inclusive) e 2,1 (inclusive), que foram 1200 no total.

### 3.3 Tipagem HLA pela plataforma de sequenciamento de DNA de Sanger

As amostras foram tipificadas para os genes HLA-A, -B, -C, DRB1 e DQB1 à alta resolução usando-se um protocolo comercial (SeCore, Life Technologies) baseado no sequenciamento de Sanger. A primeira etapa do protocolo consistiu na amplificação de regiões específicas dos genes HLA via PCR. Para os genes HLA classe I, empregou-se uma PCR que gerou, numa mesma reação, dois *amplicons* para cada gene, o primeiro abrangendo os éxons 2 e 3 (HLA-A, 1200bp; HLA-B, 1400bp; HLA-C, 1375bp) e o segundo contendo o éxon 4 (HLA-A, 990bp; HLA-B, 950bp; HLA-C, 1600bp).

Para os genes HLA classe II foram necessárias duas reações separadas por amostra: uma para amplificar o éxon 2 (HLA-DRB1, 500 – 850bp; HLA-DQB1, 350bp), e outra, para o éxon 3 (HLA-DRB1, 350bp; HLA-DQB1, 375bp).

O produto resultante foi tratado com duas enzimas – exonuclease e fosfatase alcalina – (ExoSAP) para remoção de *primers* e dNTPs não incorporados aos fragmentos de DNA. Os mesmos éxons descritos na tabela acima foram sequenciados de maneira bidirecional (fitas *forward* e *reverse*) usando-se nucleotídeos fluorescentes com radical bloqueador da extensão (BigDye *Terminator sequencing*). As sequências resultantes foram purificadas por precipitação com etanol 80% preparado a fresco e incubadas com formamida a 95°C para sofrer desnaturação. Em seguida, as sequências foram submetidas à eletroforese capilar automatizada (ABI 3500, Applied Biosystems) e identificadas pela fluorescência emitida após excitação por um laser. Os dados gerados foram interpretados por um software específico (Utype) que exibiu o eletroferograma e a(s) combinação(ões) de alelo(s) possível(eis) após o alinhamento às sequências de referência. Em alguns casos, *primers* específicos (gSSP) foram empregados para solução de ambiguidades de tipagem.

### **3.4 Tipagem HLA pelas plataformas de sequenciamento de nova geração**

Amostras de DNA do laboratório de Imunogenética foram submetidas a 4 protocolos de tipagem HLA por NGS. As diferenças quanto à plataforma NGS utilizada e número de amostras testadas, bem como quanto aos genes HLA e suas regiões abrangidas estão descritas na tabela 03 e tabelas 04 e 05, respectivamente.

Os protocolos NGS testados podem ser subdivididos em 4 grandes etapas: amplificação da região alvo, preparo da biblioteca, amplificação clonal, sequenciamento e análise de dados. PacBio, excepcionalmente, não emprega a etapa de amplificação clonal.

Tabela 03: Nome, genes HLA abrangidos, número de amostras testadas e fabricantes do protocolos de tipagem HLA por NGS analisados.

Protocolo	Gene HLA											n	Sequenciador	Fabricante
	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DPA1			
Sanger	X	X	X	X	X							7	AB 3500	Life Technologies
Illumina01	X	X	X	X	X	X	X	X	X			384	Miseq (Illumina)	Histogenetics
Illumina02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12	Miseq (Illumina)	Illumina
Ion	X	X	X	X	X	X	X	X	X			32	Ion S5 (Thermo)	OneLambda
PacBio	X	X	X	X	X	X						384	RSII / Sequel (PacBio)	Histogenetics



### 3.4.1 Teste do protocolo comercial Illumina02

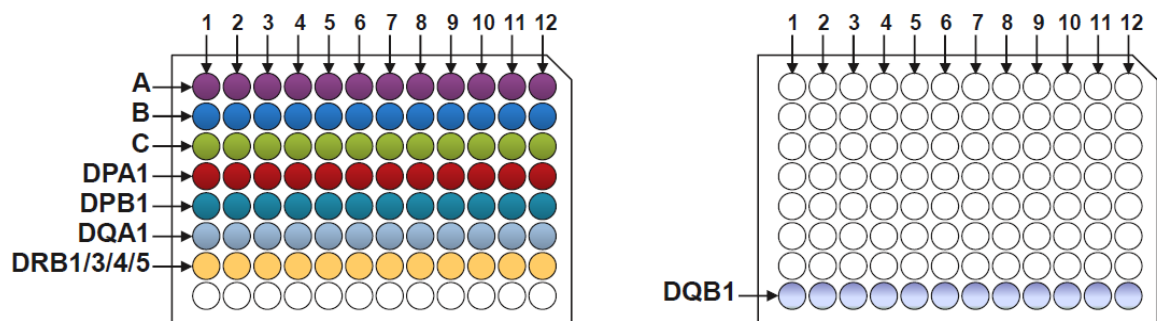
O primeiro protocolo de tipagem HLA por NGS avaliado (Illumina02) foi a versão 2 da solução oferecida no mercado pela Illumina (*Trusight HLA v. 02*). Todas os procedimentos foram executadas conforme descrito no protocolo. A primeira etapa foi determinar a concentração de DNA das 12 amostras por um método fluorimétrico (Qubit 2.0 *High sensitivity*). A partir dos dados obtidos (tabela 06), as concentrações das amostras foram ajustadas para 10ng/uL. Em seguida, 5uL (50ng de DNA) foi utilizado para cada uma das 8 reações de amplificação dos 11 genes HLA. À exceção dos genes HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 e -DRB5, todas os demais genes foram amplificados separadamente, conforme ilustra a figura 13. Além disso, foram empregados dois programas de amplificação: um para o gene HLA-DQB1 [1x (94° C 3 minutos); 10x (94° C por 30 segundos, 55° C por 2 minutos, 72° C por 15 minutos); 20x (94° C por 30 segundos, 60° C por 2 minutos, 72° C por 15 minutos); 1x (72° C por 10 minutos)] e outro para os demais genes [1x (94° C por 3 minutos); 30x (94° C por 30 segundos, 60° C por 2 minutos, 68° C por 15 minutos); 1x (68° C por 10 minutos)]. A etapa seguinte - preparo da biblioteca – conforme a figura 11 teve início com a purificação e normalização dos amplicons gerados empregando-se microesferas magnéticas. Os amplicons foram, então, fragmentados (Nextera, Illumina) e, aqueles pertencentes a uma mesma amostra, foram agrupados num único poço (1° pool) e purificados novamente. Através de uma nova reação de PCR, sequências adaptadoras (P5 e P7) conjugadas a 2 sequências índice (*barcodes*) foram adicionadas aos amplicons de cada amostra. Após nova etapa de purificação, os amplicons foram unidos em um único tubo formando a biblioteca final que, após desnaturação com NaOH 0,1N, foi inserida no cartucho de sequenciamento da plataforma NGS MiSeq (Illumina). Para as etapas de amplificação clonal e sequenciamento, foi empregada a *flow cell* micro MiSeq v2 e o kit de sequenciamento MiSeq *Reagent Kit* v2 - 300 *cycles* no modelo *paired-end sequencing* (2 x 150 ciclos).

Os dados gerados pelo equipamento foram analisados utilizando-se o software Assign TruSight HLA v2.0 (Illumina) que realizou a montagem e alinhamento das sequências contidas nos arquivos fastq de cada amostra e informou as tipagens para cada uma das amostras e genes HLA. Como métricas de qualidade, o software

Assign calculou a proporção de bases identificadas que possuíam Q-score superior a 30 (acurácia igual ou superior a 99,9%) bem como a cobertura média dos alelos

**Tabela 06: Comparação dos valores de quantificação determinados por espectrofotometria e fluorimetria das amostras utilizadas no teste do protocolo Illumina02.** À direita, discrepância dos valores de fluorimetria comparados aos obtidos por espectrometria.

Amostra	Método		Discrepância
	Espectrofotometria	Fluorimetria	
1	80,63	65,6	81,4
2	54,53	35,6	65,3
3	34,69	24,2	69,8
4	58,9	41,4	70,3
5	43,68	21,8	49,9
6	42,81	29,2	68,2
7	60,21	57,2	95,0
8	70,18	41,6	59,3
9	64,18	40,2	62,6
10	64,94	49,6	76,4
11	61,2	33,4	54,6
12	53,39	31,2	58,4
Média	57,4	39,25	67,6
Desvio	12,7	13,1	12,4



**Figura 11: Modelos de amplificação dos genes HLA adotados por Illumina02.** Empregou-se majoritariamente a amplificação em separado dos diferentes genes, bem como de um protocolo de amplificação diferente para o gene HLA-DQB1,

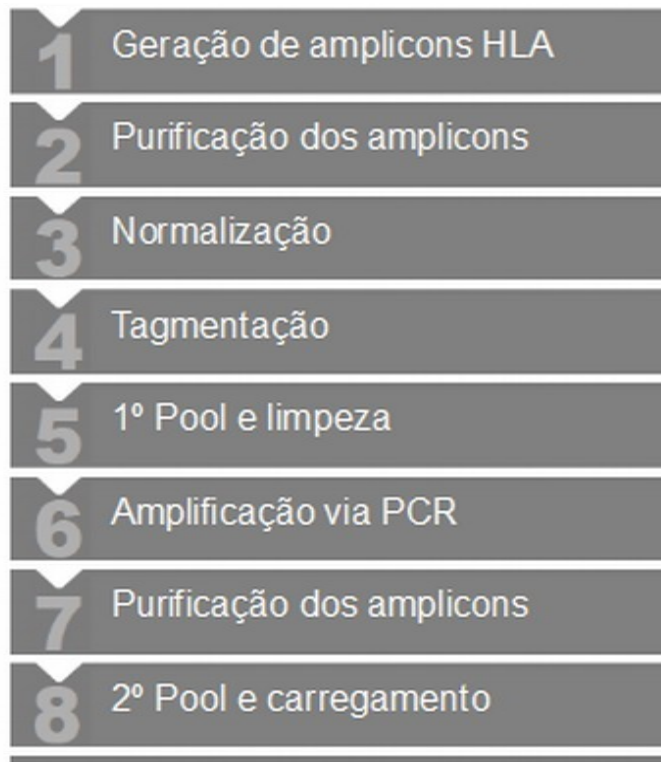


Figura 12: Etapas do preparo da biblioteca de NGS do protocolo Illumina02.

### 3.4.2 Teste do protocolo comercial Ion

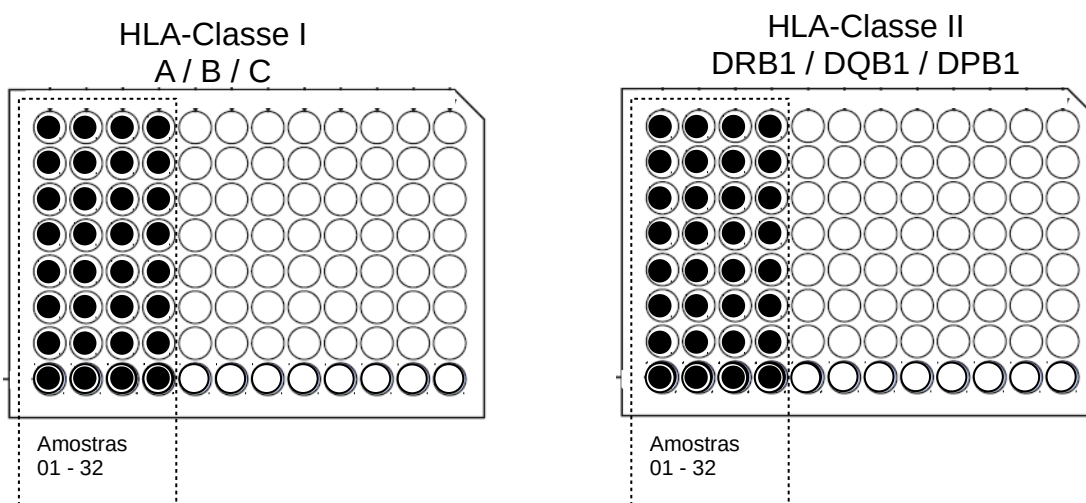
O segundo protocolo testado utilizou os reagentes e procedimentos validados pela empresa OneLambda sob o nome comercial *NxType*. Semelhantemente a Illumina02, a primeira etapa do protocolo Ion foi determinar a concentração das 32 amostras investigadas por fluorimetria (Qubit High sensitivity, Invitrogen) conforme os dados da tabela 07. Em seguida, 50 ng de DNA foram empregados para realizar 2 PCRs multiplex por amostra: uma abrangendo os genes HLA de classe I e outra os genes HLA classe II cujos protocolos de amplificação foram: 1x (94° C por 2 minutos); 22x (98° C por 10 segundos, 69° C por 3 minutos); 8x (98° C por 10 segundos, 60° C por 3 minutos); 1x (94° C por 2 minutos); 30x (98° C por 10 segundos, 69° C por 3 minutos), respectivamente com ajuste de rampa para simular o termociclador GeneAmp 9600 (Veriti, Thermo).

Amostra	Método		Discrepância %
	Espectrofotometria	Fluorimetria	
1	50,1	56,2	112,2
2	7,5	7,6	100,2
3	23,0	36,0	156,5
4	9,3	15,7	168,8
5	36,2	34,6	95,6
6	54,5	12,0	22,0
7	171,6	25,0	14,6
8	70,5	96,6	137,0
9	43,5	50,8	116,8
10	98,8	73,4	74,3
11	72,2	98,0	135,7
12	42,4	63,6	150,1
13	52,0	84,6	162,7
14	36,6	55,4	151,4
15	59,4	93,4	157,3
16	4,9	9,7	198,7
17	58,3	93,0	159,5
18	45,4	40,4	89,1
19	28,5	47,0	165,0
20	60,8	87,4	143,7
21	35,5	56,4	158,9
22	64,7	114,0	176,2
23	60,1	85,4	142,1
24	51,1	67,8	132,7
25	40,0	60,2	150,5
26	30,0	50,4	168,0
27	20,4	31,0	152,0
28	85,2	99,0	116,2
29	47,5	69,4	146,1
30	9,3	13,6	146,2
31	10,6	17,7	167,0
32	81,5	110,0	135,0
Média	48,8	58,0	134,4
Desvio	32,6	32,0	40,7

**Tabela 07: Comparação dos valores de quantificação determinados por espectrofotometria e fluorimetria das amostras utilizadas no teste do protocolo Ion. À direita, discrepância dos valores de fluorimetria comparados aos obtidos por espectrometria.**



O preparo da biblioteca teve início com a purificação dos amplicons utilizando-se microesferas magnéticas (*Ampure beads, Beckman Coulter*). Em seguida, cada reação foi quantificada por fluorimetria (Qubit 2.0, Invitrogen) para cálculo do volume necessário à formação do pool intra-amostra. Em seguida, os amplicons sofreram fragmentação enzimática (Ion Shear kit, Thermo) e foram ligados a sequências adaptadoras inerentes a plataforma de sequenciamento, bem como sequências índice amostra-específicas. (*barcodes*). Com o uso de diferentes concentrações de microesferas magnéticas, foram selecionados fragmentos de tamanho desejado e, através de uma etapa de amplificação secundária, amplificados apenas os fragmentos que ligaram-se com sucesso aos adaptadores de sequenciamento. Após uma última purificação, as bibliotecas foram quantificadas para a formação de um pool final equimolar. As etapas de amplificação clonal (Ion 520 & 530 Ext kit chef) e carregamento do chip de sequenciamento (Ion 530, Thermo) foram realizadas no equipamento Ion Chef (Thermo Fisher), enquanto o sequenciamento na plataforma Ion S5 (Thermo Fisher). Ao fim da corrida, os arquivos fastQ foram analisados no software Type Stream Visual (OneLambda, Thermo) que retornou as respectivas tipagens HLA de cada amostra para cada um dos 9 genes HLA. Para verificação da qualidade dos resultados foi calculado o balanço alélico, a porcentagem de cobertura dos éxons principais, e os valores mínimo e máximo de cobertura para os éxons 2, 3 e 4.



**Figura 13: Modelo de amplificação dos genes HLA adotado por Ion.** Com um modelo de montagem da placa de amplificação mais simplificado, o protocolo Ion resume a amplificação de 09 genes HLA em apenas duas reações de PCR por amostra.

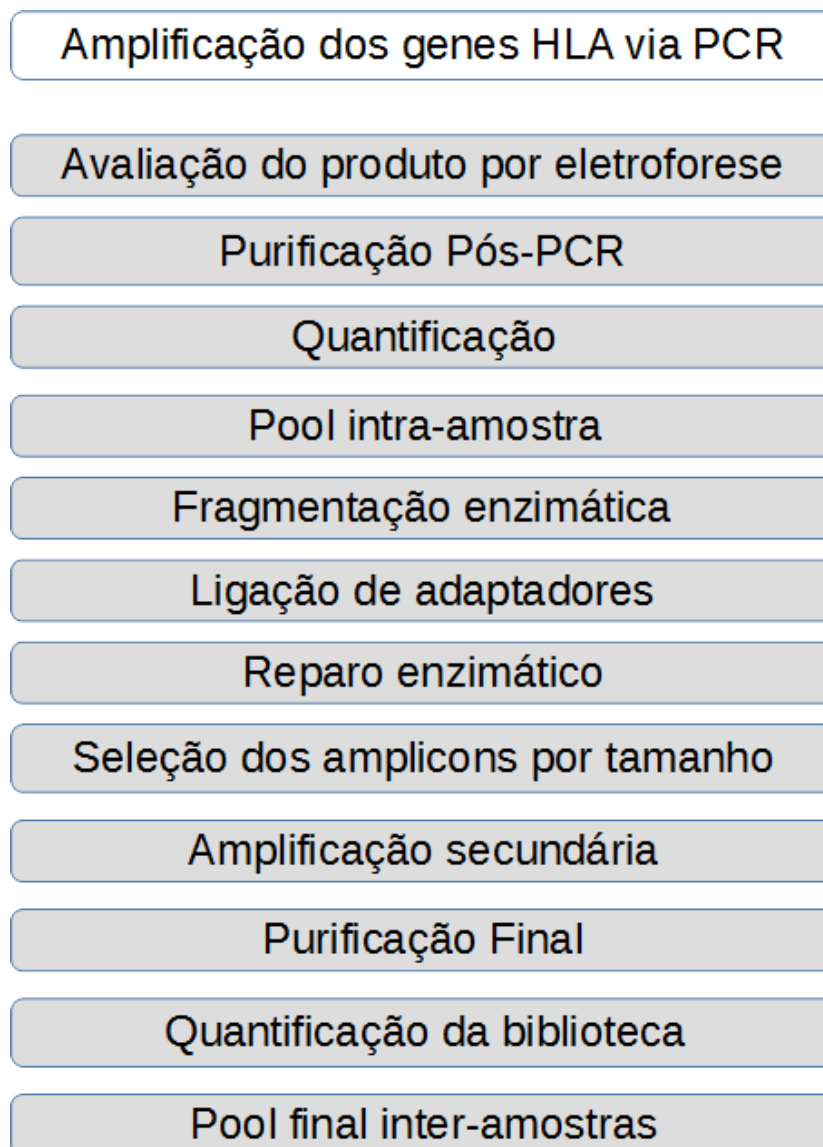


Figura 14: Etapas do preparo da biblioteca de NGS do protocolo Ion.

### 3.4.3 Teste de um serviço internacional de tipagem HLA por NGS

Dois protocolos disponíveis no mercado como serviço de tipagem HLA por NGS para bancos de medula óssea também foram analisados. Conforme as tabelas 03, 04 e 05, o protocolo Illumina01 abrange apenas os éxons mais polimórficos de 9 genes HLA empregando a plataforma NGS MiSeq (Illumina); já o protocolo PacBio sequencia éxons e íntrons de 6 genes HLA utilizando o sequenciador RS-II da Pacific Biosciences. Todas as etapas dos protocolos foram realizadas na sede da empresa Histogenetics em Nova Iorque, Estados Unidos.

Das 384 amostras remetidas à empresa para tipagem, algumas foram escolhidas

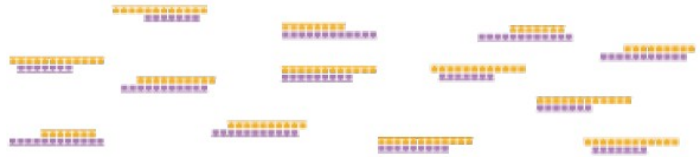
para mensuração da concentração de DNA e razão 260/280nm por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo). No protocolo Illumina01, foram empregadas 31 PCRs separadamente para abranger um total de 20 éxons dos 9 genes HLA tipados (11904 amplificações). Em seguida, uma parcela destes produtos foi submetido à eletroforese em gele de agarose para verificar a formação do amplicon desejado. O preparo da biblioteca assemelhou-se a Illumina02, porém otimizado para empregar apenas uma etapa de purificação e seleção por tamanho somente após a formação do pool final. Em seguida, a biblioteca foi quantificada por um método fluorimétrico (Qubit 2.0, Invitrogen), submetida a desnaturação com NaOH 0,1N e carregada no sequenciador MiSeq (Illumina) utilizando o kit 2 x 250bp *paired-end sequencing*.

Para o protocolo PacBio, após a amplificação em separado dos 6 genes HLA tipificados (tabela 03), o preparo da biblioteca seguiu as etapas ilustradas na figura 15. Após reparo das extremidades, foram adicionadas aos amplicons sequências adaptadoras no formato de grampo. Por último, os *primers* de sequenciamento e a DNA polimerase foram ligados ao conjunto (chamado SMRTbell template). Ao final, foram formados 6 pooles gene-específico, cada qual contendo amplicons de 384 amostras diferentes porém para um mesmo gene HLA. Estes 6 pooles foram, então, inseridos em 6 sequenciadores PacBio RS-II.

Os arquivos fastQ gerados para cada uma das amostras em ambos protocolos foram analisados em algoritmo de bioinformática próprio da empresa (AutoTyping, Histogenetics) que retornou as respectivas tipagens HLA encontradas.

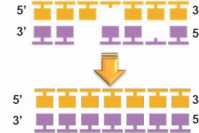
**Geração dos amplicons**

Amplificação por PCR das regiões a serem sequenciadas



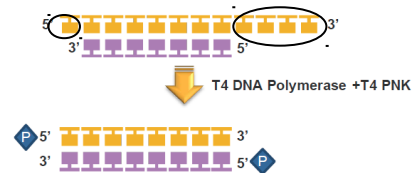
**Reparo de danos ao DNA**

Eliminação de bloqueios na extremidade 3', bases oxidadas, citosinas desaminadas



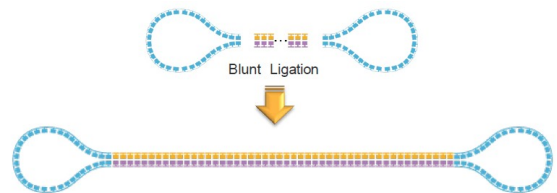
**Reparo das extremidades**

Preparação para incorporar adaptadores  
 - Eliminação de pontas 3' não emparelhadas  
 - Complementação emparelhamento pontas 5';



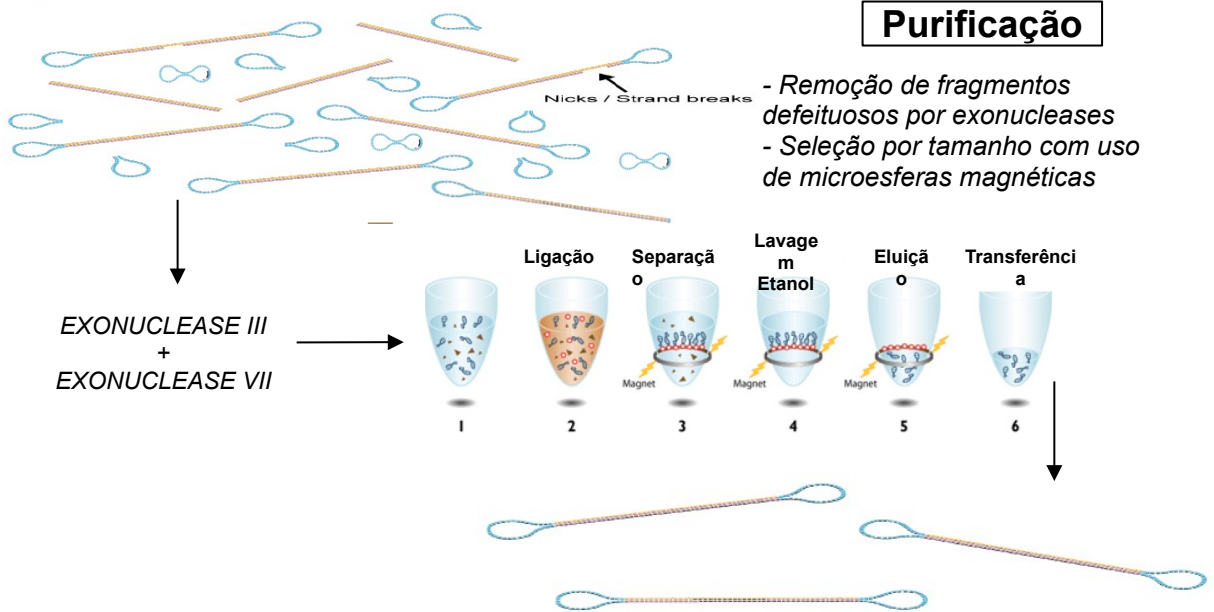
**Ligação dos adaptadores**

Adaptadores são sítio de ligação do primer de sequenciamento e da DNA polimerase



**Purificação**

- Remoção de fragmentos defeituosos por exonucleases  
 - Seleção por tamanho com uso de microesferas magnéticas



**Anelamento do primer**

**Ligação da DNA polimerase**



Figura 15: Etapas de preparo da SMRTbell sequenciada na plataforma Pacbio.

### 3.4.4 Verificação da qualidade das leituras geradas pelas plataformas NGS

Para verificar o perfil das leituras geradas em cada protocolo e sua respectiva plataforma NGS, os arquivos fastQ obtidos para os 6 genes HLA clássicos comuns a todas as plataformas foram submetidos a dois algoritmos de tipagem HLA comercial (NGSEngine v.2.7, GenDx; Type Stream Visual 1.0, OneLambda) conforme tabela 09. Durante a análise pelo software NGSEngine, as leituras foram submetidas a filtros de qualidade que foram ajustados conforme a plataforma NGS de origem (ver tabela 08). Ao final da análise, sete métricas de qualidade foram calculadas pelos dois algoritmos utilizados.

Critério	Variável	Protocolo NGS			Definição	
		Illumina01 / 02	Ion	PacBio		
Avaliação de leituras	Tamanho da janela	10	10	-	nº de nucleotídeos vizinhos considerados para cálculo	
	Q score	Absoluto	20	15	-	Limiar mínimo de Qscore médio da janela
		Relativo (%)	70	-	-	Limiar mínimo de Qscore em relação à média total da leitura
Avaliação do alinhamento	Limiar de Cobertura	20			Nº de leituras mínimo aceitável para análise de uma região	
	Frequência mínima (%)	20			frequência acima da qual uma base é considerada na tipagem	
	Ruído (%)	14			frequência abaixo da qual uma base é considerada ruído de sequenciamento (Erro)	

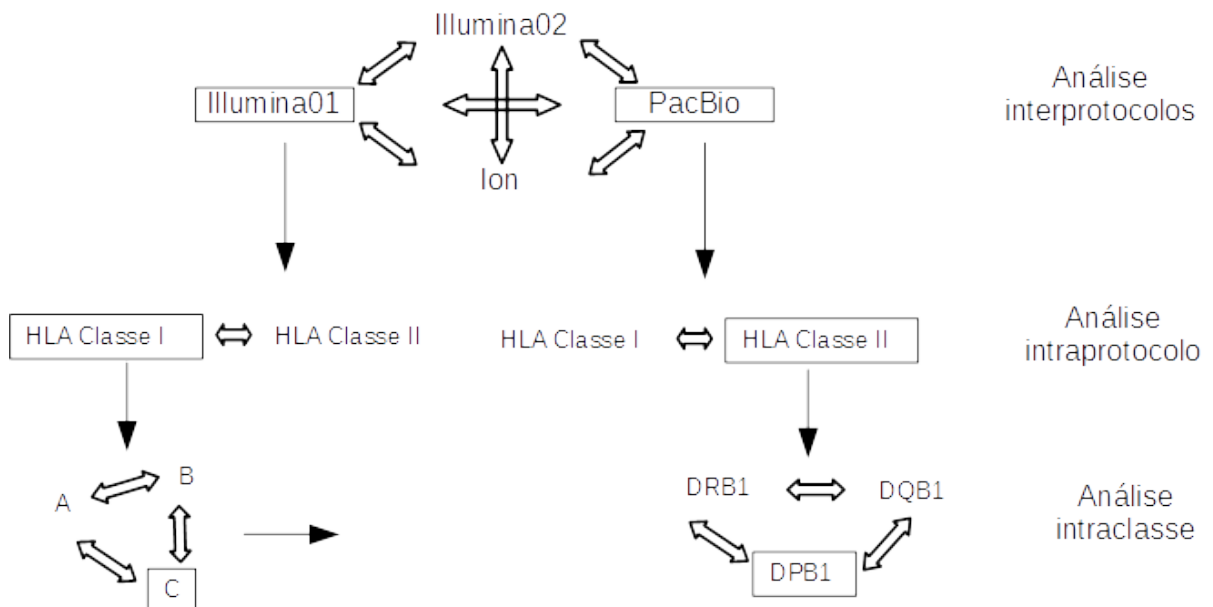
**Tabela 08: Nível padrão dos filtros de qualidade aplicados pelo software NGSEngine para avaliação de leituras e do alinhamento gerado para as plataformas NGS de tipagem HLA.** Enquanto os critérios de avaliação do alinhamento são semelhantes para todos os sequenciadores, a avaliação das leituras é mais rigorosa para as leituras Illumina, seguida pelas de Ion, enquanto ara PacBio eles sequer são aplicados.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o pacote Prism (versão 4.0) e os testes não-paramétricos de *Mann Whitney*, - até 2 grupos de dados – e de Kruskal Wallis – demais casos – para a comparação das medianas. Para cada variável foi feita uma análise interprotocolos, isto é, comparou-se entre si os dados 4 protocolo para cada variável analisada. Em seguida, aquelas plataformas que apresentaram o melhor e pior desempenho, foram submetidas a uma análise intraprotocolo, com os dados estratificadas em dois grupos: genes HLA de classe I (HLA-A, -B, -C) e genes HLA de Classe II (HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1). Havendo diferença significativa entre as

classes, em seguida, uma comparação intraclasses HLA investigou diferenças entre os genes HLA para aquela variável, conforme esquema da figura 16. O valor de  $p$  foi considerado significativo quando inferior a 0,05.

Variável	Protocolo NGS				Software
	Illumina01	Illumina02	Ion	PacBio	
Contagem Total	x	x	x	x	NGSEngine
Comprimento Médio	x	x	x	x	
Mapeabilidade (%)	x	x	x	x	
Cobertura Média		x	x	x	
Cobertura Mínima (éxons)	x				Type Stream
Cobertura Máxima (éxons)	x				
Balanco alélico	x	x	x		

**Tabela 09: Variáveis utilizadas para verificar a qualidade das leituras geradas para cada protocolo NGS na tipagem de 6 genes HLA.** Devido a limitações dos softwares, a variável Cobertura mediana não foi determinada para Illumina01, sendo substituída então pela cobertura dos éxons chave, calculada pelo programa *Type Stream*. Por motivo semelhante o balanço alélico não foi verificado para PacBio.



**Figura 16: Comparações efetuadas para os dados de métricas de qualidade dos 4 protocolos HLA testados.** Neste exemplo, os valores encontrados para as leituras dos genes HLA-C e HLA-DPB1 dos protocolos Illumina01 e PacBio, respectivamente, apresentaram os valores extremos (maior e menor) para a métrica analisada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Tipagens geradas pelos protocolos comerciais

Os resultados de tipagem HLA obtidos para os protocolos Illumina02 e Ion podem ser encontrados nas tabelas 10 e 12, respectivamente.

No protocolo Illumina02, 212 alelos HLA foram investigados. Entretanto, 22 não puderam ser determinados pelos seguintes motivos: contaminação durante o preparo da biblioteca (9/22); presença de alelos possivelmente novos (4/22); falha do software com o uso de sequência de referência desatualizada (2/22); ambiguidades não resolvidas ao nível do grupo HLA (6/22), e do alelo (1/22). Conforme a tabela 11, 03 tipagens apresentaram cobertura média inferior a 100 (nível mínimo aceitável) e a menor proporção de bases com Q30 foi de 93%. Além disso, 4 novas sequências foram apontadas como alelos novos, uma para cada um dos seguintes genes HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB4.

Em contrapartida, no protocolo Ion, todos os 576 alelos investigados para 9 genes HLA foram tipados até o nível do terceiro campo numérico, à exceção de 10 tipagens (2,2%) que apresentaram ambiguidades ao nível de mutações em éxons (HLA-B= 4; HLA-DRB1= 3; HLA-DPB1= 3) conforme os resultados da tabela 10. A análise das métricas calculadas pelo software TypeStream Visual demonstrou valores fora do aceitável apenas para a variável balanço alélico (menor que 0,3), conforme apêndice 03.

**Tabela 10: Tipagem HLA das 12 amostras submetidas ao protocolo Illumina02.** Abaixo, segue o significado dos códigos utilizados na tabela. A letra X denota a não detecção de outro alelo para a amostra, caso provável de homozigose.

Amostra	Genes										
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DPA1	HLA-DPB1	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DRB1	HLA-DRB3	HLA-DRB4	HLA-DRB5
891A	11:01:01 *Novo 01	51:01:01 X	07:01:01 X	01:03:01 X	04:01:01 X	05:05:01 X	03:01:01 X	11:01:01 X	02:02:01 X		
891B	26:01:01 33:01:01	14:02:01 38:01:01	08:02:01 12:03:01	01:03:01 X	04:01:01 X	01:01:02 03:01:01	03:02:01 05:01:01	01:02:01 04:02:01		*Novo 04	
891C	02:01:01 11:01:01	*Novo 02	02:02:02 03:03:01	01:03:01 X	*Ambig. 01	01:03:01 05:05:01	03:01:01 06:03:01	16:02:01 13:01:01	02:02:01		02:02
891D	*Contam. 01	13:02:01 35:04:01	04:01:01 06:02:01	01:03:01 02:01:01	*Ambig. 02	02:01 04:01:01	02:02:01 04:02:01	08:07 07:01:01		01:03:01 X	
891E	*Contam. 02	15:03:01 81:01	02:10:01 08:04:01	01:03:01 03:01	18:01 105:01	01:02:01 01:05:01	05:01:01 06:04:01	Ambig. 04 13:16	01:01:02 03:01:01		
891F	*Contam. 03	07:02:01 41:01:01	Novo 03	01:03:01 X	02:01:02 04:01:01	01:02:01 X	03:01:01 06:02:01	15:01:01 13:02:01	03:01:01		01:01:01
891G	02:01:01 23:17	08:01:01 15:222	07:01:01 18:02	01:03:01 02:01:08	01:01:01 124:01	01:02:01 05:05:01	03:01:01 06:02:01	*Contam. 04	*Contam. 05		
891H	02:22:01 23:01:01	15:04:01 53:01:01	01:02:01 06:02:01	02:01:01 02:02:02	*Ambig. 03	01:02:01 03:01:01	03:02:01 05:01:01	13:02:01 04:03:01	03:01:01	01:03:02	
892A	23:01:01 33:03:01	49:01:01 53:01:01	04:01:01 07:01:01	02:01:01 X	01:01:02 02:01:02	04:01:02 06:01:01	03:01:01 03:19	08:03:02 08:04:01			
892B	11:01:01 32:01:01	35:01:01 35:03:01	*Referência	02:01:01 02:02:02	05:01:01 17:01	01:04:01 02:01	02:02:01 05:03:01	14:54:01 07:01:01	02:02:01	01:03:01	
892C	01:01:01 02:158	08:01:01 40:04	03:04:01 07:01:01	01:03:01 02:01:02	01:01:01 04:02:01	03:01:01 05:01:01	02:01:01 03:02:01	03:01:01 04:11:01	01:01:02	01:03:01	
892D	02:01:01 11:01:01	35:01:01 44:02:01	04:01:01 05:01:01	01:03:01 X	04:01:01 X	01:02:01 01:04:01	05:03:01 06:02:01	15:01:01 14:54:01	02:02:01		01:01:01



Código	Significado
Novo 1	Nova mutação encontrada no códon 136.3 CAG→CGG. Mudança de Glutamina para arginina. A*11:01:01 + *11:new
Novo 2	Nova mutação encontrada GAT -> GAC. Ambos codificam ácido aspártico. Novo subtipo de B*15:04
Novo 3	Nova mutação encontrada no codon 203.3 CGA ->CGG. Ambos codificam arginina. Novo subtipo de C*07:02
Novo 4	Nova mutação encontrada no codon 76.2 GGC ->GAC. Mudança de glicina para ácido aspártico
Contam. 01	Contaminação. Nenhum resultado identificado.
Contam. 02	Contaminação. Nenhum resultado identificado.
Contam. 03	Contaminação. Provável A*02:01:01 + *24:02:01, minor contamination
Contam. 04	Contaminação. Provável DRB1*08:04:01 + *11:01:02
Contam. 05	Contaminação. Provável DRB3* 03:01:01
Referência	Reanalisar resultado com sequencia de referência atualizada
Ambig. 01	Ambiguidade ao nível do grupo alélico 04:01:01+04:02:01 ou 105:01+126:01
Ambig. 02	Ambiguidade ao nível do grupo alélico 04:02:01+17:01 ou 105:01+460:01
Ambig. 03	Ambiguidade ao nível do grupo alélico 05:01:01+13:01:01 ou 05:01:01+107:01
Ambig. 04	Ambiguidade ao nível do alelo 12: - - : - - => não foi possível determinar o alelo; apenas o grupo.

**Tabela 11: Valores de Cobertura média (C) e porcentagem de bases com Q score acima de 30 encontrados pelo software Assign Trusight HLA para cada alelo tipificado pelo protocolo Illumina02. Apenas 3 alelos (\*) apresentaram cobertura média inferior a 100 reads; todos pertencentes ao gene HLA-DQB1.**

Amostra	Genes																							
	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DPA1		HLA-DPB1		HLA-DQA1		HLA-DQB1		HLA-DRB1		HLA-DRB3		HLA-DRB4		HLA-DRB5			
	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30	C	Q30		
891A	252	95%	253	95%	241	96%	232	96%	233	96%	237	96%	245	96%	260	96%	255	96%						
	252	95%	253	95%	241	96%	232	96%	233	96%	237	96%	245	96%	260	96%	255	96%						
891B	254	95%	259	95%	230	96%	230	96%	230	96%	239	96%	233	96%	258	96%			250	96%				
	254	95%	259	95%	230	96%	230	96%	230	96%	239	96%	233	96%	219	96%			250	96%				
891C	245	95%	245	94%	235	95%	230	96%	230	96%	238	96%	224	96%	245	96%	251	95%					247	95%
	245	95%	245	94%	235	95%	230	96%	230	96%	238	96%	104	96%	254	96%								
891D	240	95%	243	95%	225	95%	228	97%	218	97%	233	97%	229	97%	228	97%			247	96%				
	240	95%	243	95%	225	95%	228	97%	218	97%	233	97%	229	97%	248	97%			247	96%				
891E	246	95%	252	95%	230	95%	227	96%	234	96%	238	96%	229	96%	256	96%	252	96%						
	246	95%	252	95%	230	95%	227	96%	234	96%	238	96%	125	96%	256	96%	252	96%						
891F	236	96%	256	95%	238	96%	227	96%	224	96%	231	96%	33*	96%	244	96%	250	96%					244	96%
	236	96%	256	95%	238	96%	227	96%	224	96%	231	96%	225	96%	250	96%								
891G	221	94%	245	94%	219	94%	186	95%	221	95%	237	95%	210	95%	243	95%	251	95%						
	221	94%	245	94%	219	94%	186	95%	221	95%	237	95%	66*	95%	243	95%	251	95%						
891H	226	94%	243	93%	221	93%	218	95%	110	95%	233	95%	225	95%	240	95%	242	95%	230	95%				
	226	94%	243	93%	221	93%	218	95%	110	95%	233	95%	225	95%	179	95%								
892A	246	94%	247	93%	237	93%	202	94%	230	94%	221	94%	210	94%	226	94%								
	246	94%	247	93%	237	93%	202	94%	230	94%	221	94%	210	94%	226	94%								
892B	239	94%	229	93%	219	94%	206	95%	209	95%	223	95%	180	95%	201	95%	215	94%	157	95%				
	239	94%	229	93%	219	94%	206	95%	209	95%	223	95%	180	95%	183	95%								
892C	239	94%	237	94%	223	94%	209	95%	193	95%	213	95%	210	95%	229	95%	240	94%	177	95%				
	239	94%	237	94%	223	94%	209	95%	193	95%	213	95%	210	95%	104	95%								
892D	243	94%	241	94%	208	94%	204	95%	126	95%	190	95%	151	95%	236	95%	246	94%					243	94%
	243	94%	241	94%	208	94%	204	95%	126	95%	190	95%	70*	95%	243	95%								

Tabela 12: Tipagens obtidas pelo protocolo Ion para 9 genes HLA. AJ=01/08; CJB=01/19; AC=01/03; FKP=01/34; BWPS=01/77; CTZ=:01/21; JV=:01/10

ID	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1	HLA-DPB1	HLA-DR..	HLA-DR..
1	01:01:01	24:02:01	37:01:01	55:01:01	01:02:01	06:02:01	10:01:01	16:01:01	05:01:01	05:02:01	02:01:02	02:01:02	B5*02:02	B5*02:02
2	02:01:01	32:01:01	51:01:01	51:01:01	01:02:01	16:01:01	<b>08:BWPS</b>	14:54	04:02:01	05:03:01	03:01:01	104:01:01	B3*02:02:01	B3*02:02:01
3	02:01:01	03:01:01	18:01:01	37:01:01	02:02:02	06:02:01	13:01:01	13:01:01	05:01:01	06:03:01	11:01:01	17:01	B3*01:01:02	B3*01:01:02
4	24:02:01	24:02:01	<b>51:AJ</b>	<b>52:CJB</b>	14:02:01	16:02:01	04:03:01	04:08:01	03:01:01	03:02:01	04:01:01	04:01:01	B4*01:03:01	B4*01:03:01
5	02:01:01	23:01:01	44:03:01	51:01:01	04:01:01	16:01:01	04:04:01	04:05:01	03:02:01	03:02:01	01:01:01	06:01:01	B4*01:03:01	B4*01:03:01
6	26:01:01	66:01:01	38:01:01	51:01:01	02:02:02	12:03:01	01:01:01	04:03:01	03:02:01	05:01:01	04:01:01	10:01:01	B4*01:03:01	B4*01:03:01
7	30:01:01	68:01:02	37:01:01	49:01:01	06:02:01	07:01:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	02:02:01	02:01:02	10:01:01	B4*01:01:01	B4*01:03:01
8	02:01:01	11:01:01	35:01:01	51:01:01	04:01:01	07:02:01	01:01:01	11:01:01	03:01:01	05:01:01	04:01:01	17:01	B3*02:02:01	B3*02:02:01
9	33:01:01	80:01:01	42:01:01	44:03:01	04:01:01	17:01:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	04:01:01	17:01	B3*02:02:01	B4*01:01:01
10	03:01:01	30:02:01	35:01:01	57:03:01	04:01:01	18:02	13:01:01	13:01:01	05:01:01	06:03:01	01:01:01	04:02:01	B3*01:01:02	B3*03:01:01
11	02:01:01	29:01:01	44:03:01	51:01:01	03:03:01	04:01:01	07:01:01	09:01:02	02:02:01	03:03:02	04:01:01	11:01:01	B4*01:01:01	B4*01:03:02
12	01:01:01	01:01:01	08:01:01	53:01:01	04:01:01	07:01:01	03:01:01	13:03:01	02:01:01	02:02:01	01:01:01	04:01:01	B3*01:01:02	B3*02:02:01
13	24:02:01	24:02:01	14:02:01	44:03:01	02:02:02	02:02:02	01:02:01	01:02:01	05:01:01	05:01:01	04:01:01	04:01:01	---	---
14	02:01:01	03:01:01	<b>35:AC</b>	<b>58:FKP</b>	03:02:02	04:01:01	03:01:01	15:01:01	02:01:01	06:02:01	04:01:01	04:01:01	B3*02:02:01	B5*01:01:01
15	02:01:01	68:01:02	35:05:01	48:01:01	01:02:30	04:01:01	08:02:01	16:02:01	03:01:01	04:02:01	04:02:01	05:01:01	B5*02:02	B5*02:02
16	01:01:01	02:01:01	08:01:01	49:01:01	07:01:01	07:01:01	01:01:01	07:01:01	03:03:02	05:01:01	02:01:02	06:01:01	B4*01:03:01N	B4*01:03:01N
17	02:01:01	29:02:01	44:03:01	51:01:01	16:01:01	16:02:01	07:01:01	11:02:01	02:02:01	03:19:01	01:01:02	11:01:01	B3*02:02:01	B4*01:01:01
18	02:01:01	32:01:01	08:01:01	40:02:01	02:02:02	07:01:01	07:01:01	15:01:01	02:02:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01	B4*01:03:01	B5*01:01:01
19	02:01:15	24:02:01	50:02	50:02	06:02:01	06:02:01	04:06:02	15:01:01	04:02:01	06:02:01	04:02:01	104:01:01	B4*01:03:01	B5*01:01:01
20	02:01:01	23:01:01	35:01:01	52:01:01	04:01:01	12:03:01	01:01:01	15:02:01	05:01:01	06:01:01	04:01:01	04:02:01	B5*01:02	B5*01:02
21	02:01:01	30:02:01	27:05:02	58:01:01	01:02:01	07:18	12:01:01	14:54:01	05:01:01	05:03:01	02:01:19	04:01:01	B3*01:01:02	B3*02:02:01
22	02:01:01	31:15	35:05:01	35:05:01	04:01:01	04:01:01	04:11:01	09:01:02	03:02:01	03:03:02	04:02:01	04:02:01	B4*01:03:01	B4*01:03:02
23	02:01:01	02:01:01	44:02:01	44:02:01	05:01:01	05:01:01	03:01:01	04:01:01	02:01:01	03:01:01	01:01:01	03:01:01	B3*01:01:02	B4*01:03:01
24	03:01:01	24:02:01	14:02:01	15:01:01	03:03:01	08:02:01	13:01:01	16:01:01	05:02:01	06:03:01	04:02:01	10:01:01	B3*02:02:01	B5*02:02
25	02:01:01	02:20:01	18:01:01	38:01:01	07:01:01	12:03:01	04:03:01	13:01:01	03:02:01	06:03:01	04:01:01	04:01:01	B3*01:01:02	B4*01:03:01
26	24:02:01	29:02:01	15:17:01	45:01:01	06:02:01	07:01:02	<b>09:CTZ</b>	13:02:01	02:02:01	06:04:01	05:01:01	14:01:01	B3*03:01:01	B4*01:01:01
27	24:05:01	26:01:01	27:05:02	35:03:01	02:02:02	04:01:01	11:01:01	11:01:01	03:01:01	03:01:01	04:02:01	10:01:01	B3*02:02:01	B3*02:02:01
28	24:02:01	68:02:01	15:03:01	50:02	02:10:01	06:02:01	04:06:02	13:02:01	04:02:01	06:09:01	<b>02:01:02 / 104:01:01</b>	<b>124:01 / 414:01</b>	B3*03:01:01	B4*01:03:01
29	02:01:01	02:01:01	07:02:01	51:01:01	07:01:01	07:02:01	13:01:01	15:01:01	06:02:01	06:03:01	04:01:01	04:01:01	B3*01:01:02	B5*01:01:01
30	02:01:01	30:02:01	08:01:01	50:01:01	06:02:01	07:01:01	03:01:01	04:03:01	02:01:01	03:02:01	02:01:02	04:01:01	B3*02:02:01	B4*01:03:01
31	02:01:01	30:01:01	07:02:01	13:02:01	06:02:01	07:02:01	07:01:01	15:01:01	02:02:01	06:02:01	10:01:01	<b>13:01:01 / 107:01</b>	B4*01:03:01	B5*01:01:01
32	02:01:01	02:01:01	15:01:01	18:01:01	03:04:01	05:01:01	07:01:01	<b>12:JV</b>	02:02:01	03:01:01	02:01:02	04:01:01	B3*02:02:01	B4*01:03:01

## 4.2 Tipagens geradas pelo laboratório Histogenetics

Quanto ao teste do serviço de tipagem HLA oferecido pelo Laboratório Histogenetics, foi observada grande diferença nos resultados obtidos por ambos protocolos. Das 384 amostras enviadas para tipagem HLA pelo protocolo Illumina01 (Histogenetics), 381 (99,2%) foram tipificadas para 9 genes HLA numa única corrida da plataforma NGS Miseq (Illumina). Ao todo foram identificados 5204 alelos HLA em sua maioria ao nível de resolução do grupo G, e, em alguns casos, ao nível de resolução alélica. Dentre estes alelos, duas novas mutações foram identificados para os genes HLA-B e HLA-C, conforme tabela no apêndice 4.

Em contrapartida, apenas para 155 amostras (40,3%) de 384 foi reportada tipagem HLA para 6 genes HLA pelo protocolo PacBio. No total, 1860 tipagens foram obtidas em 6 corridas do sequenciador Rs-II. Dentre 131 tipagens (7,6%) que apresentaram alguma ambiguidade, apenas 62 casos representavam tipagens onde havia mais de um fenótipo HLA possível (mutações não silenciosas em éxons), para os genes HLA-DRB1 (11 casos) e HLA-DPB1 (51 casos). Os demais 1729 resultados (92,9%) foram reportados com o mais alto nível de resolução descrito para cada alelo, na sua grande maioria, alcançando-se o oitavo dígito da nomenclatura HLA.

Para ambos protocolos Illumina01 e PacBio não foram fornecidos dados de métricas de qualidade do sequenciamento pela empresa Histogenetics.

### 4.3 Análise da confiabilidade dos dados obtidos por NGS

#### 4.3.1 Comparação das tipagens obtidas por NGS com o padrão ouro

Todas as tipagens obtidas pelos 4 protocolos NGS testados foram comparadas com aquelas determinadas pela plataforma de Sanger atualmente empregada no laboratório de Imunogenética do INCA. Como são tipificados atualmente apenas 5 genes HLA de rotina (HLA-A, -B, -C, DRB1, DQB1) por Sanger, a comparação restringiu-se, portanto, apenas a estes 5 loci HLA.

Para isso, levou-se em consideração as diferenças de resolução da nomenclatura HLA alcançada pelas plataformas. Dessa maneira, alguns resultados, apesar de apresentarem nomenclaturas diversas entre os protocolos, são compatíveis e coerentes, variando a sua redação devido a resolução de cada plataforma empregada. Por exemplo, enquanto na plataforma de Sanger encontramos o resultado HLA-A\*02:01P, podemos encontrar nos demais protocolos resultados como HLA-A\*02:01:01:01/02:01:01:02L/02:01:01:03/02:01:01:04; ou HLA-A\*02:01:01G; ou HLA-A\*02:01:01. Todas estas possibilidades são coerentes com o resultado HLA-A\*02:01P. Portanto, não são consideradas discrepâncias.

Apenas a tipagem de um alelo HLA-DQB1 foi encontrada discrepante na comparação NGS-Sanger. Enquanto por Sanger a tipagem encontrada foi HLA-DQB1\*06:02:01 HLA-DQB1\*06:04:01, Illumina02 encontrou a tipagem HLA-DQB1\*03:01:01 HLA-DQB1\*06:02:01, assinalando, portanto, o alelo HLA-DQB1\*06:04:01 em lugar de HLA-DQB1\*03:01:01. O resultado encontrado por Sanger foi ratificado posteriormente por outra plataforma NGS.

A busca por alelos novos restringiu-se às mutações em éxons. Foram encontrados 5 alelos HLA novos: 2 alelos portadores de mutações sinônimas (HLA-B\*15:04:NEW; HLA-C\*07:02:NEW) e 3, não-sinônimas (HLA-A\*11:NEW; HLA-B\*07:NEW; HLA-DRB4\*). Na comparação com Sanger, 3 alelos novos foram ratificados (HLA-HLA-B\*15:04:NEW; HLA-B\*07:NEW; HLA-C\*07:02:NEW), 1 não foi tipificado (HLA-DRB4\*) e 1 não foi confirmado (HLA-A\*11:NEW).

Os 2 alelos novos não confirmados pela plataforma de Sanger foram encontrados apenas pelo protocolo Illumina02. Após sequenciamento por outra plataforma NGS verificou-se que tratavam-se de alelos já descritos, portanto, erroneamente sinalizados como novos.

#### **4.3.2 Verificação da qualidade das leituras geradas NGS**

Os resultados das análises interprotocolos NGS estão detalhados na tabela 13. Para todas as variáveis, os protocolos apresentaram desempenhos diferentes entre si ( $p < 0,0001$ ). A distribuição dos dados de cada protocolo para os 6 genes HLA em cada variável estão nos gráficos 01 a 06.

O protocolo que gerou maior número de leituras para tipagem dos 06 genes HLA foi Ion, com destaque para o grupo de genes HLA classe II, especialmente para HLA-DPB1 e HLA-DRB1 (medianas de 100900 e 87440 respectivamente;  $p > 0,05$ ). Por outro lado, os genes de classe I da plataforma PacBio foram aqueles tipificados com o menor número de leituras, sendo HLA-C aquele que gerou menor quantidade de leituras (463,5;  $p < 0,001$ ). Vale acrescentar que, à exceção de Illumina02, todas as demais plataformas também geraram maior número de leituras para genes HLA de classe II quando comparado aos de classe I ( $p < 0,0001$ ).

Os maiores valores de mapeabilidade foram encontrados na plataforma Illumina02 e os piores para PacBio. Apesar de não haver diferença significativa na mapeabilidade entre as classes HLA de Illumina02, PacBio apresentou os menores valores de mapeabilidade para os genes de classe I HLA-B (26,00) e HLA-C (27,50).

**Tabela 13: Mediana e respectivos 1º (Q1) e 3º (Q3) resumindo a distribuição das variáveis analisadas para os 4 protocolos NGS.** O valor de p mostrado na última coluna refere-se a comparação de todos os dados gerados por cada uma plataforma contra as demais (\*). Para todas as variáveis o valor de p foi achado significativo.

Variável		Illumina01			Illumina02			Ion			PacBio			p Total
		Total	Classe I	Classe II	Total	Classe I	Classe II	Total	Classe I	Classe II	Total	Classe I	Classe II	
Contagem Total	Q1	2816	7854	1959	7090	6573	7521	35535	29534	51258	539	490,5	625,5	<0.0001
	mediana	<b>5874*</b>	<b>8877</b>	<b>2820</b>	<b>9629*</b>	<b>8595</b>	<b>10797</b>	<b>53523*</b>	<b>39866</b>	<b>75676</b>	<b>717*</b>	<b>614</b>	<b>879</b>	
	Q3	8878	11155	3638	14031	12048	14666	80219	54744	103548	1009	789	1252	
Mapeabilidade (%)	Q1	96	99	91	99	99	99	97	97	96	29	25,5	41	<0.0001
	mediana	<b>98*</b>	<b>99</b>	<b>96</b>	<b>99*</b>	<b>99</b>	<b>99</b>	<b>97*</b>	<b>97</b>	<b>97</b>	<b>40*</b>	<b>30</b>	<b>46</b>	
	Q3	99	99	98	99	99	99	97	97	97	48	37,5	51	
Comprimento médio	Q1	207	210	202	134,5	133,5	137	216	214	219,5	2588	2536	2879	<0.0001
	mediana	<b>212*</b>	<b>213</b>	<b>210</b>	<b>137,5</b>	<b>135</b>	<b>138</b>	<b>224*</b>	<b>220</b>	<b>227</b>	<b>2702*</b>	<b>2589</b>	<b>3293</b>	
	Q3	217	217	216	139,5	139	141	231	229	233	3292	2637	3520	
Cobertura média	Q1	---	---	---	276	503	242	2464	2268	2779	150	119,5	240,5	<0.0001
	mediana	---	---	---	<b>442*</b>	<b>621,5</b>	<b>310,5</b>	<b>3385*</b>	<b>3066</b>	<b>3801</b>	<b>241*</b>	<b>161</b>	<b>337</b>	
	Q3	---	---	---	627,5	995	403,5	4709	4214	4950	410	241,5	547,5	
Balanço alélico	Q1	0,67	0,74	0,48	0,71	0,845	0,44	0,78	0,81	0,7	---	---	---	<0.0001
	mediana	<b>0,8*</b>	<b>0,81</b>	<b>0,77</b>	<b>0,85*</b>	<b>0,875</b>	<b>0,735</b>	<b>0,86*</b>	<b>0,86</b>	<b>0,85</b>	---	---	---	
	Q3	0,9	0,87	0,92	0,895	0,9	0,88	0,905	0,905	0,91	---	---	---	

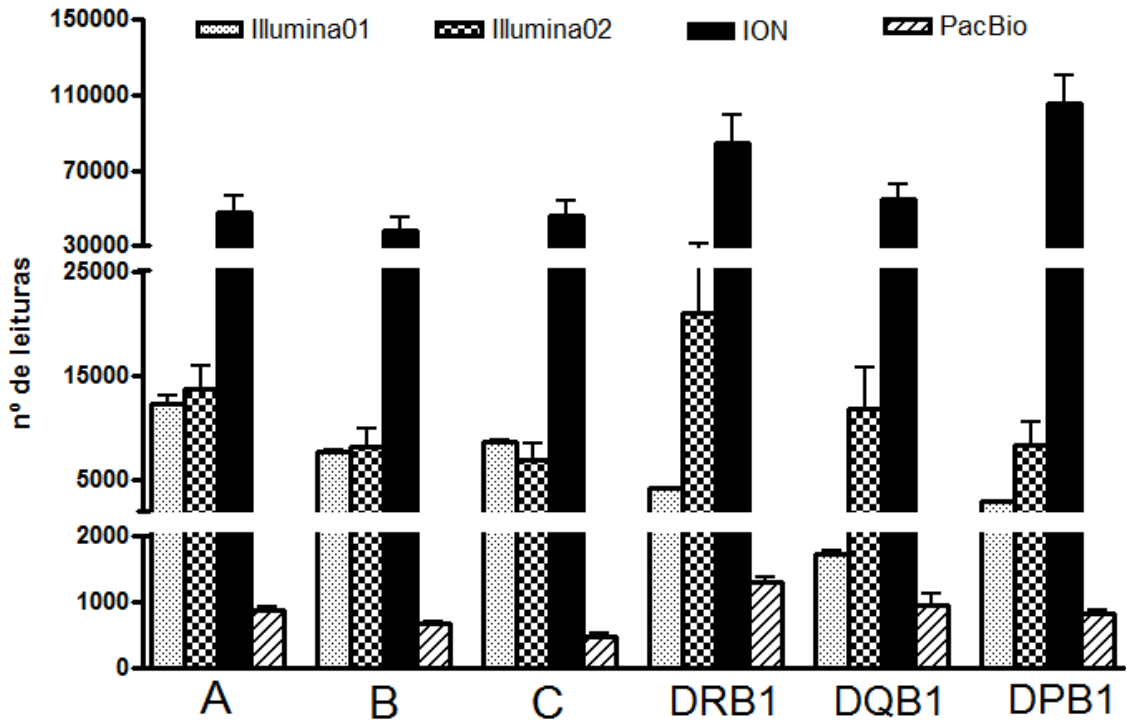


Gráfico 01: Média do número total de leituras geradas por cada protocolo NGS para tipagem dos 6 genes HLA clássicos

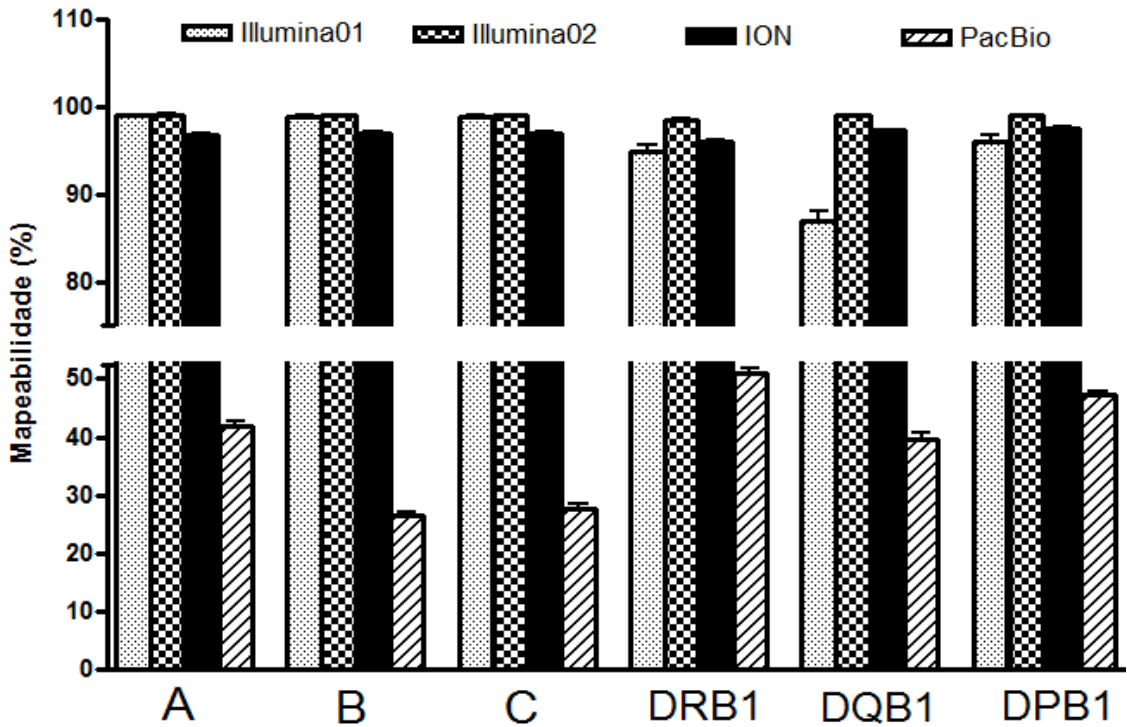


Gráfico 02: Porcentagem das leituras aprovadas para tipagem dos genes HLA geradas pelos diferentes protocolos NGS



Além do número e da qualidade, as leituras também apresentavam comprimentos distintos para cada protocolo. O gráfico 03 demonstra 2 patamares bem distintos de tamanho de leituras: as longas, geradas por PacBio, com tamanho da ordem de milhares de bases; e as curtas, geradas por Ion, Illumina01 e Illumina 02 (em ordem decrescente de tamanho) da ordem de centenas de bases.

A análise das leituras de PacBio mostrou que os maiores comprimentos de leitura foram encontrados para HLA-DPB1 (3605 bases) seguido por HLA-DQB1 (3307 bases) e HLA-DRB1 (2816 bases). Em contrapartida, as menores leituras de todas as plataformas pertenciam aos genes HLA classe I (135 bases) que diferiam dos genes de classe II em apenas 3 bases (138 bases).

Quanto à cobertura, observou-se que os maiores valores foram encontrados para a plataforma Ion (3385 leituras), num patamar bem superior aos seus pares Illumina02 e PacBio, que foi a plataforma com os menores valores para esta variável. Na análise intra-plataforma, os genes HLA Classe II de Ion apresentaram as maiores coberturas (3801 leituras), enquanto que HLA-C (113,5 leituras) e os genes HLA classe I (161 leituras) tiveram os piores níveis de cobertura. Os dados de cobertura máxima e mínima para os éxons 2 e 3 do protocolo Illumina01 estão expostos no gráfico 05. Apesar de sequenciar número muito superior de amostras numa única reação de sequenciamento, os valores de cobertura encontrados são satisfatórios. Apesar da comparação inter-protocolos não ser possível, na análise intra-protocolo parece haver uma maior representatividade de leituras do éxon 2 dos genes HLA de classe I e, no outro extremo, em menor número, o éxon 3 dos genes HLA classe II.

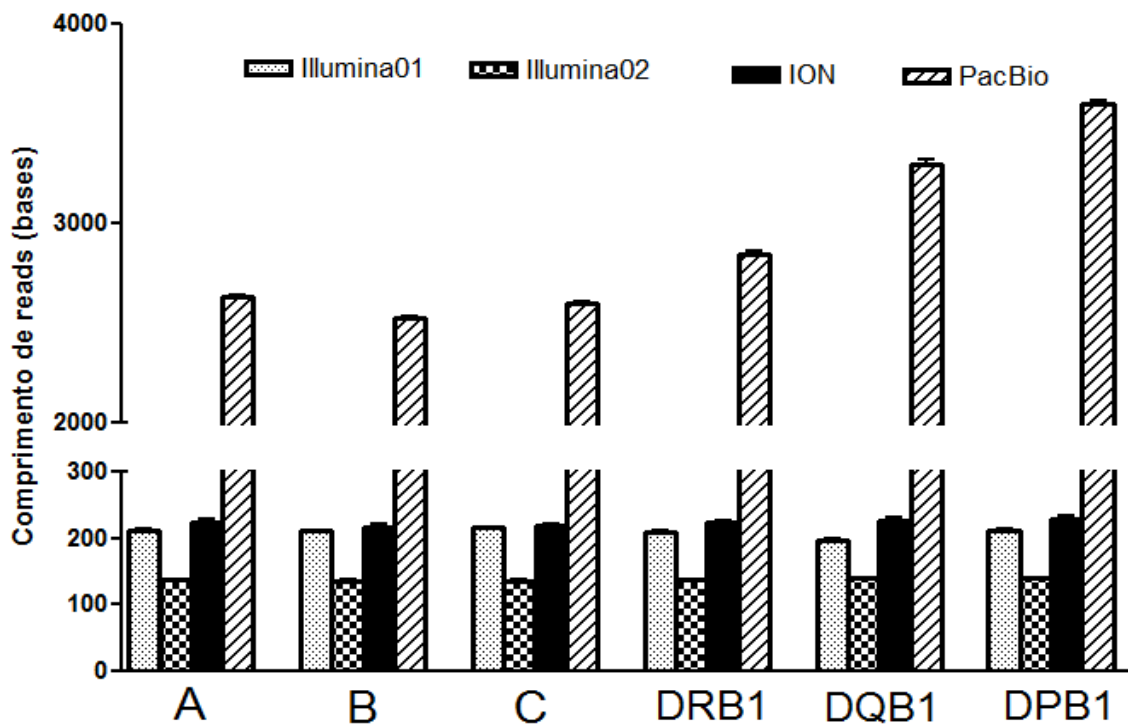


Gráfico 03: Comprimento médio das leituras geradas por cada protocolo NGS para os genes HLA classe I e II

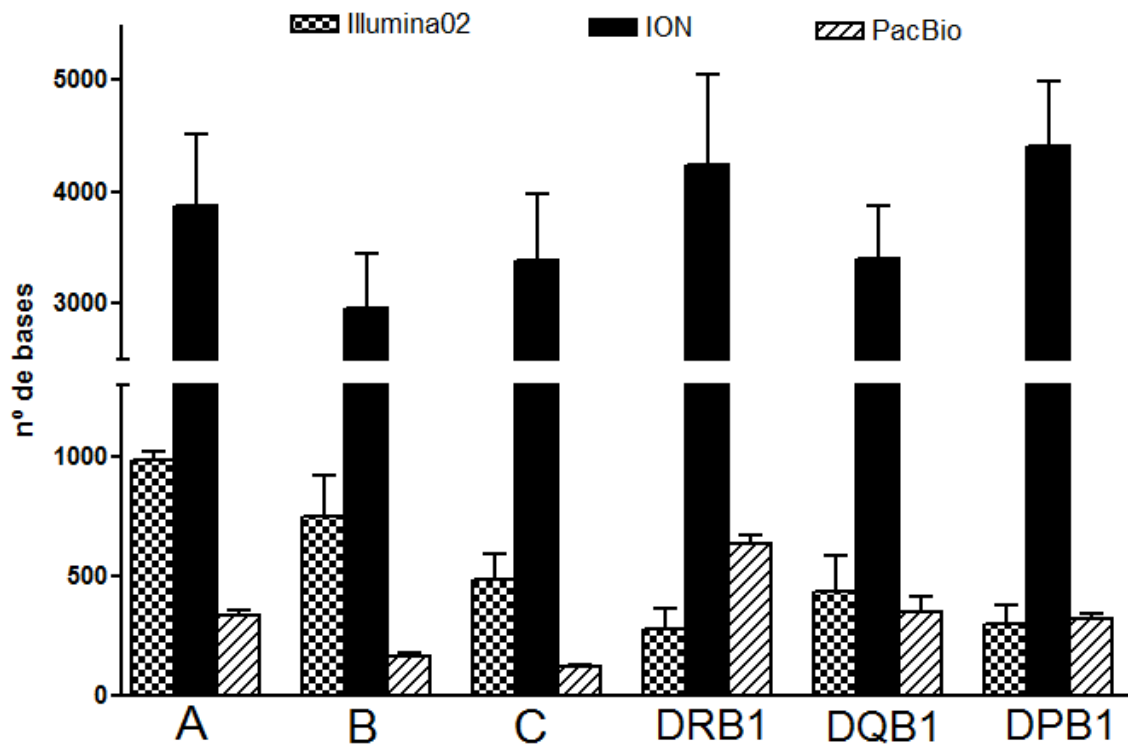


Gráfico 04: Cobertura média dos diferentes genes HLA por 3 protocolos NGS

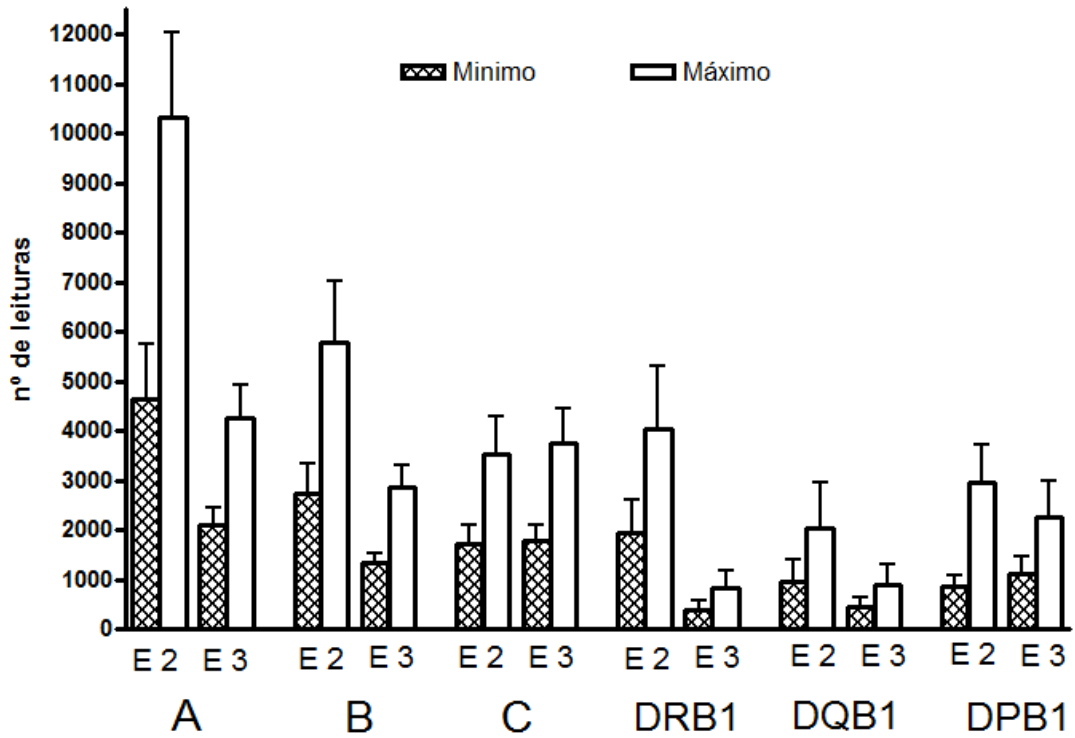


Gráfico 05: Média das coberturas mínima e máxima para os éxons 2 e 3 no protocolo Illumina01

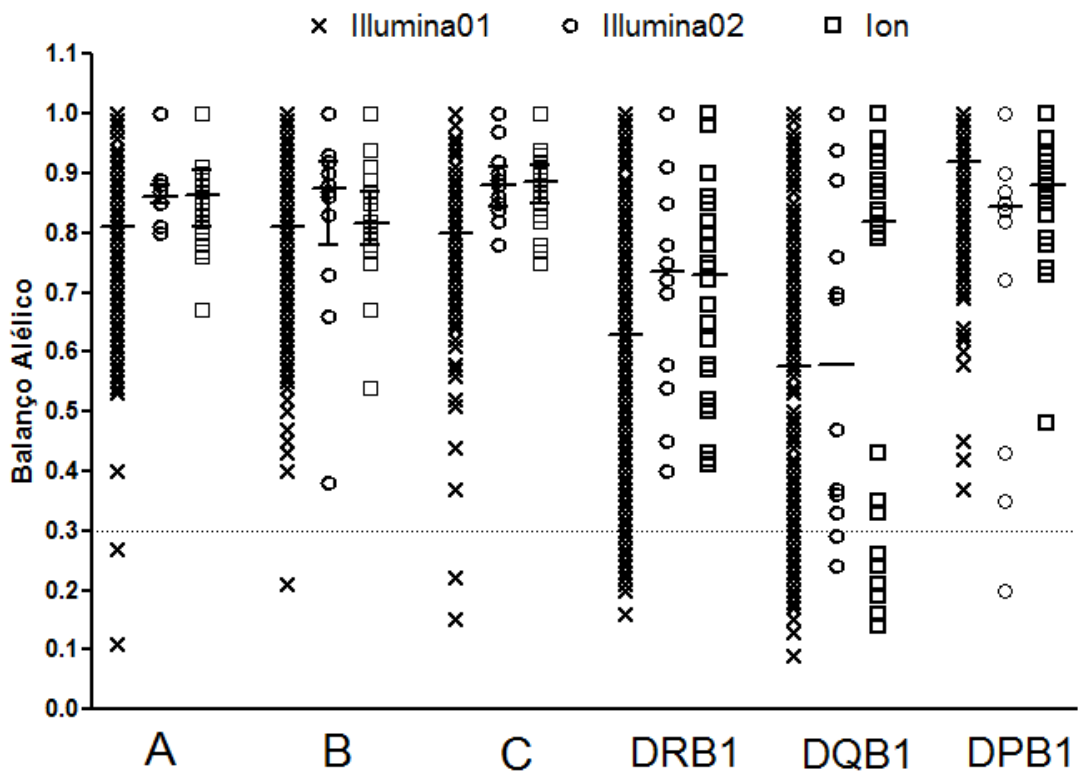


Gráfico 06: Balanço alélico para os 6 genes HLA clássicos por 3 protocolos NGS

A distribuição do índice de balanço alélico para 3 das 4 plataformas NGS, calculadas pelo software TypeStream, está demonstrada no gráfico 06. Valores inferiores a 0,3 (marcado pela linha tracejada) são considerados casos de desbalanço enquanto valores iguais a 1 são casos de homozigose. A plataforma Illumina01 apresentou o maior número de ocorrências de balanço alélico menor que 0,3 com 134 tipagens (5% de 2287), seguida por Ion, com 7 tipagens (3% de 193) e Illumina02 com 3 tipagens (4% de 71), conforme dados das tabelas 14 e 15.

Os genes HLA de classe II foram praticamente os únicos a serem afetados em todos os protocolos, com destaque para HLA-DQB1, que agrupa 75% dos casos. Em Ion, onde o desequilíbrio foi observado apenas para DQB1, todas as 7 amostras (11, 14, 17, 18, 26, 31, 32) com desbalanço alélico menor que 0,3 e outras 2 amostras (23 e 30) com valores próximos ao desbalanço (0,33 e 0,35) apresentavam, em comum uma menor representação dos alelos HLA-DQB1\*02. Para as demais plataformas, não foi encontrado padrão semelhante.

Além da caracterização das leituras utilizadas pelos 4 protocolos NGS, também foi investigado o nível e padrão de erro de sequenciamento através dos subprodutos gráficos estatísticos do software NGSengine individualizados para cada tipagem HLA em cada amostra. Conforme a figura 17, em termos de nível de erro de determinação de base (pontos pequenos), PacBio apresentou o pior desempenho com a maior densidade de erros entre 1 e 10%, podendo chegar em algumas posições do gene a 20%. Illumina leva vantagem sobre Ion pela menor incidência de erros que, em sua maioria, limitam-se ao nível de frequência de 1%.

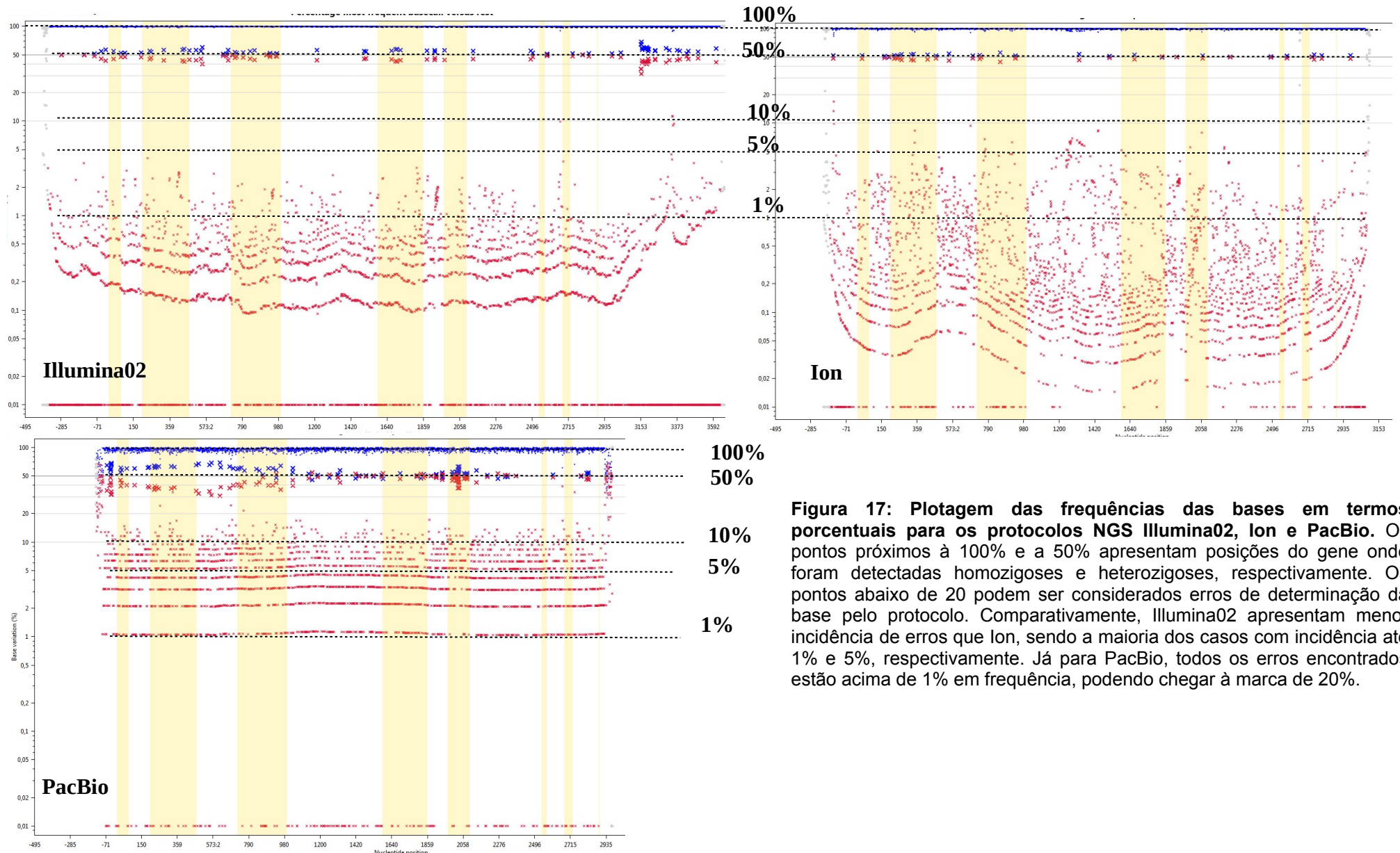
Na figura 18, observamos o nível de atribuições equivocadas de inserções para cada plataforma. Enquanto para Illumina01 e 02 estes erros praticamente não ocorrem, em PacBio e em Ion eles parecem ser a maior causa dos erros encontrados na figura 17.

**Tabela 14: Frequências absoluta e relativa de valores de balanço alélico inferiores a 0,3 para cada protocolo entre os genes HLA classe I.**

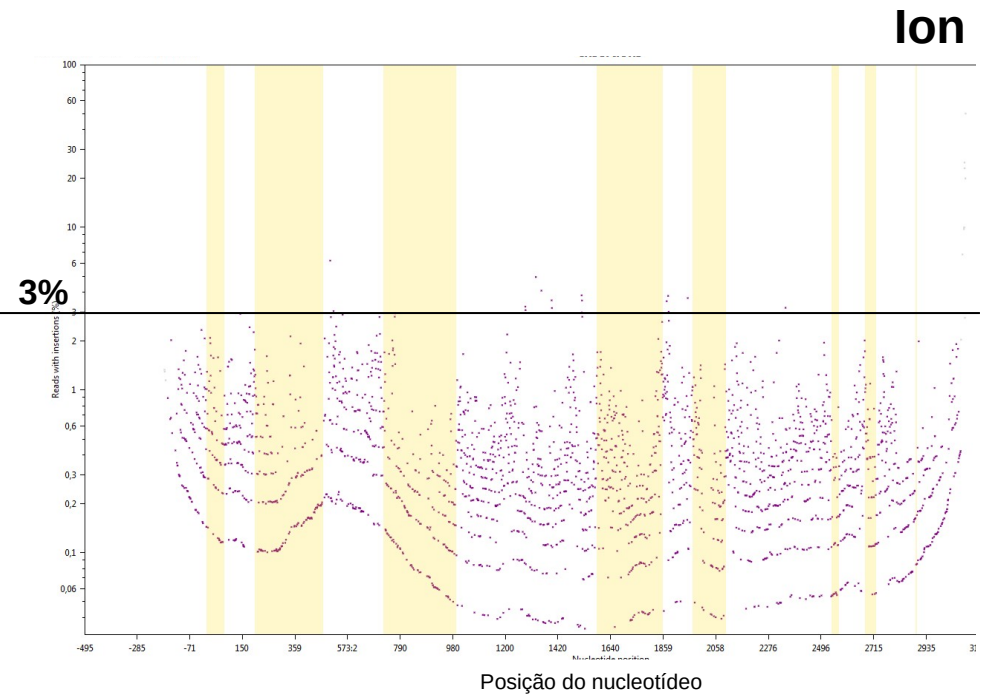
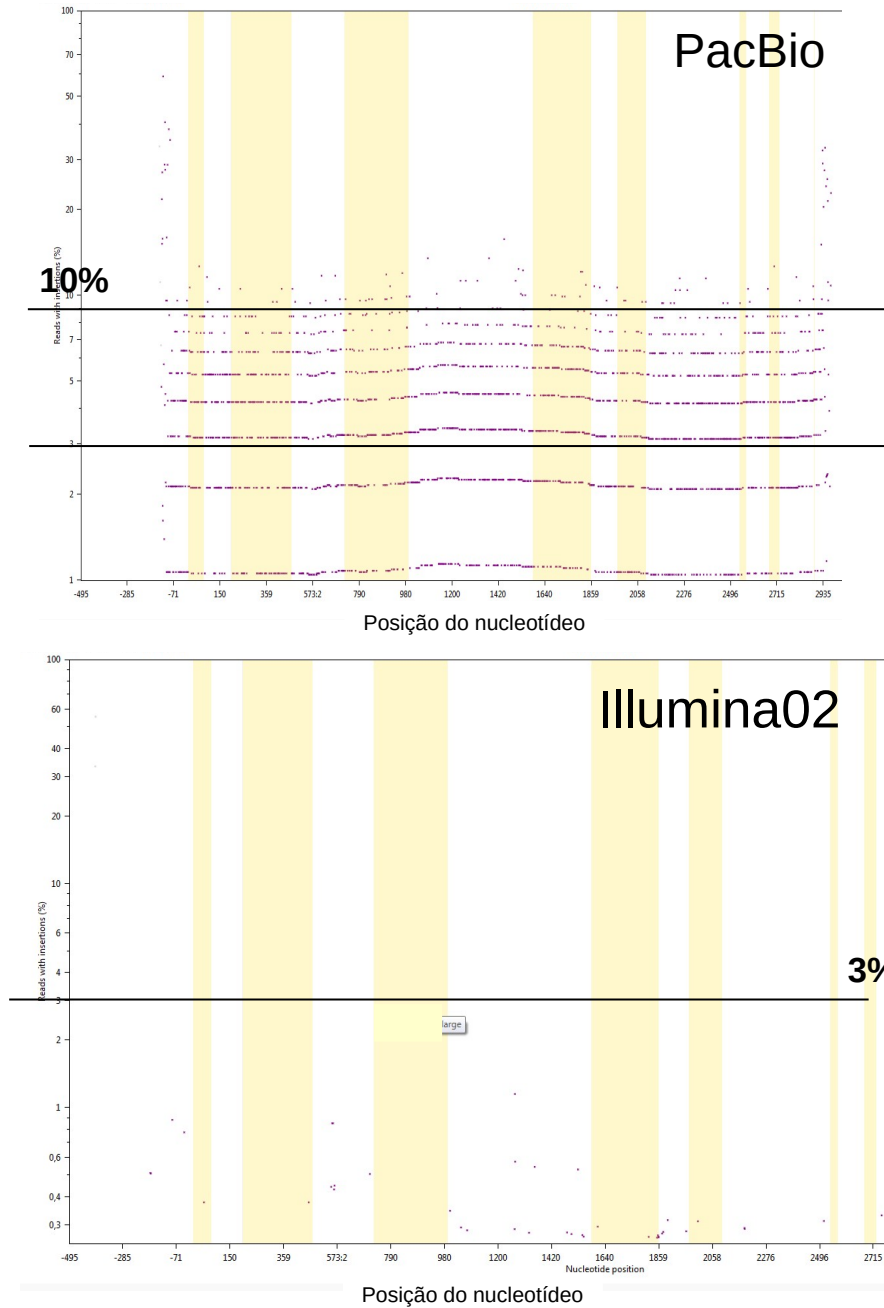
Protocolos	Tipagens N	Total < 0,3		Classe I < 0,3		HLA-A < 0,3		HLA-B < 0,3		HLA-C < 0,3	
		%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
IL01	2287	5,82%	133	3,8%	5	1,5%	2	0,8%	1	1,5%	2
IL02	72	4,17%	3	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
ION	192	3,65%	7	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0

**Tabela 15: Frequências absoluta e relativa de valores de balanço alélico inferiores a 0,3 para cada protocolo entre os genes HLA classe II.**

Protocolos	Tipagens N	Total < 0,3		Classe II < 0,3		HLA-DRB1 < 0,3		HLA-DQB1 < 0,3		HLA-DPB1 < 0,3	
		%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
IL01	2287	5,82%	133	96,2%	128	21,8%	29	74,4%	99	0%	0
IL02	72	4,17%	3	100%	3	0,0%	0	67%	2	33%	1
ION	192	3,65%	7	100%	7	0,0%	0	100%	7	0%	0



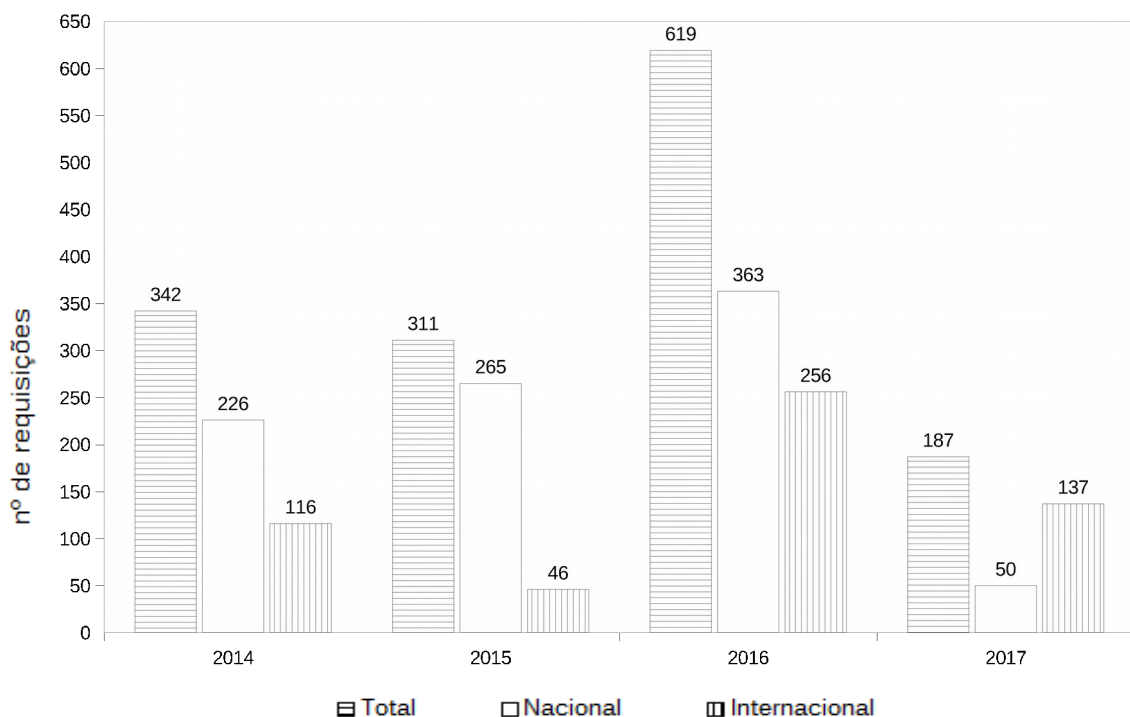
**Figura 17: Plotagem das frequências das bases em termos percentuais para os protocolos NGS Illumina02, Ion e PacBio.** Os pontos próximos à 100% e a 50% apresentam posições do gene onde foram detectadas homozigoses e heterozigoses, respectivamente. Os pontos abaixo de 20 podem ser considerados erros de determinação da base pelo protocolo. Comparativamente, Illumina02 apresentam menor incidência de erros que Ion, sendo a maioria dos casos com incidência até 1% e 5%, respectivamente. Já para PacBio, todos os erros encontrados estão acima de 1% em frequência, podendo chegar à marca de 20%.



**Figura 18: Plotagem das frequências dos erros de inserção encontrados ao longo do gene para os protocolos NGS Illumina02, Ion e PacBio. A plataforma Illumina02 praticamente não apresenta erros de inserção, seguida de Ion, com a maioria deles em torno de 3% e PacBio, podendo ultrapassar a marca de 10% de frequência.**

## 5. DISCUSSÃO

Em 2011 o laboratório de Imunogenética do INCA deu início à tipagem HLA de alta resolução, atendendo principalmente as solicitações do REDOME, na busca de doadores de medula óssea para pacientes brasileiros. Entretanto, o número e o perfil das solicitações mudaram, com um acréscimo de 95% no ano de 2016, em comparação com a média dos dois anos anteriores (326,5), conforme gráfico 07. Além disso, as solicitações, que a princípio eram de origem majoritariamente nacional, agora tem uma contribuição muito maior das requisições de Registros Internacionais que saltaram mais de 3 vezes, de uma média anual de 81 para 256. Em termos proporcionais, enquanto nos anos de 2014 e 2015 os pedidos Internacionais representaram aproximadamente 25% do total de testes confirmatórios, em 2016 esse número passou a 41%, chegando a mais de 70% nos dados preliminares de 2017.



**Gráfico 07: Distribuição das requisições de exames de tipagem HLA confirmatórios estratificados pela origem recebidos entre Janeiro de 2014 e Março de 2017.**



Para atender este crescimento na demanda, foram implementadas atualizações na plataforma em uso atualmente (Sanger) tanto no protocolo (possibilidade de sequenciar outros éxons) quanto no sequenciador (aumento no número de capilares de 8 para 16). Porém, estas medidas não tem se mostrado suficientes. O número de amostras tipificadas por corrida do equipamento ainda é limitado a 6 num protocolo que contempla apenas os éxons mais polimórficos de cada gene HLA e não inclui o HLA-DPB1, mais novo candidato aos testes de histocompatibilidade para transplantes de medula. Portanto, detectou-se a necessidade da busca por novas estratégias de tipagem HLA com maior capacidade de liberação de resultados.

A tipagem dos 05 genes HLA pelo sequenciamento de Sanger requer a formação de 27 bibliotecas por amostra (HLA-A, -B, -C = 6 por gene; HLA--DRB1 – 5, HLA-DQB1 – 4). Iniciando-se o preparo da biblioteca pela manhã, ao fim do dia pode ser iniciada a corrida no sequenciador 3500XL (Applied Biosystems) que permite sequenciar 192 bibliotecas de DNA em 15 horas. Portanto, na manhã do dia seguinte teremos a tipagem completa de 5 genes HLA para apenas 7 amostras. Levando-se em conta a possibilidade de repetições, semanalmente, a capacidade máxima de amostras liberadas com tipagem de alta resolução é 28. Vale ressaltar que este cálculo não leva em consideração a tipagem do gene HLA-DPB1, que requer o sequenciamento de 8 bibliotecas.

Como a nova geração de tecnologias de sequenciamento surgiu dedicada à superação dessas limitações impostas pelo sequenciamento clássico, é natural a migração para estas novas plataformas. Isso já vem ocorrendo no Brasil, pois, atualmente, os SGSs já podem ser encontrados nas principais Universidades públicas da cidade (UFRJ, UERJ) bem como em centros de excelência em pesquisa, como FioCruz e o próprio INCA, que conta com 3 equipamentos SGS, 2 deles sendo parte do parque tecnológico da Divisão de Laboratórios do CEMO.

Neste trabalho, comparamos o desempenho de 4 protocolos que utilizam diferentes abordagens e plataformas de sequenciamento de nova geração para a tipagem dos genes HLA com o atual padrão ouro: o sequenciamento de Sanger. Eles diferem entre si pela quantidade de genes HLA abrangidos (5, 6, 9 ou 11 genes), a tecnologia de sequenciamento (di-desoxinucleotídeos, CRT, semicondutor ou

SMRT) e, conseqüentemente, o sequenciador empregado (3500xl, Applied Biosystems; MiSeq, Illumina; Ion S5, Thermo Fisher; PacBio, Pacific Biosciences), o nível de resolução dos resultados, além do número de amostras com tipagem completa liberada por ensaio, que varia de 7 a 384.

Uma das grandes vantagens dos protocolos NGS sobre Sanger é a possibilidade de sequenciar regiões maiores dos genes HLA, abrangendo outros éxons e incluindo íntrons e regiões não traduzidas. Illumina01 propõe-se a sequenciar basicamente os éxons principais de cada gene HLA com a contrapartida no ganho do número de amostras tipadas em uma única reação de sequenciamento. Os demais protocolos, apesar de apresentarem diferenças na cobertura de éxons e íntrons para cada um dos genes HLA demonstram um padrão: os genes HLA de classe I são sequenciados por completo, enquanto que os genes de classe II tem apenas algumas regiões abrangidas, conforme já demonstrado com detalhes na tabela 16.

O grande desafio do sequenciamento completo dos genes HLA de classe II é o seu tamanho. Conforme a tabela 18, enquanto o maior gene de classe I (HLA-C) mede pouco mais de 4000 bases, apenas o íntron 1 de HLA-DRB1 pode chegar a 5272 bases de tamanho. O que torna praticamente inócua o sequenciamento do éxon 1 destes genes pois, ainda que o seja, a ausência de leituras para o íntron 1 tornará inviável o estabelecimento de uma fase entre o éxon 1 e os demais. Isso ajuda a explicar a maior incidência de ambigüidades ao nível do alelo (2º campo numérico) para estes genes.



No início de 2016, apenas a Illumina já oferecia seu protocolo (Illumina02) para tipagem HLA por NGS no Brasil. Apesar de ao menos outras 4 empresas disputarem este mercado diagnóstico a nível mundial, todas ainda buscavam firmar parceria com um representante local ou estavam em fase final de testes de seu protocolo.

Por esta razão, o protocolo Illumina02 foi o primeiro contato prático do laboratório de Imunogenética do INCA com a tecnologia NGS. Os avanços frente ao protocolo na rotina (Sanger) em termos de aumento do número de amostras tipificadas por corrida (12, podendo chegar a 96), de genes HLA analisados (passando de 5 para 11) e do nível de resolução dos resultados (eliminação da nomenclatura G e resultados com resolução até 6º dígito) foram notórios.

Entretanto, Illumina01 sinalizou 2 mutações novas que, testadas por Sanger e por, ao menos, um dos demais protocolos NGS, não foram confirmadas. A causa pode ser atribuída a problemas na manipulação durante o preparo da biblioteca. Mesmo um volume pequeno de amplicons trocados entre as amostras nas etapas anteriores a ligação das sequências código de barra podem vir a tornarem-se representativas após a etapa de amplificação clonal e passarem do nível de simples ruído de sequenciamento a falsa heterozigose. Reforça esta tese a detecção de contaminação em 5 das 12 amostras testadas. A inexperiência do manipulador e o alto grau de manipulação exigida pelo protocolo são as prováveis causas dos altos níveis de contaminação encontrados. Não por acaso um dos laboratórios que já utiliza este protocolo em sua rotina diagnóstica busca implementar a automação do preparo de biblioteca. Porém, a discrepância de uma tipagem para o gene HLA-DQB1 não parece ter origem nesta mesma causa.

Diante de resultados tão desanimadores e da escassez de produtos semelhantes no mercado nacional, buscamos protocolos alternativos no mercado internacional. Após contato e tratativas com outras empresas (Omixon, GenDx e Immucor) o teste de seus protocolos tornou-se inviável quer pela ausência de suporte local, quer pela carência de infraestrutura exigida para execução de seus protocolos. Dessa maneira, o teste seguinte foi executado em um laboratório nos Estados Unidos da América. Utilizando a estrutura tecnologia próprias do laboratório Histogenetics, foram testados 2 de seus protocolos: o primeiro (Illumina01) que emprega

sequenciador da Illumina (MiSeq) e permite a tipagem simultânea de 384 amostras para 9 genes HLA, sequenciando seus principais éxons para gerar tipagem HLA de alta resolução ao nível do grupo G de alelos; o segundo, (PacBio) que busca elucidar praticamente todas as ambiguidades de tipagem através do uso de fragmentos amplificados mais longos (até 30.000 bases) para cobrir regiões maiores dos genes HLA (éxons e íntrons) e facilitar a determinação da fase dos polimorfismos encontrados.

A principal vantagem de Illumina01 é o alto número de amostras e genes HLA tipificados em uma simples corrida do sequenciador Miseq (3429 tipagens), apesar dos ganhos em número de amostras limitar o sequenciamento aos éxons principais de cada gene HLA. O nível mínimo de resolução das tipagens obtidas, restrita ao grupo G, é inferior a nomenclatura do grupo P, buscada nas tipagens liberadas por Sanger, por não descartar das ambiguidades a possibilidade de alelos nulos, relevantes para os transplantes. Contudo, a grande maioria das tipagens descritas como do grupo G por Illumina01 não apresentavam, dentre as possibilidades, alelos nulos. Além disso, em muitos casos foi demonstrado ganho no nível de resolução das tipagens de Illumina01 sobre aquelas de Sanger, resolvendo algumas ambiguidades como HLA-A\*23:01P pelo sequenciamento do éxon 1 deste gene e demonstrando melhor a presença de alelos na população brasileira como HLA-A\*23:17. Em vias de testes estava um protocolo que utilizaria o sequenciador Hiseq da linha Illumina que, por possuir com capacidade de sequenciamento possibilitaria dobrar a capacidade de amostras analisadas por corrida (768 amostras).

O protocolo PacBio destaca-se dos demais por alcançar o maior nível de resolução de resultados dentre todos os protocolos testados. Entretanto, mesmo algumas ambiguidades ao nível do quarto dígito (mutações em éxons não silenciosas), principalmente para HLA-DPB1 não puderam ser resolvidas devido ao sequenciamento incompleto deste gene. O mesmo ocorreu para HLA-A e HLA-B que, mesmo todos seus éxons e íntrons sequenciados, apresentaram ambiguidades localizadas na região 5' UTR. Contudo, estas ambiguidades são tidas como pouco relevantes por restringirem-se ao oitavo dígito numérico (mutações silenciosas em éxons e íntrons, respectivamente). Em termos de preparo da biblioteca, PacBio foi o único protocolo NGS que não agrupou amplicons de diferentes genes HLA de várias

amostras em uma mesma reação de sequenciamento. Ou seja, foram necessárias 6 preparos de bibliotecas e 6 corridas separadas do sequenciador PacBio para a tipagem de 384 amostras. Um destaque negativo foi o baixo número de amostras com tipagem reportada (40%) demonstrando o baixo rendimento da plataforma. Como justificativa foi apontado pela empresa o baixo nível de qualidade das amostras. Ressalte-se que estas foram as mesmas amostras testadas por Illumina01, que teve rendimento muito superior (99%) que PacBio. Ainda considere-se que as amostras deveriam apresentar níveis superiores de qualidade, este requisito torna-se uma barreira a rotina diagnóstica onde, muitas vezes, depara-se com amostras oriundas de pacientes cujos níveis de concentração e pureza de material genético são considerados baixos.

Somente em julho de 2017 outro protocolo de tipagem HLA foi disponibilizado para testes no mercado brasileiro pela empresa OneLambda. Este protocolo foi realizado por completo no laboratório de Imunogenética com a instalação dos equipamentos para preparo da amplificação clonal (Ion Chef) e do sequenciador Ion S5. Após a realização de algumas sessões de treinamento do tecnologista responsável, uma corrida de teste foi realizada e a tipagem de 32 amostras para os 9 genes HLA foi obtida. Com eficiência de 100%, 288 tipagens foram determinadas em sua maioria, ao nível do terceiro campo numérico de resolução. Contudo, foram encontradas ambiguidades ao nível de mutações não silenciosas em éxons (segundo campo numérico) para HLA-B, HLA-DRB1 e HLA-DPB1. Para os genes HLA classe II este resultado era esperado pelo seu sequenciamento ser incompleto. Entretanto, a causa das ambiguidades de HLA-B tem origem na dificuldade da determinação da fase de algumas posições em heterozigose, geralmente com uma distância entre elas maior que o tamanho médio do fragmento gerado pelo sequenciador. Nestes casos, far-se-ia necessário o uso de outras técnicas para determinação da tipagem correta.

A análise de parâmetros de qualidade permitiu, antes de mais nada, conhecer com maior profundidade os 4 protocolos NGS testados. Duas abordagens foram empregadas pelos 3 sequenciadores estudados para sequenciar éxons e íntrons dos genes HLA.

Os SGS Miseq e Ion geraram uma quantidade da ordem de dezenas ou mesmo centenas de milhares de leituras, respectivamente, com tamanho entre 150 e 250 bases. Em contrapartida, as leituras geradas por PacBio, apesar de em número 10 vezes menor, destacam-se pelo seu tamanho, em média, até 15 vezes maior que Miseq e Ion.

A qualidade das leituras produzidas para cada plataforma fica evidente nos resultados de mapeabilidade encontrados. Enquanto as leituras da plataforma Illumina, submetidas aos critérios mais rigorosos de qualidade, alcançaram os maiores índices de mapeabilidade (99%), PacBio, cujas leituras foram dispensadas de 3 critérios, foi a pior plataforma neste critério, tendo rejeitadas de modo geral 60% de suas leituras. O desempenho de Ion ficou muito próximo de Illumina01 e 02, apesar de diferente do ponto de vista estatístico.

Tomando por base a definição de cobertura como sendo o número de leituras alinhadas em determinada posição sequenciada do gene, os resultados encontrados estão de acordo com o esperado. Ion, por ser a plataforma que gerou mais leituras, apesar de apresentar mapeabilidade um pouco menor Illumina02, alcançou os maiores níveis de cobertura. Enquanto PacBio, pelos mesmos motivos mas com desempenho oposto para as variáveis cobertura e mapeabilidade, apresentou os menores valores de cobertura.

A investigação da métrica de qualidade balanço alélico provou-se muito útil na detecção de problemas nos protocolos NGS. Os três protocolos (Illumina01, Illumina02 e Ion) apresentarem um perfil semelhante para esta variável. Os casos de desbalanço ocorreram majoritariamente em genes HLA de classe II, principalmente HLA-DQB1. Outro aspecto importante é o padrão observado em Ion, onde todos os casos de desbalanço alélico limitavam-se à baixa representatividade dos alelos do grupo HLA-DQB1\*02.

Os problemas de baixa amplificação ou mesmo ausência de amplificação de alelos DQB1 não restringem-se a protocolos NGS. A literatura e nossa própria experiência com as diversas plataformas de tipagem HLA por SSO ou mesmo Sanger demonstram que o desafio de tipificar este gene de maneira inequívoca parece ser

maior que os demais (VOORTER, 1998). Talvez o melhor desenho para os *primers* responsáveis pela amplificação de HLA-DQB1 ainda não tenha sido encontrado, pois não somente Illumina02, mas também outros fabricantes de protocolos NGS para tipagem HLA empregam estratégias específicas para a amplificação de HLA-DQB1, alterando os reagentes empregados, bem como os ciclos de temperatura.

A ocorrência de casos de desbalanço alélico reforça a necessidade da escolha de plataformas NGS com baixos níveis de determinação errônea de bases, os chamados ruídos de sequenciamento. Altos níveis de ruído podem ser confundidos como falsos casos de heterozigose, enquanto baixos valores permitem identificar facilmente casos de desbalanço alélico, principalmente na proporção 80/20.

Em termos de erros de sequenciamento, a tecnologia empregada pela Illumina parece estar em um nível muito superior ao de seu maior concorrente, Ion, que ainda é muito acometido por erros do tipo inserção de base, principalmente em regiões de homopolímeros. Apesar desta fraqueza não afetar diretamente as tipagens até o terceiro campo numérico (éxons), o mesmo não pode ser dito dos íntrons, ricos em homopolímeros. Na verdade, o software Type Stream (parte do protocolo ION), quando configurado para gerar tipagens até o oitavo dígito (diferenças em íntrons) apresenta diversas sinalizações de alelos com novas mutações em regiões de íntrons. Ao investigarem-se estes casos, verifica-se que as “novas mutações” encontradas são, na verdade, inserções em regiões de homopolímeros. Apesar de ainda inicial, o estudo de íntrons da região HLA já tem demonstrado que estas regiões contém sequências codificantes para micro-RNAs em genes HLA-B, que seriam capazes de autorregular a expressão destes genes. Portanto, a confiabilidade do sequenciamento de íntrons por Ion e PacBio ficaria prejudicada.



## 6. CONCLUSÃO

Dadas as debilidades encontradas nos protocolos testados e a existência de outras opções de protocolos de tipagem HLA por NGS recém-chegadas ao mercado nacional, concluímos por não optar entre um dos 4 protocolos NGS testados sem antes verificar todas as possibilidades disponíveis. Os testes dos protocolos oferecidos por Omixon e GenDX estão em andamento, e os dados obtidos serão comparados àqueles apresentados neste estudo para, só então, ser possível determinar qual o melhor protocolo. Desta maneira, esperamos implementar na rotina do laboratório de Imunogenética do INCA a tipagem HLA por NGS no segundo semestre de 2018. Entretanto, é possível concluir que o sequenciador NGS Miseq da Illumina é o mais indicado para a rotina de tipagem HLA por NGS por apresentar o melhor desempenho dentre seus pares, com maiores níveis de confiabilidade das leituras geradas, melhor mapeabilidade, menores níveis de erro de determinação de base e de inserção.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. D. et al. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. **J Transl Med**, v. 2, n. 1, p. 30, Sep 2004.
- BARKER, C. F.; MARKMANN, J. F. Historical overview of transplantation. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 4, p. a014977, Apr 2013.
- BENTLEY, D. R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 53-9, Nov 2008.
- DAUSSET, J. [Iso-leuko-antibodies]. **Acta Haematol**, v. 20, n. 1-4, p. 156-66, 1958 Jul-Oct 1958.
- GATTI, R. A. et al. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. **Lancet**, v. 2, n. 7583, p. 1366-9, Dec 1968.
- GIBSON, T.; MEDAWAR, P. B. The fate of skin homografts in man. **J Anat**, v. 77, n. Pt 4, p. 299-310.4, Jul 1943.
- GORER, P. A.; LYMAN, S.; SNELL, G. D. Studies on the Genetic and Antigenic Basis of Tumour Transplantation. Linkage between a Histocompatibility Gene and 'Fused' in Mice. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences**, v. 135, n. 881, p. 499-505, 1948.
- HORTON, R. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 12, p. 889-99, Dec 2004.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 10, p. 702-9, Sep 2000.
- LOMAN, N. J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 5, p. 434-9, May 2012.
- MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-80, Sep 2005.
- MEDAWAR, P. B. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. **J Anat**, v. 78, n. Pt 5, p. 176-99, Oct 1944.
- MOREY, M. et al. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. **Mol Genet Metab**, v. 110, n. 1-2, p. 3-24, 2013 Sep-Oct 2013.
- NUNES, E. et al. Definitions of histocompatibility typing terms. **Blood**, v. 118, n. 23, p. e180-3, Dec 2011.
- PETERSDORF, E. W. et al. Effect of HLA class II gene disparity on clinical outcome in unrelated donor hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: the US National Marrow Donor Program Experience. **Blood**, v. 98, n. 10, p. 2922-9, Nov 2001.
- QUAIL, M. A. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, p. 341, Jul 2012.

RHOADS, A.; AU, K. F. PacBio Sequencing and Its Applications. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 278-89, Oct 2015.

ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348-52, Jul 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977.

SASAZUKI, T. et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. **N Engl J Med**, v. 339, n. 17, p. 1177-85, Oct 1998.

SCHÖFL, G. et al. 2.7 million samples genotyped for HLA by next generation sequencing: lessons learned. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 161, Feb 2017.

STARZL, T. E. Peter Brian Medawar: father of transplantation. **J Am Coll Surg**, v. 180, n. 3, p. 332-6, Mar 1995.

TERASAKI, P. I. et al. Renal damage produced in vivo by homologous mouse antisera. **Ann N Y Acad Sci**, v. 99, p. 645-56, Oct 1962.

TERASAKI, P. I.; MCCLELLAND, J. D. Antibody response to homografts. VIII. Relation of mouse hemagglutinins and cytotoxins. **J Exp Med**, v. 117, p. 675-90, Apr 1963.

TERASAKI, P. I.; RICH, N. E. Quantitative determination of antibody and complement directed against Lymphocytes. **J Immunol**, v. 92, p. 128-38, Jan 1964.

THORSBY, E. A short history of HLA. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 2, p. 101-16, Aug 2009.

TROWSDALE, J.; RAGOISSIS, J.; CAMPBELL, R. D. Map of the human MHC. **Immunol Today**, v. 12, n. 12, p. 443-6, Dec 1991.

VOORTER, C. E.; KIK, M. C.; VAN DEN BERG-LOONEN, E. M. High-resolution HLA typing for the DQB1 gene by sequence-based typing. **Tissue Antigens**, v. 51, n. 1, p. 80-7, Jan 1998.

WŁASIUK, P.; PUTOWSKI, M.; GIANNOPOULOS, K. PD1/PD1L pathway, HLA-G and T regulatory cells as new markers of immunosuppression in cancers. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 70, n. 0, p. 1044-1058, Oct 2016.

ZHOU, M. et al. Application of high-throughput, high-resolution and cost-effective next generation sequencing-based large-scale HLA typing in donor registry. **Tissue Antigens**, v. 85, n. 1, p. 20-8, Jan 2015.

ZINKERNAGEL, R. M.; DUNLOP, M. B.; DOHERTY, P. C. Cytotoxic T cell activity is strain-specific in outbred mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. **J Immunol**, v. 115, n. 6, p. 1613-6, Dec 1975.

## 8. APÊNDICES

les.cgp - Assign

Genotyping Codons Grouping All Alleles Show Update  
 rmat Excel Filtered CWD Set CWD 2012 v3.23 G About  
 ports Reports Options Fields Three Annotation Views Window System

V891A  
 ACCEPT 2 0 Go  
 A C G T A +  
 Full Gene Master

Exon 2 Intron 2 Exon 3 Intron 3 Exon 4 Intron 4 Exon 5 Intron 5 Exon 6 Intron 6 Exon 7 Intron 7 3' UTR

"--" = Ambiguous Field, "#" = Ambiguous Expression.  
 "X" in the results table does not constitute confirmation of homozygosity.

IMGT/A	IMGT/B	IMGT/C	IMGT/DPA1	IMGT/DPB1	IMGT/DQA1	IMGT/DQB1	IMGT/DRB1	IMGT/DRB3	IMGT/DRB4	IMGT/DRB5
11:01:01 X	51:01:01 X	07:01:01 X	01:03:01 X	04:01:01 X	05:05:01 X	03:01:01 X	11:01:01 X	02:02:01 X		
26:01:01	14:02:01	08:02:01	01:03:01	04:01:01	01:01:02	03:02:01	01:02:01		--:--	
33:01:01	38:01:01	12:03:01	X	X	03:01:01	05:01:01	04:02:01		--:--	
02:01:01	--:--	02:02:02	01:03:01	--:01:--	01:03:01	03:01:01	16:02:01	02:02:01		02:02
11:01:01	--:--	03:03:01	X	--:--:--	05:05:01	06:03:01	13:01:01			
--:--	13:02:01	04:01:01	01:03:01	--:--:--	02:01	02:02:01	08:07		01:03:01	
--:--	35:04:01	06:02:01	02:01:01	--:01	04:01:01	04:02:01	07:01:01		X	
--:--	15:03:01	02:10:01	01:03:01	18:01	01:02:01	05:01:01	12:--:--	01:01:02		
--:--	81:01	08:04:01	03:01	105:01	01:05:01	06:04:01	13:16	03:01:01		
--:--	07:02:01	--:--	01:03:01	02:01:02	01:02:01	03:01:01	15:01:01	03:01:01		01:01:01
--:--	41:01:01	--:--	X	04:01:01	X	--:--	13:02:01			
02:01:01	08:01:01	07:01:01	01:03:01	01:01:01	01:02:01	03:01:01	--:--	--:--		
23:17	15:222	18:02	02:01:08	124:01	05:05:01	06:02:01	--:--	--:--		
02:22:01	15:04:01	01:02:01	02:01:01	--:01:--	01:02:01	03:02:01	13:02:01	03:01:01	01:03:02	

Apêndice 01: Captura da tela inicial do software do protocolo 01 (Assign Trusight HLA v2) contendo os resultados preliminares de tipagem HLA das amostras do INCA. Os alelos em negrito são considerados comuns. Resultados com parâmetros de qualidade fora do aceitável são sinalizados para verificação pelo usuário. Da esquerda para a direita, temos os respectivos resultados das amostras para os genes HLA-A, -B, -C, -DPA1, -DPB1, -DQA1, -DQB1, -DRB1, -DRB3, -DRB4 e -DRB5 (IMGT/A, /B, /C, /DPA1, /DPB1, /DQA1, /DQB1, /DRB1, /DRB3, /DRB4 e /DRB5).

TypeStream Visual (For Research Use Only)

Analyze Data Reports Data Sample Patient Info Profile Utilities About Exit

Session INCA\_20170919 Analysis Date 16/10/2017 Status Finished Samples 31 IMGT Ver 3.27.0.8 TypeStream Ver 1.0.0.27232 Analysis Parameters Comment:

A  B  C  DRB1  DRB345  DQB1  DPB1  DQA1  DPA1

Show All Health Number Missed  0  1  2  3  4

Key Exon Coverage  Uniformity  Mismatch in Exon  Allele Balance

Warning Flag  Show All  Possible Null  Break in Phase  Linkage  High Bkgnd Exon  Homozygous  Intron Mismatch

Barcode  Show All

Sel	Barcode	Sample ID	Patient ID	More Test	Total Read Count	Avg Read Length	Analysis Status	System Comments	User Comments
<input checked="" type="checkbox"/>	001	1041277_LUCIN...		<input type="checkbox"/>	300000	297	Confirmed	Confirmed Locus/Confirmed By: A\vinicius.B\vinicius.C\vi...	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	002	1041532_WELIT...	<input type="checkbox"/>	300000	284	Confirmed	Confirmed Locus/Confirmed By: A\vinicius.B\vinicius.C\vi...	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	003	1041533_LUISA...	<input type="checkbox"/>	300000	300	Confirmed	Confirmed Locus/Confirmed By: A\vinicius.B\vinicius.C\vi...	

Locus	Allele 1	[K/N/I] 1	Notes 1	Allele 2	[K/N/I] 2	Notes 2	Final Assignment	# G	# B	Total Reads	Mapped Reads	Min Coverage	Max Coverage	System Comments	UserComments	Coverage
A	A*01:01:01:01	[0/0/0]		A*24:02:01:01	[0/0/0]		A*01:01:01:01 A*24:02:01:01	1	0	27675	23184	823	3895			
B	B*37:01:01	[0/0/0]		B*55:01:01	[0/0/0]		B*37:01:01 B*55:01:01	1	0	16530	13686	453	2151			
C	C*01:02:01	[0/0/0]		C*06:02:01:01	[0/0/0]		C*01:02:01 C*06:02:01:01	1	0	27248	22847	650	3684			
DRB1	DRB1*10:01:01:01	[0/0/0]		DRB1*16:01:01	[0/0/0]		DRB1*10:01:01:01 DRB1*16:01:01	1	0	58852	48280	880	7234			
DRB345	DRB5*02:02	[0/0/0]		DRB5*02:02	[0/0/0]		DRB5*02:02 DRB5*02:02	1	0	29877	25179	472	3752	Warning: Locus is ho...		
DQB1	DQB1*05:01:01 [+](r)	[0/0/2]	NEW	DQB1*05:02:01	[0/0/1]	NEW	DQB1*05:01:01 DQB1*05:02:01	1	2	33110	29097	295	4425	Warning: mismatch i...		
DPB1	DPB1*02:01:02	[0/0/1]	NEW	DPB1*02:01:02	[0/0/1]	NEW	DPB1*02:01:02 DPB1*02:01:02	1	0	63545	54887	596	4885	Warning: mismatch i...		

Locus	Allele 1	[K/N/I] 1	Notes 1	Allele 2	[K/N/I] 2	Notes 2	Final Assignment	# G	# B	Total Reads	Mapped Reads	Min Coverage	Max Coverage	System Comments	UserComments	Coverage
A	A*02:01:01 [+]	[0/0/0]		A*32:01:01:01	[0/0/0]		A*02:01:01 A*32:01:01	1	0	25729	22348	1049	3023			
B	B*51:01:01 [+]	[0/0/0]		B*51:01:01 [+]	[0/0/0]		B*51:01:01 B*51:01:01	1	0	21999	18719	849	2604	Warning: Locus is ho...		
C	C*01:02:01	[0/0/0]		C*16:01:01:01	[0/0/0]		C*01:02:01 C*16:01:01	1	0	26391	22694	882	3062			
DRB1	DRB1*08 [+]	[0/0/0]		DRB1*14:54:01	[0/0/2]	NEW	DRB1*08:01:01 DRB1*14:54:01	1	1	59691	52197	1090	8033	Warning: mismatch i...		
DRB345	DRB3*02:02:01 (r)	[0/0/2]	NEW	DRB3*02:02:01 (r)	[0/0/2]	NEW	DRB3*02:02:01 DRB3*02:02:01	1	0	29757	25664	379	3881	Warning: mismatch i...		
DQB1	DQB1*04:02:01 [+](r)	[0/0/0]		DQB1*05:03:01 [+]	[0/0/2]	NEW	DQB1*04:02:01 DQB1*05:03:01	1	2	28211	24374	217	3553	Warning: mismatch i...		
DPB1	DPB1*03:01:01	[0/0/0]		DPB1*104:01:01 [+]	[0/0/0]		DPB1*03:01:01 DPB1*104:01:01	1	2	70187	61984	772	5441	Warning: Two or mor...		

Collapse All  Select All

[Replace XX Code](#) [Retype Current Barcode](#) [Reanalysis](#) [Assign All](#) [XML Report](#) [Genotype Summary \(pdf\)](#) [Genotype Summary \(csv\)](#) [Genotype Summary Health \(csv\)](#) [Close](#)

User Name: vinicius Server Name: (local)\FUSION\_SQL14EXP Database Name: NGS Ver: 1.0.0 SID: INCA\_20170919

Apêndice 02 -Tela de análise do software TypeStream Visual parte integrante do protocolo Ion. À direita, diagrama representando a cobertura ao longo do gene HLA

Apêndice 03: Medidas de qualidade calculadas pelo software TypeStream para as tipagens do protocolo Ion

Amostra	Locus	Balanço alélico	Cobertura exons chave%	Cobertura éxon 2		Cobertura éxon 3		Cobertura éxon 4	
				Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
1	A	0,85	100	823	1014	1155	2190	2882	3126
	B	0,86	100	699	921	453	1095	1486	1887
	C	0,89	100	676	1288	650	1898	2456	3427
	DPB1	1	100	596	969	2139	3291	3420	4014
	DQB1	0,93	100	295	628	1777	2338	0	0
	DRB1	0,75	100	880	1533	4207	5959	0	0
	DRB345	1	100	472	593	2380	2784	0	0
2	A	0,83	100	1049	1424	1132	2292	2324	2939
	B	1	100	980	1380	849	2126	1729	2113
	C	0,85	100	882	1547	897	2264	2086	2894
	DPB1	0,93	100	772	1232	1597	3316	3730	4300
	DQB1	0,89	100	217	505	1374	1834	0	0
	DRB1	0,78	100	1090	2050	3616	6812	0	0
	DRB345	1	100	379	613	2057	2481	0	0
3	A	0,89	100	885	1118	1136	2257	2658	3069
	B	0,79	100	702	861	400	1119	1020	1271
	C	0,9	100	856	1484	965	2236	2502	3191
	DPB1	0,88	100	508	915	1745	3148	3375	3874
	DQB1	0,8	100	288	633	2007	2582	0	0
	DRB1	1	100	685	1277	1743	4500	0	0
	DRB345	1	100	945	1309	3080	3919	0	0
4	A	1	100	644	851	1103	2094	2566	2839
	B	0,94	100	759	1054	628	1627	1882	2286
	C	0,88	100	542	791	668	1646	2047	2697
	DPB1	1	100	536	1096	2458	3881	3931	4506
	DQB1	0,92	100	124	480	1514	2027	0	0
	DRB1	0,9	100	360	939	2297	3076	0	0
	DRB345	1	100	1491	1979	3878	4406	0	0
5	A	0,89	100	898	1090	1211	2508	3092	3553
	B	0,8	100	785	965	751	1944	2322	2864
	C	0,89	100	878	1130	960	2112	2559	3324
	DPB1	0,9	100	603	963	1305	2839	3310	3746
	DQB1	1	100	231	861	1838	2427	0	0
	DRB1	0,98	100	376	908	1892	2497	0	0
	DRB345	1	100	1233	1731	3145	3571	0	0
6	A	0,81	100	706	914	668	1844	2713	3334
	B	0,78	100	613	851	416	1289	1893	2361
	C	0,85	100	593	936	675	1703	2257	2701
	DPB1	0,88	100	642	1263	2198	3863	4116	4739
	DQB1	0,89	100	268	738	2007	2595	0	0
	DRB1	0,5	100	1068	1545	3422	4760	0	0
	DRB345	1	100	662	900	2108	2388	0	0
7	A	0,76	100	924	1273	1222	2064	3337	3753
	B	0,67	100	719	963	514	1485	2152	2687
	C	0,86	100	624	1211	620	1965	2754	3266
	DPB1	0,79	100	473	1013	1426	2951	3331	3798
	DQB1	1	100	186	378	914	1149	0	0
	DRB1	1	100	1486	1804	4180	4571	0	0
	DRB345	0,72	100	1272	1685	3664	4012	0	0
8	A	0,84	100	737	941	984	1857	2981	3442
	B	0,77	100	727	972	556	1398	2101	2561
	C	0,75	100	702	979	622	1885	2572	3193
	DPB1	0,87	100	501	934	1859	3283	3405	3961
	DQB1	0,43	100	260	614	1919	2510	0	0
	DRB1	0,74	100	1225	1739	3385	6171	0	0
	DRB345	1	100	333	477	1920	2295	0	0
9	A	0,67	100	648	926	869	1828	3078	3603
	B	0,81	100	579	730	484	1593	1994	2401
	C	0,82	100	747	895	721	1767	2058	2674
	DPB1	0,88	100	596	1038	2009	3385	3670	4161
	DQB1	0,83	100	227	447	984	1328	0	0
	DRB1	0,72	100	1111	1678	3132	5042	0	0
	DRB345	0,64	100	902	1281	3260	3800	0	0
10	A	0,81	100	807	1015	978	1721	2009	2209
	B	0,85	100	639	844	507	1325	1673	2128
	C	0,91	100	556	906	596	1478	1741	2396
	DPB1	0,86	100	569	945	1633	3160	3559	4070
	DQB1	0,79	100	311	659	1903	2483	0	0
	DRB1	1	100	686	1332	1635	4204	0	0
	DRB345	0,73	100	1273	1619	3265	4236	0	0

Apêndice 03: Medidas de qualidade calculadas pelo software TypeStream para as tipagens do protocolo Ion

Amostra	Locus	Balanço alélico	Cobertura exons chave%	Cobertura éxon 2		Cobertura éxon 3		Cobertura éxon 4	
				Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
11	A	0,91	100	647	915	887	1886	2741	3483
	B	0,77	100	552	646	454	1365	1817	2130
	C	0,9	100	651	901	700	1748	2045	2848
	DPB1	0,89	100	495	906	1672	2959	3267	3838
	DQB1	0,24	100	206	646	1411	2091	0	163
	DRB1	0,8	100	1172	1489	4055	4946	0	266
	DRB345	0,72	100	1070	1516	3295	3616	0	265
12	A	1	100	760	992	997	1661	2486	2685
	B	0,91	100	673	874	515	1455	1846	2379
	C	0,85	100	831	1083	643	2124	2492	3060
	DPB1	0,88	100	649	1069	1727	3416	3826	4395
	DQB1	0,81	100	239	509	1141	1432	0	0
	DRB1	0,78	100	1041	1470	1847	4428	0	0
	DRB345	0,58	100	901	1163	3098	3731	0	0
13	A	1	100	756	1081	1316	2633	3414	3783
	B	0,75	100	782	872	662	1925	2214	2694
	C	0,94	100	925	1354	970	2442	2652	3585
	DPB1	1	100	636	1089	2180	3594	3681	4257
	DQB1	1	100	395	801	2135	2733	0	0
	DRB1	1	100	699	1892	4607	6774	0	0
	DRB345	0,79	100	1181	1810	4753	5614	0	0
14	A	0,8	100	776	1020	1022	1797	1894	2444
	B	0,54	100	649	939	482	1471	1625	2085
	C	0,89	100	816	1081	853	1909	1826	2303
	DPB1	1	100	185	268	663	979	992	1105
	DQB1	0,16	100	124	284	739	1183	0	0
	DRB1	0,57	100	1133	1957	2977	6080	0	0
	DRB345	0,79	100	1181	1810	4753	5614	0	0
15	A	0,87	100	742	892	890	1778	2878	3523
	B	0,67	100	756	1001	570	1739	2106	2545
	C	0,78	100	715	1052	493	1588	2351	3015
	DPB1	0,83	100	480	900	1210	3082	3158	3665
	DQB1	0,81	100	146	594	1996	2945	0	0
	DRB1	0,43	100	1130	1532	4991	7088	0	0
	DRB345	1	100	421	618	2711	3145	0	0
16	A	0,85	100	720	904	915	1535	1780	2100
	B	0,85	100	603	738	396	1224	1298	1652
	C	1	100	576	905	337	1774	1925	2262
	DPB1	0,78	100	553	1003	1710	3449	3622	4213
	DQB1	0,8	100	229	638	1753	2353	0	0
	DRB1	0,86	100	1794	2310	5652	7743	0	0
	DRB345	1	100	384	851	2234	2487	0	0
17	A	0,89	100	685	1084	1073	2422	3770	4838
	B	0,78	100	711	898	578	1855	2681	3294
	C	0,92	100	606	914	746	1899	2827	3421
	DPB1	0,96	100	393	869	1340	3063	3282	3877
	DQB1	0,24	100	107	397	1540	2097	0	0
	DRB1	0,72	100	946	1175	2975	4638	0	0
	DRB345	0,64	100	736	957	3107	3541	0	0
18	A	0,87	100	646	953	782	2104	2558	3524
	B	0,8	100	577	828	382	1276	1765	2249
	C	0,83	100	461	876	565	1887	1791	2462
	DPB1	0,86	100	415	809	1292	3084	3713	4502
	DQB1	0,21	100	231	494	1475	1805	0	0
	DRB1	0,51	100	837	1051	2661	3184	0	0
	DRB345	0,66	100	927	1306	2638	3653	0	0
19	A	0,81	100	518	680	712	1188	2164	2684
	B	1	100	473	670	350	1246	1760	2133
	C	1	100	365	701	528	1250	1988	2298
	DPB1	0,85	100	343	940	1548	3223	3240	3841
	DQB1	0,87	100	126	497	2072	2716	0	0
	DRB1	0,85	100	453	620	2284	3250	0	0
	DRB345	0,55	100	676	1092	3260	4081	0	0
20	A	0,91	100	488	668	741	1858	2909	3310
	B	0,78	100	532	743	433	1153	1858	2290
	C	0,87	100	502	705	605	1569	2448	2948
	DPB1	0,48	100	490	1172	2440	4433	4597	5501
	DQB1	0,88	100	383	987	2815	3558	0	0
	DRB1	0,41	100	1090	1298	4195	6393	0	0
	DRB345	1	100	161	530	2543	3142	0	0



Apêndice 03: Medidas de qualidade calculadas pelo software TypeStream para as tipagens do protocolo Ion

Amostra	Locus	Balanço alélico	Cobertura exons chave%	Cobertura éxon 2		Cobertura éxon 3		Cobertura éxon 4	
				Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
21	A	0,77	100	643	837	785	1580	2568	2816
	B	0,87	100	517	738	349	1166	2032	2429
	C	0,87	100	424	849	320	1453	2269	2848
	DPB1	0,74	100	411	1004	1844	3638	3995	4903
	DQB1	0,96	100	343	756	2427	2916	0	0
	DRB1	0,75	100	489	984	3011	5243	0	0
	DRB345	0,58	100	763	946	3308	4085	0	0
22	A	0,86	100	393	619	627	1240	2275	2804
	B	1	100	418	543	281	746	1430	1722
	C	1	100	486	644	437	1145	2004	2428
	DPB1	1	100	344	826	1716	3154	3136	3751
	DQB1	0,92	100	114	663	1954	2440	0	0
	DRB1	0,42	100	586	731	2592	3504	0	0
	DRB345	0,46	100	596	1072	2983	3307	0	0
23	A	1	100	542	861	734	1805	2746	3520
	B	1	100	447	569	469	1595	2105	2677
	C	1	100	474	851	619	1722	2320	2846
	DPB1	0,87	100	571	1126	1542	3522	3797	4500
	DQB1	0,33	100	182	496	1780	2285	0	0
	DRB1	0,57	100	785	1000	2075	4157	0	0
	DRB345	0,67	100	1134	1422	3746	4364	0	0
24	A	0,82	100	641	841	1042	2163	3284	3517
	B	0,82	100	734	946	604	1428	2002	2452
	C	0,9	100	554	1032	749	2029	2915	3495
	DPB1	0,85	100	460	1010	1733	3455	3723	4277
	DQB1	0,8	100	272	647	2401	2953	0	0
	DRB1	0,68	100	628	913	2249	4347	0	0
	DRB345	0,78	100	646	810	3517	4192	0	0
25	A	0,85	100	766	1082	907	1597	2122	3052
	B	0,89	100	622	861	363	1064	1204	1555
	C	0,91	100	629	954	685	2024	1993	2588
	DPB1	1	100	642	754	1265	2280	2558	2782
	DQB1	0,84	100	234	732	1620	2298	0	0
	DRB1	0,52	100	648	1306	1328	2744	0	0
	DRB345	0,7	100	973	1530	2613	2984	0	0
26	A	0,9	100	538	847	979	1862	2305	2805
	B	0,81	100	562	750	470	1322	1557	2051
	C	0,85	100	555	843	514	1507	1852	2275
	DPB1	0,92	100	556	986	1363	3086	3119	3586
	DQB1	0,14	100	198	553	1937	2437	0	0
	DRB1	0,82	100	620	1361	2871	5001	0	0
	DRB345	0,74	100	1322	1694	3498	4448	0	0
27	A	0,89	100	633	912	797	2124	3044	3500
	B	0,87	100	732	962	459	1464	2448	2873
	C	0,88	100	704	1017	779	1891	2685	3136
	DPB1	0,87	100	447	928	1695	3496	3572	4284
	DQB1	1	100	179	556	2254	3069	0	0
	DRB1	1	100	588	1129	1854	4840	0	0
	DRB345	1	100	503	637	2854	3687	0	0
28	A	0,88	100	778	969	1115	2431	3576	3947
	B	0,86	100	766	1023	639	1786	2427	2972
	C	0,93	100	769	1262	802	1921	2803	3375
	DPB1	0,73	100	489	959	1570	3081	3200	3783
	DQB1	0,87	100	253	728	2353	2950	0	0
	DRB1	0,65	100	462	1088	2203	3885	0	0
	DRB345	0,72	100	1204	1490	3799	4484	0	0
29	A	1	100	393	568	506	1347	2395	2943
	B	0,85	100	456	622	437	1135	1730	2240
	C	0,83	100	307	478	223	1092	1637	1889
	DPB1	1	100	370	811	1666	3176	3392	3898
	DQB1	0,88	100	218	550	2273	3028	0	0
	DRB1	0,58	100	595	836	1910	3828	0	0
	DRB345	0,82	100	771	1008	3210	4043	0	0
30	A	0,8	100	782	1031	836	1689	2450	2785
	B	0,87	100	573	776	387	1247	1965	2464
	C	0,88	100	510	814	474	1548	2340	2645
	DPB1	0,87	100	356	793	1823	3086	3242	3855
	DQB1	0,35	100	130	446	1283	1771	0	0
	DRB1	0,62	100	467	733	1721	3349	0	0
	DRB345	0,64	100	736	929	3087	3612	0	0



**Apêndice 03: Medidas de qualidade calculadas pelo software TypeStream para as tipagens do protocolo Ion**

Amostra	Locus	Balanço alélico	Cobertura exons chave%	Cobertura éxon 2		Cobertura éxon 3		Cobertura éxon 4	
				Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
31	A	0,78	100	786	969	971	1962	2880	3178
	B	0,78	100	739	995	582	1751	2536	3178
	C	0,77	100	510	842	534	1567	2506	2795
	DPB1	0,89	100	377	903	1397	3038	3161	3721
	DQB1	0,26	100	141	372	1300	1746	0	0
	DRB1	0,57	100	719	972	3372	4428	0	0
	DRB345	0,65	100	783	1095	3514	4320	0	0
32	A	1	100	823	1382	1214	2811	4394	5570
	B	0,77	100	773	1118	624	1587	2223	2764
	C	0,93	100	788	1396	1047	2770	3518	4448
	DPB1	0,86	100	318	704	1594	2687	2906	3454
	DQB1	0,19	100	109	297	1145	1527	0	0
	DRB1	0,72	100	727	912	3441	4419	0	0
	DRB345	0,65	100	639	875	2908	3418	0	0

Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
89 1 A	11:01:01G	11:01:01G	51:01:01G	51:01:01G	07:01:01G	07:01:01G	11:01:01	11:01:01	03:01:01	03:01:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
89 1 B	26:01:01	33:01:01	14:02:01	38:01:01	08:02:01G	12:03:01G	01:02:01	04:02:01	03:02:01	05:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
89 1 C	02:01:01G	11:01:01G	15:04:01	40:02:01G	02:02:02G	03:03:01G	13:01:01	16:02:01	03:01:01G	06:03:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*02:02:01G
89 1 D	24:02:01G	31:01:02G	13:02:01	35:04:01	04:01:01G	06:02:01G	07:01:01G	08:07	02:02:01	04:02:01	04:02:01G	17:01	B4*01:01:01G	
89 1 E	03:01:01G	33:03:01	15:03:01G	81:01:01G	02:10	08:04:01	12:01:01G	13:16	05:01:01G	06:04:01	105:01	18:01	B3*01:01:02G	B3*03:01:01G
89 1 F	02:01:01G	24:02:01G	07:02:01G	41:01:01	07:XX	17:01:01G	13:02:01	15:01:01G	06:02:01G	06:04:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*03:01:01G	B5*01:01:01
89 1 G	02:01:01G	23:01:01G	08:01:01G	15:222	07:01:01G	18:01:01G	08:04:01	11:01:02	03:01:01G	06:02:01	01:01:01G	03:01:01G	B3*03:01:01G	
89 1 H	02:22:01	23:01:01G	15:04:01	53:01:01	01:02:01G	06:02:01G	04:03:01	13:02:01	03:02:01	05:01:01G	05:01:01G	13:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
89 2 A	23:01:01G	33:03:01	49:01:01G	53:01:01	04:01:01G	07:01:01G	08:03:02	08:04:01	03:01:01G	03:19	01:01:02G	02:01:02G		
89 2 B	11:01:01G	32:01:01	35:03:01	35:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	07:01:01G	14:54:01	02:02:01	05:03:01G	05:01:01G	17:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 2 C	01:01:01G	02:158	08:01:01G	40:04	03:04:01G	07:01:01G	03:01:01G	04:11:01	02:01:01	03:02:01	01:01:01G	04:02:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
89 2 D	02:01:01G	11:01:01G	35:01:01G	44:02:01G	04:01:01G	05:01:01G	14:54:01	15:01:01G	05:03:01G	06:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
89 2 E	02:52	02:01:01G	51:01:01G	57:01:01	01:02:01G	07:01:01G	08:02:01	11:02:01	03:19	04:02:01	04:01:01G	15:01:01	B3*02:02:01G	
89 2 F	02:01:01G	66:01:01	51:31	58:02	06:02:01G	15:02:01G	07:01:01G	09:01:02G	02:02:01	03:03:02G	105:01	13:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
89 2 G	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
89 2 H	02:01:01G	24:02:01G	15:01:01	55:01:01	01:02:01G	03:03:01G	04:01:01	13:01:01	03:02:01	06:03:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 3 A	24:02:01G	24:02:01G	15:37	55:01:01	01:02:01G	03:04:02	03:01:01G	13:01:01	02:01:01G	06:03:01G	01:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
89 3 B	02:01:01G	24:284	45:01:01	58:19	07:01:01G	16:01:01	13:01:01	15:03:01G	06:02:01	06:03:01	02:01:02G	39:01	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
89 3 C	01:01:01G	24:02:01G	15:04:01	56:13	01:02:01G	03:03:01G	13:01:01	16:02:01	03:01:01G	06:03:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*02:02:01G
89 3 D	02:05:01	11:01:01G	41:01:01	44:02:01G	05:01:01G	07:01:01G	13:01:01	13:05:01	03:01:01G	06:03:01	02:01:02G	03:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
89 3 E	02:01:01G	02:01:01G	07:02:01G	51:01:01G	07:02:01G	15:02:01G	13:111	15:01:01G	06:02:01	06:03:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
89 3 F	02:01:01G	02:01:01G	35:01:01G	35:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	01:01:01	01:01:01	05:01:01G	05:01:01G	02:01:02	04:01:01G		
89 3 G	30:01:01	68:02:01G	42:02	81:01:01G	17:01:01G	18:01:01G	11:02:01	12:38	03:19	05:01:01G	03:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
89 3 H	02:01:01G	30:01:01	42:02	53:01:01	04:01:01G	17:01:01G	11:01:02	12:38	03:19	05:01:01G	04:01:01G	17:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
89 4 A	01:01:01G	74:01	07:02:01G	08:01:01G	07:02:01G	07:01:01G	03:01:01G	11:04:01	02:01:01	03:01:01G	04:02:01G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
89 4 B	30:02:01G	30:02:01G	18:01:01G	57:03:01	05:01:01G	18:01:01G	01:03	13:01:01	05:01:01G	05:01:01G	02:01:02G	03:01:01G	B3*03:01:01G	
89 4 C	31:01:02G	32:01:01	35:20:01	40:01:01G	03:04:01G	04:01:01G	01:01:01	16:02:01	03:01:01G	05:01:01G	04:02:01G	04:01:01G	B5*02:02:01G	
89 4 D	24:02:01G	29:02:01G	07:02:01G	44:03:01	07:02:01G	16:01:01	07:01:01G	15:01:01G	02:02:01	06:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01

Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
89 4 E	23:01:01G	68:02:01G	44:03:01	50:02	04:01:01G	06:02:01G	07:01:01G	13:01:01	02:02:01	06:03:01	04:01:01G	10:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 4 F	02:01:01G	03:01:01G	07:02:01G	57:01:01	06:02:01G	07:02:01G	01:01:01	07:01:01G	03:03:02G	05:01:01G	04:02:01G	16:01:01	B4*01:03N	
89 4 G	02:01:01G	03:01:01G	14:02:01	40:01:01G	03:04:01G	08:02:01G	03:01:01G	13:02:01	02:01:01	06:09:01	01:01:01G	01:01:01G	B3*01:01:02G	B3*03:01:01G
89 4 H	02:17:02	11:01:01G	35:01:01G	35:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	04:07:01G	14:01:01	03:01:01G	05:03:01G	03:01:01G	04:01:01	B3*02:01:01G	B4*01:01:01G
89 5 A	30:02:01G	68:02:01G	08:01:01G	18:01:01G	05:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	02:01:02	15:01:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 5 B	03:01:01G	29:02:01G	44:03:01	57:03:01	07:01:01G	16:01:01	07:01:01G	08:06	02:02:01	05:03:01G	01:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
89 5 C	23:01:01G	30:02:01G	14:02:01	18:01:01G	05:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	15:03:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02	02:02	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
89 5 D	01:01:01G	36:01	08:01:01G	53:01:01	04:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	15:03:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02	11:01:01	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
89 5 E	01:01:01G	24:02:01G	57:01:01	57:01:01	06:02:01G	06:02:01G	08:01	13:01:01	04:02:01	06:03:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	
89 5 F	02:01:01G	31:01:02:01	35:20:01	44:02:01:01	04:01:01:01	05:01:01:02	04:01:01	16:02:01	03:01:01	03:01:01	04:01:01	04:02:01:02	B4*01:01:01G	B5*02:02:01G
89 5 G	03:01:01G	11:01:01G	14:02:01	18:01:01G	08:02:01G	12:03:01G	01:02:01	11:04:01	03:01:01G	05:01:01G	04:02:01G	13:01:01G	B3*02:02:01G	
89 5 H	03:01:01G	24:02:01G	44:02:01G	51:01:01G	05:01:01G	15:02:01G	13:01:01	15:01:01G	06:02:01	06:03:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
89 6 A	24:02:01G	24:02:01G	07:02:01G	38:01:01	07:02:01G	12:03:01G	10:01:01	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01	02:01:02	02:01:02	B5*01:01:01	
89 6 B	01:02	02:01:01G	49:01:01G	50:01:01	06:02:01G	07:01:01G	07:01:01G	13:05:01	02:02:01	03:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 6 C	01:01:01G	02:06:01	51:01:01G	58:01:01	07:01:01G	15:02:01G	07:01:01G	14:54:01	02:02:01	05:03:01G	05:01:01G	17:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 6 D	02:01:01G	24:02:01G	14:02:01	44:02:01G	02:02:02G	05:01:01G	04:01:01	09:01:02G	03:02:01	03:03:02G	02:01:02	04:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
89 6 E	30:02:01G	68:02:01G	15:10:01	42:01:01	03:04:02	17:01:01G	03:01:01G	03:02:01	02:01:01	04:02:01	01:01:01G	01:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
89 6 F	03:01:01G	24:02:01G	18:05	35:01:01G	04:01:01G	12:03:01G	03:01:01G	08:03:02	02:01:01	03:01:01G	01:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	
89 6 G	68:02:01G	68:02:01G	08:01:01G	53:01:01	04:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	13:02:01	02:01:01	06:04:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*03:01:01G
89 6 H	02:01:01G	24:02:01G	14:02:01	44:03:01	02:02:02G	05:01:01G	01:02:01	11:01:01	03:01:01G	05:01:01G	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	
89 7 A	02:01:01G	11:01:01:01	07:02:01	14:01:01	07:02:01:03	08:02:01:02	04:02:01	15:01:01G	03:02:01	06:02:01	04:01:01	04:01:01	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
89 7 B	01:01:01G	02:66	51:01:01G	58:01:01	07:01:01G	15:02:01G	07:01:01G	14:54:01	02:02:01	05:03:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 7 C	03:01:01G	23:01:01G	07:05:01G	15:03:01G	02:10	15:05:01G	04:05:01	09:01:02G	02:02:01	03:02:01	03:01:01G	13:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
89 7 D	02:01:01G	30:01:01	35:05:01	42:01:01	04:01:01G	17:01:01G	04:04:01	08:04:01	03:01:04	03:02:01	01:01:01G	03:01:01G	B4*01:01:01G	
89 7 E	01:01:01G	02:01:01G	35:01:01G	57:01:01	04:01:01G	07:01:01G	01:01:01	03:01:01G	02:01:01	05:01:01G	04:01:01G	14:01:01	B3*02:02:01G	
89 7 F	01:01:01G	02:01:01G	44:02:01G	58:01:01	03:03:01G	07:01:01G	13:01:01	13:03:01	03:01:01G	06:03:01	03:01:01G	10:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
89 7 G	30:02:01G	30:02:01G	14:02:01	18:01:01G	05:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	15:03:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02G	13:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
89 7 H	03:01:01G	33:01:01	14:02:01	15:01:01G	07:04:01	08:02:01G	03:01:01	13:02:01	02:01:01	06:04:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*03:01:01G

Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
89 8 A	23:01:01G	24:02:01G	08:01:01G	44:03:01	04:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	15:01:01G	02:01:01G	06:02:01G	04:01:01G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
89 8 B	11:01:01G	30:02:01G	08:01:01G	40:01:01G	03:04:01G	07:01:01G	03:01:01G	04:01:01	02:01:01	03:02:01	06:01	105:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 8 C	24:02:01G	26:01:01	35:03:01	38:01:01	12:03:01G	12:03:01G	13:01:01	14:54:01	05:03:01G	06:03:01	02:01:02	02:01:02	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
89 8 D	02:01:01G	11:01:01G	35:01:01G	41:01:01	04:01:01G	17:01:01G	03:01:01G	13:02:01	02:01:01	06:04:01	02:01:02	05:01:01G	B3*02:02:01G	B3*03:01:01G
89 8 E	02:05:01	24:02:01G	18:01:01G	58:01:01	05:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	11:02:01	02:01:01	03:19	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:10	B3*02:02:01G
89 8 F	02:11:01	74:01	35:01:01G	39:09:01	04:01:01G	07:02:01G	08:02:01	15:03:01G	04:02:01	06:02:01	03:01:01G	04:02:01G	B5*01:01:01	
89 8 G	02:02:01	23:01:01G	07:02:01G	15:03:01G	04:01:01G	07:02:01G	11:01:02	15:03:01G	03:19	06:02:01	105:01	18:01	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
89 8 H	03:01:01G	03:01:01G	07:02:01G	18:01:01G	07:02:01G	12:03:01G	03:01:01G	15:01:01G	02:01:01	06:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
89 9 A	24:02:01:01	25:01:01	14:02:01	18:01:01:02	02:02:02:01	12:03:01:01	01:02:01	04:01:01	03:02:01	05:01:01:01	04:01:01	04:02:01	B4*01:01:01G	
89 9 B	01:01:01G	23:01:01G	14:02:01	50:01:01	06:02:01G	08:02:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	02:01:02	02:01:02	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 9 C	01:01:01G	02:01:01G	51:01:01G	58:01:01	07:01:01G	15:02:01G	07:01:01G	14:54:01	02:02:01	05:03:01G	01:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 9 D	23:01:01G	30:02:01G	14:02:01	18:01:02	05:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	15:03:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02	124:01	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
89 9 E	31:01:02:01	33:01:01	14:02:01	51:01:01:01	08:02:01:01	15:02:01:01	01:02:01	04:07:01G	03:01:01:01	05:01:01:01	04:01:01	04:01:01	B4*01:01:01G	
89 9 F	24:02:01G	33:01:01	14:01:01	14:02:01	08:02:01G	08:02:01G	07:01:01G	11:04:01	02:02:01	03:01:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 9 G	01:01:01G	68:02:01G	37:01:01	44:03:01	04:01:01G	06:02:01G	03:02:01	10:01:01	04:02:01	05:01:01G	01:01:01G	02:01:02	B3*01:01:02G	
89 9 H	24:02:01G	29:02:01G	07:02:01G	44:03:01	07:02:01G	16:01:01	01:03	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B5*01:01:01	
89 10 A	02:01:01G	26:01:01	51:01:01:01	51:01:01:01	07:01:01:01	14:02:01	04:08:01	13:01:01	03:01:01:01	06:03:01	04:01:01	04:01:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
89 10 B	02:01:01G	68:01:02G	14:01:01	44:02:01G	07:04:01	08:02:01G	13:01:01	13:02:01	06:04:01G	06:03:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*03:01:01G
89 10 C	02:01:01G	24:02:01G	14:02:01	15:01:01	02:02:02G	03:03:01G	01:02:01	04:01:01	03:02:01	05:01:01G	02:01:02	04:01:01G	B4*01:01:01G	
89 10 D	02:01:01G	33:01:01	14:02:01	51:01:01G	08:02:01G	14:02:01	08:01:01G	15:01:01G	04:02:01	06:02:01	04:01:01G	13:01:01G	B5*01:01:01	
89 10 E	02:01:01G	24:03:01	15:01:01:01	40:02:01	03:03:01	03:04:01G	04:05:01	16:02:01	03:01:01G	03:02:01	01:01:01G	04:02:01:02	B4*01:01:01G	B5*02:02:01G
89 10 F	02:11:01	11:01:01G	48:01:01	51:01:01G	08:03:01	15:02:01G	04:03:01	04:11:01	03:02:01	03:02:01	01:01:01G	03:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
89 10 G	23:01:01G	68:01:02G	39:09:01	44:03:01	04:01:01G	07:02:01G	07:01:01G	08:02:01	02:02:01	04:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
89 10 H	24:02:01G	31:15	07:02:01G	15:05:01	01:02:01G	07:02:01G	04:11:01	15:01:01G	03:02:01	06:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
89 11 A	23:01:01G	33:01:01	49:01:01G	49:01:01G	07:01:01G	07:01:01G	04:05:01	07:01:01G	03:03:02:01	03:02:01	01:01:01G	13:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:03:01:02N
89 11 B	01:01:01G	24:02:01G	08:01:01G	15:17:01G	07:01:01G	07:01:01G	01:01:01	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B5*01:01:01	
89 11 C	02:02:01	74:01	14:02:01	44:03:01	08:02:01:01	14:03	08:04:01	11:04:02	03:19	05:02:01	01:01:01G	01:01:02	B3*02:02:01G	
89 11 D	02:01:01G	68:02:01G	07:02:01G	40:02:01G	03:04:01G	07:02:01G	15:03:01G	16:02:01	03:01:01G	06:02:01	04:02:01G	105:01	B5*01:01:01	B5*02:02:01G



Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
89 11 E	24:02:01G	69:01	35:01:01G	37:01:01	04:01:01G	06:02:01G	01:01:01	04:01:01	03:02:01	05:01:01G	03:01:01G	10:01	B4*01:01:01G	
89 11 F	01:01:01G	11:01:01G	14:02:01	14:02:01	02:02:02G	08:02:01G	01:02:01	01:02:01	05:01:01G	05:01:01G	02:01:02	04:01:01G		
89 11 G	23:01:01G	32:01:01	14:02:01	49:01:01G	07:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	15:01:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
89 11 H	01:01:01G	02:01:01G	35:01:01G	57:03:01	04:01:01G	07:01:01G	01:01:01	03:01:01G	02:01:01	05:01:01G	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	
89 12 A	02:01:01G	29:02:01G	44:03:01	50:01:01	12:03:01:01	16:01:01	07:01:01G	13:02:01	02:02:01	06:09:01	01:01:01G	05:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
89 12 B	02:01:01G	23:01:01G	13:02:01	44:03:01	02:02:02G	06:02:01G	07:01:01G	13:02:01	02:02:01	06:04:01	04:02:01G	04:02:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
89 12 C	02:01:01G	03:01:01G	27:05:02G	51:01:01G	01:02:01G	14:02:01	01:01:01	08:01:01G	04:02:01	05:01:01G	04:02:01G	04:01:01G		
89 12 D	02:01:01G	23:01:01G	15:18:01	44:03:01	07:04:01	16:01:01	13:01:01	13:02:01	06:04:01G	06:03:01G	03:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*03:01:01G
89 12 E	24:03:01	32:01:01	44:03:01	49:01:01G	07:01:01G	16:01:01	04:05:01	07:01:01G	02:02:01	03:02:01	03:01:01G	17:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
89 12 F	02:22:01	23:01:01G	15:04:01	53:01:01	01:02:01G	06:02:01G	04:03:01	13:02:01	03:02:01	05:01:01G	05:01:01G	13:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
89 12 G	02:01:01G	24:02:13	57:03:01	58:01:01	07:01:01G	07:01:01G	04:04:01	15:03:01G	03:02:01	06:09:01	01:01:01G	06:01	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
89 12 H	11:01:01G	30:02:01G	18:01:01G	35:01:01G	04:01:01G	05:01:01G	01:01:01	03:01:01G	02:01:01	05:01:01G	04:02:01G	10:01	B3*02:02:01G	
93 1 A	26:01:01	33:01:01	14:02:01	38:01:01	08:02:01G	12:03:01G	01:02:01	04:02:01	03:02:01	05:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
93 1 B	02:01:01G	30:02:01G	14:02:01	35:02:01	04:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	15:03:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
93 1 C	02:01:01G	02:01:01G	15:16:01	15:01:01	03:04:02	03:03:01G	04:01:01	12:01:01G	03:02:01	05:01:01G	04:01:01G	18:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
93 1 D	02:01:01G	24:02:01G	07:02:01G	35:01:01G	04:01:01G	07:02:01G	15:01:01G	15:01:01G	05:02:01	06:02:01	02:01:02G	04:02:01G	B5*01:01:01	B5*01:01:01
93 1 E	25:01:01	68:01:01G	35:03:01	51:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	01:01:01	04:07:01G	03:01:01G	05:01:01G	04:01:01G	09:01:01	B4*01:01:01G	
93 1 F	03:01:01G	26:01:01	38:01:01	39:01:01G	12:03:01G	12:03:01G	04:04:01	16:01:01	03:02:01	05:02:01	04:01:01G	10:01	B4*01:01:01G	B5*02:02:01G
93 1 G	01:01:01G	31:01:02G	08:01:01G	15:20	03:04:01G	07:01:01G	04:11:01	14:02:01	03:01:01G	03:02:01	14:01:01	14:01:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
93 1 H	30:01:01	30:01:01	42:01:01	42:02	17:01:01G	17:01:01G	11:01:02	12:01:01G	05:01:01G	05:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*03:01:01G
93 2 A	23:01:01G	36:01	07:02:01G	08:01:01G	03:04:01G	07:02:01G	07:01:01G	15:03:01G	02:02:01	06:02:01	18:01	19:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
93 2 B	29:02:01G	31:01:02G	39:06:01	51:01:01G	07:02:01G	14:02:01	08:02:01	08:03:02	03:01:01	04:02:01	04:02:01G	04:01:01G		
93 2 C	02:01:01G	31:01:02G	35:01:01G	51:01:01G	04:01:01G	16:02:01G	07:01:01G	07:01:01G	02:02:01	02:02:01	04:02:01G	17:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
93 2 D	31:01:02G	31:01:02G	35:01:01G	39:02:02	04:01:01G	07:02:01G	04:11:01	08:04:01	03:02:01	04:02:01	04:02:01G	04:02:01G	B4*01:01:01G	
93 2 E	11:01:01G	68:02:01G	14:02:01	15:10:01	03:04:02	08:02:01G	01:02:01	10:01:01	05:01:01G	05:01:01G	02:01:02	14:01:01		
93 2 F	23:01:01G	36:01	07:02:01G	53:01:01	04:01:01G	07:02:01G	08:04:01	15:03:01G	03:19	06:02:01	03:01:01G	18:01	B5*01:01:01	
93 2 G	23:01:01G	36:01	07:02:01G	53:01:01	04:01:01G	07:02:01G	08:04:01	15:03:01G	03:01:04	06:02:01	02:01:02	11:01:01	B5*01:01:01	
93 2 H	01:01:01G	03:01:01G	07:02:01G	08:01:01G	07:02:01G	07:01:01G	01:02:01	13:01:01	05:01:01G	05:01:01G	03:01:01G	10:01	B3*01:01:02G	



## Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
93 6 E	11:01:01G	30:02:01G	18:01:01G	35:02:01	04:01:01G	05:01:01G	03:01:01G	11:04:01	02:01:01	03:01:01G	02:02	03:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
93 6 F	01:01:01G	24:02:01G	37:01:01	44:03:01	04:01:01G	06:02:01G	07:01:01G	11:19:01	02:02:01	03:01:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
93 6 G	02:01:01G	30:02:01G	49:01:01G	50:01:01	06:02:01G	07:01:01G	04:05:01	07:01:01G	02:02:01	03:02:01	04:01:01G	13:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
93 6 H	01:01:01G	26:08	08:01:01G	15:01:01	03:03:01G	07:01:01G	03:01:01G	13:01:01G	02:01:01G	05:01:01G	04:01:01G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B3*01:01:02G
93 7 A	24:02:01G	30:02:01G	18:01:01G	35:05:01	03:04:01G	07:04:01	11:01:01	11:01:02	03:01:01	06:02:01	04:02:01G	105:01	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
93 7 B	02:01:01G	30:02:01G	15:10:01	51:01:01G	03:04:02	15:02:01G	03:01:01G	13:01:01	02:01:01	06:03:01	01:01:01G	03:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
93 7 C	03:01:01G	68:01:02G	35:01:01G	40:04	03:04:01G	04:01:01G	01:01:01	04:11:01	03:02:01	05:01:01G	05:01:01G	10:01	B4*01:01:01G	
93 7 D	01:01:01G	02:01:01G	08:01:01G	27:05:02G	02:02:02G	07:01:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
93 7 E	31:01:02G	68:01:02G	35:06	40:01:01G	03:04:01G	04:01:01G	04:04:01	14:02:01	03:01:01:01	03:02:01	06:01	105:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
93 7 F	03:01:01G	24:03:01	15:20	50:01:01	03:04:01G	06:02:01G	04:08:01	10:01:01	03:01:01	05:01:01	04:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
93 7 G	02:01:01G	02:01:01G	13:02:01	35:01:01G	04:01:01G	06:02:01G	01:01:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	01:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
93 7 H	03:01:01G	33:01:01	14:02:01	15:01:01	03:04:01G	08:02:01G	03:01:01G	13:02:01	02:01:01	06:04:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*03:01:01G
93 8 A	02:01:01G	23:01:01G	15:01:01G	58:01:01	03:02:01G	04:01:01G	11:01:01	15:03:01G	03:01:01	06:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
93 8 B	02:01:01G	23:01:01G	08:01:01G	44:03:01	04:01:01G	07:01:01G	07:01:01G	11:01:02	02:02:01	06:02:01	03:01:01G	03:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
93 8 C	02:01:01G	24:02:01G	15:03:01G	45:01:01	02:10	16:01:01	03:02:01	10:01:01	04:02:01	05:01:01	01:01:01G	17:01	B3*01:01:02G	
93 8 D	01:01:01G	01:01:01G	08:01:01G	52:01:01G	07:01:01G	12:02:02	03:01:01G	15:02:01	02:01:01	06:01:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:02:01G
93 8 E	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
93 8 F	03:01:01G	32:01:01	07:02:01G	78:01:01	07:02:01G	16:01:01	07:01:01G	11:04:01	02:02:01	03:01:01G	13:01:01G	17:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
93 8 G	25:01:01	30:01:01	13:02:01	18:01:01G	06:02:01:01	12:03:01:01	07:01:01G	15:01:01G	02:02:01	06:02:01	09:01:01	23:01:01	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
93 8 H	02:01:01G	30:02:01G	15:10:01	40:01:01G	03:04:01G	03:04:02	03:01:01G	04:04:01	02:01:01	03:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
93 9 A	24:02:01G	32:01:01	15:01:01G	57:01:01	03:03:01G	06:02:01G	11:03	13:01:01	03:01:01	06:03:01	04:02:01G	04:02:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
93 9 B	02:01:01G	30:02:01G	18:01:01G	35:01:01G	04:01:01G	07:04:01	01:01:01	11:01:02	05:01:01G	06:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	
93 9 C	31:01:02G	34:02:01	35:04:01	35:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	08:07	13:02:01	04:02:01	05:01:01	01:01:01G	04:02:01G	B3*03:01:01G	
93 9 D	36:01	74:01	15:03:01G	53:01:01	02:10	04:01:01G	11:01:02	15:03:01G	06:02:01	06:02:01	02:01:02	02:01:02	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
93 9 E	03:01:01G	30:01:01	49:01:01G	57:02:01	07:01:01G	18:01:01G	11:01:02	11:02:01	03:19	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
93 9 F	02:01:01G	68:01:02G	27:05:02G	40:04	02:02:02G	03:04:01G	04:11:01	15:01:01G	03:02:01	06:02:01	06:01	14:01:01	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
93 9 G	02:01:01G	30:02:01G	18:01:01G	44:03:01	04:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	02:01:02	02:02	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
93 9 H	24:02:01G	25:01:01	07:02:01G	44:02:01G	05:01:01G	07:02:01G	04:07:01G	15:01:01G	03:02:01	06:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01



Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
93 10 A	02:01:01G	11:01:01G	44:02:01G	56:01:01G	01:02:01G	05:01:01G	01:01:01	11:01:01	03:01:01G	05:01:01G	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	
93 10 B	26:01:01	31:01:02G	38:01:01	39:03	07:02:01G	12:03:01G	08:02:01	13:01:01	04:02:01	06:03:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	
93 10 C	29:02:01G	31:01:02G	14:01:01	44:03:01	08:02:01G	16:01:01	07:01:01G	11:01:01	02:02:01	03:01:01G	04:01:01G	13:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
93 10 D	01:01:01G	32:01:01	14:01:01	57:01:01	07:01:01G	08:02:01G	07:01:01G	07:01:01G	02:02:01	03:03:02G	04:01:01G	11:01:01	B4*01:03N	B4*01:01:01G
93 10 E	26:01:01	31:01:02G	38:01:01	39:13:01	07:02:01G	12:03:01G	08:07	13:02:01	04:02:01	06:04:01	02:01:02	27:01	B3*03:01:01G	
93 10 F	24:02:01G	26:01:01	27:05:02G	35:01:01G	01:22	04:01:01G	13:03:01	14:01:01	03:01:01G	05:03:01G	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:01:01G
93 10 G	02:01:01G	68:02:01G	49:01:01G	53:01:01	04:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	03:02:01	02:01:01	04:02:01	01:01:01G	17:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
93 10 H	03:01:01G	31:01:02G	07:02:01G	14:02:01	07:02:01G	08:02:01G	04:05:01	14:01:01G	03:02:01	05:01:01	04:01:01	105:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
93 11 A	01:01:01G	02:04	35:11:01	37:01:01	03:04:01G	06:02:01G	09:01:02G	10:01:01	03:03:02G	05:01:01G	04:01:01G	14:01:01	B4*01:01:01G	
93 11 B	01:01:01:01	11:01:01:01	44:02:01:01	51:01:01:01	05:01:01:02	07:01:01:01	08:01	12:01:01G	03:01:01G	04:02:01	02:01:02	03:01:01G	B3*02:02:01G	
93 11 C	01:01:01G	36:01	08:01:01G	44:03:01	04:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	15:03:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02	06:01	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
93 11 D	23:01:01G	68:02:01G	07:XX	41:01:01	07:02:01G	08:02:01G	11:01:02	15:03:01G	06:02:01	06:02:01	11:01:01	17:01	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
93 11 E	11:01:01G	68:02:01G	15:16:01	55:01:01	03:03:01G	14:02:01	01:02:01	14:54:01	05:01:01G	05:03:01G	01:01:02G	02:01:02G	B3*02:02:01G	
93 11 F	01:01:01G	02:01:01G	07:02:01G	37:01:01	06:02:01G	07:02:01G	13:01:01	15:01:01G	06:02:01	06:03:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
93 11 G	23:01:01G	68:01:01G	49:01:01G	58:02	06:02:01G	07:01:01G	11:01:01	12:01:01G	03:01:01G	05:01:01G	01:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
93 11 H	01:01:01G	01:01:01G	08:01:01G	40:01:01G	03:04:01G	07:01:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	04:01:01G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
93 12 A	26:01:01	33:01:01	14:02:01	53:01:01	04:01:01G	08:02:01G	07:01:01G	11:02:01	02:02:01	03:19	01:01:02G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
93 12 B	11:01:01G	24:02:01G	35:01:01G	44:03:01	04:01:01G	04:01:01G	14:54:01	15:03:01G	05:03:01G	06:02:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
93 12 C	02:01:01G	33:01:01	07:02:01G	14:02:01	07:02:01G	08:02:01G	01:02:01	11:01:01	03:01:01G	05:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	
93 12 D	02:01:01G	24:02:01	51:01:01:01	55:01:01	01:02:01	15:02:01:01	11:01:01	13:01:01	03:01:01	06:03:01	04:01:01	04:01:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
93 12 E	03:01:01G	11:01:01G	18:01:01G	35:01:01G	02:02:02G	04:01:01G	01:01:01	13:01:01	05:01:01G	06:03:01	03:01:01G	11:01:01	B3*01:01:02G	
93 12 F	30:01:01	33:01:01	42:02	53:01:01	04:01:01G	17:01:01G	12:01:01G	15:03:01G	05:01:01G	06:02:01	01:01:01G	02:01:02	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
93 12 G	01:01:01G	02:05:01	08:01:01G	57:03:01	07:01:01G	07:01:01G	01:02:01	07:01:01G	02:01:01G	05:01:01G	04:02:01G	13:01:01G	B4*01:01:01G	
93 12 H	02:01:01G	68:01:01G	44:02:01G	58:02	05:01:01G	06:02:01G	03:01:01G	12:01:01G	02:01:01	05:01:01G	04:01:01G	18:01	B3*01:01:02G	B3*01:01:02G
144 1 A	29:02:01G	29:02:01G	15:03:01G	49:01:01G	02:10	07:01:01G	13:02:01	15:03:01G	06:02:01G	06:04:01G	01:01:02G	04:02:01G	B3*03:01:01G	B5*01:01:01
144 1 B	02:01:01G	03:01:01G	18:01:01G	35:03:01	04:01:01G	05:01:01G	03:01:01G	11:01:01	02:01:01	03:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
144 1 C	02:01:01G	74:01	49:01:01G	53:01:01	04:01:01G	07:01:01G	04:05:01	15:01:01G	03:02:01	06:02:01	13:01:01G	17:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
144 1 D	24:02:01G	31:01:02G	51:01:01G	53:01:01	04:01:01G	15:02:01G	01:01:01	03:01:01G	02:01:01	05:01:01G	04:02:01G	10:01	B3*01:01:02G	



Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
144 1 E	32:01:01	33:01:01	07:02:01G	14:02:01	07:02:01G	08:02:01G	01:02:01	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01	04:01:01G	05:01:01G	B5*01:01:01	
144 1 F	02:01:01G	02:01:01G	08:01:01G	45:01:01	07:01:01G	16:01:01	03:01:01G	11:01:02	02:01:01	06:02:01	04:01:01G	105:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
144 1 G	02:01:01G	11:01:01G	44:02:01G	56:01:01G	01:02:01G	05:01:01G	01:01:01	11:01:01	03:01:01G	05:01:01G	04:01:01G	14:01:01	B3*02:02:01G	
144 1 H	23:01:01G	74:01	15:03:01G	41:02:01	02:10	17:01:01G	13:01:01	15:03:01G	06:02:01	06:03:01	02:01:02	11:01:01	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
144 2 A	11:01:01G	30:01:01	27:05:02G	42:02	01:02:01G	17:01:01G	01:01:01	12:01:01G	05:01:01G	05:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	
144 2 B	03:01:01G	24:02:01G	07:02:01G	51:01:01G	07:02:01G	14:02:01	11:01:01	15:01:01G	03:01:01G	06:02:01G	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
144 2 C	11:01:01G	11:01:01G	07:02:01G	52:01:01G	07:02:01G	12:02:02	13:02:01	15:01:01G	06:02:01G	06:09:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*03:01:01G	B5*01:01:01
144 2 D	01:01:01:01	29:02:01:01	08:01:01G	44:03:01	07:01:01G	16:01:01	04:07:01G	07:01:01G	02:02:01	03:01:01:01	03:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
144 2 E	01:01:01G	03:01:01G	08:01:01G	51:01:01G	07:01:01G	14:02:01	03:01:01G	13:01:01	02:01:01	06:03:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*01:01:02G
144 2 F	24:02:01G	31:01:02G	15:01:01	35:04:01	03:03:01G	04:01:01G	08:07	13:01:01	04:02:01	06:03:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	
144 2 G	30:01:01	30:02:01G	13:02:01	18:01:01G	05:01:01G	06:02:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	04:02:01G	10:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 2 H	29:02:01G	29:02:01G	49:01:01G	58:01:01	07:01:01G	07:01:01G	08:04:01	15:03:01G	04:02:01	06:02:01	03:01:01G	04:02:01G	B5*01:01:01	
144 3 A	23:01:01G	32:01:01	40:02:01G	58:01:01	02:02:02G	07:01:01G	03:01:01G	13:01:01	02:01:01	06:03:01	04:02:01G	105:01	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
144 3 B	02:01:01G	02:01:01G	39:09:01	40:04	03:04:01G	07:02:01G	04:11:01	14:06:01	03:01:01G	03:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
144 3 C	23:05	24:02:01:01	07:02:01G	14:02:01	02:02:02G	07:02:01G	01:02:01	15:03:01G	05:01:01G	06:02:01	04:01:01G	18:01	B5*01:01:01	
144 3 D	01:01:01:01	03:01:01:01	44:02:01:03	57:01:01	06:02:01:01	07:04:01	11:04:01	11:01:01	03:01:01	03:01:01	02:01:02	04:01:01	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
144 3 E	01:01:01G	24:02:01G	15:08:01	35:03:01	03:03:01G	04:01:01G	04:03:01	13:02:01	03:02:01G	06:04:01G	04:02:01G	04:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
144 3 F	02:01:01G	25:01:01	44:02:01G	52:01:01G	05:01:01G	12:02:02	04:01:01	15:02:01	03:01:01G	06:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:02:01G
144 3 G	02:01:01G	30:01:01	07:02:01G	50:01:01	06:02:01G	07:02:01G	01:02:01	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01	01:01:01G	05:01:01G	B5*01:01:01	
144 3 H	03:01:01G	69:01	07:02:01G	35:08:01	07:02:01G	12:03:01G	04:03:01	15:01:01G	03:02:01	06:02:01	02:01:02	02:01:02	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
144 4 A	02:01:01G	68:01:02G	07:02:01G	40:04	03:04:01G	07:02:01G	04:11:01	13:02:01	03:02:01	06:04:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
144 4 B	30:01:01	74:01	07:02:01G	58:01:01	03:02:01G	04:07	13:01:01	15:01:01G	06:02:01	06:03:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
144 4 C	02:01:01G	23:01:01G	35:08:01	51:01:07	04:01:01G	16:01:01	11:02:01	13:01:01	03:19	06:03:01	04:01:01G	17:01	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
144 4 D	02:01:01G	34:02:01	15:17:01G	39:01:01G	05:01:01G	12:03:01G	11:01:02	16:01:01	05:02:01	06:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*02:02:01G
144 4 E	03:01:01G	33:03:01	07:02:01G	35:01:01G	04:01:01G	07:02:01G	10:01:01	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B5*01:01:01	
144 4 F	03:01:01G	25:01:01	14:02:01	39:01:01G	08:02:01G	12:03:01G	01:02:01	04:03:01	03:04:01	05:01:01G	01:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
144 4 G	02:01:01G	02:01:01G	40:01:01G	50:01:01	03:04:01G	06:02:01G	07:01:01G	13:02:01	02:02:01	06:04:01	04:01:01G	13:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
144 4 H	02:01:01G	11:01:01G	39:06:02	44:02:01G	05:01:01G	07:02:01G	08:01:01G	13:01:01	04:02:01	06:03:01	03:01:01G	19:01	B3*01:01:02G	

Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
144 5 A	02:01:01G	03:01:01G	35:01:01G	44:05:01	02:02:02G	04:01:01G	11:04:01	16:01:01	03:01:01	05:02:01	04:02:01G	06:01	B3*02:02:01G	B5*02:02:01G
144 5 B	23:01:01G	33:03:01	14:02:01	44:03:01	08:02:01G	16:01:01	07:01:01G	13:01:01	02:02:01	06:03:01	04:01:01G	16:01:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
144 5 C	23:01:01G	33:03:01	14:02:01	53:01:01	04:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	08:04:01	02:01:01	03:19	105:01	18:01	B3*02:02:01G	
144 5 D	03:01:01G	33:01:01	14:02:01	35:01:01G	04:01:01G	08:02:01G	01:01:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	04:01:01G	17:01	B4*01:01:01G	
144 5 E	32:01:01	32:01:01	49:01:01G	49:01:01G	07:01:01G	07:01:01G	04:05:01	04:05:01	03:02:01	03:02:01	02:01:02	02:01:02	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
144 5 F	01:01:01G	11:01:01G	44:02:01G	51:01:01G	05:01:01G	07:01:01G	08:01:01G	12:01:01G	03:01:01G	04:02:01	02:01:02G	03:01:01G	B3*02:02:01G	
144 5 G	24:02:01G	26:01:01	15:03:01G	38:37	02:10	12:03:01G	03:01:01G	04:02:01	02:01:01	03:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 5 H	02:01:01G	33:01:01	08:01:01G	14:02:01	07:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	131:01	17:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 6 A	02:01:01G	25:01:01	44:02:01G	52:01:01G	05:01:01G	12:02:02	04:01:01	15:02:01	03:01:01G	06:01:01G	03:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:02:01G
144 6 B	02:01:01G	33:01:01	14:02:01	15:01:01	03:03:01G	08:02:01G	01:02:01	04:01:01	03:02:01	05:01:01G	02:01:02	04:01:01G	B4*01:01:01G	
144 6 C	02:01:01G	23:01:01G	45:01:01	51:01:01G	06:02:01:03	12:03:01:01	04:03:01	11:01:01	03:01:01	03:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 6 D	11:01:01G	24:02:01G	07:02:01G	14:01:01	07:02:01G	08:02:01G	07:01:01G	15:01:01G	02:02:01	06:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
144 6 E	11:01:01G	11:01:01G	51:01:01G	51:01:01G	07:01:01G	07:01:01G	11:01:01	11:01:01	03:01:01G	03:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
144 6 F	03:01:01G	29:02:01G	39:06:02	44:03:01	07:02:01G	16:01:01	07:01:01G	08:01:01G	02:02:01	04:02:01	02:01:02G	03:01:01G	B4*01:01:01G	
144 6 G	24:02:01G	24:02:01G	14:02:01	35:08:01	02:02:02G	04:01:01G	01:02:01	13:01:01	05:01:01G	06:03:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	
144 6 H	01:01:01G	02:01:01G	27:05:02G	51:01:01G	02:02:02G	14:02:01	01:01:01G	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01G	04:01:01G	11:01:01	B5*01:01:01	
144 7 A	11:01:01G	24:02:01G	35:08:01	45:01:01	04:01:01G	16:01:01	10:01:01	13:01:01	05:01:01G	06:03:01	04:01:01G	17:01	B3*02:02:01G	
144 7 B	33:03:01	74:01	07:02:01G	44:03:01	07:02:01G	16:01:01	07:01:01G	09:01:02G	02:01:01G	02:01:01G	03:01:01G	11:01:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
144 7 C	02:01:01G	24:02:01G	27:05:02G	39:06:02	02:02:02G	07:02:01G	08:01:01G	15:01:01G	04:02:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B5*01:01:01	
144 7 D	02:01:01G	24:02:01G	15:04:01	44:03:01	03:03:01G	05:01:01G	11:01:01	16:02:01	03:01:01G	03:01:01G	04:02:01G	10:01	B3*02:02:01G	B5*02:02:01G
144 7 E	29:02:01G	31:01:02G	13:02:01	44:03:01	06:02:01G	16:01:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	02:02:01	04:01:01G	11:01:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
144 7 F	03:02:01	24:02:01G	44:02:01G	51:01:01G	05:01:01G	15:02:01G	13:01:01	15:01:01G	06:02:01	06:03:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
144 7 G	01:01:01G	02:01:01G	37:01:01	40:04	03:04:01G	06:02:01G	01:01:01	04:11:01	03:02:01	05:01:01G	02:01:02	14:01:01	B4*01:01:01G	
144 7 H	02:01:01G	29:02:01G	15:03:01G	44:03:01	02:10	16:01:01	01:02:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	01:01:01G	11:01:01	B4*01:01:01G	
144 8 A	02:01:01G	24:02:01G	35:02:01	40:01:01G	03:04:01G	04:01:01G	04:05:01	15:01:01	03:02:01	06:02:01	04:01:01G	17:01	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
144 8 B	02:01:01G	03:01:01G	07:02:01G	47:01:01G	06:02:01G	07:02:01G	04:05:01	15:01:01G	03:02:01	06:02:01	04:01:01G	13:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
144 8 C	03:01:01G	33:01:01	14:02:01	35:01:01G	04:01:01G	08:02:01G	01:01:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	02:01:02G	04:02:01G	B4*01:01:01G	
144 8 D	01:01:01G	11:01:01G	08:01:01G	35:01:01G	04:01:01G	07:01:01G	01:03	03:01:01G	02:01:01	05:01:01G	04:01:01G	13:01:01G	B3*01:01:02G	

Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
144 8 E	01:01:01G	11:01:01G	35:02:01	51:01:01G	04:01:01G	15:02:01G	01:01:01	11:04:01	03:01:01G	05:01:01G	01:01:01G	03:01:01G	B3*02:02:01G	
144 8 F	11:01:01G	23:01:01G	35:01:01G	51:01:01G	02:02:02G	04:01:01G	01:01:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	01:01:01G	04:02:01G	B4*01:01:01G	
144 8 G	02:01:01G	03:01:01G	27:05:02G	51:01:01G	01:02:01G	15:02:01G	01:01:01	13:01:01	05:01:01G	06:03:01	04:02:01G	06:01	B3*01:01:02G	
144 8 H	23:01:01G	66:01:01	35:01:01G	51:01:01G	02:02:02G	04:01:01G	01:01:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	01:01:01G	04:02:01G	B4*01:01:01G	
144 9 A	23:01:01G	25:01:01	15:01:01G	44:03:01	03:03:01G	04:01:01G	07:01:01G	07:01:01G	02:02:01	02:02:01	04:01:01G	10:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
144 9 B	03:01:01G	29:02:01G	39:01:01G	44:03:01	07:02:01G	16:01:01	07:01:01G	08:01:01G	02:02:01	04:02:01	04:01:01G	06:01	B4*01:01:01G	
144 9 C	24:02:01G	32:01:01	14:01:01	35:03:01	08:02:01G	12:03:01G	07:01:01G	14:54:01	02:02:01	05:03:01G	04:01:01G	10:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 9 D	02:05:01	29:02:01G	44:03:01	45:01:01	06:02:01G	16:01:01	07:01:01G	13:01:01	02:02:01	03:03:02G	11:01:01	11:01:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 9 E	30:02:01G	30:02:01G	07:02:01G	08:01:01G	07:02:01G	07:01:01G	11:01:02	15:03:01G	03:19	06:02:01	02:01:02	105:01	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
144 9 F	02:01:01G	29:02:01G	07:02:01G	50:01:01	06:02:01G	07:02:01G	03:01:01G	15:01:01G	02:01:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
144 9 G	02:01:01G	03:01:01G	44:02:01G	51:01:01G	05:01:01G	16:02:01G	07:01:01G	08:01:01G	02:02:01	04:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
144 9 H	23:01:01G	29:02:01G	14:03	44:03:01	04:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	03:02:01	02:01:01	04:02:01	01:01:01G	03:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
144 10 A	01:01:01:01	03:01:01:01	07:06	35:01:01	04:01:01:01	15:05:02	01:01:01	04:05:01	03:02:01	05:01:01	03:01:01G	04:01:01	B4*01:01:01G	
144 10 B	02:01:01G	31:01:02G	15:01:01G	35:05:01	03:04:01G	04:01:01G	04:01:01	14:02:01	03:01:01	03:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
144 10 C	01:01:01G	30:01:01	08:01:01G	42:01:01	07:01:01G	17:01:01G	03:01:01G	03:02:01	02:01:01	04:02:01	01:01:01G	01:01:01G	B3*01:01:02G	B3*01:01:02G
144 10 D	31:01:02G	32:01:01	08:01:01G	40:01:01G	03:04:01G	07:01:01G	04:04:01	04:07:01G	03:01:01G	03:02:01	03:01:01G	10:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
144 10 E	11:01:01G	23:01:01G	49:01:01	50:02	04:01:01G	07:01:01G	04:05:01	13:01:01	03:02:01	06:03:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
144 10 F	01:01:01G	02:01:01G	08:01:01G	51:01:01G	02:02:02G	07:01:01G	03:01:01G	11:01:01	02:01:01	03:01:01G	04:01:01G	06:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
144 10 G	01:01:01G	02:01:01G	27:05:02G	51:01:01G	01:02:01G	15:02:01G	01:01:01	15:01:01G	05:01:01G	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B5*01:01:01	
144 10 H	01:01:01G	03:01:01G	14:02:01	35:03:01	04:01:01G	08:02:01G	01:02:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	02:01:02G	04:02:01G	B4*01:01:01G	
144 11 A	03:01:01G	29:02:01G	41:02:01	44:03:01	16:01:01	17:01:01G	07:01:01G	15:03:01G	02:02:01	06:02:01	03:01:01G	04:02:01G	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
144 11 B	02:01:01G	31:01:02G	39:05:01	50:01:01	06:02:01G	07:02:01G	04:04:01	14:54:01	03:02:01	05:03:01G	04:02:01G	13:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 11 C	02:01:01G	31:01:02G	39:01:01G	44:27:01	07:04:01	12:03:01G	01:01:01	16:01:01	05:01:01G	05:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B5*02:02:01G	
144 11 D	11:01:01G	23:01:01G	18:01:01G	49:01:01G	07:01:01G	12:03:01G	13:02:01	16:02:01	05:02:01	06:04:01	02:01:02G	03:01:01G	B3*03:01:01G	B5*02:02:01G
144 11 E	03:01:01G	24:02:01G	27:05:02G	51:01:01G	01:02:01G	02:02:02G	01:01:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	04:01:01G	06:01	B4*01:01:01G	
144 11 F	02:01:01G	29:02:01G	40:04	45:01:01	03:04:01G	06:02:01G	04:11:01	11:01:01	03:01:01G	03:02:01	03:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 11 G	02:01:01G	74:03	35:01:01G	40:02:01G	02:02:02G	04:01:01G	08:04:01	13:01:01	04:02:01	06:03:01	03:01:01G	10:01	B3*01:01:02G	
144 11 H	02:01:01G	24:02:01G	39:06:02	51:01:01G	07:02:01G	14:02:01	04:03:01	08:01:01G	03:02:01	04:02:01	04:01:01G	11:01:01	B4*01:01:01G	



Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
144 12 A	02:01:01G	03:01:01G	14:02:01	57:01:01	06:02:01G	08:02:01G	01:02:01	07:01:01G	03:03:02:01	05:01:01:01	04:01:01G	04:01:01G	34*01:03:01:02N	
144 12 B	02:01:01G	68:01:01G	35:03:01	45:01:01	04:01:01G	16:01:01	03:01:01G	11:02:01	02:01:01	03:19	03:01:01G	13:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
144 12 C	02:01:01G	11:01:01:01	27:05:02	35:08:01	01:02:01	04:01:01	01:01:01	11:01:01	03:01:01	05:01:01	03:01:01G	04:01:01	B3*02:02:01G	
144 12 D	02:01:01G	24:03:01	07:02:01	44:02:01:01	05:01:01:02	07:02:01:03	04:01:01	11:01:01	03:01:01	03:01:01:01	02:01:02	04:01:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
144 12 E	01:01:01G	32:01:01	15:01:01G	44:02:01G	03:03:01G	05:01:01G	01:01:01G	13:01:01G	05:01:01G	06:03:01	11:01:01	35:01:01	B3*01:01:02G	
144 12 F	29:02:01G	68:01:02G	18:01:01G	18:01:01G	05:01:01G	12:03:01G	03:01:01G	15:01:01G	02:01:01	06:02:01	04:01:01G	23:01:01	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
144 12 G	01:01:01G	26:08	41:01:01	44:02:01G	05:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	12:01:01G	02:01:01	03:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
144 12 H	03:01:01G	24:02:01G	07:02:01G	13:02:01	06:02:01G	07:02:01G	07:01:01G	13:01:01	02:02:01	06:03:01	02:01:02G	04:02:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 1 A	01:01:01G	02:01:01G	18:01:01G	35:02:01	04:01:01G	07:01:01G	11:01:01	11:04:01	03:01:01	03:01:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
423 1 B	02:01:01G	24:03:01	35:05:01	44:02:01G	04:01:01G	05:01:01G	04:04:01	13:01:01	03:02:01	06:03:01	02:01:02	14:01:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 1 C	01:01:01G	29:02:01G	08:01:01G	44:03:01	07:01:01G	16:01:01	04:07:01G	07:01:01G	02:02:01	03:01:01G	02:01:02	04:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
423 1 D	02:01:01G	23:01:01G	44:02:01G	44:02:01G	04:01:01G	05:01:01G	11:18	13:01:01	03:01:01G	06:03:01	02:01:02	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
423 1 E	02:01:01G	31:01:02G	39:05:01	52:01:02	07:02:01G	15:02:01G	04:04:01	08:02:01	03:02:01	04:02:01	04:02:01G	14:01:01	B4*01:01:01G	
423 1 F	03:01:01G	03:01:01G	07:02:01G	07:02:01G	07:02:01G	07:02:01G	13:01:01	15:01:01G	06:02:01	06:03:01	02:01:02G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
423 1 G	24:02:01G	32:01:01	40:02:01G	50:02	02:02:02G	06:02:01G	07:01:01G	13:01:01	02:02:01	06:03:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 1 H	23:01:01G	74:01	08:01:01G	15:03:01G	02:10	03:04:01G	01:02:01	09:01:02G	02:02:01	05:01:01G	01:01:01G	02:01:02	B4*01:01:01G	
423 2 A	11:01:01G	23:01:01G	49:01:01G	50:01:01	06:02:01G	07:01:01G	03:01:01G	13:02:01	02:01:01G	06:04:01G	04:02:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*03:01:01G
423 2 B	02:01:01G	11:01:01G	44:02:01G	44:02:01G	05:01:01G	15:02:01G	04:02:01	12:01:01G	03:01:01G	03:02:01	04:01:01G	05:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 2 C	03:01:01G	24:03:01	15:01:01G	35:01:01G	03:03:01G	04:01:01G	01:01:01	08:04:01	04:02:01	05:01:01G	04:02:01G	04:02:01G		
423 2 D	03:01:01G	23:01:01G	49:01:01G	51:01:01G	07:01:01G	15:02:01G	07:01:01G	07:01:01G	02:02:01	02:02:01	10:01	15:01:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
423 2 E	02:01:01G	02:01:01G	44:02:01G	51:01:01G	05:01:01G	07:01:01G	13:01:01	13:01:01	06:03:01	06:03:01	02:01:02	02:01:02	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
423 2 F	01:01:01G	02:01:01G	51:01:01G	51:01:01G	14:02:01	15:02:01G	11:01:01	13:01:01	03:01:01G	06:03:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
423 2 G	24:02:01G	24:02:01G	35:03:01	35:01:01G	04:01:01G	12:03:01G	04:01:01	14:54:01	03:02:01	05:03:01G	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 2 H	02:01:01G	29:02:01G	18:01:01G	44:03:01	02:02:02G	16:01:01	04:04:01	07:01:01G	02:02:01	03:02:01	04:01:01G	14:01:01	B4*01:03:03	B4*01:01:01G
423 3 A	02:01:01G	68:01:02G	40:04	51:01:01G	03:04:01G	14:02:01	01:01:01	04:11:01	03:02:01	05:01:01G	04:02:01G	20:01:01	B4*01:01:01G	
423 3 B	01:01:01G	30:01:01	13:02:01	41:01:01	06:02:01G	16:02:01G	04:05:01	07:01:01G	02:02:01	03:02:01	03:01:01G	13:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
423 3 C	03:01:01G	24:02:01G	39:06:02	44:27:01	07:02:01G	07:04:01	01:03	08:01:01G	04:02:01	05:01:01G	02:01:02	10:01		
423 3 D	11:01:01G	26:01:01	14:02:01	49:01:01G	07:01:01G	08:02:01G	01:02:01	11:01:01	03:01:01	05:01:01:01	02:01:02G	13:01:01G	B3*02:02:01G	

Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
423 3 E	01:01:01G	68:01:02G	08:01:01G	35:05:01	04:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	04:11:01	02:01:01	03:02:01	02:01:02G	04:02:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 3 F	33:01:01	68:01:01G	15:17:01G	15:03:01G	02:10	05:01:01G	10:01:01	11:02:01	03:19	05:01:01G	01:01:01G	105:01	B3*02:02:01G	
423 3 G	23:01:01G	68:02:01G	07:02:01G	15:16:01	07:02:01G	14:02:01	01:02:01	09:01:02G	02:02:01	05:01:01G	01:01:02	131:01	B4*01:01:01G	
423 3 H	26:01:01	68:02:01G	18:01:01G	53:01:01	04:01:01G	12:03:01G	11:02:01	11:04:01	03:19	03:01:01	02:01:02G	04:02:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
423 4 A	24:02:01G	33:01:01	14:02:01	52:01:02	08:02:01G	15:02:01G	01:02:01	04:04:01	03:02:01	05:01:01G	02:01:02G	03:01:01G	B4*01:01:01G	
423 4 B	24:02:01G	32:02	35:01:01G	44:02:01G	04:01:01G	05:01:01G	04:02:01	13:01:01	03:02:01	06:03:01	02:01:02G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 4 C	23:01:01G	68:01:02G	27:05:02G	39:01:01G	02:02:02G	07:02:01G	04:04:01	08:07	03:02:01	04:02:01	03:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	
423 4 D	02:01:01G	23:17	15:03:01	51:01:01:01	02:10	14:02:01	11:01:02	11:01:01	03:01:01	06:02:01	04:02:01:02	18:01	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
423 4 E	03:01:01G	32:01:01	39:01:01G	51:01:01G	12:03:01:01	16:02:01	11:03	13:01:01	03:01:01G	06:03:01	02:01:02G	04:02:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
423 4 F	24:02:01G	24:02:01G	39:01:01G	44:02:01G	05:01:01G	12:03:01G	13:01:01	13:01:01	06:03:01	06:03:01	04:02:01G	11:01:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
423 4 G	02:01:01G	68:01:02G	08:01:01G	15:18:01	07:04:01	07:01:01G	03:01:01G	11:03	02:01:01	03:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
423 4 H	02:01:01G	11:01:01G	35:01:01G	44:02:01G	02:02:02G	05:01:01G	15:01:01G	15:01:01G	06:02:01	06:02:01	05:01:01G	19:01	B5*01:01:01	B5*01:01:01
423 5 A	02:01:01G	03:01:01G	42:01:01	51:01:01G	15:02:01G	17:01:01G	08:02:01	08:04:01	03:01:04	04:02:01	02:01:02G	04:02:01G		
423 5 B	02:01:01G	02:01:01G	44:02:01G	51:01:01G	05:01:01G	14:02:01	01:02:01	08:01:01G	04:02:01	05:01:01G	02:01:02G	04:01:01G		
423 5 C	02:05:01	02:01:01G	35:03:01	50:01:01	04:01:01G	06:02:01G	07:01:01G	10:01:01	02:02:01	05:01:01G	02:01:02G	03:01:01G	B4*01:01:01G	
423 5 D	23:01:01G	29:02:01G	07:02:01G	44:03:01	07:02:01G	16:01:01	07:01:01G	15:01:01G	02:02:01	06:02:01	04:01:01G	09:01:01	B4*01:01:01G	B5*01:01:01
423 5 E	01:01:01G	33:01:01	14:02:01	57:01:01	06:02:01G	08:02:01G	01:02:01	04:02:01	03:02:01	05:01:01G	04:01:01G	05:01:01G	B4*01:03N	
423 5 F	02:11:01	24:26	18:01:01G	48:02:01	04:01:01G	12:03:01G	03:01:01G	09:01:02G	02:01:01	03:03:02	03:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 5 G	36:01	74:01	15:03:01G	81:01:01G	02:10	18:01:01G	03:01:01G	11:01:02	02:01:01	06:02:01	105:01	29:01	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
423 5 H	24:02:01G	68:01:02G	18:01:01G	40:01:01G	03:04:01G	07:01:01G	11:04:01	15:01:01G	03:01:01G	06:02:01	02:01:02G	03:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
423 6 A	01:01:01:01	33:03:01	57:01:01	58:01:01	03:02:02:01	06:02:01:01	04:04:01	15:02:01	03:02:01	06:01	02:02	03:01:01G	B4*01:01:01G	B5*01:02:01G
423 6 B	24:02:01G	26:01:01	35:03:01	55:01:01	03:03:01G	12:03:01G	11:01:01	13:01:01	03:01:01G	06:03:01	04:01:01G	10:01	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
423 6 C	01:02	33:01:01	15:03:01G	49:01:01G	02:10	07:01:01G	10:01:01	11:01:02	03:19	05:01:01G	01:01:01G	17:01	B3*02:02:01G	
423 6 D	01:01:01G	31:01:02	08:01:01G	15:04:01	03:03:01G	07:01:01G	14:02:01	15:01:01G	03:01:01:01	06:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
423 6 E	02:01:01G	30:01:01	08:01:01G	44:03:01	07:01:01G	16:02:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	01:01:01G	04:02:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 6 F	02:01:01G	31:01:02G	39:03	44:02:01G	05:01:01G	07:02:01G	04:04:01	13:01:01	03:02:01	06:03:01	02:01:02G	04:02:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 6 G	31:01:02G	31:01:02G	15:01:01	35:08:01	03:04:01G	04:01:01G	04:01:01	04:03:01	03:02:01	03:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
423 6 H	01:01:01G	01:01:01G	08:01:01G	58:01:01	03:02:01G	07:01:01G	13:02:01	13:02:01	06:04:01	06:09:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*03:01:01G	B3*03:01:01G

Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
423 7 A	02:01:01G	24:02:01G	39:01:01G	41:01:01	12:03:01G	17:01:01G	07:01:01G	16:01:01	02:02:01	05:02:01	02:01:02G	04:02:01G	B4*01:01:01G	B5*02:02:01G
423 7 B	30:01:01	34:02:01	35:01:01G	42:02	04:01:01G	17:01:01G	12:01:01G	12:01:01G	05:01:01G	05:01:01G	04:02:01G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B3*01:01:02G
423 7 C	02:01:01G	30:01:01	42:01:01	49:01:01G	07:01:01G	17:01:01G	03:02:01	13:02:01	04:02:01	06:04:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B3*03:01:01G
423 7 D	01:01:01G	68:01:02G	08:01:01G	40:04	03:04:01G	07:01:01G	03:01:01G	04:11:01	02:01:01	03:02:01	04:02:01G	14:01:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 7 E	02:01:01G	29:02:01G	07:02:01G	41:01:01	07:02:01G	08:02:01G	11:01:02	16:01:01	05:02:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B5*02:02:01G
423 7 F	02:01:01G	32:01:01	14:02:01	50:01:01	06:02:01G	08:02:01G	01:02:01	07:01:01G	02:02:01	05:01:01G	02:01:02	02:01:02	B4*01:01:01G	
423 7 G	03:01:01G	24:03:01	40:02:01G	49:01:01G	03:04:01G	07:01:01G	04:05:01	16:02:01	03:01:01	03:02:01	04:02:01G	17:01	B4*01:01:01G	B5*02:02:01G
423 7 H	03:01:01G	31:01:02G	07:02:01G	35:04:01	04:01:01G	07:02:01G	14:02:01	15:01:01G	03:01:01	06:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
423 8 A	01:01:01G	02:01:01G	38:01:01	51:01:01G	01:02:01G	06:02:01G	07:01:01G	13:01:01	02:01:01G	06:03:01G	04:02:01G	17:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 8 B	11:01:01G	30:02:01G	44:03:01	44:03:01	16:01:01	16:01:01	07:01:01G	07:01:01G	02:02:01	02:02:01	04:01:01G	11:01:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
423 8 C	02:01:01G	26:01:01	38:01:01	44:03:01	12:03:01:01	16:01:01	07:01:01G	11:01:01	02:02:01	03:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 8 D	11:01:01G	29:02:01G	44:03:01	51:01:01G	15:02:01G	16:01:01	07:01:01G	14:54:01	02:02:01	05:03:01G	03:01:01G	11:01:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 8 E	01:01:01G	02:01:01G	38:01:01	51:01:01G	02:02:02G	06:02:01G	07:01:01G	13:01:01	02:02:01	06:03:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 8 F	02:01:01G	03:01:01G	35:03:01	51:01:01G	02:02:02G	04:01:01G	03:01:01G	11:01:01	02:01:01	03:01:01G	04:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*02:02:01G
423 8 G	02:02:01	24:02:01:01	35:02:01	51:01:01:01	04:01:01	14:02:01	01:01:01	11:04:01	03:01:01	05:01:01	03:01:01G	04:02:01:02	B3*02:02:01G	
423 8 H	29:02:01G	31:01:02G	44:03:01	52:01:02	15:02:01G	16:01:01	07:01:01G	08:02:01	02:02:01	04:02:01	11:01:01	14:01:01	B4*01:01:01G	
423 9 A	03:01:01G	23:01:01G	14:02:01	41:01:01	08:02:01G	08:02:01G	04:05:01	11:01:02	03:02:01	06:02:01	03:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 9 B	02:01:01G	03:01:01G	13:02:01	41:01:01	06:02:01G	17:01:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	02:01:02	04:01:01G	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 9 C	02:05:01	02:01:01G	45:01:01	49:01:01	07:01:01G	16:01:01	04:05:01	11:01:01	03:01:01	03:02:01	02:01:02	02:01:02	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 9 D	23:01:01G	30:02:01G	15:10:01	15:03:01G	02:10	03:04:02	01:02:01	03:01:01G	02:01:01G	05:01:01G	02:01:02	105:01	B3*02:02:01G	
423 9 E	03:01:01G	30:02:01G	27:05:02G	58:01:01	02:02:02G	07:01:01G	03:01:01G	15:01:01G	02:01:01	06:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
423 9 F	02:05:01	02:01:01G	50:01:01	50:01:01	06:02:01G	07:01:01G	07:01:01G	07:01:01G	02:02:01	03:03:02G	02:01:02	04:01:01G	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
423 9 G	01:01:01G	02:01:01G	07:02:01G	44:03:01	07:02:01G	16:01:01	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	02:01:02	11:01:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 9 H	03:01:01G	03:01:01G	07:02:01G	18:05	07:02:01G	12:03:01G	08:03:02	15:01:01G	03:01:01	06:02:01	04:01:01G	04:01:01G	B5*01:01:01	
423 10 A	03:01:01G	24:02:01G	08:01:01G	51:01:01G	03:03:01G	07:01:01G	03:01:01G	09:01:02G	02:01:01	03:03:02	04:01:01G	10:01	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 10 B	02:01:01G	74:01	15:03:01G	55:01:01	02:10	03:03:01G	13:02:01	14:54:01	05:03:01G	06:09:01	03:01:01G	04:01:01G	B3*02:02:01G	B3*03:01:01G
423 10 C	02:01:01G	03:01:01G	35:03:01	58:01:01	04:01:01G	07:01:01G	11:01:01	15:03:01G	03:01:01G	06:02:01	01:01:01G	03:01:01G	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
423 10 D	23:01:01G	26:01:01	08:01:01G	14:01:01	07:01:01G	08:02:01G	03:01:01G	07:01:01G	02:01:01	02:02:01	01:01:01G	04:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G



Apêndice 04: Resultados de Tipagem HLA obtidos pelo protocolo Illumina01 da Histogenetics para 9 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1	HLA – DRB	HLA – DRB
423 10 E	11:01:01G	32:01:01	14:01:01	35:01:01G	04:01:01G	08:02:01G	07:01:01G	11:01:01	02:02:01	03:01:01G	02:01:02	10:01	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 10 F	01:01:01G	34:02:01	08:01:01G	53:01:01	04:01:01G	07:01:01G	03:01:01G	15:03:01G	02:01:01	06:02:01	01:01:01G	105:01	B3*01:01:02G	B5*01:01:01
423 10 G	24:03:01	33:01:01	14:02:01	39:13:01	07:02:01G	08:02:01G	01:02:01	16:02:01	03:01:01G	05:01:01G	04:02:01G	04:01:01G	B5*02:02:01G	
423 10 H	01:01:01G	02:01:01G	08:01:01G	44:03:01	07:01:01G	16:02:01G	03:01:01G	04:02:01	02:01:01	03:02:01	01:01:01G	02:01:02	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G
423 11 A	29:02:01G	74:01	15:03:01G	44:03:01	02:10	16:01:01	11:01:02	13:01:01	03:19	06:03:01	04:01:01G	105:01	B3*01:01:02G	B3*02:02:01G
423 11 B	03:01:01G	68:01:02G	39:02:02	51:01:01G	01:02:01G	03:04:01G	01:01:01	08:04:01	04:02:01	05:01:01G	03:01:01G	04:02:01G		
423 11 C	29:02:01G	31:01:02G	44:03:01	52:01:02	15:02:01G	16:01:01	07:01:01G	08:02:01	02:02:01	04:02:01	04:02:01G	11:01:01	B4*01:01:01G	
423 11 D	03:01:01G	68:02:01G	07:02:01G	15:03:01G	02:10	07:02:01G	15:03:01G	15:03:01G	06:02:01	06:02:01	02:01:02	105:01	B5*01:01:01	B5*01:01:01
423 11 E	02:01:01G	30:01:01	39:10:01	50:01:01	06:02:01:01	12:03:01:01	01:02:01	15:03:01G	05:01:01G	06:02:01	02:01:02G	03:01:01G	B5*01:01:01	
423 11 F	02:01:01G	11:01:01G	35:01:01G	44:02:01G	04:01:01G	05:01:01G	01:01:01	13:01:01	05:01:01G	06:03:01	02:01:02G	04:02:01G	B3*02:02:01G	
423 11 G	02:01:01G	68:02:01G	51:01:01G	53:01:01	04:01:01G	15:02:01G	07:01:01G	13:02:01	02:02:01	06:04:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
423 11 H	30:02:01G	74:01	08:01:01G	18:01:01G	02:10	07:01:01G	04:11:01	11:01:02	03:02:01	05:02:01	04:02:01G	04:01:01G	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
423 12 A	03:01:01:01	31:01:02:01	07:02:01	39:01:01G	07:02:01:03	12:03:01:01	11:01:01	15:01:01	03:01:01	06:02:01	06:01	14:01:01	B3*02:02:01G	B5*01:01:01
423 12 B	02:01:01G	02:01:01G	27:05:02G	45:01:01	01:02:01G	16:01:01	01:01:01	01:02:01	05:01:01G	05:01:01G	01:01:01G	04:02:01G		
423 12 C	30:02:01G	33:03:01	07:02:01G	18:01:01G	05:01:01G	07:02:01G	03:01:01G	09:01:02G	02:01:01	02:02:01	01:01:01G	02:02	B3*02:02:01G	B4*01:01:01G
423 12 D	02:01:01G	02:01:01G	07:02:01G	15:03:01G	02:10	07:02:01G	07:01:01G	13:02:01	02:02:01	06:04:01	03:01:01G	10:01	B3*03:01:01G	B4*01:01:01G
423 12 E	02:01:01G	03:01:01G	14:02:01	18:01:01G	02:02:02G	08:02:01G	01:02:01	13:01:01G	05:01:01G	06:03:01G	11:01:01	17:01:01G	B3*01:01:02G	
423 12 F	02:01:01G	11:01:01G	49:01:01G	50:01:01	06:02:01G	07:01:01G	04:05:01	04:06:01G	03:02:01	04:02:01	13:01:01G	34:01	B4*01:01:01G	B4*01:01:01G
423 12 G	11:01:01G	31:01:02G	27:05:02G	44:03:01	01:02:01G	16:01:01	01:01:01	07:01:01G	02:01:01G	05:01:01G	02:01:02	04:01:01G	B4*01:01:01G	
423 12 H	03:01:01G	68:02:01G	14:02:01	47:01:01G	06:02:01G	08:02:01G	04:05:01	13:03:01	03:01:01G	03:02:01	02:01:02G	13:01:01G	B3*01:01:02G	B4*01:01:01G

Legenda

Código	Significado
07:XX1	Mutação não-sinônima. AA 42 AGT (S) → GGT (G). O alelo mais similar é C*07:02:01G
07:XX2	Mutação não-sinônima. AA 77 AAC (N) → AAA (K). O alelo mais similar é B*07:57
NT	Não tipado

## Apêndice 05: Resultados de tipagem HLA obtidos pelo protocolo PacBio da Histogenetics para 6 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1
89 1 A	11:01:01:01	11:01:01:01	51:01:01:01	51:01:01:01	07:01:01:01	07:01:01:01	11:01:01	11:01:01	03:01:01	03:01:01	04:01:01	04:01:01
89 1 B	26:01:01	33:01:01	14:02:01	38:01:01	08:02:01:01	12:03:01:01	01:02:01	04:02:01	03:02:01	05:01:01:01	04:01:01	04:01:01
89 1 D	24:02:01:02L	31:01:02:01	13:02:01	35:04:01	04:01:01:01	06:02:01:01	07:01:01	08:07	02:02:01	04:02:01	04:02:01:02	17:01
89 2 B	11:01:01:01	32:01:01	35:01:01	35:03:01	04:01:01:01	04:01:01:05	07:01:01	14:54:01	02:02:01	05:03:01	05:RGPW	17:01
89 2 D	02:ANGA	11:01:01:01	35:01:01	44:02:01:01	04:01:01:05	05:01:01:02	14:54:01	15:01:01	05:03:01	06:02:01	04:01:01	04:01:01
89 2 F	02:ANGA	66:01:01	51:31	58:02	06:02:01:01	15:02:01:01	07:01:01	09:CTZ	02:02:01	03:03:02:04	105:01	13:FNVU
89 3 A	24:02:01:01	24:02:01:02L	15:37	55:01:01	01:02:01	03:04:02	03:01:01	13:01:01	02:01:01	06:03:01	01:AETTA	04:01:01
89 3 E	02:ANGA	02:ANGA	07:02:01	51:01:01:01	07:02:01:03	15:02:01:01	13:111	15:01:01	06:02:01	06:03:01	04:01:01	04:01:01
89 3 F	02:ANGA	02:ANGA	35:01:01	35:01:01	04:01:01:01	04:01:01:01	01:01:01	01:01:01	05:01:01	05:01:01	02:01:02	04:01:01
89 3 H	02:ANGA	30:01:01	42:02	53:01:01	04:01:01:01	17:01:01:02	11:01:02	12:38	03:19	05:01:01	04:01:01	17:01
89 4 A	01:01:01:01	74:01	07:02:01	08:01:01	07:02:01:03	07:01:01:01	03:01:01	11:04:01	02:01:01	03:01:01	04:02:01:02	13:FNVU
89 4 D	24:02:01:01	29:02:01:01	07:02:01	44:03:01	07:02:01:03	16:01:01	07:01:01	15:01:01	02:02:01	06:02:01	04:01:01	04:01:01
89 4 E	23:01:01	68:02:01:01	44:03:01	50:02	04:01:01:01	06:02:01:02	07:01:01	13:01:01	02:02:01	06:03:01	04:01:01	10:01
89 4 F	02:ANGA	03:01:01:01	07:02:01	57:01:01	06:02:01:01	07:02:01:03	01:01:01	07:01:01	03:03:02:01	05:01:01	04:02:01:02	16:01:01
89 5 A	30:02:01:03	68:02:01:01	08:01:01	18:01:01:01	05:01:01:01	07:01:01:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	02:01:02	15:01:01
89 5 B	03:01:01	29:02:01:01	44:03:01	57:03:01	07:01:01:01	16:01:01	07:01:01	08:06	02:02:01	05:03:01	01:AETTA	04:01:01
89 5 D	01:01:01:01	36:01	08:01:01	53:01:01	04:01:01:01	07:01:01:01	03:01:01	15:03:01	02:01:01	06:02:01	02:01:02	11:01:01
89 5 H	03:01:01:01	24:02:01:01	44:02:01:01	51:01:01:01	05:01:01:02	15:02:01:01	13:01:01	15:01:01	06:02:01	06:03:01	04:01:01	04:02:01:02
89 7 B	01:01:01:01	02:66	51:01:01:01	58:01:01	07:18	15:02:01:01	07:01:01	14:54:01	02:02:01	05:03:01	02:01:02	04:01:01
89 7 F	01:01:01:01	02:ANGA	44:02:01:01	58:01:01	03:03:01	07:18	13:03:01	13:01:01	03:01:01	06:03:01	03:FNVX	10:01
89 7 G	30:02:01:01	30:02:01:01	14:02:01	18:01:01:01	05:01:01:01	08:02:01:01	03:01:01	15:03:01	02:01:01	06:02:01	02:01:02	13:FNVU
89 8 C	24:02:01	26:01:01	35:03:01	38:01:01	12:03:01:01	12:03:01:01	13:01:01	14:54:01	05:03:01	06:03:01	02:01:02	02:01:02
89 9 B	01:01:01:01	23:01:01	14:02:01	50:01:01	06:02:01:02	08:02:01:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	02:01:02	02:01:02
89 10 C	02:ANGA	24:02:01:01	14:02:01	15:01:01:01	02:02:02	03:03:01	01:02:01	04:01:01	03:02:01	05:01:01:01	02:01:02	04:01:01
89 10 H	24:02:01:01	31:15	07:02:01	15:05:01	01:02:30	07:02:01:03	04:11:01	15:01:01	03:02:01	06:02:01	04:01:01	04:01:01
89 11 B	01:01:01:01	24:02:01:01	08:01:01	15:17:01:01	07:01:01:01	07:01:02	01:01:01	15:01:01	05:01:01	06:02:01	04:01:01	04:01:01
89 11 F	01:01:01:01	11:01:01:01	14:02:01	14:02:01	02:02:02:01	08:02:01:01	01:02:01	01:02:01	05:01:01:01	05:01:01:01	02:01:02	04:01:01
89 11 G	23:01:01	32:01:01	14:02:01	49:01:01	07:01:01:01	08:02:01:01	03:01:01	15:01:01	02:01:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01



## Apêndice 05: Resultados de tipagem HLA obtidos pelo protocolo PacBio da Histogenetics para 6 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1
89 11 H	01:01:01:01	02:ANGA	35:01:01	57:03:01	04:01:01:01	07:01:02	01:01:01	03:01:01	02:01:01	05:01:01	04:01:01	04:02:01:02
89 12 A	02:ANGA	29:02:01:01	44:03:01	50:01:01	12:03:01:01	16:01:01	07:01:01	13:02:01	02:02:01	06:09:01	01:AETTA	05:RGPW
89 12 E	24:03:01	32:01:01	44:03:01	49:01:01	07:01:01:01	16:01:01	04:05:01	07:01:01	02:02:01	03:02:01	03:FNVX	17:01
89 12 H	11:01:01:01	30:02:01:01	18:01:01:01	35:01:01	04:01:01:01	05:01:01:01	01:01:01	03:01:01	02:01:01	05:01:01	04:02:01:02	10:01
93 1 B	02:ANGA	30:02:01:01	14:02:01	35:02:01	04:01:01	08:02:01:01	03:01:01	15:03:01	02:01:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01
93 2 B	29:02:01:01	31:01:02:01	39:06:01	51:01:01:01	07:02:01:01	14:02:01	08:02:01	08:03:02	03:01:01	04:02:01	04:01:01	04:02:01:02
93 2 C	02:ANGA	31:01:02:01	35:01:01	51:01:01:01	04:01:01:01	16:02:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	02:02:01	04:02:01:02	17:01
93 3 A	02:ANGA	23:01:01	44:03:01	58:01:01	04:01:01:01	07:18	07:01:01	15:03:01	02:02:01	06:02:01	105:01	17:01
93 3 C	23:17	31:01:02	08:01:01	15:10:01	03:04:02	07:01:01:01	03:01:01	11:01:02	02:01:01	06:02:01	01:AETTA	18:01
93 3 H	03:01:01	68:02:01:01	14:02:01	49:01:01	07:01:01:01	08:02:01:01	04:05:01	15:03:01	03:02:01	06:02:01	02:01:02	02:01:02
93 4 A	01:01:01:01	02:ANGA	39:10:01	51:01:01:01	12:03:01:01	15:13	04:02:01	10:01:01	03:02:01	05:01:01	13:FNVU	17:01
93 4 B	02:ANGA	03:01:01:01	35:03:01	44:02:01:01	05:01:01:02	12:03:01:01	04:01:01	11:01:01	03:01:01	03:01:01:01	04:01:01	04:02:01:02
93 4 E	01:01:01:01	23:01:01	15:17:01:01	57:01:01	06:02:01:01	07:01:02	08:01	13:02:01	04:02:01	06:04:01	04:01:01	17:01
93 5 B	29:02:01:01	31:01:02:01	15:01:01:01	39:03	03:03:01	07:02:01:01	08:02:01	13:01:01	04:02:01	06:03:01	02:01:02	04:02:01:02
93 5 D	02:ANGA	29:02:01:01	15:01:01:01	57:01:01	03:03:01	07:01:01:01	04:01:01	07:01:01	03:03:02:01	03:02:01	02:01:02	04:01:01
93 5 E	32:01:01	68:01:01:02	40:02:01	58:01:01	02:02:02:01	07:18	11:02:01	15:01:01	03:19	06:02:01	02:01:02	04:01:01
93 5 F	02:ANGA	24:05	07:02:01	08:01:01	07:02:01:03	07:01:01:01	03:01:01	16:01:01	02:01:01	05:02:01	04:01:01	04:01:01
93 5 G	02:ANGA	30:02:01:01	35:03:01	58:01:01	04:01:01:01	07:18	13:02:01	15:03:01	06:02:01	06:04:01	02:01:02	17:01
93 5 H	02:ANGA	30:01:01	35:05:01	42:02	04:01:01:01	17:01:01:02	08:02:01	12:JV	04:02:01	05:01:01	04:02:01	18:01
93 6 A	23:17	31:01:02:01	15:03:01	40:01:02	02:10	03:04:01	04:04:01	11:01:02	03:02:01	06:02:01	02:01:02	105:01
93 6 B	01:01:01:01	03:01:01:01	57:01:01	57:01:01	06:02:01:01	07:01:01:01	01:01:01	07:01:01	03:03:02:01	05:01:01	04:01:01	04:02:01:02
93 6 G	02:ANGA	30:02:01:01	49:01:01	50:01:01	06:02:01:02	07:01:01:01	04:05:01	07:01:01	02:02:01	03:02:01	04:01:01	13:FNVU
93 6 H	01:01:01:01	26:08	08:01:01	15:01:01:01	03:03:01	07:01:01:01	03:01:01	13:01:01	02:01:01	05:01:01	04:01:01	13:FNVU
93 7 A	24:02:01:01	30:02:01:01	18:01:01:02	35:05:01	03:04:01	07:04:01	11:01:02	11:01:01	03:01:01	06:02:01	105:01	04:02:01
93 7 B	02:ANGA	30:02:01:03	15:10:01	51:01:01:01	03:04:02	15:02:01:01	03:01:01	13:01:01	02:01:01	06:03:01	01:AETTA	03:FNVX
93 7 C	03:01:01:01	68:01:02:01	35:01:01	40:04	03:04:01	04:01:01:01	01:01:01	04:11:01	03:02:01	05:01:01	05:RGPW	10:01
93 7 E	31:01:02:01	68:01:02:01	35:06	40:01:02	03:04:01	04:01:01:01	04:04:01	14:02:01	03:01:01:01	03:02:01	105:01	06:01
93 7 F	03:01:01:01	24:03:01	15:20	50:01:01	03:04:01	06:02:01:02	04:08:01	10:01:01	03:01:01	05:01:01	04:01:01	04:01:01

## Apêndice 05: Resultados de tipagem HLA obtidos pelo protocolo PacBio da Histogenetics para 6 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1
93 7 G	02:ANGA	02:01:01	13:02:01	35:01:01	04:01:01:01	06:02:01:01	01:01:01	07:01:01	02:02:01	05:01:01	01:AETTA	04:01:01
93 8 A	02:ANGA	23:01:01	15:01:01	58:01:01	03:02:02:01	04:01:01	11:01:01	15:03:01	03:01:01	06:02:01	01:AETTA	04:01:01
93 8 C	02:ANGA	24:02:01:01	15:03:01	45:01:01	02:10	16:01:01	03:02:01	10:01:01	04:02:01	05:01:01	01:AETTA	17:01
93 9 A	24:02:01:01	32:01:01	15:01:01:01	57:01:01	03:03:01	06:02:01:01	11:03	13:01:01	03:01:01	06:03:01	04:02:01:02	04:02:01:02
93 9 B	02:ANGA	30:02:01:01	18:01:01:02	35:01:01	04:01:01:01	07:04:01	01:01:01	11:01:02	05:01:01	06:02:01	01:AETTA	04:01:01
93 9 C	31:01:02:01	34:02:01	35:04:01	35:01:01	04:01:01:01	04:01:01:01	08:07	13:02:01	04:02:01	05:01:01	01:AETTA	04:02:01:02
93 9 E	03:01:01	30:01:01	49:01:01	57:02:01	07:01:01:01	18:02	11:01:02	11:02:01	03:19	06:02:01	02:01:02	04:01:01
93 10 G	02:ANGA	68:02:01:01	49:01:01	53:01:01	04:01:01:01	07:01:02	03:01:01	03:02:01	02:01:01	04:02:01	01:AETTA	17:01
93 10 H	03:01:01:01	31:01:02:01	07:02:01	14:02:01	07:02:01:01	08:02:01:01	04:05:01	14:54:01	03:02:01	05:01:01	04:01:01	105:01
93 11 A	01:01:01:01	02:04	35:11:01	37:01:01	03:04:01	06:02:01:01	09:CTZ	10:01:01	03:03:02	05:01:01	04:01:01	14:01:01
93 11 C	01:01:01	36:01	08:01:01	44:03:01	04:01:01:01	07:01:01:01	03:01:01	15:03:01	02:01:01	06:02:01	02:01:02	06:01
93 11 E	11:01:01:01	68:02:01:01	15:16:01	55:01:01	03:03:01	14:02:01	01:02:01	14:54:01	05:03:01	05:01:01	01:01:02	02:01:02
93 11 G	23:01:01	68:01:01:02	49:01:01	58:02	06:02:01:01	07:01:01:01	11:01:01	12:JV	03:01:01	05:01:01	01:AETTA	04:01:01
93 12 B	11:01:01:01	24:02:01:01	35:01:01	44:03:01	04:01:01:01	04:01:01:05	14:54:01	15:03:01	05:03:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01
93 12 E	03:01:01	11:01:01:01	18:01:01:01	35:01:01	02:02:02:01	04:01:01:01	01:01:01	13:01:01	05:01:01	06:03:01	03:FNVX	11:01:01
144 1 B	02:ANGA	03:01:01:01	18:01:01:01	35:03:01	04:01:01:01	05:01:01:01	03:01:01	11:01:01	02:01:01	03:01:01	04:01:01	04:01:01
144 1 D	24:02:01:01	31:01:02:01	51:01:01:01	53:01:01	04:01:01:01	15:02:01:01	01:01:01	03:01:01	02:01:01	05:01:01	04:02:01:02	10:01
144 1 F	02:ANGA	02:ANGA	08:01:01	45:01:01	07:01:01:01	16:01:01	03:01:01	11:01:02	02:01:01	06:02:01	04:01:01	105:01
144 1 H	23:01:01	74:01	15:03:01	41:02:01	02:10	17:01:01:02	13:01:01	15:03:01	06:02:01	06:03:01	02:01:02	11:01:01
144 2 C	11:01:01:01	11:01:01:01	07:02:01	52:01:01	07:02:01:03	12:02:02	13:02:01	15:01:01	06:02:01	06:09:01	04:01:01	04:01:01
144 2 E	01:01:01:01	03:01:01:01	08:01:01	51:01:01:01	07:01:01:01	14:02:01	03:01:01	13:01:01	02:01:01	06:03:01	01:AETTA	04:01:01
144 2 G	30:01:01	30:02:01:01	13:02:01	18:01:01:01	05:01:01:01	06:02:01:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	04:02:01:01	10:01
144 3 H	03:01:01:01	69:01	07:02:01	35:08:01	07:02:01:03	12:03:01:01	04:03:01	15:01:01	03:02:01	06:02:01	02:01:02	02:01:02
144 4 E	03:01:01:01	33:03:01	07:02:01	35:01:01	04:01:01:01	07:02:01:03	10:01:01	15:01:01	05:01:01	06:02:01	01:AETTA	04:01:01
144 4 F	03:01:01:01	25:01:01	14:02:01	39:BMFM	08:02:01:01	12:03:01:01	01:02:01	04:03:01	03:04:01	05:01:01:01	01:AETTA	04:01:01
144 4 G	02:ANGA	02:ANGA	40:01:02	50:01:01	03:04:01	06:02:01:02	07:01:01	13:02:01	02:02:01	06:04:01	04:01:01	13:FNVU
144 5 A	02:ANGA	03:01:01:01	35:01:01	44:05:01	02:02:02:01	04:01:01:01	11:04:01	16:01:01	03:01:01	05:02:01	04:02:01:01	06:01
144 5 B	23:01:01	33:03:01	14:02:01	44:03:01	08:02:01:01	16:01:01	07:01:01	13:01:01	02:02:01	06:03:01	04:01:01	16:01:01

## Apêndice 05: Resultados de tipagem HLA obtidos pelo protocolo PacBio da Histogenetics para 6 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1
144 5 F	01:01:01:01	11:01:01:01	44:02:01:01	51:01:01:01	05:01:01:02	07:01:01:01	08:01	12:JV	03:01:01	04:02:01	02:01:02	03:FNVX
144 5 G	24:02:01:01	26:01:01	15:03:01	38:37	02:10	12:03:01:01	03:01:01	04:02:01	02:01:01	03:02:01	02:01:02	04:01:01
144 5 H	02:ANGA	33:01:01	08:01:01	14:02:01	07:01:01:01	08:02:01:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	131:01	17:01
144 6 A	02:ANGA	25:01:01	44:02:01:01	52:01:01	05:01:01:02	12:02:02	04:01:01	15:02:01	03:01:01:01	06:01	03:FNVX	04:01:01
144 6 G	24:02:01:01	24:02:01:01	14:02:01	35:08:01	02:02:02:01	04:01:01	01:02:01	13:01:01	05:01:01:01	06:03:01	02:01:02	04:01:01
144 7 A	11:01:01:01	24:02:01:01	35:08:01	45:01:01	04:01:01	16:01:01	10:01:01	13:01:01	05:01:01	06:03:01	04:01:01	17:01
144 7 D	02:ANGA	24:02:01:01	15:04:01	44:03:01	03:03:01	05:01:01:02	11:01:01	16:02:01	03:01:01	03:01:01	04:02:01:02	10:01
144 7 E	29:02:01:01	31:01:02:01	13:02:01	44:03:01	06:02:01:01	16:01:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	02:02:01	04:01:01	11:01:01
144 7 F	03:02:01	24:02:01	44:02:01:01	51:01:01:01	05:01:01:02	15:02:01:01	13:01:01	15:01:01	06:02:01	06:03:01	02:01:02	04:01:01
144 8 A	02:ANGA	24:02:01:01	35:02:01	40:01:02	03:04:01	04:01:01	04:05:01	15:01:01	03:02:01	06:02:01	04:01:01	17:01
144 8 H	23:01:01	66:01:01	35:01:01	51:01:01:01	02:02:02:01	04:01:01:01	01:01:01	07:01:01	02:02:01	05:01:01	01:AETTA	04:02:01:02
144 9 A	23:01:01	25:01:01	15:01:01:01	44:03:01	03:03:01	04:01:01:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	02:02:01	04:01:01	10:01
144 9 C	24:02:01:01	32:01:01	14:01:01	35:03:01	08:02:01:02	12:03:01:01	07:01:01	14:54:01	02:02:01	05:03:01	04:01:01	10:01
144 9 D	02:05:01	29:02:01	44:03:01	45:01:01	06:02:01:03	16:01:01	07:01:01	13:01:01	02:02:01	03:03:02:01	11:01:01	11:01:01
144 9 E	30:02:01:03	30:02:01:03	07:02:01	08:01:01	07:02:01:01	07:01:01:01	11:01:02	15:03:01	03:19	06:02:01	02:01:02	105:01
144 9 G	02:ANGA	03:01:01:01	44:02:01:01	51:01:01:01	05:01:01:02	16:02:01	07:01:01	08:01	02:02:01	04:02:01	04:01:01	04:02:01:02
144 10 H	01:01:01:01	03:01:01:01	14:02:01	35:03:01	04:01:01:01	08:02:01:01	01:02:01	07:01:01	02:02:01	05:01:01:01	02:01:02	04:02:01:02
144 11 A	03:01:01	29:02:01:01	41:02:01	44:03:01	16:01:01	17:01:01:02	07:01:01	15:03:01	02:02:01	06:02:01	03:FNVX	105:01
144 11 D	11:01:01:01	23:01:01	18:01:01:02	49:01:01	07:01:01:01	12:03:01:01	13:02:01	16:02:01	05:02:01	06:04:01	02:01:02	03:FNVX
144 11 F	02:ANGA	29:02:01:02	40:04	45:01:01	03:04:01	06:02:01:03	04:11:01	11:01:01	03:01:01	03:02:01	03:FNVX	04:01:01
144 11 H	02:ANGA	24:02:01:01	39:06:02	51:01:01:01	07:02:01:01	14:02:01	04:03:01	08:01	03:02:01	04:02:01	04:01:01	11:01:01
144 12 A	02:ANGA	03:01:01:01	14:02:01	57:01:01	06:02:01:01	08:02:01:01	01:02:01	07:01:01	03:03:02:01	05:01:01:01	04:01:01	04:01:01
144 12 B	02:ANGA	68:01:01:02	35:03:01	45:01:01	04:01:01:01	16:01:01	03:01:01	11:02:01	02:01:01	03:19	03:FNVX	13:FNVU
144 12 F	29:02:01:01	68:01:02:02	18:01:01:02	18:01:01:01	05:01:01:01	12:03:01:01	03:01:01	15:01:01	02:01:01	06:02:01	04:01:01	23:01:01
144 12 G	01:01:01:01	26:08	41:01:01	44:02:01:01	05:01:01:02	07:01:02	03:01:01	12:JV	02:01:01	03:01:01	04:01:01	04:01:01
144 12 H	03:01:01:01	24:02:01:01	07:02:01	13:02:01	06:02:01:01	07:02:01:03	07:01:01	13:01:01	02:02:01	06:03:01	02:01:02	04:02:01
423 1 A	01:01:01:01	02:ANGA	18:01:01:02	35:02:01	04:01:01	07:01:01:01	11:04:01	11:01:01	03:01:01	03:01:01	02:01:02	04:01:01
423 1 B	02:ANGA	24:03:01	35:05:01	44:02:01:01	04:01:01:01	05:01:01:02	04:04:01	13:01:01	03:02:01	06:03:01	02:01:02	14:01:01



## Apêndice 05: Resultados de tipagem HLA obtidos pelo protocolo PacBio da Histogenetics para 6 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1
423 1 D	02:ANGA	23:01:01	44:02:01:01	44:02:01:01	04:01:01:01	05:01:01:02	11:18	13:01:01	03:01:01	06:03:01	02:01:02	04:01:01
423 1 F	03:01:01:01	03:01:01:01	07:02:01	07:02:01	07:02:01:03	07:02:01:03	13:01:01	15:01:01	06:02:01	06:03:01	02:01:02	13:FNVU
423 1 H	23:01:01	74:01	08:01:01	15:03:01	02:10	03:04:01	01:02:01	09:CTZ	02:02:01	05:01:01:01	01:AETTA	02:01:02
423 2 B	02:ANGA	11:01:01:01	44:02:01:01	44:02:01:01	05:01:01:02	15:02:01:01	04:02:01	12:JV	03:01:01	03:02:01	04:01:01	05:RGPW
423 2 C	03:01:01:01	24:03:01	15:01:01:01	35:01:01	03:03:01	04:01:01:01	01:01:01	08:04:01	04:02:01	05:01:01	04:02:01:02	04:02:01:02
423 2 D	03:01:01:01	23:01:01	49:01:01	51:01:01:01	07:01:01:01	15:02:01:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	02:02:01	10:01	15:01:01
423 2 E	02:ANGA	02:ANGA	44:02:01:01	51:01:01:01	05:01:01:02	07:01:01:01	13:01:01	13:01:01	06:03:01	06:03:01	02:01:02	02:01:02
423 2 F	01:01:01:01	02:ANGA	51:01:01:01	51:01:01:01	14:02:01	15:02:01:01	11:01:01	13:01:01	03:01:01	06:03:01	04:01:01	04:02:01:02
423 2 G	24:02:01:01	24:02:01:01	35:01:01	35:03:01	04:01:01:05	12:03:01:01	04:01:01	14:54:01	03:02:01	05:03:01	02:01:02	04:01:01
423 2 H	02:ANGA	29:02:01:01	18:01:01:02	44:03:01	02:02:02:01	16:01:01	04:04:01	07:01:01	02:02:01	03:02:01	04:01:01	14:01:01
423 3 A	02:ANGA	68:01:02:01	40:04	51:01:01:01	03:04:01	14:02:01	01:01:01	04:11:01	03:02:01	05:01:01	04:02:01:02	20:01:01
423 3 D	11:01:01:01	26:01:01	14:02:01	49:01:01	07:01:01:01	08:02:01:01	01:02:01	11:01:01	03:01:01	05:01:01:01	02:01:02	13:FNVU
423 3 G	23:01:01	68:02:01:01	07:02:01	15:16:01	07:02:01:01	14:02:01	01:02:01	09:CTZ	02:02:01	05:01:01	01:01:02	131:01
423 3 H	26:01:01	68:02:01:01	18:01:01:02	53:01:01	04:01:01:01	12:03:01:01	11:02:01	11:04:01	03:19	03:01:01	02:01:02	04:02:01:01
423 4 E	03:01:01:01	32:01:01	39:BMFM	51:01:01:01	12:03:01:01	16:02:01	11:03	13:01:01	03:01:01	06:03:01	02:01:02	04:02:01:02
423 4 F	24:02:01:01	24:02:01:01	39:BMFM	44:02:01:01	05:01:01:02	12:03:01:01	13:01:01	13:01:01	06:03:01	06:03:01	04:02:01:02	11:01:01
423 4 G	02:ANGA	68:01:02	08:01:01	15:18:01	07:01:01:01	07:04:01	03:01:01	11:03	02:01:01	03:01:01	04:01:01	04:01:01
423 4 H	02:ANGA	11:01:01:01	35:01:01	44:02:01:01	02:02:02:01	05:01:01:02	15:01:01	15:01:01	06:02:01	06:02:01	05:RGPW	19:01
423 5 C	02:ANGA	02:05:01	35:03:01	50:01:01	04:01:01:01	06:02:01:02	07:01:01	10:01:01	02:02:01	05:01:01	02:01:02	03:FNVX
423 5 D	23:01:01	29:02:01:01	07:02:01	44:03:01	07:02:01:03	16:01:01	07:01:01	15:01:01	02:02:01	06:02:01	04:01:01	09:01:01
423 6 C	01:02	33:01:01	15:03:01	49:01:01	02:10	07:01:01:01	10:01:01	11:01:02	03:19	05:01:01	01:AETTA	17:01
423 6 E	02:ANGA	30:01:01	08:01:01	44:03:01	07:01:01:01	16:02:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	01:AETTA	04:02:01:02
423 7 B	30:01:01	34:02:01	35:01:01	42:02	04:01:01:01	17:01:01:02	12:JV	12:JV	05:01:01	05:01:01	04:02:01:02	13:FNVU
423 7 E	02:ANGA	29:02:01:01	07:02:01	41:01:01	07:02:01:03	08:02:01:01	11:01:02	16:01:01	05:02:01	06:02:01	02:01:02	04:01:01
423 7 F	02:ANGA	32:01:01	14:02:01	50:01:01	06:02:01:02	08:02:01:01	01:02:01	07:01:01	02:02:01	05:01:01:01	02:01:02	02:01:02
423 7 H	03:01:01:01	31:01:02:01	07:02:01	35:04:01	04:01:01:01	07:02:01:03	14:02:01	15:01:01	03:01:01	06:02:01	04:01:01	04:01:01
423 8 A	01:01:01:01	02:ANGA	38:01:01	51:01:01:01	01:02:01	06:02:01:01	07:01:01	13:01:01	02:02:01	06:03:01	04:02:01:02	17:01
423 8 B	11:01:01:01	30:02:01:01	44:03:01	44:03:01	16:01:01	16:01:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	02:02:01	04:01:01	11:01:01

## Apêndice 05: Resultados de tipagem HLA obtidos pelo protocolo PacBio da Histogenetics para 6 genes HLA.

Amostra	HLA – A	HLA – A	HLA – B	HLA – B	HLA – C	HLA – C	HLA – DRB1	HLA – DRB1	HLA – DQB1	HLA – DQB1	HLA – DPB1	HLA – DPB1
423 8 D	11:01:01:01	29:02:01:01	44:03:01	51:01:01:01	15:02:01:01	16:01:01	07:01:01	14:54:01	02:02:01	05:03:01	03:FNVX	11:01:01
423 8 F	02:ANGA	03:01:01:01	35:03:01	51:01:01:01	02:02:02:01	04:01:01:01	03:01:01	11:01:01	02:01:01	03:01:01	04:01:01	04:01:01
423 9 A	03:01:01:01	23:01:01	14:02:01	41:01:01	08:02:01:01	08:02:01:01	04:05:01	11:01:02	03:02:01	06:02:01	03:FNVX	04:01:01
423 9 B	02:ANGA	03:01:01:01	13:02:01	41:01:01	06:02:01:01	17:01:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	02:01:02	04:01:01
423 9 C	02:ANGA	02:05:01	45:01:01	49:01:01	07:01:01:01	16:01:01	04:05:01	11:01:01	03:01:01	03:02:01	02:01:02	02:01:02
423 9 D	23:01:01	30:02:01:02	15:10:01	15:03:01	02:10	03:04:02	01:02:01	03:01:01	02:01:01	05:01:01:01	02:01:02	105:01
423 9 F	02:ANGA	02:05:01	50:01:01	50:01:01	06:02:01:02	07:01:01:01	07:01:01	07:01:01	02:02:01	03:03:02:01	02:01:02	04:01:01
423 9 G	01:01:01:01	02:ANGA	07:02:01	44:03:01	07:02:01:03	16:01:01	03:01:01	07:01:01	02:01:01	02:02:01	02:01:02	11:01:01
423 10 D	23:01:01	26:01:01	08:01:01	14:01:01	07:01:01:01	08:02:01:02	03:01:01	07:01:01	02:02:01	02:01:01	01:AETTA	04:01:01
423 10 G	24:03:01	33:01:01	14:02:01	39:13:01	07:02:01:01	08:02:01:01	01:02:01	16:02:01	03:01:01	05:01:01:01	04:01:01	04:02:01:02
423 10 H	01:01:01:01	02:ANGA	08:01:01	44:03:01	07:01:01:01	16:02:01	03:01:01	04:02:01	02:01:01	03:02:01	01:AETTA	02:01:02
423 11 A	29:02:01:01	74:01	15:03:01	44:03:01	02:10	16:01:01	11:01:02	13:01:01	03:19	06:03:01	04:01:01	105:01
423 11 C	29:02:01:01	31:01:02:01	44:03:01	52:01:02	15:02:01:01	16:01:01	07:01:01	08:02:01	02:02:01	04:02:01	04:02:01	11:01:01
423 11 E	02:ANGA	30:01:01	39:10:01	50:01:01	06:02:01:01	12:03:01:01	01:02:01	15:03:01	05:01:01:01	06:02:01	02:01:02	03:FNVX
423 11 H	30:02:01:03	74:01	08:01:01	18:01:01	02:10	07:01:01:01	04:11:01	11:01:02	03:02:01	05:02:01	04:01:01	04:02:01:02

## Legenda

Gene HLA	Resultado	Significado	
		Grupo G	Alelos Possíveis
A	02:ANGA	02:01:01G	02:01:01:01/02:01:01:02L/02:01:01:03/02:01:01:04
B	39:BMFM	39:01:01G	39:01:01:01/39:01:01:02L/39:01:01:03/02:01:03
DRB1	09:CTZ	09:01:02G	09:01:02/09:21
DRB1	12:JV	12:01:01G	12:01:01/12:10
DPB1	01:AETTA	01:01:01G	01:01:01/417:01
DPB1	03:FNVX	03:01:01G	03:01:01/104:01
DPB1	05:RGPW	05:01:01G	05:01:01/135:01
DPB1	13:FNVU	13:01:01G	13:01:01/107:01

NGSEngine®

File Users Aligner View Help

# GENDX

User: [First reviewer] vinicius

Library: IMGT 3.28.0

Project: Ion

OneLambdalonSS CAUsers\18

Browse

Data folders: C:\Users\1864447.HC\Downloads\R...

Add data folder

Analyze

Pause Resume

Cancel Reset

Overview Statistics Reports

32 / 32 samples

Samples: 31 / 32  
Loci: 233 / 237

Resolution:	All fields	Status	Actions
IonXpress_019.19.R_2017_10_13_15_43_57_user_S5-0053-31-Teste_INCA_131017		248465/273722 (90%)	Reanalyze
HLA-A	21909/22395 (97%) 242 [4-749] 2075 [114-3084] 1 A*02:01:15, A*24:02:01:01	[Ex] 0 [In] 0 [R] 1 ✓ X	Reanalyze
HLA-B	19108/19482 (98%) 239 [4-761] 1564 [92-2516] 1 B*50:02, B*50:02	[Ex] 0 [In] 1 [R] 1 ✓ X	Reanalyze
HLA-C	20866/21263 (98%) 236 [2-687] 1587 [80-2831] 2 C*06:02:01:02, C*06:02:01:02	[Ex] 0 [In] 2 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
DRB1	38470/40311 (95%) 242 [3-759] 2356 [94-3986] 2 DRB1*04:06:02, DRB1*15:01:01:03 DRB4.5	[Ex] 0 [In] 20 [?] 13 [R] 3 ✓ X	Reanalyze
DRB4	19939/20271 (98%) 245 [7-797] 1024 [55-2366] 4 DRB4*01:03:01:01	[Ex] 2 [In] 3 [R] 3 ✓ X	Reanalyze
DRB5	22376/22758 (98%) 235 [4-708] 1583 [80-2998] 1 DRB5*01:01:01	[Ex] 0 [In] 6 [R] 1 ✓ X	Reanalyze
DQB1	37243/37882 (98%) 245 [4-805] 2752 [104-4367] 2 DQB1*04:02:01:01, DQB1*06:02:01:01	[Ex] 0 [In] 2 [?] 13 [R] 1 ✓ X	Reanalyze
DPB1	63106/64103 (98%) 247 [3-767] 2952 [120-4512] 4 DPB1*04:02:01:02, DPB1*104:01:01:01	[Ex] 0 [In] 10 [?] 18 [R] 4 ✓ X	Reanalyze
IonXpress_011.11.R_2017_10_13_15_43_57_user_S5-0053-31-Teste_INCA_131017		462499/510398 (90%)	Reanalyze
HLA-A	47097/48651 (96%) 219 [2-652] 3870 [233-6096] 2 A*02:01:01:01, A*29:01:01:01	[Ex] 0 [In] 1 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
HLA-B	37960/39098 (97%) 213 [3-640] 3063 [160-4265] 8 B*44:03:01:01, B*51:01:01:01	[Ex] 0 [In] 0 [?] 4 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
HLA-C	44570/45862 (97%) 214 [2-693] 3510 [171-5504] 3 C*03:03:01:01, C*04:01:01:01	[Ex] 0 [In] 0 [?] 1 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
DRB1	93265/96530 (96%) 213 [2-689] 4991 [224-9903] 4 DRB1*07:01:01:01, DRB1*09:01:02 DRB4	[Ex] 0 [In] 3 [R] 1 ✓ X	Reanalyze
DRB4	66737/68327 (97%) 222 [2-732] 3273 [193-6709] 1 DRB4*01:01:01:01, DRB4*01:03:02	[Ex] 1 [In] 4 [?] 1 [R] 7 ✓ X	Reanalyze
DQB1	52760/54023 (97%) 222 [3-758] 3308 [134-5859] 2 DQB1*02:02:01:01, DQB1*03:03:02:02	[Ex] 0 [In] 282 [?] 5 [R] 1 ✓ X	Reanalyze
DPB1	107325/110008 (97%) 223 [2-745] 4510 [199-6827] 1 DPB1*04:01:01:06, DPB1*11:01:01	[Ex] 0 [In] 3 [?] 1 [R] 3 ✓ X	Reanalyze
IonXpress_005.5.R_2017_10_13_15_43_57_user_S5-0053-31-Teste_INCA_131017		663896/724522 (91%)	Reanalyze
HLA-A	77883/79734 (97%) 216 [2-684] 6668 [347-9064] 2 A*02:01:01:01, A*23:01:01:01	[Ex] 0 [In] 1 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
HLA-B	69779/71404 (97%) 210 [2-635] 5518 [251-7441] 8 B*44:03:01:01, B*51:01:01:01	[Ex] 0 [In] 0 [?] 2 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
HLA-C	75378/77020 (97%) 212 [3-670] 5620 [260-8758] 3 C*04:01:01:01, C*16:01:01:01	[Ex] 0 [In] 0 [?] 1 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
DRB1	95116/100047 (95%) 212 [2-701] 4596 [229-7592] 1 DRB1*04:05:01, DRB1*04:05:01 DRB4	[Ex] 1 [In] 33 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
DRB4	93168/94840 (98%) 218 [2-744] 4782 [239-8934] 4 DRB4*01:03:01:01	[Ex] 1 [In] 0 [R] 1 ✓ X	Reanalyze
DQB1	86640/88319 (98%) 219 [2-760] 5620 [219-9002] 4 DQB1*03:02:01:01, DQB1*03:02:01:01	[Ex] 0 [In] 4 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
DPB1	149791/152532 (98%) 218 [2-680] 5985 [276-9355] 6 DPB1*01:01:01:01, DPB1*06:01:01:01	[Ex] 0 [In] 2 [R] 6 ✓ X	Reanalyze
IonXpress_025.25.R_2017_10_13_15_43_57_user_S5-0053-31-Teste_INCA_131017		725839/825866 (87%)	Reanalyze
HLA-A	80602/83426 (96%) 190 [2-659] 5685 [324-8848] 2 A*02:01:01:01, A*02:20:01	[Ex] 0 [In] 1 [R] 2 ✓ X	Reanalyze
HLA-B	52727/54619 (96%) 186 [2-619] 3454 [182-4784] 2 B*18:01:01:02, B*38:01:01	[Ex] 0 [In] 0 [R] 2 ✓ X	Reanalyze

Apêndice 06 - Captura da tela inicial do software NGSEngine utilizado para as análises de qualidade das leituras de cada sequenciador empregado.