

GENOTIPAGEM DOS ALELOS *HLA-B*27* POR PCR-SSP EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E ARTRITE PSORIÁSICA

Giovana Paola Zaccarias Bemvides (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Cristiane Maria Coli, Fernanda Lara, Ana Maria Sell (Orientador), e-mail: amsell@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Ciências Biológicas/ Imunogenética

Palavras-chave: imunogenética, técnicas de genotipagem, espondiloartropatias

Resumo

A espondilite anquilosante e a artrite psoriática estão englobadas dentro de um grupo de doenças conhecido como espondiloartropatias. O envolvimento do *HLA-B*27* com as espondiloartropatias está bem estabelecido. Entretanto, ainda não está claro quais dos alelos específicos tem maior grau de contribuição com a patogênese. O objetivo desse estudo foi determinar os alelos específicos do *HLA-B*27* em pacientes com espondilite anquilosante e artrite psoriática que apresentavam o grupo alélico *HLA-B*27*, atendidos na região Sul do Brasil. Os alelos específicos foram determinados por reações de PCR-SSP (*Single Specific Primer*). A reação foi padronizada e os pacientes que foram positivos ao grupo alélico *HLA-B*27* (9 dentre 35 indivíduos) apresentaram o alelo específico *HLA-B*27:05*, representando uma frequência alélica de 100%.

Introdução

A espondilite anquilosante (EA) e a artrite psoriática (AP) estão englobadas dentro de um grupo de doenças conhecido como espondiloartropatias. Além da EA e da AP, estão nesse grupo a artrite reativa, a espondiloartrite indiferenciada e a artrite associada à doença inflamatória intestinal. Essas doenças apresentam algumas características em comum que permitem englobá-las nesse grupo, tais como a associação com *HLA-B*27*, a soronegatividade para o fator reumatoide, as manifestações axiais, como o acometimento das vértebras, das articulações sacroilíacas e da pelve, e manifestações periféricas, como artrite periférica, espondilite, entesite, dactilite e doença inflamatória dos olhos.

A EA é uma doença inflamatória crônica que acomete preferencialmente a coluna vertebral, podendo evoluir para a rigidez e limitação funcional progressiva do esqueleto axial. Esta doença aparece como o maior subgrupo das espondiloartrites e geralmente se inicia na segunda a quarta décadas da vida, com predomínio do sexo masculino, da cor branca e em indivíduos *HLA-B*27* positivos. A doença apresenta prevalência de 0,1 a 1,4% na população. O *HLA-B*27* é encontrado em 80 a 90% da população com EA, em comparação com 6 a 9% da população em geral. Apesar disso, o mecanismo molecular entre a associação do *HLA-B*27* e a EA ainda não foi elucidado (ESPINOZA & CUELLAR, 1998).

A AP costuma iniciar-se entre a terceira e a quinta décadas de vida e não possui predomínio de sexo. A psoríase cutânea pode acometer até 1% a 2% da população e a AP de 5% a 10% desses pacientes (ESPINOZA & CUELLAR, 1998).

O envolvimento do *HLA-B*27* com as espondilartropatias está bem estabelecido. Este gene está inserido dentro de uma região gênica chamada de Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, MHC) que possui genes que codificam moléculas responsáveis por apresentar antígenos as células do sistema imune, chamadas de antígeno leucocitário humano. O gene *HLA-B*27* tem um alto grau de polimorfismo, com mais de 105 alelos conhecidos. Entretanto, ainda não está bem estabelecido quais destes alelos tem maior grau de contribuição com a patogênese das espondiloartrites. Os alelos *HLA-B*27:05* (caucasianos), *HLA-B*27:04* (chineses), *B*27:02* (mediterrânea) parecem estar associados com a EA (CHEN *et al.*, 2017). O objetivo desse estudo foi determinar os alelos específicos do *HLA-B*27* em pacientes com espondilite anquilosante e artrite psoriásica que apresentavam o grupo alélico *HLA-B*27*, atendidos na região Sul do Brasil.

Materiais e métodos

De um total de 35 pacientes com espondilite anquilosante e artrite psoriática, nove foram previamente genotipados como *HLA-B*27* positivos. Para determinar o alelo específico de *HLA-B*27* foram realizadas reações de PCR-SSP, com diferentes misturas de primers. As combinações de resultados das diferentes reações de PCR-SSP permitiram a determinação do alelo específico, conforme descrito a seguir. A tabela 1 apresenta os primers utilizados.

Para a determinação dos alelos a reação foi realizada em etapas. A etapa 1 que envolve a reação com mix 1 e 2 define a positividade do *HLA-B*27*. As demais estão descritas abaixo, onde (+) e (-) indicam, respectivamente reações positiva e negativa.

i- Quando MIX 5 (+) e MIX 10 (-): Realizou-se as reações do mix 2 e 8 (essas reações podem ser realizadas concomitantemente ou pode-se realizar primeiro para o mix 2 e posteriormente a análise do resultado, realizar a reação do mix 8 somente para as amostras negativas para mix 2). Para as amostras positivas para o mix 8, realizou-se ainda a reação do mix 12. Quando alguma amostra permaneceu negativa após essas reações, realizou-se a reação do mix 4.

Análise do resultado:

MIX 2 +: As amostras são *HLA-B*27:02*

MIX 8 + MIX 12 -: as amostras são *B*27:08*

MIX 8 + e MIX 12 +: as amostras são *B*27:12*.

MIX 2 -, MIX 8 - e MIX 4 +: as amostras são *B*27:04*.

ii- Quando MIX 5 (-) e MIX 10 (+): Realizou-se a reação do mix 9.

Análise do resultado: Se a reação for positiva a amostra é *B*27:09*.

iii- Quando MIX 5 (+) e MIX 10 (+): Realizou-se a reação do mix 3 e 4.

Análise do resultado:

MIX 3 + e MIX 4 -: a amostra é *B*27:03*.

MIX 3 - e MIX 4 -: a amostra é *B*27:05*.

MIX 3 - e MIX 4 +: a amostra é B*27:10.

iv- Quando MIX 5(-) e MIX 10 (-): Realizou-se a reação do mix 4 e mix 7.

Análise do resultado:

MIX 4 +: as amostras são B*27:04.

MIX 7 +: as amostras são B*27:07.

Tabela 1. Iniciadores específicos para o grupo alélico (Mix SC1 e SC2) e para os alelos específicos (Mix 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12) do gene *HLA-B*27*.

Nº do mix	Nome	P	Sequência (5' – 3')	Localização	Posição	Alelos específicos <i>HLA-B*27</i> amplificados
Sc1	F16	1	GCT ACG TGG ACG	Exon 2	149–	01–11, 12?, 13–15, 16?, 17, 19–21, 24–28, 30–43
	7T	2	ACA CGC T	Exon 2	167	
	R27		GTC TGT GCC TTG GCC TTG		272–	
	2G		C		290	
Sc2	F204	3	GAC GCC GCG AGT CCG AGA	Exon 2	187–	01–06, 08–10, 12–13, 15–18, 20, 23, 25–29, 31, 35–42
	A	4	CAC GTC GCA GCC ATA CAT	Exon 3	204	
	R362		AT		362–	
	A				381	
2	F311	6	ACC GAG AGA ACC TGC GGA	Exon 2	293–	02
	T	4	T	Exon 3	311	
	R362		CAC GTC GCA GCC ATA CAT		362–	
	A		AT		381	
3	F167	7	GCT ACG TGG ACG ACA CGC	Exon 2	149–	03
	T	8	T	Exon 2	167	
	R247		GTG TCT CCC GGT CCC AAT		247–	
	C		G		265	
4	F362	9	GGT CTC ACA CCC TCC AGA	Exon 3	344–	04, 06, 10, 15, 18, 20, 25
	A	1	A	Exon 3	362	
	R527	0	CTC TCA GCT GCT CCG CCT		527–	
	A				544	
5	F272	1	ACC GGG AGA CAC AGA TCT	Exon 2	254–	01–05, 08, 10, 12–17, 19, 25–26, 28, 30–32, 36–40, 42
	G	1	G	Exon 3	272	
	R418	1	CTT GCC GTC GTA GGC GTC		418–	
	G	2			434	
7	F301	1	GCA CAG ACT GAC CGA GAG	Exon 2	283–	07, 32, 34, 43, B*0727, B*3707, B*3709
	G	4	G	Exon 3	301	
	R363	1	CAC GTC GCA GCC GTA CAT		363–	
	C	5	G		381	
8	F311	1	CCG AGA GAG CCT GCG	Exon 2	294–	08, 12, 18, 26, 40, 42, B*1802
	A	6	GAA	Exon 3	311	
	R362	4	CAC GTC GCA GCC ATA CAT		362–	
	A		AT		381	
9	F272	1	ACC GGG AGA CAC AGA TCT	Exon 2	254–	09
	G	1	G	Exon 3	272	
	R418	1	CTT GCC GTC GTA GGC GTG		418–	
	C	7			434	
10	F301	1	GCA CAG ACT GAC CGA GAG	Exon 2	283–	03, 05, 09–10, 13, 16–17, 27–29, 35, 37–39, 41–42 B*3702, B*4701, B*4705
	G	4	G	Exon 3	301	
	R362	4	CAC GTC GCA GCC ATA CAT		362–	
	A		AT		381	
12	F277	1	GGA GAC ACA GAT CTG CAA	Exon 2	258–	0505?, 12, 16, 18, 23?, 29, B*1802?, B*3702, B*4704–05
	A	9	GA	Exon 3	277	
	R362	4	CAC GTC GCA GCC ATA CAT		362–	
	A		AT		381	

Após o preparo do MIX, as amostras eram colocadas em um termociclador, onde de fato a reação acontecia, com as condições de ciclagem descritas na tabela 2.

Tabela 2. Condições de termociclagem utilizadas para reações de PCR-SSP para genotipagem de alelos *HLA*B27*

Ciclo	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1 Ciclo	96°C – 2 min.	-----	-----
5 Ciclos	96°C – 30 s.	68°C – 60 s.	72°C – 40 s.
21 Ciclos	96°C – 30 s.	65°C – 60 s.	72°C – 40 s.
4 Ciclos	96°C – 30 s.	55°C – 75 s.	72°C – 120 s.
1 Ciclo	-----	-----	72°C – 10 min.

Para a visualização dos resultados utilizou-se a eletroforese em gel de agarose (2%), com corante SYBER Safer, e uma corrida de 100V, por 20 minutos, 300mA e 150W, com um marcador de peso molecular (*Ladder*) de 100 pb.

Resultados e Discussão

As reações de PCR-SSP foram bem padronizadas e foi possível a determinação de alelos específicos de *HLA-B*27* em pacientes com espondilite anquilosante e artrite psoriásica. De 35 pacientes 9 (25.71%) foram previamente genotipados como *HLA-B*27* positivos. Para determinar o alelo específico do *HLA-B*27* foram realizadas reações de PCR-SSP, com diferentes mixes de primers. As combinações de resultados permitiram a detecção do alelo específico conforme sequência descrita anteriormente. Os 9 pacientes genotipados como sendo *HLA-B*27* positivos apresentaram resultado negativo para as reações de mix 3 e mix 4, levando a conclusão que possuíam o alelo específico *HLA-B*27:05*.

Conclusões

As reações de PCR-SSP foram padronizadas durante este projeto e de 35 pacientes 9 (25.71%) apresentaram o *HLA-B*27*. Todos os pacientes *HLA-B*27* positivos apresentaram o alelo específico *HLA-B*27:05*, correspondendo a uma frequência alélica de 100% no grupo estudado.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM).

Referências

Chen B, Li J, He C, Li D, Tong W, Zou Y, et al. Role of *HLA-B27* in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review). **Molecular Medicine Reports**, v.15, p. 1943-1951, 2017.

Espinoza LR, Cuellar ML. Psoriatic arthritis and spondylitis: a clinical approach. **Spondylarthritides**, Oxford University Press, Oxford, p. 97-111, 1998.