

## **AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO E DA FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS HLA-A, HLA-B E HLA-C EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE**

Leticia Cristina de Almeida Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka (Coorientador), Felipe Cayres Nogueira da Rocha Loures (Pesquisador), Victor Hugo de Souza (Pesquisador), Fernanda Pelisson Massi (Pesquisadora), Quirino Alves de Lima Neto (Orientador), e-mail: leticia.cristina1001@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área e sub-área do conhecimento: Ciências Biológicas – Imunologia/Imunogenética.**

**Palavras-chave:** doenças autoimunes, espondilite anquilosante, antígenos HLA.

### **Resumo:**

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença com acometimento das articulações sacro-ilíacas e da coluna vertebral, principalmente do segmento lombar. Dentre seus achados clínicos, além de histórico familiar de EA, a presença do alelo HLA-B\*27, presente nos genes do sistema HLA de classe I, tem mostrado ser um fator de risco para o desenvolvimento dessa doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição dos genótipos HLA de classe I e a relação existente entre os alelos encontrados e a fisiopatologia da EA. Por meio dos resultados foi possível avaliar que o HLA-B e o -C estão relacionados com o desenvolvimento de EA, tendo os alelos B\*27 e C\*02 uma forte relação com a EA, visto que observou-se um risco aumentado para o desenvolvimento desta doença em indivíduos portadores destes alelos. Porém, ao analisar o HLA-A, não foi possível observar nenhuma associação deste gene com a doença.

### **Introdução**

Espondiloartrites (EpAs) é um termo genérico usado para determinar um grupo heterogêneo de doenças inflamatórias crônicas. Dentre os quadros clínicos, a doença pode se manifestar sobre diversas formas, como a espondilite anquilosante (EA), artrite psoriásica (AP) e artrite reativa (AR) (Garg et al., 2014).

A EA, o maior subgrupo das EpAs, se caracteriza pelo envolvimento articular periférico, em especial dos membros inferiores, com acometimento das articulações sacro-ilíacas e da coluna vertebral, principalmente do segmento lombar. Dentre os achados clínicos de EA pode-se citar a negatividade para a pesquisa do fator reumatoide pelos métodos convencionais, histórico familiar de EA e a presença do alelo HLA-B\*27 (Garg et al., 2014)

Os genes localizados no cluster do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) são os mais polimórficos no genoma humano. Nos seres humanos as proteínas codificadas pelo MHC são denominadas Antígenos

Leucocitários Humano (HLA), e são divididas em dois grupos: HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) e HLA de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP). No caso da EA, já está estabelecido que há uma forte relação com o alelo HLA-B\*27, mostrando uma tendência para o desenvolvimento da doença, sendo encontrado em 80 a 90% da população com EA, em comparação com 6 a 9% da população em geral. Entretanto, apenas uma minoria portadora do alelo (1-5%) desenvolve a doença. Assim, o mecanismo molecular pelo qual a proteína HLA-B\*27 atua, causando a associação deste alelo com a EA, ainda não foi totalmente elucidado (Cortes et al., 2013).

Dessa forma, diversos estudos do MHC têm demonstrado a importância dos genes do sistema HLA permitindo um melhor entendimento da imunogenética e fisiopatologia de várias doenças, entre as quais a EA. Tendo isso em vista, esse projeto pretende avaliar a distribuição dos genótipos HLA de classe I e a relação existente entre os alelos encontrados e a fisiopatologia da EA.

## Materiais e Métodos

O trabalho foi executado seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Parecer COPEP nº 5.231.082/22, CAAE 27723114.0.0000.0104).

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Um total de 188 indivíduos foram selecionados para participar deste estudo, sendo 91 pacientes adultos com EA, classificados pelos critérios ASAS 2009 e residentes da região norte/noroeste do estado do Paraná e 97 indivíduos controles sem a doença, ambos não aparentados e pareados por sexo, idade e grupo étnico.

Após a coleta de sangue, realizou-se a extração de DNA usando coluna de sílica, por Biopur Kit Extração Mini Spin Plus (Mobius Life Science, Pinhais, PR, BR), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foram analisadas pela medida da densidade ótica em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (NanoDrop 2000R, Thermo Scientific).

Os genes HLA-A, -B, -C foram tipificados pela metodologia PCR-SSOR (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Reverse*) com tecnologia Luminex™ usando o kit LABType™ CWD (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, o DNA foi amplificado por PCR usando *primers* biotinizados específicos. Posteriormente, o DNA amplificado foi hibridizado com sondas ligadas a microesferas fluorescentes marcadas com estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina (SAPE). A hibridização foi verificada pela intensidade de fluorescência usando citometria de fluxo (FLEXMAP 3D™ Instrument Systems). Os resultados foram interpretados por meio do *software* HLA FUSION, versão 4.6 (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, EUA).

As análises estatísticas foram realizadas por meio de regressão logística utilizando o pacote *stats* em R versão 4.2.0. As diferenças foram estatisticamente significativas nos casos em que  $P \leq 0,05$ . Nos casos em que a diferença entre as frequências alélicas ou genóticas de pacientes e controles apresentaram significância estatística, foi calculado *Odds Ratio* (OR ou razão de probabilidade) para verificar o risco de desenvolvimento da doença.

## Resultados e Discussão

Este estudo caso/controle foi realizado com 188 indivíduos, sendo 91 com EA e 97 indivíduos que estão dentro do grupo controle sem EA. A média de idade foi  $44,67 \pm 13,03$  e  $41,95 \pm 12,82$  para pacientes e controles, respectivamente. Não foram observadas diferenças na distribuição de sexo dentro de pacientes e controles ( $P > 0,05$ ), sugerindo o adequado pareamento. As características gerais da população de estudo estão compiladas na tabela 1.

**Tabela 1: Características gerais de controles e pacientes com espondilite anquilosante.**

		Pacientes N = 91 n (%)	Controles N = 97 n (%)	P-valor
Idade (anos $\pm$ DP)		$44,67 \pm 13,03$	$41,95 \pm 12,82$	$>0,05$
Sexo	Feminino	60 (65,93)	54 (55,67)	$>0,05$
	Masculino	31 (34,07)	43 (44,33)	
Grupo Étnico	Branco	80 (88,90)	90 (92,78)	$>0,05$
	Pardo	5 (5,55)	5 (5,15)	
	Negro	3 (3,33)	2 (2,06)	
	Oriental	2 (2,22)	0 (0,0)	

N= número total da população, n = número de indivíduos, DP= desvio padrão.

As frequências dos alelos de HLA-A, -B, -C foram obtidas a partir da genotipagem dos indivíduos portadores de EA e dos indivíduos controle. O alelo A\*02 foi o mais frequente em pacientes e controles, 26% e 23%, respectivamente. Ao consultar a base de dados para frequência dos alelos HLA na população brasileira (*Allele Frequencies*), observou-se uma frequência de aproximadamente 27% para o alelo A\*02 na população paranaense de doadores voluntários de medula óssea escritos no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME), mostrando uma congruência com os dados esperados na literatura (Rede Brasil de Imunogenética, 2022). Porém, nenhuma associação significativa foi encontrada para esse alelo ou outro HLA-A.

Com relação ao *locus* B, dentro do grupo de controles o alelo mais frequente foi B\*35 (16%), diferentemente do grupo de pacientes no qual o alelo mais frequente foi o B\*27 (18%). O alelo B\*27 foi encontrado como o mais frequente nos pacientes portadores de EA quando comparado ao grupo controle (18% e 1%, respectivamente). Além disso, observou-se uma associação significativa para o alelo B\*27 (OR = 16,30; IC 95% = 4,52-104;  $P < 0,001$ ), demonstrando um risco 15 vezes maior no desenvolvimento de EA nos indivíduos que possuem este alelo. Este resultado já era esperado, uma vez que há uma alta incidência deste alelo nestes pacientes, sendo o mesmo considerado um fator de predisposição para EA em indivíduos portadores (Braun et al., 2007).

Para o *locus* C, o alelo mais frequente foi o C\*07, tanto para os pacientes portadores de EA quanto para os indivíduos controle 23% e 28%, respectivamente. Porém nenhuma associação significativa foi encontrada para esse alelo. O alelo C\*02 foi mais presente em pacientes quando comparado a controles (10% e 5%, respectivamente), observando um risco aumentado para o desenvolvimento da EA

quando comparado com controles sem a doença (OR = 2,77, IC 95% = 1,18 – 6,95;  $P = 0,023$ ). Porém, após a correção por Bonferroni, essa associação foi perdida ( $P = 0,299$ ). O alelo C\*02 demonstrou ser um fator de risco (OR = 5.40, 95% IC = 2.17–14.40,  $P < 0.0005$ ) para o desenvolvimento de artrite psoriática em um grupo de pacientes tratados em um hospital universitário na Polônia (Sokolik, 2014).

## Conclusões

Por meio dos resultados foi possível avaliar que o HLA-B e o -C estão relacionados com o desenvolvimento de EA. Os alelos HLA-B\*27 e -C\*02 possuem uma forte relação com a EA, visto que observou-se um risco aumentado para o desenvolvimento desta doença em indivíduos portadores destes alelos. Ao analisar o HLA-A, não foi possível observar nenhuma associação deste gene com a doença. No entanto, mais estudos são necessários.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária e Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

## Referências

BRAUN, Jurgem; SIEPER, Joachim. Ankylosing spondylitis. **Lancet**, v. 369, n. 9570, p. 1379-1390, 21 abr. 2007.

CORTES, Adrian et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. **Nature Genetics**, v. 45, n. 7, p. 730-738, 9 jun. 2013.

GARG, Neha; BOSCH, Filip van den; DEODHAR, Atul. The concept of spondyloarthritis: where are we now? **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 28, n. 5, p. 663-672, 18 nov. 2014.

Rede Brasil de Imunogenética. Perfil Genômico do REDOME / REREME. Governo Federal, 2022. Disponível em: <http://imunogenetica.org/>. Acesso em: 29 ago. 2022.

SOKOLIK, Renata et al. Significance of association of HLA-C and HLA-E with psoriatic arthritis. **Human immunology**, v. 75, n. 12, p. 1188-1191, 16 out. 2014.