



UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

LÍVIA LIMA ALVES CINTRA

**POLIMORFISMO DO GENE HLA DE CLASSE II, EM SEU HAPLÓTIPO DR, EM
PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO
NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Recife

2019

LÍVIA LIMA ALVES CINTRA

**POLIMORFISMO DO GENE HLA DE CLASSE II, EM SEU HAPLÓTIPO DR, EM
PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO
NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Co orientadora: Prof.^a Dr.^a Paula Sandrin Garcia

Recife

2019

C575p Cintra, Lívia Lima Alves.
Polimorfismo do gene HLA de classe II, em seu haplótipo DR, em pacientes adultos portadores de lúpus eritematoso sistêmico no estado de Pernambuco / Lívia Lima Alves Cintra. – Recife: o autor, 2019.
52 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Patologia.
Inclui referências e anexos.

1. Lúpus eritematosos sistêmico. 2. Antígenos HLA. 3. Polimorfismo genético.
I. Brandão, Lucas André Cavalcanti (orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 087)

LÍVIA LIMA ALVES CINTRA

**POLIMORFISMO DO GENE HLA DE CLASSE II, EM SEU HAPLÓTIPO DR, EM
PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO
NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Mello Júnior (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

“Não ande apenas pelo caminho já traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros
já foram” (BELL, A. G., 1883).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me abençoar sempre com saúde e pessoas tão maravilhosas ao longo desta jornada; por me proporcionar a oportunidade de viver coisas tão incríveis, como a oportunidade de viver este Mestrado;

Aos meus pais, Sinara e Marco, meus espelhos e os maiores incentivadores e apoiadores em todas as etapas do meu crescimento pessoal e profissional; assim como minhas irmãs, Lara e Luana, pelo carinho e pela presença constante em todos os momentos da minha vida;

Ao meu esposo, Flávio, pelo amor, incentivo e sobretudo paciência. Por partilhar todos os momentos importantes em minha vida e por acreditar tanto em mim;

Ao Prof. Lucas Brandão, por ter me acolhido de braços abertos em seu grupo de pesquisa, sendo sempre solícito, otimista e paciente;

Ao grupo de pesquisa PatGen, pelo apoio e carinho, em todos os seus integrantes, sobretudo ao Pós-Dr. Ronald, um exemplo de presteza e humildade, sendo imprescindível para tornar este trabalho possível;

Aos meus colegas de turma pelo laço de amizade construído e pelos momentos de alegria que seguirão para sempre em minha memória! Em especial à Heverton Colaço, que tornou-se um grande amigo e tornou os dias cansativos mais leves e felizes;

Aos professores e funcionários da Pós-graduação de Patologia pela acolhida e aprendizado, em especial à Margarete Valdevino (secretária do PosPat), pela paciência, auxílio e doçura em todos os momentos;

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e ao Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco pelo suporte técnico-científico. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para realização deste projeto;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma grave desordem crônica autoimune, caracterizada por perda da tolerância aos antígenos próprios com desregulação na resposta de interferons, que podem ocorrer nos mais diversos sistemas do organismo. Ela provém da associação de fatores genéticos com outros de origem ambiental, imunológico ou hormonal. Ocorre uma resposta imune policlonal contra numerosos auto-antígenos nucleares com persistência de anticorpos antinucleares. São documentados muitos loci gênicos de envolvimento na patogênese do LES, dentre eles destacamos a molécula do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) de reconhecimento antigênico, por ser um sistema primário de resposta imune adquirida, com alto índice polimórfico e participação comprovada da patogênese do LES. Este trabalho objetiva caracterizar o gene DRB1 do loci HLA classe II em pacientes adultos no estado de Pernambuco, portadores de LES, atendidos no setor de Reumatologia do Hospital das Clínicas do Recife – PE. Foram incluídos 178 pacientes portadores de LES e 69 controles saudáveis. Para avaliar o gene DRB1, foi produzido um par de *primers* (iniciadores), voltado para amplificar o Exon 2, usando as sequências gênicas de todos os alelos do HLA disponíveis no HLA *Databases* através do programa “R”, com posterior análise de DNA por Sequenciamento de Sanger, para determinação do HLA em baixa resolução. Ao final, foram encontrados 356 alelos no grupo LES e 134 alelos nos controles saudáveis. Houve predomínio do sexo feminino, com idade média de 30 anos, e significância para risco à doença com os alelos DRB1*08 e DRB1*14 (*p-value* 0,04 para ambos). Esses dados constituem a primeira pesquisa brasileira a se quantificar alelos dentro do contexto do LES, sendo então pioneira. Embora traga dados diferentes do “habitual”, os alelos de fator de risco para LES apresentam grande heterogeneidade etiológica nas mais variadas literaturas e países do mundo. Estes dados podem subsidiar outras pesquisas, bem como a elaboração de técnicas de diagnóstico molecular, no intuito de otimizar os diagnósticos destes pacientes e o consequente acesso ao tratamento de maneira precoce.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Antígenos HLA. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe chronic autoimmune disorder, characterized by loss of tolerance to its own antigens with deregulation in the response of interferons, which can occur in the most diverse systems of the organism. It comes from the association of genetic factors with others of environmental, immunological or hormonal origin. A polyclonal immune response occurs against numerous nuclear autoantigens with persistent antinuclear antibodies. Many gene loci of involvement in the pathogenesis of SLE are documented, among them the Human Leukocyte Antigen (HLA) molecule of antigenic recognition, because it is a primary system of acquired immune response, with a high polymorphic index and a proven participation in the pathogenesis of SLE. This work aims to characterize the DRB1 gene of the HLA class II loci in adult patients in the state of Pernambuco, with SLE, treated in the Rheumatology sector of the Hospital das Clínicas do Recife - PE. We included 178 patients with SLE and 69 healthy controls. To evaluate the DRB1 gene, a pair of primers (primers), designed to amplify Exon 2, were produced using the gene sequences of all HLA alleles available in HLA Databases through the "R" program, with subsequent DNA analysis by Sanger sequencing for low resolution HLA determination. At the end, 356 alleles were found in the SLE group and 134 alleles in the healthy controls. There was a predominance of females, with a mean age of 30 years, and significance for disease risk with the DRB1 * 08 and DRB1 * 14 alleles (p-value 0.04 for both). These data constitute the first Brazilian research to quantify alleles within the context of SLE, being a pioneer. Although it brings different data from the "usual", the risk factor alleles for SLE present great etiological heterogeneity in the most varied literatures and countries of the world. These data may support other research, as well as the development of molecular diagnostic techniques, in order to optimize the diagnoses of these patients and the consequent access to treatment in an early manner.

Palavras-chave: Lupus Erythematosus Systemic. HLA Antigens. Polymorphism Genetic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma do desenvolvimento patogênico do LES: Um antígeno próprio é reconhecido pelo IgM ou englobado através de fagocitose. Com isso, essas partículas são interiorizadas, processadas e então apresentados ao HLA, que por sua vez migra para a porção citoplasmática. Desta forma, ocorre a apresentação deste complexo ao Linfócito TCD4+ que inicia o processo de produção de citocinas, que atuam tanto na quimiotaxia de Linfócitos B como para conversão das Células B em plasmócitos. Estes, iniciam produção de anticorpos DNA-específicos, que progridem na formação dos imunocomplexos, característicos da patogênese do LES. A presença destes imunocomplexos têm a capacidade de ativar o sistema complemento, e a reação entre ambos gera um processo de inflamação local e consequente degradação tecidual, que culmina no surgimento dos sinais e sintomas da doença, que podem variar mediante a estrutura acometida. Fluxograma pensado e elaborado pelo autor 21
- Figura 2 - Imagens de lesões cutâneas características do LES, onde: A: Lesão cutânea localizada em dorso; B: Lesão cutânea localizada na região palmar; C: Lesão ou eritema em asa de borboleta, que ocorre da base do nariz e segue por toda a extensão das bochechas, caracterizando o *rash* malar; D: Lesão lúpica em língua 23
- Figura 3 - Mapa da região do complexo HLA, proveniente do braço curto do cromossomo 6. Em ênfase, o desdobramento do HLA de classe II, visto com maiores detalhes 25
- Figura 4 - Estrutura das moléculas HLA, em suas classes I e II. Apresentação das moléculas nas porções citosólica, transmembrana e extracelular 27

Figura 5 - Exemplo de denominação de um haplótipo derivado do HLA 28

Figura 6 - A- Eletroforese em gel de Agarose como piloto das reações com o gene DRB1. Na imagem, reações submetidas a diversos graus de temperatura diferentes, em sequência: 53°C, 54,3°C, 55,1°C, 55,8°C, 57,1°C, 57,9°C E 59°C. B- Eletroforese em gel de Agarose no piloto das reações, na foto para o gene DRB1, em PCR sob temperatura 53°C 36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Especificações dos alelos DRB1 visto em homozigose dentro do grupo caso (pacientes portadores de LES)	43
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios de classificação de LES do <i>American College of Rheumatology</i> , revisados em 1997	22
Tabela 2 -	Critérios revisados pelo SLICC para diagnóstico de LES em 2012	24
Tabela 3 -	Sequência Majoritária dos Genes escolhidos, obtidas através de síntese realizado pelo programa "R", seguidos de suas regiões de maior polimorfismo e tamanho do amplicon	33
Tabela 4 -	Primers elaborados, seguidos de suas posições para anelamento, temperatura de Melting e tamanho	34
Tabela 5 -	Especificações dos reagente e concentrações utilizadas no processo de PCR, termociclagem e eletroforese em Gel de Agarose aplicadas às amostras	35
Tabela 6 -	Resultados do sequenciamento das amostras de pacientes com LES para o gene DRB1	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Anticorpo Anti-Nuclear
APC's	Células Apresentadoras de Antígeno
AR	Artrite Reumatoide
BANK 1	Do inglês, B Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats
BLK	Tirosina Quinase Específica do Linfócito B
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	Esclerose Sistêmica
FAN	Fator Antinuclear
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IgM / G	Imunoglobulina M / G
INF1 / α	Intérferon tipo I / α
IRF5 - 7	Fator Regulador do Intérferon 5 ou 7
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial
NET's	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
PAMP's	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDC's	Células Dendríticas Plasmocitóides
PLC	Complexo de Carregamento de Peptídeos
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PXK	Domínio PX contendo Serina / Treonina Quinase
SLICC	Colaboração Clínica de Lúpus Sistêmico Internacional
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STAT 4	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 4
TLR 7 / 8 / 9	Receptor Toll-like 7 / 8 / 9

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	AUTOIMUNIDADE	16
2.2	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	16
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.4	ETIOPATOGENESE DO LES	19
2.5	DIAGNÓSTICO	22
2.6	HLA	25
2.7	NOMENCLATURA	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	DESENHO DO ESTUDO	32
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	32
4.3	ELABORAÇÃO DOS PRIMERS	33
4.4	OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS.....	35
4.5	GENOTIPAGEM	36
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA	50

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é definido como uma grave desordem crônica autoimune, caracterizada pela perda da tolerância aos antígenos próprios com desregulação na resposta de interferons, que podem ocorrer nos mais diversos sistemas do organismo (GHODKE-PURANIK & NIEWOLD, 2015).

Sua origem se dá na associação de fatores genéticos com outros de origem ambiental, imunológica ou hormonal. Além desta característica, o LES é tendencioso no desenvolvimento de uma debilidade crônica e pode tornar-se um importante risco à vida ao acometer órgãos vitais (AMUR et al, 2012; D'CRUZ et al, 2007).

A doença possui sinais e sintomas heterogêneos, que podem ser persistentes ou intermitentes, com períodos alternados de remissão e exacerbação dos sintomas, ou ainda de forma crônica indolente. Em seu desenvolvimento inicial, a sintomatologia se mostra inespecífica, como fadiga, mal-estar e perda de peso. Estes fatores colaboram para um diagnóstico e tratamento tardios, o que pode contribuir para uma pior resposta clínica com consequente surgimento de complicações ou agravos (ASSIS & BAAKLINI, 2009).

Além da problemática supracitada, hoje, no Brasil, o LES é uma patologia cujo diagnóstico é de exclusão em decorrência da escassez de marcadores “LES-Específicos” e sinais clínicos patognomônicos que conduzir à uma suspeita de LES ao primeiro contato com o paciente. Isto contribui para o surgimento de agravos importantes por também serem um fator de atraso ao tratamento precoce (BERTSIAS et al, 2013).

Por ser uma doença genética e crônica, sem tratamentos que resultem em cura, se faz importante o domínio quando ao seu desenvolvimento patológico, bem como das estruturas envolvidas neste processo. Estudos de associação genética demonstraram que a susceptibilidade ao LES é poligênica, e os genes encontrados variam de acordo com a etnia da população estudada, o que não subsidia uma técnica diagnóstica molecular comum. Por isso, é imprescindível a busca por técnicas diagnósticas com boa sensibilidade e especificidade, para que se possa

obter o diagnóstico e tratamento da forma mais precoce possível, com apostas em técnicas moleculares, baseadas no princípio que as alterações moleculares precedem quaisquer outros fenômenos celulares (FERNANDES et al, 2003).

Frente a esse questionamento e entendendo a importância de algumas estruturas conhecidas já relacionadas à patogênese do LES, despertou-se o interesse na atuação do HLA dentro deste processo, em decorrência da sua atuação para apresentação de peptídeos aos receptores de linfócitos T durante o processo patogênico (FERNANDES et al, 2003).

Partindo desse argumento e vendo a escassez de pesquisas correlacionando o HLA e o LES no Brasil, objetivamos então analisar o gene DRB1 do loci HLA classe II em pacientes adultos portadores de LES no estado de Pernambuco, estabelecendo comparação com grupo controle pareados quanto à miscigenação genética.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AUTOIMUNIDADE

A doença autoimune surge quando, por diversos meios, há uma quebra na tolerância imunológica, onde o organismo acaba por não diferenciar o próprio do não próprio ("self/no self") e isto culmina no reconhecimento errôneo dos próprios antígenos e consequente resposta imune contra si mesmo (MAIDHOF & HILAS, 2012).

Existem diversas teorias que tentam estabelecer os mecanismos que induzem a autoimunidade. Revisões mais recentes trazem fatores como a ineficiência da tolerância central, ativação de células auto reativas que escapam à tentativa de correção e reparo do organismo, o enigma das células T regulatórias fortemente reativas, a detecção de ácidos nucleicos como "*trigger*" inicial da autoimunidade e a predileção da autoimunidade ao sexo feminino como as principais vias que induzem ao desenvolvimento da autoimunidade (THEOFILOPOULOS et al, 2017).

Outra via, que é inerente ao estresse celular, é baseada na ruptura da cromatina por nucléolos durante o estresse celular, onde estes podem expandir drasticamente devido ao aumento dos níveis de poliamina, que se relaciona à descrição de muitas doenças autoimunes. Além disso, o cromossomo X inativo teria um poder de interação anormal com estes nucléolos, o que geraria uma expansão drástica e englobamento da cromatina vizinha, com consequente rompimento do cromossomo X inativo durante este processo (SELMI, 2018).

Ao pesquisar "autoimunidade" dentre os mais importantes periódicos indexados, como nature immunology, journal of immunology e autoimmunity reviews (por exemplo), os principais resultados obtidos são lúpus eritematoso sistêmico (les), artrite reumatoide (ar), esclerose sistêmica (es) e câncer (SELMI, 2018).

2.2. LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

A história do Lúpus não é muito abordada nos artigos ou revisões que trazem esta patologia como enfoque, porém é consenso que a primeira descrição clara do lúpus eritematoso foi feita por Biett e relatada por seu aluno Cazenave em 1833, com denominação de “eritema centrífuga”. Posteriormente, em 1851, Cazenave o renomeou para Lúpus Eritematoso. Após esta data, houveram alguns avanços para consolidar sua definição e subdivisões, porém o achado mais significativo posterior a este foi feito por Willian Osler, em 1895, através da publicação de 29 casos de Lúpus, associando o que até então era uma doença cutânea como tendo relação com manifestações sistêmicas, modificando o termo para Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (SMITH & CYR, 1988).

Sua denominação provém do latim “lupus”, que significa lobo, enquanto eritematoso vem do grego, “erito”, que significa vermelho. Estes termos são designados em decorrência do sintoma clínico de eritema ou *rash* malar, que é evidenciado por mancha avermelhada e bolhas que incidem na extensão do rosto à altura do nariz e bochechas, assemelhando-se à face de um lob (NORMAN, 2016).

O LES é uma doença crônica, de origem autoimune e características inflamatórias, que possui um amplo espectro de manifestações clínicas e sorológicas, onde sua principal característica é a produção de auto anticorpos, ativação do sistema complemento e deposição de imunecomplexos em diversas estruturas do organismo. De etiopatogenia ainda não tão estabelecida, o mais aceito atualmente é que o LES resulte da interação complexa entre fatores genéticos e exposições ambientais, que culminam em um curso clínico imprevisível (ALI et al, 2018).

Dentro de um escore de risco genético, vários estudos envolvendo genômica confirmam pelo menos 28% de hereditariedade, independentemente de comparações entre populações, sobretudo uma frequência aumentada de LES, entre outras doenças autoimunes, em parentes de primeiro grau (DENG & TSAO, 2017).

Um estudo genômico recente, utilizando sequenciamento direcionado, indicou que todos os alelos DR e DQ associados ao LES apresentam forte desequilíbrio de ligação com haplótipos regulatórios denominados XL9, o que poderia aumentar a transcrição do gene HLA classe II, e este aumento da expressão superficial de moléculas HLA de classe II em linhagens de células imunes pode afetar uma variedade de processos funcionais que conduzem a uma resposta imune hiperativa, característico da patogênese da doença (RAJ et al, 2016).

Outro fator é a ocorrência de mutações no braço curto do cromossomo 6, que alterem as estruturas do MHC aumentando as frequências de determinados haplótipos, se relacionam com o maior risco de desenvolvimento da doença (CRUZ-TAPIAS, 2012).

Além do fator genético supracitado, dentre os fatores ambientais já documentados são descritos a radiação UV; partículas de ar poluído; traços de urânio, mercúrio, cádmio, níquel, ouro, cobre, zinco, sílica e selênio; e ainda há uma evidência indireta quanto à influência por infecções virais, como pelo Epstein Barr Vírus (GULATI & BRUNNER, 2018).

É uma patologia caracterizada pela heterogeneidade de sintomas clínicos, justificados pela possibilidade de deposição dos imunocomplexos nos mais diversos órgãos ou sistemas diferentes, o que culmina em sinais e sintomas distintos. Estes imunocomplexos são decorrentes da junção de autoanticorpos e componentes do sistema complemento, sendo o primeiro uma das principais características da doença, sobretudo no subtipo de anticorpos antinucleares, considerados os principais mediadores definitivos da lesão tecidual (ASSIS & BAAKLINI, 2009).

É uma doença que por si só gera sinais e sintomas que podem progredir com gravidade, e ainda pode ser um fator importante de complicação no curso clínico de de outras doenças, potencializando o risco de mortalidade.

2.3. EPIDEMIOLOGIA

Dados epidemiológicos mundiais mostram uma incidência de 0,3 a 23,7 casos por cada 100.000 pessoas/ano, dentro de pacientes que atingem os critérios do ACR (ACR 1982 e 1997); e prevalência de 6,5 a 178,0 por cada 100.000 pessoas/ano, ressaltando que esses números podem variar de acordo com o local, etnia, idade e gênero. Dentro destes valores, destaca-se uma predominância particular em mulheres negras, tendo idade fértil como faixa etária incidente. Vale ressaltar ainda que embora exista uma predominância dentro do perfil supracitado, indivíduos de todos os gêneros, idades e de ancestralidades distintas são susceptíveis ao seu desenvolvimento (PONS-ESTEL et al, 2017; GHODKE-PURANIK & NIEWOLD, 2015).

Dados brasileiros consistentes e atuais ainda são escassos, porém se observou incidência de 8,7 a cada 100.000 na cidade de Natal, no Rio Grande do Norte (BEZERRA et al, 2005); e 4,8 a cada 100.000 em Cascavel, no Paraná (NAKASHIMA et al, 2011).

Um estudo entre 2002 e 2011 mostrou 8.761 mortes de paciente com LES, representando 4,76 mortes/105 habitantes, tendo como idade média 40,7 anos. Pacientes com LES em países emergentes (como o Brasil), apresentaram pior prognóstico em decorrência do baixo nível socioeconômico e educacional dessas populações, bem como o atraso no diagnóstico, dificuldades de acesso a serviços de saúde, além de apresentarem infecções e complicações da doença de uma forma mais frequente (COSTI et al, 2017; SOUZA et al, 2012).

2.4. ETIOPATOGENESE DO LES

O LES é uma doença autoimune sistêmica com característica de resposta auto-imune policlonal contra numerosos auto-antígenos nucleares, tendo assim presença persistente de anticorpos antinucleares que indicam, a longo prazo, uma imunossupressão. A afinidade e o tamanho do clone de tais efetores imunes adaptativos persistentes, anticorpos e células T autorreativas, determinam a atividade da doença. Os principais anticorpos antinucleares produzidos são do tipo ANA, denominados anticorpos antinucleares, que atuam principalmente contra os

componentes do DNA, como ribonucleoproteínas e histonas, formando os complexos imunes também característicos (WEIDENBUSCH et al, 2017).

Sob condições inflamatórias, neutrófilos morrem por um processo chamado Netose. Durante este processo, estes liberam armadilhas extracelulares (NET's) que contém mitocôndrias e alvos de DNA funcionam como antígenos na patogênese do LES. O mtDNA (DNA mitocondrial) derivado dos NET's estimula fortemente as células dendríticas plasmocitóides (PDC's) para produção de interferon alfa (INF- α). O papel dos neutrófilos na patogênese do LES é ainda sublinhada pela noção de que espécies reativas de oxigênio (EROS) produzido por neutrófilos citosólicos mutados está associado com o LES em seres humanos. Em neutrófilos de baixa densidade, os quais são numerosos em pacientes com LES, há elevada produção de EROS mitocondrial, com formação de NET's interferogênico (WEIDENBUSCH et al, 2017).

Além disso, o fator regulador de interéferon (IRF5 e IRF7), transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (STAT4), toll-like receptors (TLR7, TLR8 e TLR9) estão envolvidos na detecção de ácidos nucleicos e na produção de interéferon tipo I (INF1) por APC's (Células Apresentadoras de Antígenos, do inglês Antigen Presenting Cells), incluindo as células Dendríticas. Estes propiciam um ambiente pró-inflamatório, subsidiando surgimento e permanência do LES (MOULTON et al, 2017).

Como fatores de exacerbação da doença e seus sinais clínicos temos as infecções, pela sua característica de exposição do sistema imunológico a padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês Pathogen-associated Molecular Pattern) que ativam os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) do sistema imune inato para induzir antígeno-apresentação, onde então a imunidade inata leva à imunidade adaptativa e à autoimunidade. Outro fator desencadeante das crises de LES podem ser a morte celular relacionada a traumas ou queimaduras solares, que expõe o sistema imune inato a detritos nucleares derivados de células mortas, que tem o potencial de ativar clones de anticorpos antinucleares e outros autoantígenos nucleares em indivíduos com uma déficit

gênico para limpar rapidamente o material nuclear e outros detritos de células mortas do espaço extracelular (WEIDENBUSCH et al, 2017).

São documentados muitos loci gênicos de envolvimento na patogênese do Lúpus, como por exemplo os genes envolvidos na sinalização, produção e sinalização do interferon I, pelo potencial de quebra da auto-tolerância pela ativação de células apresentadoras de antígenos após a absorção de antígenos próprios. Porém, o maior destaque se dá na molécula HLA, integrantes do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) de reconhecimento antigênico, por ser um sistema primário de resposta imune adquirida, com alto índice polimórfico e participação comprovada da patogênese do LES (GHODKE-PURANIK & NIEWOLD, 2015).

Agregando o conhecimento dos vários artigos que mencionam a patogênese do LES, podemos concluir que a mesma ocorre, de forma simplificada, da seguinte maneira:



Figura 1: Fluxograma do desenvolvimento patogênico do LES: Um antígeno próprio é reconhecido pelo IgM ou englobado através de fagocitose. Com isso, essas partículas são interiorizadas, processadas e então apresentados ao HLA, que por sua vez migra para a porção citoplasmática. Desta forma, ocorre a apresentação deste complexo ao Linfócito TCD4+ que inicia o processo de produção de citocinas, que atuam tanto na quimiotaxia de Linfócitos B como para conversão das células B em Plasmócitos. Estes, iniciam produção de anticorpos DNA-específicos, que progridem na formação dos imunocomplexos, característicos da patogênese do LES. A presença destes imunocomplexos têm a capacidade de ativar o sistema complemento, e a reação entre ambos gera um processo de inflamação local e consequente degradação tecidual, que culmina no surgimento dos sinais e sintomas da doença, que podem variar mediante a estrutura acometida. Fluxograma pensado e elaborado pelo autor.

2.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do LES é feito com base nos parâmetros estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* em 1982, com revisão em 1997, dispostos da seguinte forma (tabela 1):

Tabela 1 – Critérios de classificação de LES do *American College of Rheumatology*, revisados em 1997

ÍTEM	SINAIS E SINTOMAS	DESCRIÇÃO
1.	Eritema malar	Lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2.	Lesão discoide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3.	Fotossensibilidade	Exantema cutâneo como reação não-usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
4.	Úlceras orais e nasais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
5.	Artrite	Não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
6.	Serosite	Pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
7.	Comprometimento Renal	Proteinúria persistente ($> 0,5$ g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
8.	Alterações Neurológicas	Convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
9.	Alterações Hematológicas	Anemia hemolítica ou leucopenia (menor que $4.000/mm^3$ em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que $1.500/mm^3$ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que $100.000/mm^3$ na ausência de outra causa).
10.	Alterações Imunológicas	Anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou c) teste falso-positivo para sífilis, por, no mínimo, seis meses.
11.	Anticorpos Antinucleares	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

Para um diagnóstico positivo deve-se obter quatro ou mais dos onze parâmetros elencados acima de forma simultânea. Seguindo-a, o diagnóstico pode ser feito com 95% de especificidade e 85% de sensibilidade. Dos itens, o mais relevante é a detecção de anticorpos antinucleares, sobretudo o Anti-DNA e o anti-Smith (MAIDHOF & HILAS, 2012).

Dentro dos critérios apontados anteriormente, no Lúpus Eritematoso Sistêmico há um destaque para as alterações cutâneas da doença, pela formação de lesões crostosas, incluindo o clássico eritema em forma de borboleta, conforme ilustrado nas imagens que seguem (KAUL et al, 2016):

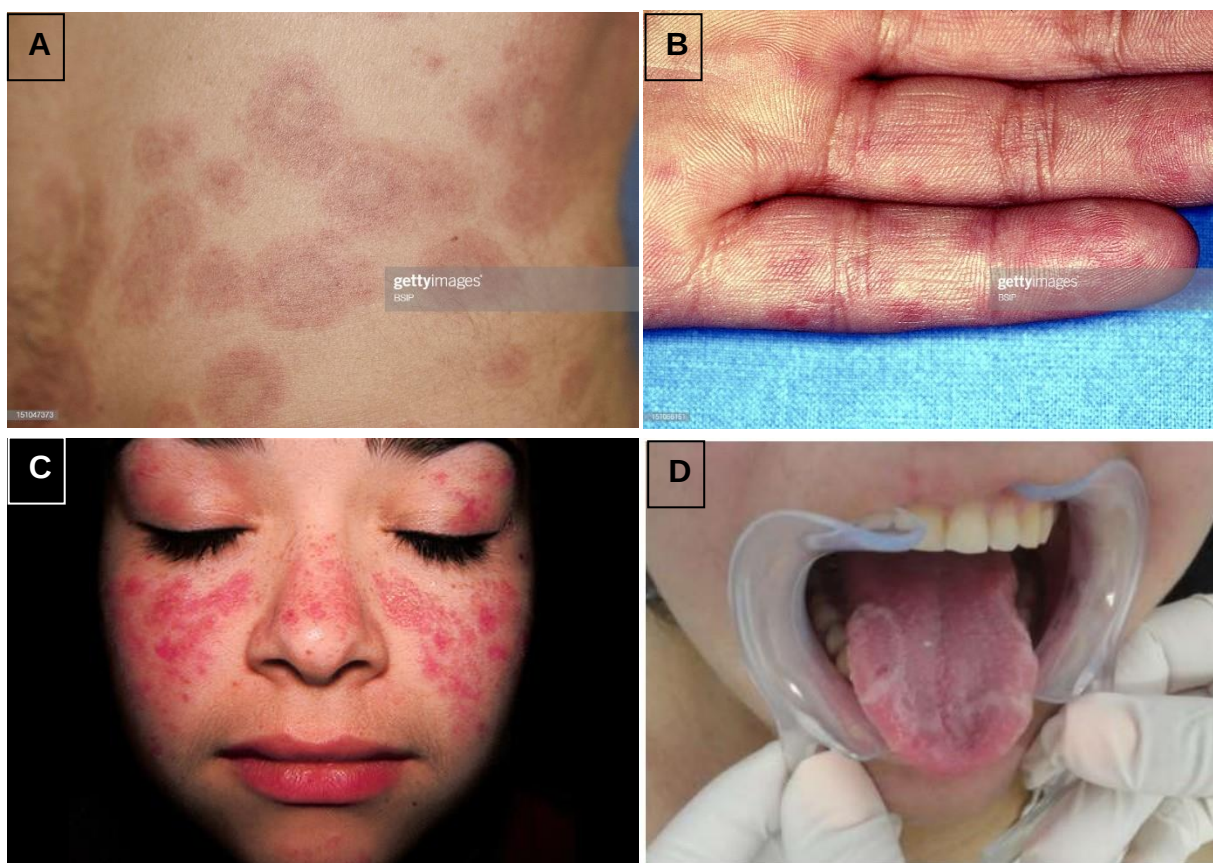


Figura 2: Imagens de lesões cutâneas características do LES, onde: A: Lesão cutânea localizada em dorso; B: Lesão cutânea localizada na região palmar; C: Lesão ou eritema em asa de borboleta, que ocorre da base do nariz e segue por toda a extensão das bochechas, caracterizando o rash malar; D: Lesão lúpica em língua. Imagens capturadas em 03/04/2019, às 17h, respectivamente em: Figuras A e B (<https://www.gettyimages.co.uk/photos/lupus-skin?sort=mostpopular&mediatype=photography&phrase=lupus%20skin>); Figura C (https://www.medicinenet.com/image-collection/systemic_lupus_erythematosus_1_picture/picture.htm); e Figura D (<http://archhealthinvestigation.com.br/ArchHI/article/viewFile/912/1567>).

Posterior a essa classificação, foram estabelecidos critérios com alguns pontos diferentes, elencados pelo SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) em 2012, que estabelece novos pontos a serem considerados, porém sem ainda desvalidar o ACR de 1982. Neste, a categoria de fatores hematológicos e os anticorpos antinucleares são divididos em subitens distintos, critérios estes que são cumulativos e não precisam estar presentes simultaneamente. O paciente deve contemplar quatro critérios, sendo pelo menos um clínico e um imunológico, ou ainda possuir nefrite comprovada por biópsia compatível com LES e com anticorpos ANA ou anti-dsDNA, conforme descrito na tabela abaixo (BALACHANDRAN & MATHEW, 2015) (tabela 2):

Tabela 2 – Critérios revisados pelo SLICC para diagnóstico de LES em 2012.

CRITÉRIO	ÍTEM	DESCRIÇÃO
CRITÉRIOS CLÍNICOS – LABORATORIAIS	1.	Lúpus cutâneo agudo
	2.	Lúpus cutâneo crônico
	3.	Úlceras orais ou nasofaríngeas
	4.	Alopécia (“no-sarring”)
	5.	Sinovite envolvendo mais que 2 articulações
	6.	Serosite
	7.	Manifestações renais
	8.	Manifestações neurológicas
	9.	Anemia hemolítica
	10.	Leucopenia/Linfopenia
	11.	Trombocitopenia
CRITÉRIOS IMUNOLÓGICOS	12.	Anticorpos anti-nucleares (ANA)
	13.	Anti-dsDNA
	14.	Anti-Sm
	15.	Anticorpos anti-fosfolipídios
	16.	Baixa quantidades de proteínas do sistema complemento
	17.	Teste de coombs direto

Porém é importante lembrar que LES ainda é uma doença cujo diagnóstico é de exclusão frente à outras patologias, o que pode acabar culminando em uma demora diagnóstica, que é crucial no início do tratamento, consequente controle dos sintomas clínicos e complicações.

2.6. HLA

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH ou, do inglês, MHC – *Major Histocompatibility Complex*) é o responsável pela identificação de antígenos. Na espécie humana, os genes desse complexo recebem o nome de sistema HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*, ou Antígeno Leucocitário Humano), que se divide em 3 regiões ou classes principais, denominadas I, II e III (TROWSDALE & KNIGHT, 2013). Estas estruturas se localizam no braço curto do cromossomo 6 e têm diferentes funções, conforme podemos observar na figura 3 abaixo.

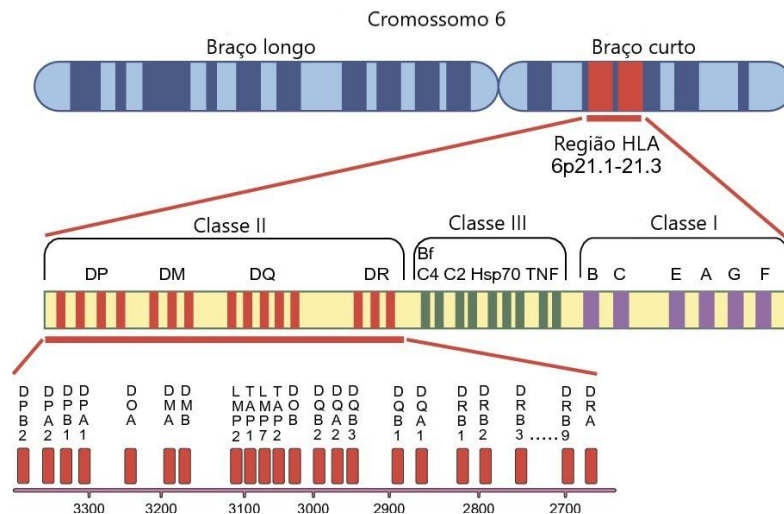


Figura 3: Mapa da região do complexo HLA, proveniente do braço curto do cromossomo 6. Em ênfase, o desdobramento do HLA de classe II, visto com maiores detalhes. Traduzido de: [https://www.semanticscholar.org/paper/Early-prediction-of-autoimmune-\(type-1\)-diabetes-Regnell-Lernmark/9bfb91c9f52f539b1472742cbccdf68746998d34](https://www.semanticscholar.org/paper/Early-prediction-of-autoimmune-(type-1)-diabetes-Regnell-Lernmark/9bfb91c9f52f539b1472742cbccdf68746998d34).

- Classe I: Glicoproteína de membrana expressa em células nucleadas para exposição de peptídeos endógenos a serem reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos CD8+;
- Classe II: Glicoproteína de membrana expressa em APC's, para exposição de peptídeos exógenos a serem reconhecidos pelas células T auxiliares CD4+;
- Classe III: Codificação proteica de integrantes do sistema complemento e moléculas envolvidas no processo inflamatório.

A função primordial das proteínas de classe I e II são transportar para a superfície celular, peptídeos derivados de proteínas processadas/degradadas dentro das células. A classe I transporta peptídeos oriundos dos proteossomos, enquanto que a classe II, os produtos processados nos endossomos, ambos para apresentação às células T (GOLDBERG & RIZZO, 2014).

O HLA pode apresentar uma ou duas cadeias de subunidade. Os de classe I possuem apenas uma cadeia α , enquanto os de classe II possuem duas: uma subunidade α e uma β . Tais subunidades são sintetizadas e os respectivos heterodímeros, α e β , são formados no retículo endoplasmático da célula, porém de maneiras distintas. Enquanto que a classe I recebe seus peptídeos ainda no retículo, através do auxílio da PLC (*peptide-loading complex*); a classe II tem de ser transferida para o fagolisossomo, para a montagem final. As moléculas do HLA são divididas em 3 porções: uma citosólica, para transdução de sinais; uma transmembrana, que acopla a molécula à camada bilipídica da membrana; e uma extracelular, para apresentação dos peptídeos (GOLDBERG & RIZZO, 2014).

Dentro do que é sabido no desenvolvimento do Lúpus, os estudos documentam um maior envolvimento do HLA de classe II, uma vez que ele é responsável pela apresentação de peptídeos aos receptores de linfócitos T, o que corrobora com a patogênese descrita desta doença. Elas estão presentes nas superfícies das APC's, como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas (FERNANDES et al, 2003). Desta maneira, essa classe de HLA foi escolhida no presente estudo para correlacionar com o desenvolvimento do LES.

Estruturalmente, é composto por uma cadeia α e uma β polipeptídicas, ambas divididas em dois domínios ($\alpha 1/\alpha 2$ e $\beta 1/\beta 2$). Os domínios de final 1 apresentam maior polimorfismo, com cerca de 90 aminoácidos residuais, para moléculas HLA-DQ e HLA-DP. A interação dos segmentos $\alpha 1$ e $\beta 1$ forma o sulco de ligação ao peptídeo, que, estável, facilita sua apresentação ao receptor do linfócito T CD4 (McDEVITT, 2000), conforme ilustrado abaixo:

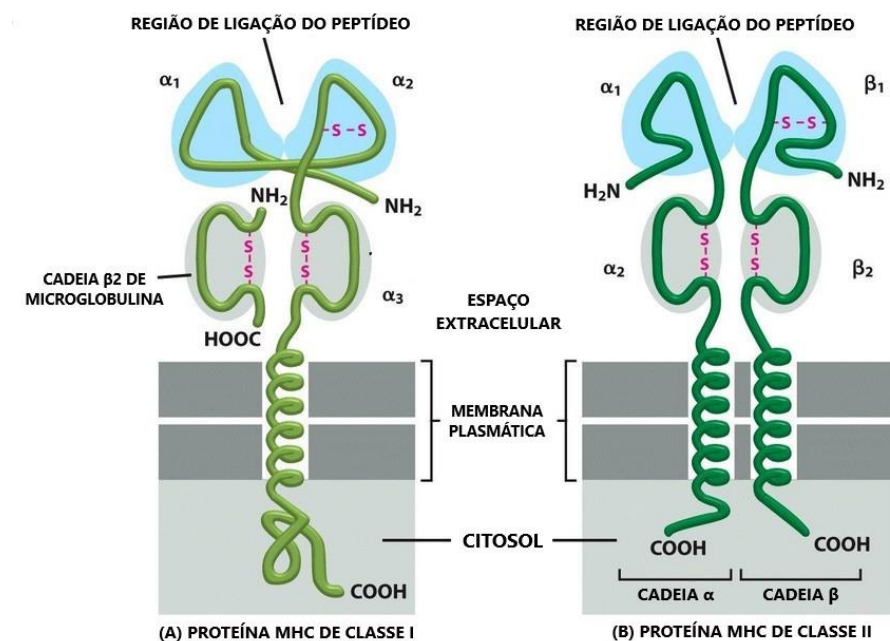


Figura 4: Estrutura das moléculas HLA, em suas classes I e II. Apresentação das moléculas nas porções citosólica, transmembrana e extracelular. Traduzido de: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-MHC-Class-I-A-and-class-II-proteins-B-The-two-globular-domains-furthest_fig1_303995647.

Isso ocorre quando estas partículas são reconhecidas pelos receptores de células B, e no caso do LES, isso se dá pela estrutura IgM (imunoglobulina M). Este receptor reconhece e interioriza estes fragmentos, que são então processados pelo Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II (MHC II). Após este processo, a célula B (ou linfócito B), apresenta esta “junção” ao linfócito T auxiliar CD4, que reconhece e inicia a produção de citocinas. Estas citocinas, por sua vez, têm a capacidade de ativar o linfócito B, que então se diferencia em plasmócito, que irá produzir e secretar anticorpos auto reativos DNA-específicos. As consequentes ligações dos “antígenos” com os anticorpos produzidos darão origem aos imunocomplexos, característicos da fisiopatologia do LES (CAROLL, 2004).

Quando estes imunocomplexos não são eliminados pelo organismo, eles podem ser depositados nas mais diversas estruturas do organismo, como vasos sanguíneos, pele, rins e articulações e tal deposição, a longo prazo, ativa o sistema complemento, com produção de anafilotoxinas. Com isso, há aumento na

permeabilidade dos vasos e quimiotaxia de leucócitos e neutrófilos para o local acometido. A reação dos neutrófilos com os imunocomplexos gera produção de enzimas com alta capacidade de degradação tecidual local (BALESTIERI, 2006).

Segundo o site HLA Nomenclature (hla.alleles.org, 2017), são documentados 17.166 alelos, sendo destes 4.622 do tipo HLA de classe II, divididos entre os haplótipos: DR α , DR β , DQ α 1, DQ β 1, DP α 1, DP α 2, DP β 1, DP β 2, DM α , DM β , DO α e DO β . Muitos estudos mostram que há uma relação entre o LES e os alelos HLA de classe II, justamente pelo fato destas moléculas apresentarem antígenos às células T. Os principais alelos descritos na literatura são os DR e DQ, em decorrência de relação direta com a produção de auto anticorpos durante a patogênese do LES (WAKELAND et al, 2001).

2.7. NOMENCLATURA

Desde 1964, ano em que ocorreu o 1º Workshop Internacional de Histocompatibilidade (IHWS), ocorrido em Durham, na Carolina do Norte (EUA), que se iniciou uma dedicação a nomear o HLA através de análises sorológicas. Após vários workshops e mudanças nas nomenclaturas, desde 2010 temos um modelo que até então é o que se encontra em vigência. Este se baseia após análises moleculares (TORRES & MORAIS, 2011).

A nomenclatura surge ao associar várias características do haplótipo, conforme ilustrado abaixo:

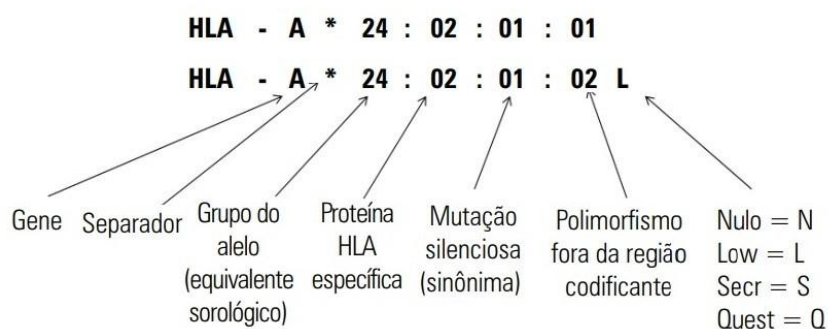


Figura 5: Exemplo de denominação de um haplótipo derivado do HLA. Obtido de: <http://sciscogenetics.com/pages/technology.html>.

Dentre as moléculas agrupadas na região classe II do MHC, temos os três principais HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP, codificadas por loci genéticos distintos. A proteína obtida como produto final é derivada de atuação simultânea de duas cadeias de membrana, denominadas α e β . Estas se unem de forma não covalente para formar o sulco de ligação ao peptídeo/antígeno acima de uma estrutura conservada membrana-proximal, que tem por objetivo interagir com as células TCD4 (McCLUSKEY et al, 2017).

Desta forma, assim como as proteínas são denominadas α e β , os genes que as originam dentro do complexo MHC classe II também possuem na sua denominação os subtipos α e β , e por isso as nomenclaturas são DR α e DR β , DQ α e DQ β , DP α e DP β), que podem ainda se subdividir em 1 ou 2. Então, em decorrência dessa peculiaridade, além da forma de obter a nomenclatura já mencionada, acrescenta-se o símbolo de α ou β após a sigla do gene (DR, DP ou DQ), para denominações dentro da classe II, como por exemplo HLA-DRB1*13:01:01:02, onde podemos ter (MARSH et al, 2010; McCLUSKEY et al, 2017):

- HLA é a região ao qual ocupa;
- HLA-DRB1 (beta 1) é uma porção particular do locus HLA;
- HLA-DRB1* pois o é colocado para alusão a técnicas moleculares que culminaram em sua descoberta;
- HLA-DRB1* 13 por ser um grupo de alelos que codificam o antígeno DR13;
- HLA-DRB1* 13:01 por 01 ser um alelo HLA específico;
- HLA-DRB1* 13:01 N quando este se apresenta como um alelo nulo;
- HLA-DRB1* 13:01:02 para um alelo que difere por um sinônimo de mutação da DRB1* 13:01:01;
- HLA-DRB1* 13:01:01:02 para os alelos que contém uma mutação fora da região de codificação de DRB1* 13:01:01:01.

O número de alelos em cada um dos loci da classe II está crescendo de forma constante, pois a tipagem HLA de alta resolução é aplicada em testes clínicos e antropológicos (McCLUSKEY et al, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a distribuição dos alelos do gene DRB1 do loci HLA classe II em pacientes adultos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) no estado de Pernambuco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Rebuscar ferramentas de Bioinformática para a detecção de variantes alélicas do HLA;
- Avaliar os alelos do gene DRB1 em pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial para Lúpus Eritematoso Sistêmico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Esta pesquisa possui natureza aplicada, com tratamento quantitativo dos dados, caráter descritivo e explicativo e comportamento *ex post facto* em relação à doença.

Foi realizado análise através de DNA de pacientes portadores de LES, com diagnóstico clínico comprovado e vigência de resultado laboratorial positivo para FAN (Fator Antinuclear), através de extração de sangue periférico. Estes pacientes eram brasileiros, com idade maior que 18 anos e com acompanhamento clínico contínuo no setor de Reumatologia do Hospital das Clínicas do Recife – PE.

Como grupo controle, foram utilizadas amostras de DNA de um banco de controles saudáveis pareados quanto à miscigenação genética, denominado “Ancestralidade”. Este grupo foi composto de indivíduos com idade superior a 18 anos; ausência de diagnóstico, sintomatologia e histórico familiar para doenças crônicas ou autoimunes.

Foram excluídos da referida pesquisa pacientes menores de idade (18 anos), estrangeiros, com diagnóstico ainda indefinido ou com outras comorbidades genéticas, autoimunes ou crônicas.

Este projeto foi aprovado pelo CEP (Comitê de Ética na Pesquisa) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, sob número de CAAE: 24374913.0.0000.5208.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Foi realizada a coleta de aproximadamente 8 mL de sangue venoso periférico em tubos contendo EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) de cada paciente. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), onde o DNA

genômico foi isolado a partir das células do sangue periférico de cada paciente seguindo as instruções do protocolo pré-estabelecido.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas, armazenadas em *eppendorfs* contendo identificação de cada uma e mantidas em freezer sob temperatura de -20°C.

4.3 ELABORAÇÃO DOS PRIMERS

Foi realizada busca em artigos científicos quanto à SNP's (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*, ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único) para HLA que pudessem ser utilizados na presente pesquisa. Todos os SNP's encontrados, diferentemente do que os artigos abordavam, foram consultados em bases de dados e seus resultados apontaram para SNP's intrônicos ou intergênicos unanimemente, o que descaracteriza sua funcionalidade, inviabilizando seu uso na presente pesquisa.

Frente a esta questão, optou-se pela elaboração de uma metodologia bioinformática para busca e detecção de variantes do HLA, inicialmente focada nos *primers* a serem utilizados. Para tal, foi procedido com pesquisa de todas as sequências gênicas do HLA no site *HLA Databases*. Após obtenção destes dados, utilizou-se o programa "R" para compilar as diversas sequências em segmentos únicos, intitulados "sequências consenso" ou "majoritária", obtendo uma sequência única do Exon 2 para DRB1, conforme segue abaixo. Além das sequências, o "R" pôde mostrar as principais áreas polimórficas dentro das sequências gênicas obtidas, conforme demonstrado na Tabela 3:

Tabela 3: Sequência Majoritária dos Genes escolhidos, obtidas através de síntese realizado pelo programa "R", seguidos de suas regiões de maior polimorfismo e tamanho do amplicon.

DRB1	
SEQUÊNCIA MAJORITÁRIA	CACGTTTCTTGGAGCAGGNTAAGCATGAGTGTCATTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGC GGTTCTG GACAGATACTTCTATAACCAAGAGGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGG TGACGGAGCTGGGGCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAGGC GGGCCGCGGTGGACACCTACTGCAGACACAACCTACGGGGAGGACCTCCTGGAGCAGAGGGCGGCCG CGGTGGACACCTACTGCAGACACAACCTACGGGGTGGTGAGAGCTTCACAGTGCAGCGGCGAG
PRINCIPAIS REGIÕES POLIMÓRFICAS	NUCLEOTÍDEOS 99 E 252
AMPLICON	238 PB

A partir das sequências consenso, pôde-se iniciar o processo de elaboração dos *primers*. A sequência dada pelo “R” foi aplicada ao site *Primer 3 Input* (site: <http://primer3.ut.ee/>) para verificar as regiões de anelamento dos possíveis primers, uma vez que o objetivo seria anelar nas regiões mais extremas da sequência, para que fosse possível amplificar o máximo possível do gene.

Para elaboração do primer reverse, além da etapa supracitada, foi necessário aplicar os primers pretendidos ao site *Reverse Complement* (site: https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), que traduz uma determinada sequência em sua sequência de complementariedade. Após obter os possíveis primers, eles foram passados no site *OligoCalc* (site: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), site que testa as chances de Hairpin, que é a possibilidade do primer anelar nele mesmo durante a reação de PCR, o que também é chamado de “grampo”.

Feito isto, os primers foram aplicados ao site da Thermo Fisher (site: <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>), no qual, é visto a temperatura de anelamento, *Melting*, diferença de temperatura entre os primers Forward e Reverse e o tamanhos limites do primer, para que eles pudessem ser escolhidos dentre dos parâmetros onde sua ação fosse mais efetiva possível.

Ao passar por todas estas etapas, os primers escolhidos para DRB1 foram os que seguem descritos abaixo na tabela 4:

Tabela 4: Primers elaborados, seguidos de suas posições para anelamento, temperatura de Melting e tamanho.

GENE	PRIMER	POSIÇÃO	TM	TAMANHO
DRB1 FORWARD	AGTGTCATTCTTCAATGGGACG	27 A 49	62,5°C	23 PB
DRB1 REVERSE	CGCTGCACTGTGAAGCTCTC	306 A 355	62,5°C	20 PB

Após chegada dos primers, que vêm liofilizados, foi procedido com suspensão dos mesmos com água ultrapura (Milli-Q®) para ficarem na igual concentração de 100µM (micro molar).

4.4 OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS

Foi procedido com teste piloto de otimização dos primers para elencar a melhor concentração dos reagentes e temperaturas a serem utilizadas no processo de PCR. Após diversas tentativas, tanto de concentrações dos Mix's, como de PCR's e Eletroforese, definido o padrão que seriam aplicadas as amostras de casos e controles, conforme mostrado na tabela 5 abaixo:

Tabela 5: Especificações dos reagentes e concentrações utilizadas no processo de PCR, termociclagem e eletroforese em Gel de Agarose aplicadas às amostras.

DRB1		
PCR		
REAGENTE	CONCENTRAÇÃO	VOLUME PARA 1 AMOSTRA
Tampão (Buffer)	5X	5µL
MgCl2	1,8Mm	1,8µL
dNTP's	0,2mM	2,5µL
Forward DRB1	0,5mM	1,25µL
Reverse DRB1	0,5mM	1,25µL
Taq Polimerase	1,25U/µL	0,25µL
Água Mili-Q	---	10,95µL
DNA	50ng/µL	2µL
Volume total	---	25µL
TERMOCICLAGEM		
Ciclos	35 ciclos	
Tm	53°C	
ELETROFORESE		
REAGENTE		VOLUME / QUANTIDADE
Concentração da Agarose		1% (1,3g)
TBE		130ml
Brometo de Etídeo		15µl
Volts		100V
Mili-Ampére		500mA
Watt		150W
Tempo		50'

Segue abaixo imagens de Eletroforese em Gel de Agarose, capturadas durante o processo de otimização dos *primers*. O gel em questão, foi realizado para os testes de variação de temperatura. Este procedimento foi feito utilizando cubas da *Loccus®* sob as condições descritas anteriormente:

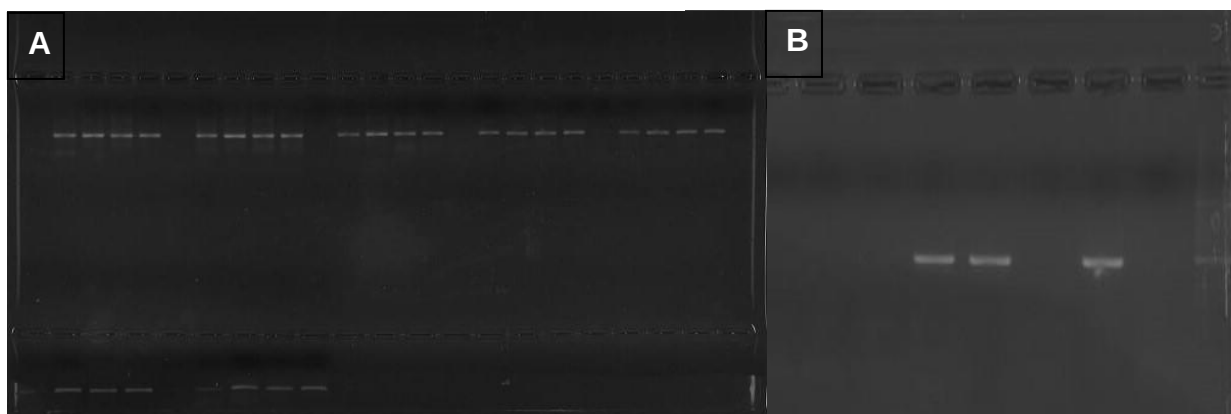


Figura 6: A- Eletroforese em gel de Agarose como piloto das reações com o gene DRB1. Na imagem, reações submetidas a diversos graus de temperatura diferentes, em sequência: 53°C, 54,3°C, 55,1°C, 55,8°C, 57,1°C, 57,9°C E 59°C. B- Eletroforese em gel de Agarose no piloto das reações, na foto para o gene DRB1, em PCR sob temperatura 53°C.

4.5 GENOTIPAGEM

Sob concentração de 50ng/μL, 2 μL de DNA foi adicionado à 23μL do mix de reagentes mencionados no item anterior e submetidos a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).

Após esta etapa, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de Agarose para confirmação de amplificação da PCR. Um volume de 5μL das amostras foi associado com 2μL de Tampão Loading na cor verde. As amostras foram colocadas em gel na concentração de 1%.

As amostras que se mostraram amplificadas através da eletroforese foram posteriormente submetidas ao Sequenciamento de Sanger, ocorridas no Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPE. Em nova placa, colocou-se 5μL do produto de PCR associado com 2μL de Exosap. Placa submetida ao vortex para homogeneização dos seus conteúdos e em seguida foi aplicada ao termociclador *Applied Biosystems®*, sendo: temperatura de 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos.

Após esta reação, feito quantificação do DNA destas amostras, que foram aplicadas ao cálculo: $C1 \times V1 = C2 \times V2$, obtendo assim o volume de água ultrapura a ser incorporado as amostras para obtenção de uma concentração de DNA em torno

de 20ng/ μ L. Feito isto, a placa foi selada e entregue aos técnicos responsáveis do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPE, para realização do Sequenciamento de Sangue.

O resultado do sequenciamento é entregue sob forma de arquivo FASTA/AB1, o qual tem sua sequência traduzida através de ferramentas do programa “R”, e, frente a este, houve uma enorme dificuldade na definição do alelo em alta resolução. Isso ocorreu pela quantidade de polimorfismos que o HLA possui, o que impossibilitou a detecção do gene em mais de uma variação alélica, forma como estes alelos são geralmente abordados nos estudos (Ex.: DRB1*15:01). Como as diferenças entre as sequências são ínfimas, dentro de um mesmo grupo alélico, eram mostrados vários resultados de proteína HLA com o mesmo percentual de identificação.

Para os resultados encontrados, as sequências obtidas pelo sequenciamento foram aplicadas ao *Blast* no NCBI, do *HLA Databases* e ainda um *Blast* construído através de scripts do “R”, onde foram confrontados seus percentis de identificação. Por uma questão de fidedignidade, foi então considerado apenas o gene e o grupo alélico dos resultados nessas plataformas.

Para fins de maior significância dos resultados encontrados, consultamos a plataforma *Alleles Frequencies*, no intuito de ver quais os HLA já catalogados na população brasileira não associados a patologias específicas. Foi utilizado como base um estudo realizado por Donadi, intitulado pelo próprio site como um estudo na classificação “ouro”, e todos os nossos resultados eram alelos já documentados em população brasileira, o que trouxe ao resultado deste estudo um caráter de veracidade ainda maior.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença entre os valores da mediana da idade dos pacientes e controles foi verificada através do teste de Mann-Whitney, enquanto que a diferença entre as proporções de gênero foi calculada através do Teste Exato de Fisher.

As frequências alélicas entre os grupos caso e controle foram aplicadas ao programa “R” (versão 2.12.2), que através de suas ferramentas de *script* propiciaram aplicação do Teste Exato de Fisher e Odds Ratio (OR). Este teste tem a finalidade de confrontar as frequências alélicas de ambos os grupos, comparando sua incidência e estabelecendo significância entre os dados. Os resultados finais da pesquisa foram os que obtiveram valores de $p < 0,05$, o que caracteriza significância estatística.

Houve ainda mensuração do Intervalo de Confiança, com os limites inferiores e superiores de confiança estimados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma patologia genética de importante incidência em todo mundo. Além do “agravo” que já é peculiar da sua patogênese, pessoas que vivem em países de terceiro mundo, com um acesso limitado à atenção básica em saúde, técnicas diagnósticas e tratamento, enfrentam o Lúpus sob um ângulo ainda pior.

Dentro desta perspectiva, se faz imprescindível o emprego da ciência e tecnologia para se obter insumos que possibilitem a elaboração de técnicas diagnósticas e terapêuticas. Por isso, vimos a importância em se estudar, aplicado à esta patologia, a expressão do HLA-DRB1 dentro da população brasileira.

Esta molécula apresenta uma imensa quantidade de polimorfismos que, embora sejam úteis para o seu processo de atuação, uma vez que possibilitam o reconhecimento dos mais diversos peptídeos; no contexto do rastreio dos alelos promotores ocasiona uma dificuldade enorme, pois desta forma um grande número de alelos compartilha do mesmo segmento gênico e não pode ser facilmente distinguido, pois o sequenciamento dessas estruturas acaba mostrando múltiplas variantes alélicas, que diferem em apenas poucos nucleotídeos.

Estas informações corroboram a nossa dificuldade na definição do alelo em sua apresentação em alta resolução, o que nos levou, para manter a confiabilidade e significância do estudo, apresentar o resultado na apresentação: Gene + Locus Gênico + Grupo Alélico. Grupos de pesquisa que conseguem identificar alelos em resoluções maiores utilizam kits específicos cujas sequências dos *primers* nunca são mostradas e sua comercialização é feita com preços muito elevados, o que dificulta o acesso à muitos pesquisadores e centros de estudos.

Para a caracterização das amostras, a mediana de idade no grupo caso (pacientes com LES) foi de 34,49 anos de idade, enquanto que no grupo controle saudável a média foi de 48,00 anos de idade (*p value*: 0,003591).

Quanto ao gênero, houve predomínio na população feminina, que apresentou 91,01% da incidência. Em contrapartida, o sexo masculino apresentou 8,9% de casos no presente estudo, tendo uma proporção de 8,75 mulheres a cada

homem. A faixa etária do grupo controle foi de O grupo controle tinha faixa etária equivalente, contando com 66,07% de mulheres e 30,3% de homens, tendo 2,294 mulheres para cada homem (*p value*: 0,0009272).

Os dados supracitados, tanto para idade como para gênero, corroboram com a literatura pois de fato reproduz as informações encontradas nas mais diversas pesquisas em todo o mundo, onde o LES teria uma maior incidência em mulheres, sobretudo em idade reprodutiva (PONS-ESTEL et al, 2017; GHODKE-PURANIK & NIEWOLD, 2015).

Ao todo, foram sequenciados 490 alelos para o gene DRB1. Para o grupo de pacientes com LES foram sequenciados um total de 178 amostras em 12 alelos diferentes para DRB1. Já no grupo controle, foram sequenciadas amostras de 69 indivíduos saudáveis, que resultaram no sequenciamento de 10 alelos. A distribuição está descrita na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do sequenciamento das amostras de pacientes com LES para o gene DRB1.

ALELOS	LES	%	CONTROLES	%	p-VALUE	OR	IC DE 95%
DRB1*15	95	26,69%	29	21,64%	0,29	1,31	0,80 a 2,19
DRB1* 03	66	18,54%	23	17,16%	0,79	1,09	0,63 a 1,94
DRB1*04	37	10,39%	22	16,42%	0,08	0,59	0,32 a 1,10
DRB1*14	37	10,39%	23	17,16%	0,04	0,56	0,30 a 1,03
DRB1*13	36	10,11%	8	5,97%	0,21	1,77	0,78 a 4,53
DRB1* 11	27	7,58%	8	5,97%	0,69	1,29	0,55 a 3,38
DRB1*16	21	5,90%	8	5,97%	1	0,98	0,40 a 2,64
DRB1*07	13	3,65%	2	1,49%	0,37	2,49	0,55 a 23,09
DRB1*08	12	3,37%	---	---	0,04	0,51	1,06 a Inf
DRB1*01	7	1,97%	7	5,22%	0,06	0,36	0,10 a 1,24
DRB1*09	3	0,84%	4	2,99%	0,09	0,27	0,04 a 1,66
DRB1*12	2	0,56%	---	---	1	INF	0,07 a Inf

Embora numericamente mais evidentes, os alelos DRB1*15 e DRB1*03 não apresentaram nível de significância consideráveis. Os únicos com *p-value* inferior à 0,05 foram DRB1*08 e DRB1*14 (0,04, com OR: 0,56 para ambos), indicando uma maior relevância destes alelos no grupo doente em relação ao grupo controle.

Em nossa população de estudo, os resultados numéricos de forma isolada apontaram uma incidência quantitativamente maior nos alelos DRB1*15 e

DRB1*03, atingindo 26% e 18% respectivamente das amostras do grupo de pacientes. Estes são os alelos que mostram uma maior incidência nas literaturas dos mais variados países há muitos anos. Cruz-Tapias (et al, 2012) em sua meta-análise, explicita DRB1*03 como principal fator de risco para desenvolvimento de LES na população latino-americana. Já Al-Motwee (et al, 2013), menciona em seu estudo de caso-controle na população lúpica da Arábia Saudita, uma maior susceptibilidade nos portadores do DRB1*15. Ainda em meta-análise, Xue (et al, 2018) mostra forte associação tanto de DRB1*15 como DRB1*03 na população coreana portadora de Lúpus.

Embora este seja o alelo mais documentado na literatura e tenha sido mais expresso quantitativamente nos resultados, quando aplicado aos testes estatísticos, não houve significância inferior à 0,05 ao ser comparado ao grupo controle (DRB1*15: 0,29 e DRB1*03: 0,79).

Dentro dos 12 alelos explicitados pelo sequenciamento, houve significância considerável para DRB1*08 e DRB1*14 (p : 0,04 para ambos). Embora sejam resultados “não-rotineiros” dentro do contexto do LES, já existe em literatura associação entre estes.

Em estudo de caso-controle na população Coreana, Bang (et al, 2016) traz DRB1*08 como um novo alelo associado ao LES, por este estar fortemente associado ao risco de produção de anticorpos anti-Sm, característico na patogênese do Lúpus e um dos marcadores de rastreio para estabelecimento do diagnóstico, bem como associação no desenvolvimento de alterações neurológicas. Além disso, DRB1*08 foi associado como facilitador ao desenvolvimento de Esclerose Sistêmica em meta-análise de Xu (et al, 2018), que também é uma doença autoimune assim como o LES.

Para Katkam (et al, 2018), em seu estudo de caso-controle na população indiana, DRB1*14 teve resultado que o apontava como um fator protetor. Porém, este mesmo estudo traz como principal fator de risco para LES a presença do DRB1*07 como o único com significância aceitável dentro de um universo de 13

alelos estudados, o que também se mostra um resultado atípico dentro dos alelos já associados ao LES nas literaturas de outros países.

Já segundo Hussain (et al, 2011), DRB*14 foi visto como fator de risco em estudo caso-controle realizado no Paquistão, por uma alta associação de sua presença com a incidência de LES, assim como os resultados do presente estudo.

Morris (et al, 2012) realizou estudo de meta-análise na população europeia. Este trouxe DRB1*08 como um alelo prevalente nesta população de estudo, intitulando-o inclusive como um “locus clássico” do LES. Ele refere ainda que em seus resultados, associação também do LES com DRB1*14, embora que em menor frequência se comparado à DRB1*08.

A meta-análise supracitada também realizou análise de haplótipos para a susceptibilidade ao LES e referiu diversas vezes em sua discussão relação dos alelos de DRB1 com DQA1, por haver um forte desequilíbrio de ligação entre estes.

Esta informação já havia sido mencionada muito antes por Mendes (et al, 1998) em estudo de caso controle na população mexicana, que traz em seu artigo que algumas populações podem ter o risco à doença mais fortemente estimulado pela atuação do haplótipo do que pelo alelo de forma isolada. Na ocasião, ele traz que em seus resultados, houve identificação do alelo DRB1*14 em forte desequilíbrio de ligação com o alelo DQA1*05, que é um forte percussor da produção de anticorpos anti-Ro e anti-La, o que poderia explicar os achados da presente pesquisa. Ele traz ainda que houve super-expressão do alelo DRB*08 na população do México. Embora seja uma pesquisa antiga, ressalto sua relevância pelo fato de ser um dos poucos estudos que realizou o rastreo do HLA através de análise do haplótipo, que é uma vertente relevante e pouco trazidas nas pesquisas atuais.

Embora não haja uma descendência direta na população brasileira dos países mencionados como tendo alelos DRB*08 e DRB*14 como relevantes, vale ressaltar a heterogeneidade entre as pesquisas em todo o mundo quando o assunto é HLA, uma vez que o polimorfismo natural desta molécula e a aplicação do fator

ambiental (que se apresenta como fator determinante!) podem diversificar os genes e alelos envolvidos dentro do universo de uma mesma patologia.

Frente ao papel já descrito de cada alelo, comparando com a patogênese do LES, podemos concluir que DRB1*08 têm seus índices aumentados pela sua relação com a produção de anticorpos anti-SM, que são marcadores utilizados na medicina para rastreio diagnóstico. Assim como DRB1*14, que atuaria em desequilíbrio de ligação com o alelo DQA1*05 na produção de anti-RO e anti-LA, também marcadores de utilidade na rotina médica (Bang et al, 2016; Hussain et al, 2011; MENDES et al, 1998).

Outro achado obtido através de comparação entre as sequências primárias e secundárias foi a incidência de 54,49% (n: 97) de alelos em heterozigose e 45,51% (n: 81) em homozigose, com maiores índices nos haplótipos DRB1*15/ DRB1*15 e DRB1*03/ DRB1*03 (35% e 24% respectivamente), conforme ilustrado no gráfico 1 que segue abaixo:

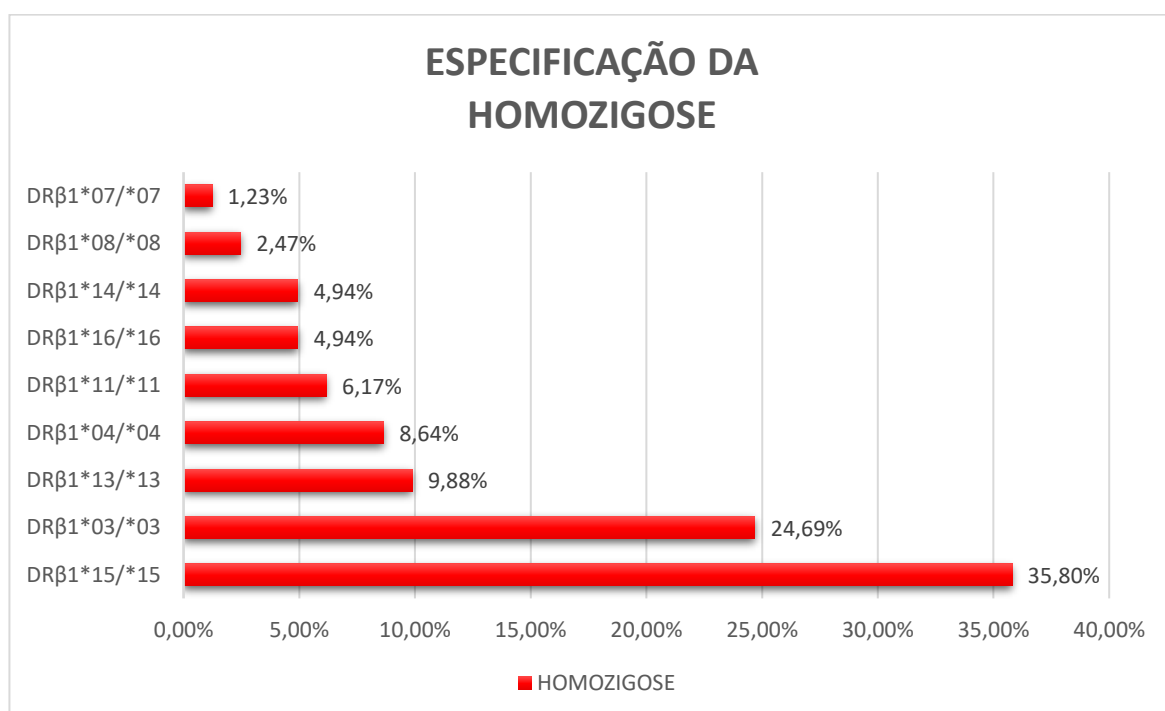


Gráfico 1: Especificações dos alelos DRB1 vistos em homozigose dentro do grupo caso (pacientes portadores de LES).

Frente a este achado, Langefeld (et al, 2017) refere em seu estudo de associação feito em população Europeia, Africana e Hispânica Ameríndia, para LES, que a heterozigose de alelos caracteriza um maior risco e uma maior intensidade nas manifestações clínicas da doença em curso se comparado à homozigose, o que também se confirmou na presente pesquisa, cujos resultados apontaram para incidência de 54,49% (n: 97) de alelos em heterozigose *versus* 45,51% (n: 81) para homozigose.

Alguns resultados ainda não foram passíveis de explicações, como o fato da alta incidência dos alelos DRB*15 e DRB*03, até então vistos com “clássicos” na literatura, estarem em altos valores no grupo controle. Haverão esforços posteriores do presente grupo de pesquisas na tentativa de elucidar esta questão.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foram encontrados dados significativos que evidenciam associação entre os alelos DRB1*08 e DRB1*14 como fatores de risco ao desenvolvimento do Lúpus Eritematoso Sistêmico dentro da população Pernambucana, sem significância nos demais 10 alelos encontrados. Houve ainda maior incidência de alelos em heterozigose no grupo de pacientes (caso), caracterizando-a então um fator de risco ao LES, bem como uma incidência maior no sexo feminino e em idade reprodutiva (média de 30 anos).

Este trabalho é o primeiro, no Brasil, a descrever e quantificar a associação de alelos DRB1 com o LES, contribuindo assim para o entendimento etiológico da doença em nosso país, bem como podendo ser base para a elaboração de técnicas de diagnóstico molecular para tal doença.

REFERÊNCIAS

- AL-MOTWEE, S.; JAWDAT, D.; JEHANI, G. S.; Anazi, H.; SHUBAILI, A.; SUTTON, P.; UYAR, A. F.; HAJEERC, A. H. **Association of HLA-DRB1*15 and HLA-DQB1*06 with SLE in Saudis**. Ann Saudi Med 2013. DOI: [10.5144/0256-4947.2013.229](https://doi.org/10.5144/0256-4947.2013.229).
- ALI, A.; SAYYED, Z.; AMEER, M. A.; ARIF, A. W.; KIRAN, F. N. U.; IFTIKHAR, A.; IFTIKHAR, W.; AHMAD, M. Q.; MALIK, M. B. KUMAR, V.; DASS, A.; SAMI, S. A.; SAPNA, F. N. U.; WAGAS, N. **Systemic Lupus Erythematosus: An Overview of the Disease Pathology and Its Management**. Rev. Cureus, 2018. DOI: [10.7759/cureus.3288](https://doi.org/10.7759/cureus.3288).
- AMUR, S.; PAREJH, A.; MUMMANENI, P. **Sex differences and genomics in autoimmune diseases**. Journal of Autoimmunity, London, v. 38, p. 254-265, 2012. DOI: [10.1016/j.jaut.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.12.001).
- ASSIS, M. R.; BAAKLINI C. E. **Lúpus Eritematoso Sistêmico**. Revista Brasileira de Medicina. Ed. Moreira Jr, 2009.
- BALACHANDRAN, A.; MATHEW, A. J. **SLICC classification criteria for SLE**. Rev. Evidence Based Medicine, 2015.
- BALESTIERI, F. M. P. **Imunologia**. Editora Manole, 1ª Ed. Barueri, São Paulo – SP, p. 477-495, 2006.
- BANG, S. Y.; CHOI, J. Y.; PARK, S.; CHOI, J.; HONG, S. J.; LEE, H. S.; CHOI, C. B.; BAE, S. C. **Influence of HLA-DRB1 Susceptibility Alleles on the Clinical Subphenotypes of Systemic Lupus Erythematosus in Koreans**. Rev. Arthritis & Rheumatology, 2016. DOI: [10.1002/art.39539](https://doi.org/10.1002/art.39539).
- BERTSIAS, G. K.; PAMFIL, C.; FANOURIKIS, A.; BOUMPAS, D. T. **Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: has the time come?** Rheumatology. Nature Reviews, 2013. DOI: [10.1038/nrrheum.2013.103](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.103).
- BEZERRA, E. L. M.; VILAR, M. J. P.; B. O. F. C.; BARBOSA, O. F. C.; SANTOS, S. Q.; CASTRO, M. A.; TRINDADE, M. C.; SATO, E. I. **Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES): Perfil clínico-laboratorial dos pacientes do Hospital Universitário Onofre Lopes (UFRN-NATAL/BRASIL) e índice de dano nos pacientes com diagnóstico recente**. Revista Brasileira de Reumatologia, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042005000600002>.
- CARROL, M. C. **A protective role for innate immunity in Systemic Lupus Erythematosus**. Nature Review Immunologys, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1456>.
- COSTI, L. R.; IWAMOTO, H. M.; NEVES, D. C. O.; CALDAS, C. A. M. **Mortality from systemic erythematosus lupus in Brazil: evaluation of causes according**

to the government health database. Rev. Bras. Reumatologia. Elsevier Editora, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.09.001>.

CRUZ-TAPIAS, P.; PÉREZ-FERNANDEZ, O. M.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; RODRIGUEZ, A.; ARANGO, M. T.; ANAYA, J. M. **Shared HLA class II in six autoimmune diseases in Latin America: A Meta-Analysis.** Rev. Autoimmune Diseases, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/569728>.

D'CRUZ, D. P.; KHAMASHTA, M. A.; HUGHES, G. R. V. **Systemic lúpus erythematosus.** Lancet, London, v. 369, p. 587-596, 2007. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60279-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60279-7).

DENG, Y.; TSAO, B. P. **Updates in Lupus Genetics.** Curr. Rheumatol. Rep. Springer Science, 2017. DOI: [10.1007/s11926-017-0695-z](https://doi.org/10.1007/s11926-017-0695-z).

FERNANDES, A. P. M.; MACIEL, L. M. Z.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. **Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças autoimunes endócrinas.** Arquivo brasileiro de endocrinologia metabólica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo – SP, 2003. DOI: [10.1590/s0004-27302003000500015](https://doi.org/10.1590/s0004-27302003000500015).

GHODKE-PURANIK, Y.; NIEWOLD, T. B. **Immunogenetics of Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Review.** Journal Autoimmunity, 2015. Indexed for MEDLINE. DOI: [10.1016/j.jaut.2015.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.004).

GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. V. **MHC structure and function – antigen presentation - Part 2.** Reviewing Basic Sciences. Hospital Israelita Albert Einstein, 2014. DOI: [10.1590/S1679-45082015RB3123](https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3123).

GULATI, Gaurav Gulati, MD, n , Hermine I. Brunner, MD. **Environmental triggers in systemic lupus erythematosus.** Rev. Elsevier, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.10.001>.

HUSSAIN, N.; JAFFERY, G.; SABRI, A. N. **HLA Association in SLE patients from Lahore-Pakistan.** Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2011. DOI: [10.17305/bjbms.2011.2618](https://doi.org/10.17305/bjbms.2011.2618).

KATKAM, S. K.; RAJASEKHAR, L.; KUTALA, V. K. **The influence of functional polymorphic positions of HLA-DRB1 molecules on risk for South Indian systemic lupus erythematosus patients.** Journals Sagepub, 2018. DOI: [10.1177/0961203318759200](https://doi.org/10.1177/0961203318759200).

KAUL, A.; GORDON, C.; CROW, M. K.; TOUMA, Z.; UROWITZ, M. B.; VOLLENHOVEN, R. V.; RUIZ-IRASTORZA, G.; HUGHES, G. **Systemic lupus erythematosus.** Nature Reviews, 2016. DOI: [10.1038/nrdp.2016.39](https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.39).

LANGFELD, C. D.; AINSWORTH, H. C.; CUNNINGHAME-GRAHAM, D. S.; et al. **Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus.** Rev. Nature, 2017. DOI: [10.1038/ncomms16021](https://doi.org/10.1038/ncomms16021).

MAIDHOF, W.; HILAS, O. **Lupus: An overview of the disease and management options.** Pharmacy and Therapeutics, Yardley, v. 37, n. 4, p. 240-249, 2012. DOI: [PMC3351863](https://doi.org/10.1002/0471142735.ima01s52).

McCLUSKEY, J.; KANAAN, C.; DIVINEY, M. **Nomenclature and Serology of HLA Class I and Class II Alleles.** Current Protocols in Immunology, Wiley Online Library, 2017. DOI: [10.1002/0471142735.ima01s52](https://doi.org/10.1002/0471142735.ima01s52).

McDEVITT, O. H. **Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response.** Annu. Rev. Immunology, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.1>.

MENDEZ, C. B.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.K.; VARGAS-ALARCON, G.; IZELUDLOW, D.; ALCOCER-VARELA, J.; GRANADOS, J. **Haplotype Distribution of Class II MHC Genes in Mexican Patients with Systemic Lupus Erythematosus.** Scand J. Rheumatology, 1998. PMID: [9808402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9808402/).

MORRIS, D. L.; TAYLOR, K. E.; FERNANDO, M. M.A.; et al. **Unraveling Multiple MHC Gene Associations with Systemic Lupus Erythematosus: Model Choice Indicates a Role for HLA Alleles and Non-HLA Genes in Europeans.** The American Journal of Human Genetics, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.026>.

MOULTON, V. R.; SUAREZ-FUEYO, A.; MEIDAN, E.; LI, H.; MIZUI, M.; TSOKOS, G. C. **Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: a cellular perspective.** Trends in Molecular Medicine. Elsevier, 2017. DOI: [10.1016/j.molmed.2017.05.006](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.05.006).

NAKASHIMA, C. A. K.; GALHARDO, A. P.; SILVA, J. F. M.; MENOLLI, R. A. **Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do lupus eritematoso sistêmico em cidade do sul do Brasil.** Revista Brasileira de Reumatologia, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042011000300004>.

NORMAN, R. A. **The history of Lupus Erythematosus and Discoid Lupus: from Hippocrates to the present.** College of medicine, University of Central Florida - USA. Lupus Open Access, 2016.

PONS-ESTEL, G. J.; UGARTE-GIL, M. F.; ALÁRCÓN, G. S. **Epidemiology of systemic lupus erythematosus.** Expert Review of Clinical Immunology, 2017. DOI: [10.1080/1744666X.2017.1327352](https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1327352).

RAJ, P.; RAI, E.; SONG, R.; KHAN S.; WAKELAND, B. E.; VISWANATHAN, K.; et al. **Regulatory polymorphisms modulate the expression of HLA class II molecules and promote autoimmunity.** Rev. Elife, 2016. DOI: [10.7554/eLife.12089](https://doi.org/10.7554/eLife.12089).

SELMÍ, C. **Autoimmunity in 2017.** Clinical reviews in allergy & immunology. Springer Science (part of Springer Nature), 2018. DOI: [10.1007/s12016-018-8699-7](https://doi.org/10.1007/s12016-018-8699-7).

SMITH, C. D.; CYR, M. **The history of lupus erythematosus: From Hippocrates to Osler.** *Rheumatology Diseases Clinical North American*, 1988. PMID: 3041483.

SOUZA, D. C. C.; SANTO, A. H.; SATO, E. I. **Mortality Profile Related to Systemic Lupus Erythematosus: A Multiple Cause-of-death Analysis.** *The Journal of Rheumatology*, 2012. DOI: [10.3899/jrheum.110241](https://doi.org/10.3899/jrheum.110241).

THEOFILOPOULOS, A. N.; KONO, D. H.; BACCALA, R. **The Multiple Pathways to Autoimmunity.** *Nature Immunology*, 2017. DOI: [10.1038/ni.3731](https://doi.org/10.1038/ni.3731).

TORRES, M. A.; MORAES, M. E. H. **Nomenclatura dos fatores do sistema HLA.** Dep. Pat. Clínica, Hosp. Israelita Albert Einstein, São Paulo – SP, 2011. DOI: [10.1590/S1679-45082011MD1914](https://doi.org/10.1590/S1679-45082011MD1914).

TROWSDALE, J.; KNIGHT, J. C. **Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease.** *Annual Rev. Genomics Human Genetic*, 2013. DOI: [10.1146/annurev-genom-091212-153455](https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153455).

WAKELAND, E. K.; LIU, K.; GRAHAM, R. R.; BEHRENS, T. W. **Delineating the Genetic Basis of Systemic Lupus Erythematosus.** *Immunity*, 2001. p. 397-408. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00201-1).

WEIDENBUSCH, M.; KULKARNI, O. P.; ANDERS, H. J. **The innate immune system in human systemic lupus erythematosus.** Review Article. *Rev. Clinical Science*, Portland Press, 2017. DOI: [10.1042/CS20160415](https://doi.org/10.1042/CS20160415).

XU, Y.; MO, N.; JIANG, Z.; FU, S.; WEI, X.; ZHAO, D.; XIE, Z.; JIA, W.; LIU, J.; WANG, X.; SHI, D.; JIAO, Y.; LIU, C.; YANG, X. **Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 allele polymorphisms and systemic sclerosis.** *Journal Modern Rheumatology*, 2018. DOI: [10.1080/14397595.2018.1519148](https://doi.org/10.1080/14397595.2018.1519148).

XUE, K.; NIU, W. Q.; CUI, Y. **Association of HLA-DR3 and HLA-DR15 Polymorphisms with Risk of Systemic Lupus Erythematosus.** *Chinese Medical Journal*, 2018. DOI: [10.4103/0366-6999.246058](https://doi.org/10.4103/0366-6999.246058).

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA

--	--	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INTERAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DA APOL1 E MYH9 COM JC POLIOMA VIRUS E EVOLUÇÃO PARA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM PACIENTES COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E GLOMERULOSCLEROSE SEGMENTAR E

Pesquisador: Gisela Vajgel Fernandes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56719116.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.712.037

Apresentação do Projeto:

O projeto será desenvolvido pela Nefrologista Gisela Vajgel Fernandes, sob orientação da Profa. Paula Sandrin Garcia, do Departamento de Genética com Laboratório no LIKA. Os pacientes serão provenientes do HC-UFPE, IMIP e EPM-UNIFESP.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o papel do polimorfismo nos genes APOL1 e MYH9 na nefrite lúpica e comparar com a glomerulosclerose segmentar e focal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores mencionam os riscos da coleta de sangue para avaliação de material genético, porém no TCLE é mencionado também a coleta de amostra de rim para biópsia.

Benefícios: O acesso direto à equipe médica e o fato de tomarem conhecimento sobre a propensão para rápida progressão da doença renal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos aspectos foram abordados de forma clara.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora aceitou e corrigiu as pendências apresentadas.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **Cep:** 50.745-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (51) 2125-8588

E-mail: capcoe@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer 1.713.037

Recomendações:

A pesquisadora informa que vai utilizar, dentro dos critérios de inclusão, dados da biópsia renal, no entanto, não deixa claro se a biópsia será feita durante o processo da pesquisa, ou se já teria sido realizada previamente e apenas os dados serão utilizados. Caso a biópsia vá ser realizada, os riscos do procedimento deverão constar nos riscos no projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais e critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (Item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do(a) pesquisador(a) assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. de Engenharia s/nº + 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Cidade: Cidade Universitária **CeP:** 50.745-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2125-8585

e-mail: cepsccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.712.037

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_690924.pdf	02/09/2016 18:17:08		Aceito
Outros	carta_resposta_CEP.docx	02/09/2016 18:16:32	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	carta_anuencia_LIKA_gisele_nova.pdf	02/09/2016 18:14:35	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_nefrite_GESF-versao_2.docx	23/08/2016 22:45:10	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	carta_anuencia_LIKA.jpeg	25/05/2016 17:44:58	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Anuencia_EPM_carimbo.pdf	25/05/2016 17:44:06	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_genetica_nefrite_lupica_GESF_maior16.pdf	16/05/2016 20:48:49	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	carta_anuencia_NefroHCassinada.pdf	12/05/2016 17:50:30	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_APOL1_MYH9_LES.pdf	12/05/2016 17:49:18	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Paula_Sandrin.pdf	06/05/2016 17:16:06	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Nadja_Asano.pdf	06/05/2016 17:15:47	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Maria_Alina.pdf	06/05/2016 17:15:27	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Lucila.pdf	06/05/2016 17:14:52	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Gianna_Mastrolanni.pdf	06/05/2016 17:14:33	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Denise_Maria.pdf	06/05/2016 17:14:12	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Camila_Barbosa.pdf	06/05/2016 17:13:54	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	Curriculo_Gisele_Vajgel.pdf	06/05/2016 17:13:21	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Outros	carta_anuencia_impassinada.jpg	06/05/2016 17:12:44	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_nefrite_GESF.docx	10/04/2016 19:36:01	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

Cep: 50.740-800

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81) 2125-8585

E-mail: cepce@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serem Humanos

2013-2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Contratação do Parecer: 1712.237

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

RECIFE, 05 de Setembro de 2016

Assinado por:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1ª andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

Cel: 50.745-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81) 2126-5555

E-mail: cepcon@ufpe.br