

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



UFPE

BRUNO DE MELO CORRÊA

**AVALIAÇÃO DO LÓCUS HLA-DRB1* COMO FATOR
PREDITIVO PARA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE**

RECIFE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**AVALIAÇÃO DO LÓCUS HLA-DRB1* COMO FATOR
PREDITIVO PARA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do
grau de mestre.

ORIENTADORES

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes

Professor Adjunto do Departamento de Medicina Clínica do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Professor Associado do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco

**RECIFE
2010**

Corrêa, Bruno de Melo

Avaliação do lócus HLA-DRB1* como fator preditivo para evolução da infecção pelo vírus da hepatite B em doadores de sangue / Bruno de Melo Corrêa. – Recife: O Autor, 2010.

73 folhas: il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências da Saúde, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Hepatite B. 2. Antígenos HLA. 3. Complexo Maior de Histocompatibilidade. 4. HLA e infecção por HBV.
I. Título.

616.36-002
616.362 3

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-155

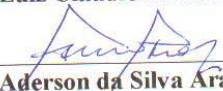


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**RELATÓRIO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE BRUNO DE MELO CORRÊA,
ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, TURMA
INICIADA EM 2008 (DOIS MIL E OITO)**

Às nove horas, do dia dezenove de agosto de dois mil e dez, no Prédio das Pós-Graduações do CCS, tiveram início, pelo Coordenador do Curso, Prof. Dr. José Ângelo Rizzo, o trabalho de Defesa de Dissertação, do mestrando Bruno de Melo Corrêa, para obtenção do **Grau de Mestre em Ciências da Saúde** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. A Comissão Julgadora eleita pelo Colegiado do Curso e homologada pelas Câmaras de Pesquisa e Pós-Graduação foi formada pelos professores: **Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar**, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, na qualidade de Presidente, **Dr. Aderson da Silva Araújo**, do Hemope, **Dr. Marcos Andre Cavalcanti Bezerra** do Departamento de Biofísica da UFPE. A Dissertação apresentada versou sobre: "**Avaliação do Locus HLS-DRB1 * e a Susceptibilidade para a Infecção pelo Vírus da Hepatite B em Doadores de Sangue**" tendo como orientador o Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, do Departamento de Medicina Clínica da UFPE. Após a explanação de 30 minutos feita pelo candidato, justificando a escolha do assunto, objetivos da Dissertação, metodologia empregada e resultados obtidos, ilustrados com diapositivos, foram realizadas as arguições pela Banca Examinadora, todos no tempo regulamentar e respondido pelo candidato. Ao término das arguições, a Banca avaliou em secreto e proferiu o seguinte resultado: Aprovado. Nada mais havendo a registrar, foram encerrados os trabalhos, do que, para constar, foi elaborado o presente relatório que vai assinado pelo Senhor Presidente e demais membros da Comissão Julgadora. Recife, 19 de agosto de 2010.


Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar (Presidente)


Prof. Dr. Aderson da Silva Araújo


Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

COORDENADOR

José Ângelo Rizzo

VICE-COORDENADOR

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Ângela Luiza Pinto Duarte

Prf^a. Arméle de Fátima Dornelas de Andrade

Prof. Brivaldo Markman Filho

Prof. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira

Prof. Edgar Guimarães Victor

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Prf^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof. Jair Carneiro Leão

Prf^a Jocelene Tenório de Albuquerque M. Godoi

Prof. José Ângelo Rizzo

Prf^a Luciane Soares de Lima

Prof. Lúcio Vilar Rabelo Filho

Prf^a Magdala de Araújo Novaes

Prf^a. Maria de Fátima Militão de Albuquerque

Prof. Odwaldo Barbosa e Silva

Prf^a. Simone Cristina Soares Brandão

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida e por me ensinarem a ter compromisso, dignidade e compaixão aos meus semelhantes.

AGRADECIMENTOS

Aos doadores de sangue que concordaram em participar deste estudo e que mantiveram a esperança de alcançar benefício.

Aos orientadores Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes e Prof^a Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência. Gostaria de ratificar as suas competências, participação com discussões, sabias idéias, sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação: Ciências da Saúde, Prof. Dr. José Ângelo Rizzo e Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

A Dra. Lúcia Dourado por sua contribuição na entrevista aos doadores de sangue, colegas do Serviço de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), em especial aos do setor de sorologia do doador onde na minha ausência davam seguimento ao processo de coleta de amostras, por sempre me incentivarem na busca do crescimento, sendo exemplos de competência, garra, determinação e disciplina.

Aos Professores Dr. José Ângelo Rizzo e Dra. Cíntia Machado, pela revisão preliminar desta Dissertação.

Aos colegas de curso, pelo incentivo e troca de conhecimentos.

Ao Laboratório HLA Diagnóstico e a empresa Biometrix Diagnóstica por ceder equipamentos e reagentes para a realização dos testes de tipificação HLA.

Aos colegas do setor de HLA da Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE), Glauco Willcox, Isa Leão, Neide Gomes, Lúcia Piron, Tirze Krols, pelo apoio.

Aos meus pais Ariovaldo e Raquel Corrêa e irmãos Carlos Augusto e Míria.

A minha esposa Rafaella Corrêa pelo amor e apoio integral.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

“Ninguém nasce odiando outra pessoa pela cor de sua pele, ou por sua origem, ou sua religião. Para odiar, as pessoas precisam aprender, e se elas aprendem a odiar, podem ser ensinadas a amar, pois o amor chega mais naturalmente ao coração humano do que seu oposto.”

Nelson Mandela

“Se fazer fosse tão fácil quanto saber o que seria bom fazer, as capelas seriam igrejas, e as choupanas dos pobres, palácios de príncipes.”

William Shakespeare

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-HBs	Anticorpo contra o Antígeno da Hepatite B
CCS	Centro de Ciências da Saúde da UFPE
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	Intervalo de Confiança
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FE	Fração Etiológica
FP	Fração Preventiva
HBcAg	Antígeno do Core do Vírus da Hepatite B
HBsAg	Antígeno da Hepatite B
HCC	Cirrose Hepatocelular
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-A*	Antígeno Leucocitário Humano Locus A
HLA-B*	Antígeno Leucocitário Humano Locus B
HLA-C*	Antígeno Leucocitário Humano Locus C
HLA-DRB1*	Antígeno Leucocitário Humano Locus DRB1*
HLA-DQB1*	Antígeno Leucocitário Humano Locus DQB1*
HLA-DPB1*	Antígeno Leucocitário Humano Locus DPB1*
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
IFN	Interferon
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade

MHC I	Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I
MHC II	Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe II
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RR	Risco Relativo
SSP	Sequência Específica de Primers
SSOP	Sequência Específica de Oligonucleotídeos Probes
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura gênica do MHC humano	25
Figura 2	Moléculas HLA de classe I e II	26
Figura 3	Transmissão haplotípica dos genes HLA-A, B e DR	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomenclatura HLA de classe I	32
Tabela 2	Nomenclatura HLA de classe II	32
Tabela 3	Distribuição de frequência dos alelos HLA-DRB1* entre casos com HBV e controles.....	61
Tabela 4	Distribuição das 78 possíveis combinações de alelos HLA-DRB1* na população de estudo segundo a presença/ausência de hepatite B.....	62
Tabela 5	Associação entre as 78 combinações possíveis encontradas entre os 13 alelos HLA-DRB1* e infecção pelo HBV.....	64
Tabela 6	Regressão logística multivariada de associação entre infecção pelo HBV e variáveis do locus DRB1*(*08,*09,*12,*15) estratificada por sexo.....	65
Tabela 7	Regressão logística multivariada de associação entre hepatite B e variáveis do locus DRB1*(*08,*09,*12,*15) estratificada por idade.....	66

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	16
ARTIGO DE REVISÃO	20
Influência do Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) na Evolução das Infecções Pelos Vírus das Hepatites B e C	21
Resumo	22
Abstract	23
Introdução	24
Estrutura e Função do Sistema HLA	25
Métodos de Tipificação HLA	27
Nomenclatura Atual	29
Sistema HLA e Doenças	33
Sistema HLA e Hepatites Virais	35
Referências	40
ARTIGO ORIGINAL	47
Avaliação do locus HLA-DRB1* como fator preditivo para evolução da infecção pelo vírus da Hepatite B em doadores de sangue	48
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Casuística e Métodos	53
Resultados	56
Discussão	57
Referências	67
ANEXOS	71
ANEXO A	72
ANEXO B	73

RESUMO

Fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão envolvidos na patogênese de diversas doenças. Dentre essas influências, o sistema de histocompatibilidade (HLA) se destaca pelo seu polimorfismo e capacidade de conferir susceptibilidade ou resistência a vários distúrbios imunomediados. De acordo com o grupo étnico-racial estudado, observam-se variações no perfil HLA relacionadas a idade de surgimento, o curso clínico e resposta ao tratamento de algumas doenças (2).

Os genes do HLA são os mais polimórficos dos mamíferos (2,6). É possível que o polimorfismo exista para garantir a sobrevivência das espécies (5). A herança de um haplótipo materno e paterno em co-dominância faz com que cada pessoa possa expressar em suas células diferentes moléculas do HLA, o que lhe confere a vantagem de apresentar mais peptídeos antigênicos às células T, possibilitando assim uma maior cobertura da resposta imune (7). Quanto maior o polimorfismo do HLA numa população, maior será a probabilidade de um indivíduo herdar haplótipos diferentes e, portanto, ser heterozigoto para todos os loci (7).

Para a compreensão dos mecanismos de associação das moléculas de histocompatibilidade com as doenças é imprescindível conhecer a nomenclatura dos diversos componentes do MHC, os métodos pelos quais os antígenos e os alelos de histocompatibilidade são identificados, e ainda a função das moléculas de HLA no sistema imune. Assim, torna-se mais fácil o entendimento dos mecanismos pelos quais as moléculas de histocompatibilidade participam da patogenia das doenças, conferindo susceptibilidade ou proteção contra o seu desenvolvimento (2). Os produtos dos genes HLA-DRB1*, DQB1* e DPB1* são as moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II, que estão envolvidas na rejeição contra enxertos e na apresentação de peptídeos aos receptores dos linfócitos T (8).

O grande avanço na tipificação do polimorfismo HLA, indubitavelmente, ocorreu no final da década de 80 com o advento das técnicas que utilizam biologia molecular. Nesses casos, não são os antígenos expressos nas superfícies celulares que são tipificados, mas sim os grupos de alelos ou os alelos individualmente do DNA genômico (1).

Em relação à associação do HLA com doenças, é importante ressaltar que nem todos os indivíduos portadores de alelos associados à susceptibilidade a determinadas doenças irão desenvolvê-las e, por outro lado, muitos daqueles acometidos por doenças relacionadas ao HLA não possuem antígenos e alelos associados à mesma (18).

A resposta imune é coordenada pelas moléculas HLA de classe I e II, as quais apresentam antígenos virais e bacterianos para os linfócitos T CD8⁺ citotóxico e T CD4⁺ helper, respectivamente. Os genes encontrados nesta molécula são os mais polimórficos do genoma humano e são os ideais para investigação de associação com o curso da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) (19).

Considerando a relevância que a infecção pelo HBV apresenta na população do estado de Pernambuco, realizou-se durante o ano de 2009, estudo sobre a associação dos antígenos HLA com a infecção pelo HBV em doadores de sangue do HEMOPE. Desta pesquisa resultaram dois artigos que compõem esta dissertação de mestrado.

O primeiro deles consta de uma revisão da literatura sobre o tema HLA e hepatites virais estruturada em tópicos, nos quais são discutidas e apresentadas a estrutura e função das moléculas do HLA, seus métodos de tipificação, a nomenclatura atual, a associação desse sistema com doenças, especialmente as hepatites virais e seus meios de diagnósticos. Para a definição de aspectos conceituais, foram utilizados livros-texto e artigos citados nas referências obtidas na revisão, e para o emprego das normas

legais foram pesquisadas as páginas de instituições nacionais e internacionais na *Internet*, perfazendo um total de 52 referências.

O segundo artigo, original, configura-se em estudo sobre a necessidade de entender melhor a resposta imune do organismo frente a infecção pelo HBV em amostras de doadores de sangue da Fundação HEMOPE, realizado no período de dezembro de 2008 a dezembro de 2009, com desenho de estudo do tipo caso controle. Tem como objetivo principal descrever e comparar a frequência genotípica para os alelos HLA de classe II presentes nos loci DRB1* em doadores de sangue com a infecção pelo HBV e imunes contra esta infecção no Estado de Pernambuco.

Palavras-chave: antígenos HLA, Complexo Maior de Histocompatibilidade, Hepatites, HLA e infecção por HBV.

Referências

1. Crésio Alves, Thaisa Souza, Sâmia Veiga, Cândida Alves, Maria Betânia Toralles, Denise Lemaire. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 2005;27(4):274-86.
2. Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2000;33:7-18.
5. Van Rood JJ. The impact of the HLA-system in clinical medicine. *Shweiz Med Wschr* 1993;123:85-92.
6. Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2003;47:601-11.
7. Turner D. The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sanguinis* 2004;87:S87-90.
8. Nepon BS & Nepon GT. Polyglot and polymorfism – An HLA update. *Arthritis Rheum* 38: 1715 – 1721, 1995.
18. Van Rood JJ. The impact of the HLA-system in clinical medicine. *Shweiz Med Wschr* 1993;123:85-92.
19. Alatrakchi, N and Koziel, M. J.: Antiviral T-cell responses and therapy in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 2003, 39, 631-634.

ABSTRACT

Genetic, immunological and environmental factors are involved in the pathogenesis of several diseases. Among the genetic influences, the histocompatibility system (HLA) is distinguished by its polymorphism and the capacity to confer susceptibility or resistance to various immune-mediated disorders. According to the ethnic-racial group studied, there are variations in the HLA profile related to age of onset, clinical course and response to treatment of some diseases (2).

HLA genes are the most polymorphic of mammals (2,6). It is possible that this polymorphism exists to ensure the survival of species (5). The inheritance of a in maternal and paternal haplotype in co-dominance means that each person can carry in their cells different HLA molecules, which gives it the advantage of providing more antigenic peptides to T cells, thus allowing greater coverage of the immune response (7). The higher the HLA polymorphism in a population, the greater the probability of an individual to inherit different haplotypes and therefore be heterozygous for all loci (7).

To understand the mechanisms of association of histocompatibility molecules with the diseases is essential to know the nomenclature of the various components of the MHC, the methods by which the antigens and the histocompatibility alleles are identified, and even the function of HLA molecules in the immune system. Thus, it becomes easier to understand the mechanisms by which the histocompatibility molecules participate in the pathogenesis of disease, conferring susceptibility or protection against its development (2). The gene products HLA-DRB1 *, DQB1 and DPB1 * * are the classical histocompatibility molecules class II which are involved in graft rejection and in the peptides presentation to the receptors of T lymphocytes (8).

The great advance in the HLA polymorphism typing undoubtedly occurred in the late 80's with the advent of molecular biology techniques. In these cases, it isn't

the antigens located on cell surfaces that are typed, but the groups of alleles or alleles individually from genomic DNA (1). Regarding the association of HLA with diseases, it is important to note that not all individuals carrying alleles associated with susceptibility to certain diseases will develop them, and on the other hand, many of those affected by diseases related to HLA antigens and alleles are not associated to them (18).

The immune response is coordinated by the molecules HLA class I and II, which present viral and bacterial antigens to T cells and CD8 + cytotoxic CD4 + T helper, respectively. The genes found in this molecule are the most polymorphic of the human genome and are ideal for the investigation of its association with the course of infection with hepatitis B virus (HBV) (19).

Due to the relevance of HBV infection in the population of the state of Pernambuco, was held during the year 2009, a study on the association of HLA with HBV infection in blood donors of HEMOPE. This research resulted in two articles that comprise this dissertation.

The first consists of a literature review about HLA and viral hepatitis structured into topics in which the structure and function of HLA molecules are presented and discussed, their methods of identification, nomenclature, the association of this system with several diseases, especially viral hepatitis and their means of diagnosis. For the definition of conceptual issues, we used text books and articles cited in the references, and for the employment of legal standards were researched in the websites of national and international institutions on the Internet, reaching a total of 52 references.

The second paper, original, is a study on the need to better understand the organism immune response against HBV infection in samples of blood donors of the

HEMOPE Foundation, conducted from December 2008 to December 2009, with case-control design. Its main objective is to describe and compare the genotypic frequencies for HLA class II alleles present in DRB1 * locus in blood donors with HBV infection and immunization against this infection in the state of Pernambuco.

Keywords: HLA, Major Histocompatibility Complex, hepatitis, HLA and HBV infection.

References

1. Crésio Alves, Thaisa Souza, Sâmia Veiga, Cândida Alves, Maria Betânia Toralles, Denise Lemaire. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 2005;27(4):274-86.
2. Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2000;33:7-18.
5. Van Rood JJ. The impact of the HLA-system in clinical medicine. *Shweiz Med Wschr* 1993;123:85-92.
6. Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2003;47:601-11.
7. Turner D. The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sanguinis* 2004;87:S87-90.
8. Nepon BS & Nepon GT. Polyglot and polymorfism – An HLA update. *Arthritis Rheum* 38: 1715 – 1721, 1995.
18. Van Rood JJ. The impact of the HLA-system in clinical medicine. *Shweiz Med Wschr* 1993;123:85-92.
19. Alatrakchi, N and Koziel, M. J.: Antiviral T-cell responses and therapy in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 2003, 39, 631-634.

ARTIGO DE REVISÃO

Influência do Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) na Evolução das Infecções Pelos Vírus das Hepatites B e C

Influence of the human leukocyte antigen (HLA) system in the course of infections by hepatitis B and C virus

Artigo de revisão

Bruno de Melo Corrêa, Mestre em Ciências da Saúde pela UFPE e Biomédico dos Laboratórios de HLA da Fundação HEMOPE e do HLA Diagnóstico LTDA, Recife-PE, Brasil .

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, Professor Adjunto do departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Endereço para correspondência:

Bruno de Melo Corrêa

Rua Simão Mendes, 92/201

CEP 52050/110 - Recife-PE - Brasil.

e-mail: brunomelocorrea@yahoo.com.br

Telefone: (81) 9245-5503

Resumo

A resposta imune é coordenada pelas moléculas HLA de classe I e II, as quais apresentam antígenos virais e bacterianos para as células T CD8⁺ citotóxico e T CD4⁺ helper, respectivamente. Os genes encontrados nesta molécula são os mais polimórficos do genoma humano e são os ideais para investigação de associação com o curso da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). O desenvolvimento de novos métodos para tipificação dos alelos HLA, assim como as mudanças em sua nomenclatura visando facilitar a compreensão de sua função têm permitido melhor entendimento desse sistema. O objetivo deste artigo é fazer revisão das teorias sobre a estrutura e função das moléculas do HLA, seus métodos de tipificação, a nomenclatura atual, seus meios de diagnósticos e a associação desse sistema com doenças, especialmente as hepatites virais. Buscaram-se artigos científicos, nos idiomas português e inglês através das bases de dados Medline via PubMed e Lilacs no período de 1974 a 2010. Os artigos foram selecionados desde que fornecessem informações sobre a função, métodos de tipificação, nomenclatura e associação do sistema HLA com as hepatites pelos vírus B e C. Além da consulta de livros-texto e artigos citados nas referências obtidas na revisão.

Palavras-chave: antígenos HLA, Complexo Maior de Histocompatibilidade, Hepatites, HLA e infecção por HBV.

Abstract

The immune response is coordinated by the HLA class I and II molecules, which present viral and bacterial antigens to T cells and CD8 + cytotoxic CD4 + T helper, respectively. The genes found in this molecule are the most polymorphic of the human genome and are ideal for the investigation of its association with the course of infection with hepatitis B virus (HBV). The development of new methods to typify HLA alleles, as well as changes in its nomenclature to facilitate the understanding of its function have allowed a better understanding of this system. The aim of this paper is to review the theories on the structure and function of HLA molecules, their methods of identification, nomenclature, the association of this system diseases, especially viral hepatitis and their means of diagnosis. Scientific papers were searched, in Portuguese and English through the Medline via PubMed and Lilacs between 1974 and 2008. Articles selected provided information about the function, typing methods, nomenclature and association of HLA with viral hepatitis. In addition textbooks and articles cited in the references were also consulted.

Keywords: HLA, Major Histocompatibility Complex, hepatitis, HLA and HBV infection.

Introdução

Fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão envolvidos na patogênese de diversas doenças. Entre as influências genéticas, o sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) se destaca pelo seu polimorfismo e capacidade de conferir susceptibilidade ou resistência a vários distúrbios imunomediados. De acordo com o grupo étnico-racial, observaram-se variações no perfil HLA relacionadas à idade de surgimento, curso clínico e resposta ao tratamento de algumas doenças.

O desenvolvimento de novos métodos para tipificação dos alelos HLA, assim como as mudanças em sua nomenclatura visando facilitar a compreensão de sua função têm permitido melhor entendimento desse sistema (1).

A presente revisão é apresentada em tópicos, nos quais são discutidas e apresentadas a estrutura e função das moléculas do HLA, seus métodos de tipificação, a nomenclatura atual, a associação desse sistema com doenças, especialmente as hepatites virais.

Foram pesquisados artigos científicos que utilizaram as palavras chaves “HLA” e “hepatite viral”, nos idiomas português e inglês através das bases de dados Medline (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online) via PubMed e Lilacs no período de 1974 a 2008. Os artigos foram selecionados desde que fornecessem informações sobre a função, métodos de tipificação, nomenclatura e associação do sistema HLA com hepatites virais. Devido a sua relevância para o tema, também foram selecionadas através de busca manual as referências indicadas nos artigos selecionados nas bases de dados.

Estrutura e Função do Sistema HLA

O complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) foi descoberto na década de 50, quando anticorpos leucoaglutinadores foram identificados no soro de pacientes politransfundidos e de mulheres múltiparas. Nos seres humanos, o MHC é denominado de HLA e os genes que codificam suas moléculas estão localizados no braço curto do cromossomo 6 (2). O sistema HLA é didaticamente dividido em três regiões: classe I, II e III, conforme sua localização cromossômica. Os loci HLA-A, -B, -C codificam a cadeia α (alfa) das moléculas HLA de classe I clássicas, e estão presentes em praticamente todas as células nucleadas. Os genes HLA-DR, -DQ e -DP codificam as moléculas do HLA de classe II presentes, principalmente, na superfície de células apresentadoras de antígenos, células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. A região de classe III possui genes que codificam componentes do complemento, das enzimas 21-hidroxilase, proteína do choque térmico e fator de necrose tumoral (2,3,4).

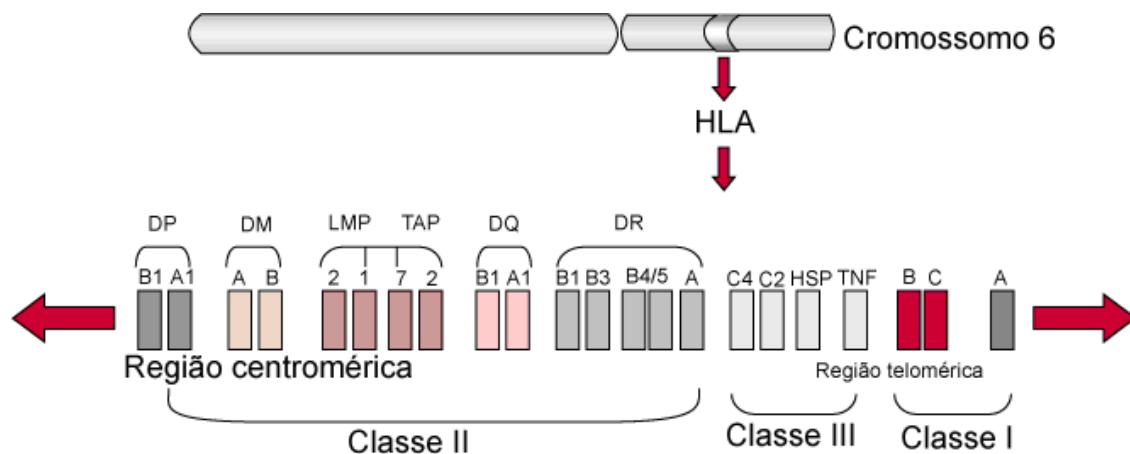


Figura 01: Estrutura gênica do MHC humano, identificando os genes HLA de classe I (HLA-A, B e C), de classe II (HLA-DR, DQ e DP) e os alelos de classe III. Os genes TAP, LMP e HLA-DM codificam proteínas não expressas nas superfícies celulares.

As moléculas de classe I apresentam peptídeos virais e bacterianos aos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Os antígenos produzidos pela degradação intracelular das proteínas do patógeno infectante e conectados às moléculas HLA de classe I são reconhecidos pelos linfócitos CD8⁺ que promovem a lise das células por eles infectadas

(3,4,5). As moléculas HLA de classe II estão envolvidas na apresentação de antígenos virais e bacterianos aos linfócitos CD4⁺ (helper), que secretam citocinas e desempenham importante papel na rejeição de enxertos (3).

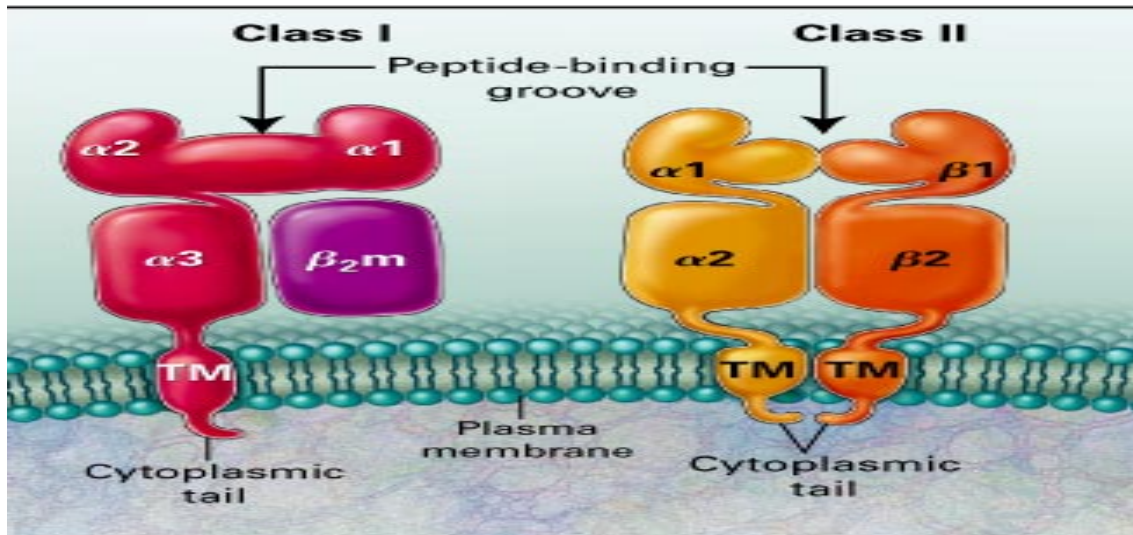


Figura 02: Moléculas HLA de classe I e II: heterodímeros formados por duas cadeias protéicas, uma cadeia pesada (alfa) e uma cadeia leve (beta). Configuram-se como um receptor ao qual pode unir-se um peptídeo.

Os genes do HLA são os mais polimórficos dos mamíferos (2,6). É possível que o polimorfismo exista para garantir a sobrevivência das espécies (5). A herança de um haplótipo materno e paterno em co-dominância faz com que cada pessoa possa expressar em suas células diferentes moléculas do HLA, o que lhe confere a vantagem de apresentar mais peptídeos antigênicos às células T, propiciando maior cobertura da resposta imune (7). Quanto maior o polimorfismo do HLA numa população, maior será a probabilidade de um indivíduo herdar haplótipos diferentes e, portanto, ser heterozigoto para todos os loci (7). A chance de duas pessoas terem HLA idênticos em todos os loci é muito baixa, entretanto irmãos apresentam 25% de chance de terem o mesmo HLA (5). Cinco loci apresentam mais de 1000 alelos detectados na população humana, dentre esses, os mais variáveis são HLA-B* e HLA-DRB1* (6).

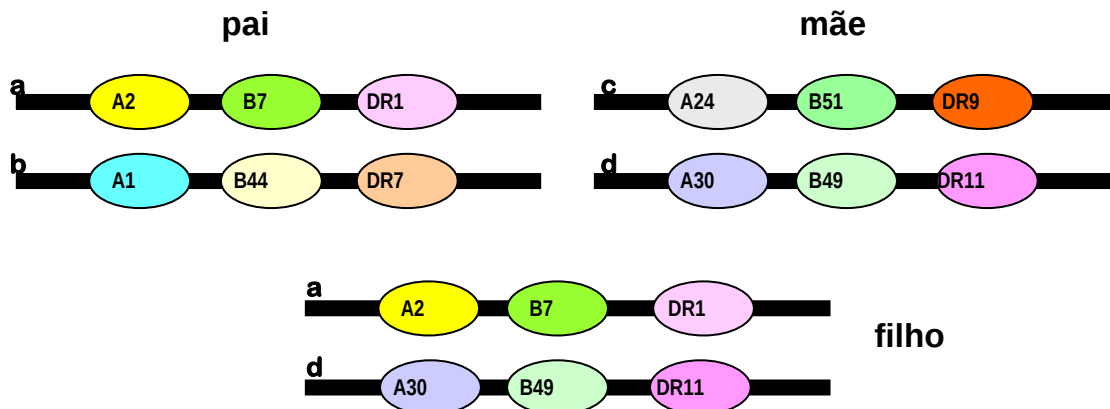


Figura 03: Transmissão haplotípica dos genes HLA-A, B e DR. Cada ser humano herda um haplótipo de cada um dos pais. No exemplo acima o filho herdou o haplótipo “a” do pai e o haplótipo “d” da mãe.

Para a compreensão dos mecanismos de associação das moléculas de histocompatibilidade com as doenças é imprescindível conhecer a nomenclatura dos diversos componentes do MHC, os métodos pelos quais os antígenos e os alelos de histocompatibilidade são identificados, e ainda a função das moléculas de HLA no sistema imune. Assim, torna-se mais fácil o entendimento dos mecanismos pelos quais as moléculas de histocompatibilidade participam da patogenia das doenças, ora conferindo susceptibilidade ora proteção contra o seu desenvolvimento (2).

Os produtos dos genes HLA-DRB1*, DQB1* e DPB1* são as moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II, que estão envolvidas na rejeição contra enxertos e na apresentação de peptídeos aos receptores dos linfócitos T (8).

Métodos de Tipificação HLA

O grande avanço na tipificação do polimorfismo HLA, indubitavelmente, ocorreu no final da década de 80 com o advento das técnicas que utilizam biologia molecular. Nesses casos, não são os antígenos expressos nas superfícies celulares que são tipificados, mas sim os grupos de alelos ou os alelos individualmente do DNA genômico. Para tanto, o DNA é extraído das células nucleadas do sangue periférico ou de outra fonte, como células da mucosa da bochecha, do cabelo ou dos ossos, entre

outros e amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificar a região do genoma a ser avaliada. Dois métodos têm sido bastante utilizados para tipificação dos alelos HLA de classe I ou II, empregando iniciadores (*primers*) ou sondas (*probes*) de oligonucleotídeos com seqüências conhecidas, sendo denominados *sequence specific primers* (SSP) ou *sequence specific oligonucleotide probes* (SSOP).

No método SSP são realizadas várias reações de amplificação, cada uma contendo um par de iniciadores capaz de detectar um grupo de alelos ou um alelo. Os produtos de amplificação são submetidos a uma eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídio, substância fluorescente capaz de se intercalar no DNA, tornando fluorescentes os produtos de amplificação quando o gel é submetido à luz ultravioleta. As bandas com cerca de 150 a 220 pares de bases correspondem aos produtos de amplificação específicos dos genes HLA, enquanto que as bandas com aproximadamente 800 pares de bases correspondem aos produtos de amplificação interna, isto é, servem para confirmar que a amplificação realmente ocorreu (12).

No método SSOP, utiliza-se um par de iniciadores construídos para amplificar uma região genérica de um gene (por exemplo HLA-DR). Em seguida, o DNA amplificado é hibridizado com sondas de oligonucleotídeos capazes de reconhecer os diversos grupos de alelos do gene. Nesse método, o DNA amplificado é desnaturado e fixado em membranas de náilon. As sondas marcadas, com material radioativo ou substância fluorescente, são hibridizadas aos DNA fixados nas membranas quando incubadas em temperaturas adequadas (12).

A tipificação realizada por técnica sorológica permite a identificação de aproximadamente 100 moléculas HLA distintas. Já pela técnica de biologia molecular, mais de 2.241 alelos têm sido identificados (13).

Nomenclatura Atual

A nomenclatura das especificidades HLA é normatizada por um Comitê Internacional que se reúne regularmente para atribuir novos nomes aos genes recentemente descobertos, ou, ainda, mudar a estrutura da nomenclatura vigente. Nas décadas de 70 e 80, os objetivos desse Comitê estavam dirigidos à normatização das nomenclaturas das especificidades HLA, definidas pelos métodos sorológicos ou celulares.

Em virtude do desconhecimento da extensão do polimorfismo do MHC e, também, devido a não disponibilidade de procedimentos metodológicos para avaliação em larga escala do polimorfismo do MHC, as especificidades HLA eram designadas por um ou dois dígitos após a identificação do *locus* HLA de classe I ou II. Assim, com os métodos sorológicos, as especificidades HLA eram definidas da seguinte forma para o *locus* HLA-A: HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A9, HLA-A10 ,etc, até o HLA-A74; para o *locus* HLA-B: HLA-B5, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B12 etc, até o HLA-B78; para o *locus* HLA-C: HLA-Cw1 até o Cw10. A letra “w” (inicial da palavra, em inglês, Workshop) era utilizada em quatro eventualidades:

1) no *locus* HLA-C, a letra era colocada para se evitar confusão com a nomenclatura do Sistema do Complemento, cujos componentes são designados como C1, C2, C3 etc.

2) nos outros *loci* de classe I ou II a letra “w” também era colocada na frente do nome do *locus* para designar que aquela nomenclatura era provisória. Assim que a identidade do antígeno era definida, após tipificação em vários laboratórios de referência, a nomenclatura era definida, e então, a letra “w” era retirada. Desta forma, o antígeno HLA-Bw51, após definição que era uma especificidade diferente do antígeno HLA-Bw52, passava a ser denominado simplesmente HLA-B51.

3) Os antígenos HLA-Bw4 e HLA-Bw6 são definidos como antígenos públicos, posto que os anti-soros anti-Bw4 e Bw6 reagem com diversos antígenos HLA-B bem definidos. Atualmente, sabe-se que esses anticorpos reagem com estruturas compartilhadas pelas moléculas HLA-B, dividindo-as em dois grandes grupos, os que reagem com o anticorpo anti-HLA-Bw4 e aquelas que reagem com o anti-HLA-Bw6.

4) As especificidades de classe II, definidas pelos métodos celulares, não podiam ser classificadas exatamente como aquelas identificadas pela sorologia. A medida em que as tipificações eram definidas por métodos celulares recebiam a denominação HLA-Dw. Mais tarde, com o advento das metodologias utilizando o DNA genômico, verificou-se que, em algumas dessas tipificações, os alelos eram mesmo incluídos dentro das especificidades HLA-DR, como o HLA-Dw4 e o HLA-Dw14, ambos subtipos do antígeno HLA-DR4, atualmente designados como HLA-DRB1*0401 e 0404, respectivamente.

Em outras situações, as especificidades definidas como HLA-Dw eram, na verdade, alelos pertencentes à região HLA-DQ, exemplo HLA-Dw1, sendo, atualmente, designado como HLA-DQB1*0101. A nomenclatura atual elimina a letra “w” em todas essas situações, exceto na denominação do *locus* HLA-C, justamente para não confundir com a nomenclatura do Sistema do Complemento (2,14). Um outro tipo de confusão, relacionada à falta de discriminação do polimorfismo das especificidades de classe I e II pelos métodos sorológicos ou celulares, refere-se aos antígenos que são subtipos (splits) de 12 outros já definidos. Referem-se como exemplos: HLA-A10 (splits HLA-A24 e A25), HLA-B5 (HLA-B51 e B52), HLADR2 (HLA-DR15 e HLADR16), HLA-DR6 (HLADR13 e HLA-DR14) e HLA-DQ1 (HLA-DQ5 e HLA-DQ6). Atualmente, com o

advento dos métodos moleculares, esses problemas não mais ocorrem, pois os alelos já são definidos especificamente (2,14).

Devido ao extenso polimorfismo dos genes HLA, no final dos anos 80 e início dos anos 90, o Comitê Internacional decidiu fazer mudanças no sistema de nomenclatura desses genes. Os *loci* de classe I continuaram com a mesma denominação, ou seja, HLA-A, HLA-B e HLA-Cw, porém, o número total de dígitos foi aumentado para quatro, com a finalidade de abranger todo o polimorfismo já identificado, bem como visando o polimorfismo a ser definido no futuro. Os dois primeiros dígitos referem-se às tipificações sorológicas e os dois seguintes ao alelo específico. Com efeito, o gene que codifica a molécula HLA-A1 passou a ser denominado HLA-A*01, contendo os alelos HLA-A*0101, *0102, *0103, etc.

Uma vez que as especificidades de classe II possuem mais de uma cadeia polimórfica, o Comitê, além de introduzir os quatro dígitos, acrescentou os nomes das cadeias a ou b da molécula de histocompatibilidade na nomenclatura, identificados com as letras A ou B, conforme já mencionado. Assim, o gene que codifica a molécula HLA-DR1 passou a ser denominado HLA-DRB1*01, abrangendo os alelos DRB1*0101, *0102, *0103, *0104, etc, sendo a letra B representativa da cadeia b, altamente polimórfica nos genes HLADR. Posto que a região HLA-DR possui diversos genes para as cadeias b, cada *locus* recebe o número correspondente, como HLA-DRB1*0101, HLADRB3* 0101, HLA-DRB4*0101 e HLA-DRB5*0101. O polimorfismo dos genes HLA-DQ e DP ocorre tanto na cadeia a como na b, sendo, então, designados genes HLA-DQA1/ DQB1 ou HLA-DPA1/DPB1 (2,14).

Tabela01: nomenclatura HLA de classe I (classificação de 2002).

Exemplos de nomenclaturas	Significado
HLA-A, -B, -C	Genes do HLA de classe I que codificam as moléculas de classe I clássicas
HLA-A2, HLA-B1, HLA-Cw2	Moléculas ou antígenos do HLA de classe I definido por sorologia mostrando exemplos de antígenos em cada classe
HLA-A*, HLA-B*, HLA-C*	HLA de classe I definido por biologia molecular
HLA-A*02	HLA de classe I, região (lócus) A, antígeno 02 (codificado por vários alelos), anteriormente definido na sorologia como HLA-A2
HLA-A*0201	HLA de classe I, lócus A, grupo alélico 02, alelo específico 01

Tabela 02: nomenclatura HLA de classe II (classificação de 2002).

Exemplos de nomenclaturas	Significado
HLA-DR, -DQ, -DP	Principais regiões de classe II
HLA-DR1	HLA de classe II, locus –DR, antígeno 1, definido por sorologia
HLA-DRB1*	HLA de classe II, locus –DR, cadeia β , gene 1, definido por biologia molecular
HLA-DRB1*13	HLA de classe II, locus –DR, cadeia β , gene 1, grupo alélico 13 (codificado por vários alelos), antes definido na sorologia como HLA-DR13
HLA-DRB1*1301	HLA de classe II, locus –DR, cadeia β , gene 1, grupo alélico 13, alelo 01 (representa um alelo específico e não, um grupo de alelos)

Em algumas situações, um quinto dígito é adicionado à denominação do alelo, indicando que, embora exista uma substituição de um nucleotídeo no genoma, a sequência de resíduos de aminoácido é mantida por ocasião da codificação das

moléculas de histocompatibilidade. Assim, os alelos HLA-DRB1*01021 e *01022 codificam moléculas com a mesma seqüência de aminoácidos, diferindo apenas em nível genômico. Finalmente, nos casos em que o gene, embora presente no DNA, não codifica a respectiva proteína, introduz-se a letra N (referente a nulo) no final da denominação do alelo, exemplo HLA-A*0104N (2,14).

Sistema HLA e Doenças

No final dos anos 60, os primeiros estudos investigando a associação entre os antígenos de histocompatibilidade e doenças mostraram resultados inconsistentes na avaliação de enfermidades como o linfoma de Hodgking e a leucemia linfóide aguda (15). Entretanto, no início dos anos 70, foi descrita forte associação do antígeno HLA-B27 com a espondilite anquilosante (16).

Dois tipos de estudos têm sido utilizados para abordar a associação entre os marcadores de histocompatibilidade com as doenças: os estudos populacionais e os familiares, sendo que os populacionais são de mais simples execução. Nestes, as freqüências dos antígenos ou dos alelos HLA observadas em um grupo de pacientes com a mesma enfermidade e não aparentados, são comparadas com aquelas verificadas em grupo controle de indivíduos sadios. A ocorrência de associação é avaliada pela comparação das freqüências dos marcadores de histocompatibilidade em pacientes e controles, utilizando-se os dados de uma tabela de contingência. A força da associação é usualmente calculada pelo risco relativo (RR), que indica quão mais freqüente uma doença ocorre em indivíduos com determinado marcador de histocompatibilidade em relação aos indivíduos que não apresentam o marcador. Nos casos em que o RR é maior do que 1, a freqüência do marcador nos pacientes é maior do que nos controles, indicando que aquele marcador está associado com susceptibilidade à doença. Quando o

RR é menor do que 1, tem significado inverso, isto é, o marcador está associado com proteção contra o desenvolvimento da doença.

Nos casos em que o RR é maior do que 1, pode-se calcular a fração etiológica (FE) que estima a magnitude de susceptibilidade ao marcador, em termos populacionais, ou seja, quanto o marcador confere susceptibilidade à doença ou qual a fração da susceptibilidade que é devida ao marcador. Nos casos em que o RR é menor do que 1, calcula-se a fração preventiva (FP), refletindo a magnitude de proteção do marcador, também definido como valor percentual.

Já os estudos familiares verificam se as frequências dos antígenos ou alelos HLA em pacientes são comparáveis aos de seus familiares de primeiro grau, não afetados pela doença. Se existir associação, o alelo ou haplótipo em questão irá ocorrer mais freqüentemente do que o esperado, por segregação gênica (1).

Em relação à associação do HLA com doenças, é importante ressaltar que nem todos os indivíduos portadores de alelos associados à susceptibilidade a determinadas doenças irão desenvolvê-las e, por outro lado, muitos daqueles acometidos por doenças relacionadas ao HLA não possuem antígenos e alelos associados a mesma (18). Quando a associação entre um antígeno HLA e uma doença é estabelecida, várias hipóteses são aventadas para explicá-la (2):

- moléculas do HLA podem funcionar como receptores para alguns agentes etiológicos e assim facilitar ou dificultar a entrada de vírus nas células;
- moléculas do HLA podem participar da patogenia de doenças ao selecionarem qual peptídeo antigênico será apresentado ao linfócito T. Por exemplo, o antígeno HLA-B53 protege contra as formas graves de malária por apresentar um peptídeo imunodominante do parasita aos linfócitos;

- moléculas do HLA podem causar doenças pelo mimetismo molecular entre os antígenos HLA e patógenos. Alguns sítios HLA se assemelham à sequência de antígenos exógenos e ao se ligar a estes determinam resposta imune de ataque. Se este antígeno exógeno exibir similaridade estrutural com proteínas próprias, a resposta imune pode atacar também estruturas do próprio indivíduo;
- células que normalmente não expressam moléculas HLA de classe II podem apresentar aos linfócitos T antígenos derivados da degradação do próprio tecido, levando a doenças auto-imunes;
- algumas moléculas do HLA podem ter afinidade alta ou baixa por determinado peptídeo derivado de um antígeno causador de doença. Tal associação do HLA com este peptídeo pode induzir vigorosa resposta de células T e provocar lesão tecidual ou reprimir a resposta imune, levando à persistência do antígeno;
- como estabelecem a forma e o repertório de antígenos apresentados aos linfócitos (seleção tímica), as moléculas do HLA definem quais antígenos serão reconhecidos ou considerados estranhos ao indivíduo.

Sistema HLA e Hepatites Virais

A resposta imune é coordenada pelas moléculas HLA de classe I e II, as quais apresentam antígenos virais e bacterianos para as células T $CD8^+$ citotóxico e T $CD4^+$ helper, respectivamente. Os genes encontrados nesta molécula são os mais polimórficos do genoma humano e são os ideais para investigação de associação com o curso da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) (19).

Devido à especificidade antigênica e a influência do sistema HLA na resposta imune, a contribuição deste sistema na evolução da infecção pelo HBV foi

estudada em diferentes populações. Tais dados entretanto ainda são inconsistentes para os efeitos do HLA no clareamento ou persistência do HBV. O alto polimorfismo contribui para que a seleção do peptídeo antigênico seja apresentado para linfócitos T resultando em diferentes respostas imunes a infecção entre indivíduos (20).

Genes HLA de classe I e II foram tipificados em 194 indivíduos caucasianos com persistência viral e 342 controles onde houve o clareamento da infecção pelo HBV. Um alelo de classe I, A*0301 (odds ratio [OR]=0,47; 95% intervalo de confiança [CI]=0,30 – 0,72; $P = 0,0005$) foi associado com o clareamento viral. O alelo de classe II DRB1*1302 também foi associado ao clareamento (OR= 0,42; 95% CI= 0,19 – 0,93; $P = 0,03$), mas a sua significância diminuiu em um modelo multivariado que incluiu outros alelos associados com a cura da doença. O B*08 isoladamente foi associado com a persistência viral (OR= 1,59; 95% CI= 1,04 – 2,43; $P = 0,03$) e quando faz parte do haplótipo em caucasianos A*01-B*08-DRB1*03 tem efeito protetor. Os haplótipos B*44-Cw*1601 (OR= 2,23; 95% CI= 1,13 – 4,42; $P = 0,02$) e B*44-Cw*0501 (OR= 1,99; 95% CI= 1,22 – 3,24; $P = 0,006$) também foram associados com a persistência da infecção pelo HBV (21).

A frequência do alelo HLA-DRB1*0301 em um grupo com hepatite B crônica foi mais elevada do que no grupo controle (17,31 % vs 5,67 % respectivamente), com resultados significantes ($X^2=12,3068$, $P=0,0074$, RR=4,15). A frequência alélica do HLA-DQA1*0501 no grupo com hepatite B crônica foi significativamente maior do que no grupo controle (25,96 % vs 13,68 %) respectivamente, sendo observada significativa correlação ($X^2=9,2002$, $P=0,0157$, RR=2,87). A frequência do alelo HLA-DQB1*0301 no grupo com hepatite B crônica também foi maior do que no grupo controle (35,58 % vs 18,87 % respectivamente), havendo significativa correlação ($X^2=15,5938$, $P=0,0075$, RR=4,07). Já a frequência

alélica do HLA-DRB1*1101/1104 no grupo com hepatite B crônica foi menor do que no grupo controle (0,96 % vs 13,33 % respectivamente), sendo observada significativa correlação ($X^2=11,9206$, $P=0,0145$, $RR=18,55$). A frequência do alelo HLA-DQA1*0301 no grupo com hepatite B crônica foi também menor no grupo controle (14,42 % vs 30 % respectivamente), existindo significativa correlação ($X^2=8,7396$, $P=0,0167$, $RR=0,35$). Portanto, os resultados do estudo descrito acima sugerem que o HLA DRB1*0301, DQA1*0501 e DQB1*0301 possa representar fator de susceptibilidade genética, e HLA DRB1*1101/1104 e DQA1*0301 possa ser um fator de resistência genética para a infecção crônica pelo HBV, e que o HLA de classe II é um fator determinante na evolução da infecção pelo HBV (22).

Em um estudo chinês, onde foi analisada a associação HLA de classe II em pacientes com hepatite B em tratamento com interferon (IFN) observou-se que o polimorfismo de HLA classe II pode influenciar a suscetibilidade à infecção pelo HBV e a resposta ao IFN. Comparado com outros alelos HLA-DRB1, HLA-DRB1 * 06, DRB1 * 08, e DRB1 * 16 pode estar associado a cronicidade da infecção pelo HBV, HLA-DRB1 * 07 com proteção contra o HBV, e HLA-DRB1 * 14 pode estar associado a elevada taxa de resposta dos pacientes tratados com IFN. Comparado com outros alelos HLA DQB1, HLA-DQB1 * 07 está associado a baixa taxa de resposta ao IFN (23,24,25).

A partir do estudo da associação do HLA com a forma de evolução da infecção pelo HBV, descobriu-se que dois alelos HLA classe II estão fortemente associados com clareamento viral (26). O primeiro alelo foi DRB1 * 1302 e este resultado foi concordante com dois outros estudos coreanos, onde demonstraram que DR13 foi associado à auto-eliminação do HBV (27,28). Além disso, DRB1 * 1302 tem sido consistentemente relatado como um fator associado com proteção contra a infecção

pelo HBV persistente em dois outros grupos raciais, os africanos (29) e caucasianos (30, 31). Um efeito benéfico do DR13 na infecção pelo HBV também tem sido confirmado. Diepolder et al, demonstraram que o DR13 em indivíduos soropositivos mostrou uma resposta mais vigorosa do linfócito T CD4 + ao antígeno do core HBV (HBcAg) do que DR13 negativos (32,33).

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) apresenta diversas manifestações clínicas. Aproximadamente, 20% dos pacientes infectados conseguem com sucesso eliminar o vírus, enquanto a maioria dos pacientes desenvolve infecção crônica com amplo espectro de lesões hepáticas, que vão desde inflamação mínima até cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (37). Os mecanismos subjacentes ao clareamento espontâneo viral ou o desenvolvimento de infecção crônica pelo HCV ainda não foram identificados (38). Além das características do genótipo viral, é geralmente aceito que respostas imunes celulares desempenhem papel importante na destruição do vírus e resolução da doença (39). O clareamento do vírus durante a infecção aguda foi associado com respostas fortes através de células T CD4+ e CD8+ (40,41).

Apesar de células T CD8 + serem efetoras primárias diretamente, eliminando as células infectadas pelo HCV, as células T CD4 + desempenham papel central de regulação, que modula a resposta das células T CD8 +, sendo crucial para a produção de anticorpos neutralizantes. Alguns estudos recentes sugeriram que as respostas de células T CD4+ multiespecíficas pode ser um fator determinante para a infecção primária pelo HCV (42,43). A importância da resposta das células T CD4+ é a apresentação de antígenos do HCV no contexto de moléculas HLA classe II. Portanto, as diferenças nos alelos HLA de classe II podem influenciar fortemente a evolução da infecção pelo HCV.

Polimorfismos nas moléculas HLA podem dar origem a novos alelos de classe II devido a troca de aminoácidos, substituições de peptídeo com diferentes características de ligação, podendo determinar antigenicidade, aumentando a eficácia da resposta imune contra a infecção pelo HCV (44,45). Por conseguinte, distintos alelos HLA de classe II podem exercer um impacto no desenvolvimento de respostas imunes contra a infecção do HCV. No entanto, poucos estudos têm demonstrado consistência em diferentes populações. Em dois estudos irlandeses realizados em mulheres expostas ao genótipo 1b a partir de um único inóculo, os alelos DRB1 * 0101 e DQB1 * 0501 estiveram associados com a eliminação viral (46,47). E estudo alemão sugere que o alelo HLA-DR15 (DRB1 * 15011) poderia constituir fator genético para o clareamento do HCV (48). Thio et al (49) revelaram que o HLA-A * 1101, HLA-B * 57 e HLA-Cw * 0102 contribuem para a cura espontânea da infecção pelo HCV. Foi descrito que os alelos DQA1 * 03 e DQB1 * 0302 promovem o clareamento viral e conferem proteção contra hepatite C crônica em caucasianos (50). Uma série de estudos foi realizado em diferentes populações étnicas para investigar as associações dos alelos DQB1 * 0301 ou DRB1 * 1101 com a cura espontânea do HCV (46,51,52).

A revisão descrita buscou esclarecer o sistema HLA na sua função, métodos de tipificação, nomenclaturas e alguns estudos realizados em populações distintas envolvendo genótipos HLA em associação com hepatites virais. Espera-se que estudos futuros propiciem a elucidação completa dos mecanismos de associação do sistema HLA com as hepatites virais, garantindo assim o diagnóstico precoce em indivíduos que apresentam predisposição a adquirir a doença e posterior tratamento medicamentoso para sua resolução.

Referências

1. Crésio Alves, Thaisa Souza, Sâmia Veiga, Cândida Alves, Maria Betânia Toralles, Denise Lemaire. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 2005;27(4):274-86.
2. Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2000;33:7-18.
3. Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-9.
4. Klein J, Sato A. The HLA System. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:782-6.
5. Van Rood JJ. The impact of the HLA-system in clinical medicine. *Shweiz Med Wschr* 1993;123:85-92.
6. Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2003;47:601-11.
7. Turner D. The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sanguinis* 2004;87:S87-90.
8. Nepon BS & Nepon GT. Polyglot and polymorfism – An HLA update. *Arthritis Rheum* 38: 1715 – 1721, 1995.
9. Terán-Escandon D, Ortiz LT, Olvera AC, Avila GG, Marin MAV, Granados J, Selman M. Human Leukocyte Antigen-Associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *Chest* 1999; 115(2):428-433.

-
10. Mehra NK, Kaur G. Gene map of human leukocyte antigen (HLA) region. Expert Reviews in Molecular Medicine 2003; 5(24). Disponível em <http://www.expertreviews.org/>.
 11. Answers.com. Human Leukocyte Antigen [on line]. [Acesso em 18 de junho de 2007]. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/human-leukocyte-antigen>.
 12. Mason PD, Lechler RI. Cellular methods in testing histocompatibility. In: Lechler R, Warrens A, eds. HLA in health and disease. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2000. p.441-50.
 13. AM Sell, JEL Visentrainer, RC Bezerra, CC Silva, SC Borelli, RA Moliterno, LT Tsuneto, MMO Dalalio. Importância da histocompatibilidade HLA no sucesso do transplante de medula óssea. Arq Mudi. 2006;10(Supl 1):245-7.
 14. Bodmer JG; Marsh SGE; Albert ED; Bodmer WF; Bontrop RE; Dupont B; Erlich HA; Hansen JA; Mach B; Mayr WR; Parham P; Petresdorf EW; Sasazuki T; Schneider GH; Strominger JL; Svejgaard A & Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. Tissue Antigens 53: 407-443, 1999.
 15. Walford RL; Finkelstein S; Neerhout R; Konrad P & Shambrom E. Acute childhood leukemia in relation to the HLA-A human transplantation genes. Nature 231: 461-462, 1970.
 16. Schlosstein L; Terasaki PI; Bluestone R & Pearson CM. High association of an HLA-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis. N Engl J Med 288: 704-706, 1973.
 17. Warrens NA. Appendix: Statistical considerations in analyzing HLA and disease associations. In: Lechler R, Warrens A, eds. HLA in health and disease. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2000. p.129-37.
 18. Van Rood JJ. The impact of the HLA-system in clinical medicine. Schweiz Med Wschr 1993;123:85-92.

-
19. Alatrakchi, N and Koziel, M. J.: Antiviral T-cell responses and therapy in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 2003, 39, 631-634.
 20. Sung Won Cho, Jae Youn Cheong, Young Su Ju, Do Hoon Oh, Young Ju Suh, and Kyung Wha Lee. Human Leukocyte Antigen Class II Association with Spontaneous Recovery from Hepatitis B Virus Infection in Koreans: Analysis at the Haplotype Level. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 838-44.
 21. Chloe L. Thio, David L. Thomas, Peter Karacki, Xiaojiang Gao, Darlene Marti, Richard A. Kaslow, James J. Goedert, Margaret Hilgartner, Steffanie A. Strathdee, Priya Duggal, Stephen J. O'Brien, Jacquie Astemborski, and Mary Carrington. Comprehensive Analysis of Class I and Class II HLA Antigens and Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology*, Nov. 2003, p. 12083–12087.
 22. Ye-Gui Jiang, Yu-Ming Wang, Tong-Hua Liu, Jun Liu. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9(10):2221-2225.
 23. Yong-Nian Han, Jin-Long Yang, Shui-Gen Zheng, Qun Tang, Wei Zhu. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World J Gastroenterol* 2005;11(36):5721-5724.
 24. Yu ML, Dai CY, Chen SC, Chiu CC, Lee LP, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, Chuang WL, Chang WY. Human leukocyte antigen class I and II alleles and response to interferon-alpha treatment, in Taiwanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003; 188: 62-65.
 25. Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2221-2225.

-
26. Sung Won Cho, Jae Youn Cheong, Young Su Ju*, Do Hoon Oh, Young Ju Suh, and Kyung Wha Lee. Human Leukocyte Antigen Class II Association with Spontaneous Recovery from Hepatitis B Virus Infection in Koreans: Analysis at the Haplotype Level. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 838-44.
 27. Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000; 31: 1371-3.
 28. Hwang SH, Sohn YH, Oh HB, Hwang CY, Lee SH, Shin ES, Lee KJ. Human leukocyte antigen alleles and haplotypes associated with chronicity of hepatitis B virus infection in Koreans. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 117-21.
 29. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1065-9.
 30. Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997; 26: 503-7.
 31. Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, Goedert JJ, Hilgartner M, Strathdee SA, Duggal P, O'Brien SJ, Astemborski J, Carrington M. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12083-7.
 32. Diepolder HM, Jung MC, Keller E, Schraut W, Gerlach JT, Gruner N, Zachoval R, Hoffmann RM, Schirren CA, Scholz S, Pape GR. A vigorous virus-specific CD4+ T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 244-51.

-
33. Cao T, Desombere I, Vanlandschoot P, Sallberg M, Leroux-Roels G. Characterization of HLA DR13-restricted CD4(+) T cell epitopes of hepatitis B core antigen associated with self-limited, acute hepatitis B. *J Gen Virol* 2002; 83: 3023-33.
 34. Schiff L, Schiff ER. Diseases of the liver. 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins 1999.
 35. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:1225-1241.
 36. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnaagle JH. Management of hepatitis B: 2000-Summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001;120:1828-1853.
 37. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S35-46
 38. Sun J, Li K, Shata MT, Chan TS. The immunologic basis for hepatitis C infection. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 598-602
 39. Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2005; 32: 75-85
 40. Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiaroni M, Cerny A, Pape GR. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 2000; 181: 1528-1536
 41. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10: 439-449
 42. Eckels DD, Wang H, Bian TH, Tabatabai N, Gill JC. Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunol Rev* 2000; 174: 90-97

-
43. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; 37: 577-589
 44. Andrade DR Jr, de Andrade DR. The influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46: 119-126
 45. Thio CL, Thomas DL, Carrington M. Chronic viral hepatitis and the human genome. *Hepatology* 2000; 31: 819-827
 46. Fanning LJ, Levis J, Kenny-Walsh E, Wynne F, Whelton M, Shanahan F. Viral clearance in hepatitis C (1b) infection: relationship with human leukocyte antigen class II in a homogeneous population. *Hepatology* 2000; 31: 1334-1337
 47. Barrett S, Goh J, Coughlan B, Ryan E, Stewart S, Cockram A, O'Keane JC, Crowe J. The natural course of hepatitis C virus infection after 22 years in a unique homogenous cohort: spontaneous viral clearance and chronic HCV infection. *Gut* 2001; 49: 423-430
 48. Lechmann M, Schneider EM, Giers G, Kaiser R, Dumoulin FL, Sauerbruch T, Spengler U. Increased frequency of the HLADR15 (B1*15011) allele in German patients with self-limited hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 337-343
 49. Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL. HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *J Virol* 2002; 76: 4792-4797
 50. Tibbs C, Donaldson P, Underhill J, Thomson L, Manabe K, Williams R. Evidence that the HLA DQA1*03 allele confers protection from chronic HCV-infection in Northern European Caucasoids. *Hepatology* 1996; 24: 1342-1345

51. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J, Puel J, Pascal JP, Duffaut M, Abbal M. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997; 113: 1675-1681
52. Spada E, Mele A, Berton A, Ruggeri L, Ferrigno L, Garbuglia AR, Perrone MP, Girelli G, Del Porto P, Piccolella E, Mondelli MU, Amoroso P, Cortese R, Nicosia A, Vitelli A, Folgori A. Multispecific T cell response and negative HCV RNA tests during acute HCV infection are early prognostic factors of spontaneous clearance. *Gut* 2004; 53: 1673-1681

Avaliação do locus HLA-DRB1* como fator preditivo para evolução da infecção pelo vírus da hepatite B em doadores de sangue

*Evaluation of HLA-DRB1 * locus as a predictive factor for progression of infection by the hepatitis B virus in blood donors*

Bruno de Melo Corrêa, Edmundo P. A. Lopes, Maria F. P. Militão de Albuquerque, Lúcia Dourado

Estudo realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Doador do Hemocentro de Pernambuco – HEMOPE; Laboratório HLA Diagnóstico LTDA, Recife, Brasil.

Endereço para correspondência:

Bruno de Melo Corrêa

Rua Simão Mendes, 92/201

CEP 52050/110 - Recife-PE - Brasil.

e-mail: brunomelocorrea@yahoo.com.br

Resumo

Objetivo: Descrever e comparar a frequência genotípica para os alelos HLA de classe II presentes nos loci DRB1* em amostras de doadores de sangue da Fundação HEMOPE, com infecção pelo HBV e imunizados contra esta infecção no Estado de Pernambuco.

Métodos: Trata-se de estudo de caso-controle. No período de dezembro de 2008 a dezembro de 2009 foram incluídos doadores de ambos os sexos e de idade entre 18 e 65 anos. O grupo de casos foi constituído por pacientes com infecção pelo vírus da hepatite B, que apresentaram os marcadores anti-HBc e HBsAg positivos. O grupo controle foi representado por indivíduos imunes ao HBV, que apresentaram os marcadores anti-HBc e anti-HBs positivos. Foi colhida amostra de 5 ml de sangue venoso em tubo contendo anticoagulante EDTA para realizar a tipificação HLA do locus DRB1*. Para verificar a ocorrência de associações entre variáveis categóricas, foram realizadas análises univariada e multivariada, utilizando o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

Resultados: Foram estudados 320 doadores de sangue, sendo 241 (75%) do sexo masculino e 79 (25%) do sexo feminino. A idade média foi de 39 anos. O grupo de casos foi constituído por 64 pacientes, e o grupo controle foi composto de 256 indivíduos imunes para o HBV. Na análise multivariada estratificada por sexo foi observado que o alelo DRB1*09 esteve associado aos indivíduos infectados pelo HBV do sexo masculino ($p=0,016$), e por idade observou-se que o alelo DRB1*08 foi mais freqüente nos casos associado à infecção pelo HBV entre os pacientes na faixa etária até 39 anos ($p=0,031$). **Conclusão:** Estes resultados sugerem que os alelos HLA-DRB1 *08 e HLA-DRB1*09 estão associados com a susceptibilidade à hepatite B crônica, em doadores com menos de 39 anos e do sexo masculino, respectivamente.

Palavras-chave: antígenos HLA, Complexo Maior de Histocompatibilidade, Hepatites, HLA e infecção por HBV.

Abstract

Objective: To compare the genotypic frequencies for HLA class II alleles present in DRB1 * locus in samples from blood donors of the HEMOPE Foundation with HBV infection and immunized against this infection in the state of Pernambuco. **Methods:** This is a case-control study. From December 2008 to December 2009 were included donors of both sexes and aged between 18 and 65 years. The case group consisted of patients infected with hepatitis B virus, which had the anti-HBc and HBsAg positive markers. The control group was represented by immune individuals to HBV, showed that the anti-HBc and anti-HBs positive markers. A 5 ml of venous blood sample was collected in tubes containing EDTA anticoagulant to perform the typing of HLA DRB1 locus *. To verify the occurrence of associations between categorical variables, univariate and multivariate analysis were proceeded using the chi-square or Fisher exact test. **Results:** We studied 320 blood donors, 241 (75%) were males and 79 (25%) were female. The average age was 39 years. The case group consisted of 64 patients and the control group was composed of 256 individuals immune to HBV. In multivariate analysis stratified by sex it was observed that the DRB1 * 09 allele was mostly associated to HBV-infected male individuals ($p = 0.016$) and by age it was observed that the DRB1 * 08 allele was more frequent in cases associated with infection HBV among patients aged up to 39 years ($p = 0.031$). **Conclusion:** These results suggest that HLA-DRB1 * 2008 and HLA-DRB1 * 09 are associated with the susceptibility to chronic hepatitis B in donors who are less than 39 years and males, respectively.

Keywords: HLA, Major Histocompatibility Complex, hepatitis, HLA and HBV infection.

Introdução

O motivo pelo qual a diversidade alélica dos genes do MHC tem sido conservada durante a evolução da espécie humana ainda não está esclarecido. Assim, o papel do polimorfismo dessas moléculas, na determinação de susceptibilidade ou resistência às doenças, tem merecido atenção (1). O rastreamento de alelos de histocompatibilidade, em diversos grupos étnicos de diferentes áreas geográficas aponta que a conversão gênica e a mutação sejam os principais mecanismos de geração de diversidade alélica em nível populacional, e que os locais de maior polimorfismo se encontram nas regiões das cadeias α e β , que estão em contacto com os peptídeos antigênicos (2). Admite-se que a diversidade alélica tenha sido gerada em decorrência da interação com os agentes patogênicos (3,4). Comparadas com as outras populações, as indígenas apresentam polimorfismo de alelos HLA relativamente baixo, refletindo, presumivelmente, o isolamento geográfico em que essas populações estão confinadas (4). Os orientais apresentam características peculiares em relação aos marcadores de susceptibilidade a doenças, usualmente, diferentes daqueles observados em indivíduos caucasianos (5,6). As populações caucasianas, evidentemente, são as mais estudadas, abrangendo doenças de diversas etiologias (7). Nas populações miscigenadas, como a brasileira, o polimorfismo ocorre, provavelmente, pela agregação de alelos de vários grupos previamente separados, cada qual possuindo um conjunto distinto de alelos, mais do que pela seleção natural de um grande número de alelos (4). Se, de um lado a diversidade alélica pode dificultar a identificação de marcadores imunogenéticos de baixo poder de associação, por outro lado, pode trazer contribuições, identificando novas associações, ou mesmo reforçando aquelas já existentes. Assim, os estudos das características de todas essas populações podem contribuir para o entendimento da associação entre os antígenos de histocompatibilidade e a susceptibilidade à infecções, como a hepatite B.

Os antígenos leucocitários humanos (HLA) são moléculas glicoproteicas presentes na superfície de membrana de todas as células do organismo (7). Esses antígenos são produtos gênicos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presentes no braço curto do cromossomo 6 humano. Sabe-se que o HLA de classe I se liga a linfócitos LTCD8+ e os de classe II aos linfócitos LTCD4+. A seleção determinante do linfócito ser LTCD4+ ou LTCD8+ ocorre no timo, órgão onde ocorre o contato dos linfócitos T com suas células epiteliais (7).

A grande importância dos alelos HLA e o seu polimorfismo peculiar os tornam notáveis na ativação da resposta imune através da sua enorme capacidade de ligar peptídeos virais em sua fenda molecular. Estima-se que uma célula apresente cerca de 100.000 a 300.000 moléculas HLA de classe I ou II em sua superfície (8). Uma vez que todas as moléculas HLA expressas na superfície celular contêm peptídeos, cada célula pode expor, em sua superfície, milhares de peptídeos. A afinidade de ligação peptídeo-HLA é inferior ao da ligação antígeno-anticorpo, porém com constantes de dissociação lentas, de horas a dias, o bastante para permanecer ligado ao peptídeo viral até ser apresentado aos LTCD4+ e culminar com a ativação e a amplificação da resposta imune (8).

A ligação de determinados peptídeos são fenômenos cruciais na eliminação ou não do agente agressor (8,9,10). Anteriormente atribuídos somente a rejeição de enxertos, tem-se reconhecido, na atualidade, novas associações entre HLA e doenças, a partir do primeiro relato da associação entre doença de Hodgkin e HLA-B5-B35-B18 em 1967, (11). Assim, tem-se intensificado, nos últimos anos, as pesquisas a respeito de sua importância e função na apresentação de antígenos virais aos linfócitos T CD4+ e T CD8+ visando eliminar a infecção do vírus da hepatite B do hospedeiro (8,12,13,14). Por exemplo, Wang et al. (15) realizaram estudo de associação entre alelos HLA e carga viral (CV) e concluíram que pacientes com o haplótipo A*34, B*56, DRB1*1502

possuíam CV significativamente inferior a daqueles sem esses alelos ($p=0,0074$, $0,0039$ e $0,016$ respectivamente). Ao contrario, os pacientes com HLA-B*4001 apresentavam CV significativamente mais elevada do que os indivíduos sem esse alelo ($p=0,0026$).

Diante da necessidade de entender melhor a resposta imune do organismo frente a infecção pelo HBV, o objetivo deste estudo foi descrever e comparar a frequência genotípica para os alelos HLA de classe II presentes nos loci DRB1* em amostras de doadores de sangue da Fundação HEMOPE, com infecção pelo HBV e imunizados contra esta infecção no Estado de Pernambuco, no período de dezembro de 2008 a dezembro de 2009.

Casuística e Métodos

- **Desenho e população de estudo**

Trata-se de estudo de caso-controle aninhado a uma coorte de doadores de sangue atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco – HEMOPE, entre dezembro de 2008 e dezembro de 2009.

- **Cálculo da Amostra**

O cálculo da amostra foi realizado seguindo os seguintes parâmetros: Erro α de 5%, poder do estudo de 80%, frequência de alelo associado à persistência de hepatite entre os controles igual a 10%, frequência de alelo associado à persistência de hepatite entre os casos igual a 25% e odds ratio igual a 3. Estes percentuais foram baseados no estudo de Chloe et al (28).

- **Coleta de Dados**

Os doadores foram analisados consecutivamente, de acordo com a demanda do HEMOPE. Aqueles que apresentaram positividade para o HBsAg e/ou anti-HBc na doação de rotina foram convocados novamente para realizar testes confirmatórios desses dois marcadores com uma outra coleta, passando a ser chamado de doador de retorno. No ato do retorno todos os doadores foram instruídos a ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 2). Todos os dados pessoais de interesse na pesquisa como, idade, sexo e data da doação já se encontravam no banco de dados da Fundação HEMOPE quando o mesmo foi doar sangue pela primeira vez.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOPE.

- **Critérios de inclusão**

Foram incluídos doadores de sangue de ambos os sexos e de idade entre 18 e 65 anos. O grupo de casos foi constituído por pacientes com infecção pelo vírus da hepatite B, que apresentaram os marcadores anti-HBc e HBsAg positivos. O grupo controle foi representado por indivíduos imunes ao HBV, que apresentaram os marcadores anti-HBc e anti-HBs positivos.

- **Critérios de Exclusão**

Doadores com anti-HCV, anti-HIV, anti-HTLV ou sorologia para chagas positiva.

Aqueles que não retornaram para realizar o teste confirmatório após terem dado anti-HBc positivo na doação de rotina.

- **Procedimentos Laboratoriais**

As pesquisas dos marcadores séricos do HBV foram realizadas utilizando-se ensaios imunoenzimáticos de micropartículas para detecção qualitativa de HBsAg (MUREX,

HBsAg versao 3, Abbott), e de anti-HBc (ORTHO, HBc ELISA Test Sytem), e para detecção quantitativa de anti-HBs (AxSYM AUSAB, Abbott) conforme instruções do fabricante.

Além da coleta de rotina para doação de sangue foi colhida amostra de 5 ml de sangue venoso em tubo de vidro contendo anticoagulante EDTA para realizar a tipificação HLA. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Doador no HEMOPE, onde foram submetidas a extração do DNA genômico, e este foi congelado e armazenado em freezer a -80° C para posterior tipificação do HLA DRB1*. Para a tipificação do locus HLA-DRB1* foi utilizado o kit de biologia molecular pela técnica de PCR-SSO (Reação em Cadeia da Polimerase – Sequência Específica de Oligonucleotídeos), RSSO2B1 da One Lambda, onde tal técnica foi dividida em duas fases, a primeira foi a amplificação do locus HLA-DRB1* com primers específicos e a segunda sendo a hibridização do produto de PCR pré-amplificado com sondas marcadas pela sequência de cada grupo alélico pertencentes ao locus HLA-DRB1*. A análise do material obtido na fase de hibridização realizou-se no citômetro Labscan 100 do fabricante LUMINEX e a interpretação dos resultados em Software apropriado fornecido pela One Lambda (16).

- **Análise Estatística**

A construção do banco de dados foi realizada no software SPSS for Windows, versão 13.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, 2005).

Inicialmente descreveram-se as características da população de estudo – sexo, idade e os 13 alelos HLA-DRB1* - em seus valores absolutos e relativos, segundo casos (paciente com infecção pelo HBV) e controles (indivíduos imunes a hepatite B).

Descreveram-se ainda todas as 78 possíveis tipificações HLA-DRB1* em pares de alelos e seus valores absolutos e relativos nos casos e controles (Tabela 2). Para

verificar a ocorrência de associações entre variáveis categóricas, foram realizadas análises univariada e multivariada, utilizando o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

Realizou-se a análise univariada considerando todos os 13 alelos DRB1* em uma tabela de contingência, analisando a presença ou ausência de cada um deles nas tipificações de casos e controles (Tabela 3).

Para a análise multivariada selecionaram-se aquelas variáveis que apresentaram associação com a presença de infecção pelo HBV na análise univariada com valor de $p \leq 0,20$. A regressão logística multivariada de associação entre infecção por HBV e variáveis do locus DRB1* pré-selecionadas na análise univariada foi estratificada por sexo e idade.

A magnitude dessas associações está estimada como *odds ratio* (OR), utilizando intervalos de confiança de 95%. O valor de p menor que 0,05 foi indicativo de significância estatística.

Resultados

Foram estudados 320 doadores de sangue, sendo 241 (75%) do sexo masculino e 79 (25%) do sexo feminino. A idade média foi de 39 anos, variando de 18 a 65 anos. O grupo de casos foi constituído por 64 pacientes, com marcadores anti-HBc e HBsAg positivos e o grupo controle foi composto de 256 indivíduos imunes para o HBV com os marcadores anti-HBc e anti-HBs positivos.

Na tabela 3 estão expressos os dados em valores absolutos e relativos referentes a frequência de cada alelo entre casos e controles ($p=0,325$).

Sexo e idade não apresentaram associação com a infecção pelo HBV na análise univariada (OR=1,021 ; IC=0,542 – 1,924 ; $p=0,948$) e (OR=0,983 ; IC=1,009 – 5,94 ; $p=0,204$) respectivamente.

As combinações mais freqüentes nos casos foram DRB1*03*08 e DRB1*04*07 (6,3%) e a combinação DRB1*11*13 foi a mais freqüente entre os controles (4,3%), porém a distribuição das combinações alélicas não diferiu entre casos e controles ($p=0,314$) (Tabela 4).

Na análise univariada mostraram-se associados ao caso (pacientes com HBV) ao nível de significância ≤ 20 as seguintes variáveis DRB1*: DRB1*08 ($p=0,067$), DRB1*09 ($p=0,083$), DRB1*12 ($p=0,135$) e DRB1*15 ($p=0,147$) e foram selecionados para a regressão logística multivariada (Tabela 5).

Na análise multivariada estratificada por sexo foi observado que o alelo DRB1*09 esteve associado aos indivíduos infectados pelo HBV (casos) do sexo masculino (OR=4,20 ; IC=1,30 – 13,60 ; $p=0,016$) (Tabela 6).

A análise multivariada estratificada por idade observou-se que o alelo DRB1*08 esteve mais freqüente nos casos associado à infecção pelo HBV (caso) entre os pacientes na faixa etária até 39 anos (OR=2,54 ; IC=1,09 – 5,94 ; $p=0,031$) (Tabela 7).

Discussão

A susceptibilidade à cronificação ou resolução da infecção pelo HBV depende da resposta imunológica e pode ser justificadas pela variabilidade genética do hospedeiro (17,18). O avanço da imunogenética tem permitido melhor entendimento da associação do HLA com várias doenças, contribuindo para a elucidação da patogenia, diagnóstico e prognóstico dessas enfermidades. O conhecimento de que o indivíduo é portador de determinado alelo ou haplótipo pode ajudar a prever o risco de desenvolvimento de determinada doença (19).

O HLA parece estar envolvido na resposta imune ao HBV. Embora a relação entre as várias enfermidades, as manifestações e os genes HLA polimórficos tenham sido objeto

de vários estudos, uma relação definitiva ainda não foi identificada devido a inconsistências dos resultados (18,20,21,22). Enquanto o mecanismo de susceptibilidade à infecção pelo HBV não for bem esclarecido, admite-se que a persistência da infecção seja influenciada por fatores imunogenéticos (23,24).

Pesquisa sobre a correlação entre HLA e a infecção pelo HBV foram realizadas há alguns anos (25). Métodos tradicionais sorológicos foram utilizados em algumas investigações, mas tornaram-se obsoletos e imprecisos. Para se ter melhor compreensão da correlação entre a infecção pelo HBV e HLA deve-se empregar técnicas de biologia molecular. Por isso, no presente estudo, examinaram-se os alelos HLA-DRB1 por PCR SSO em doadores com infecção pelo HBV e naqueles imunes ao vírus, numa tentativa de investigar a associação entre o gene HLA de classe II locus DRB1 e a infecção. Treze alelos HLA-DRB1 foram detectados neste estudo como também foram encontrados no estudo de Ye-Gui Jiang et al (25).

Verificou-se que a ocorrência do alelo HLA-DRB1*09 em pacientes do sexo masculino apresentou associação com a cronicidade da infecção pelo HBV (Tabela 4). Outra associação com significância no estudo foi do alelo HLA-DRB1*08 em pacientes com faixa etária abaixo de 39 anos estarem sujeitos à persistência da infecção pelo HBV. Estes resultados sugerem que os alelos HLA-DRB1 *08 e HLA-DRB1*09 estão associados com a susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV, em doadores com menos de 39 anos e do sexo masculino, respectivamente.

Alelos HLA por si só não definem a infecção pelo HBV, para um determinado alelo ter associação com a doença é preciso que haja a influência de fatores externos como por

exemplo sexo e idade, no presente estudo homens menores de 39 anos demonstraram tal associação.

É importante frisar que pode haver diferença nas frequências alélicas entre populações distintas, o que não permite, simplesmente, extrapolar dados. Portanto, estudos em populações específicas, principalmente as miscigenadas como a brasileira, são necessários para verificar se as associações HLA são as mesmas descritas na literatura e se há novas associações (26). Existem diferentes relações entre genes HLA polimórficos e infecção pelo HBV em diferentes populações, o que implica que várias moléculas HLA poderiam apresentar epitopos diferentes do HBV para induzir resposta imune eficaz (26).

Na Espanha, Cotrina et al (27) analisaram o genótipo HLA-DRB1 em uma série de pacientes com hepatite aguda e crônica pelo HBV, e verificaram que os alelos HLA-DRB1 * 1301 e DRB1 * 1302 estavam associados com a resolução da infecção pelo HBV e estes indivíduos estariam protegidos contra o HBV.

Yong-Nian Han et al (29) em recente estudo realizado na China concluíram que, comparado com outros alelos HLA-DRB1, os HLA-DRB1*06, DRB1*08, e DRB1*16 podem estar associados com a cronicidade da infecção pelo HBV.

O locus HLA-DRB1* constitui importante fator para determinar a evolução da infecção pelo HBV, e dará algumas pistas para novos estudos sobre a patogenia da infecção crônica pelo HBV.

Há duas limitações principais neste estudo. Em primeiro lugar, apesar do adequado tamanho de amostra, observou-se limitado poder de detectar associações com alelos de

baixa frequência. Segundo, as associações que foram detectadas podem não se aplicar a toda população e podem apresentar associações apenas em determinadas populações. Mais pesquisas, como por exemplo em outras regiões do país, serão necessárias para confirmar nossos resultados.

O estudo de populações etnicamente diversas e o melhor conhecimento da associação do sistema HLA com a infecção pelo HBV permitirão o desenvolvimento de estratégias para identificar grupos de risco. Poder-se prever o tipo de manifestação clínica da doença, orientar o uso de medicamentos de acordo com o perfil farmacogenômico dos pacientes e eventualmente investir com medidas que venham a prevenir a ocorrência da infecção.

Em conclusão, estudos com amostras maiores e um desenho adequado deverão ser realizados para investigar os determinantes genéticos para infecção pelo HBV. Encontrar associação específica entre alelos favoráveis e os resultados clínicos em pacientes com hepatite B poderá abrir novos caminhos para explorar e compreender a patogenia do HBV.

Baseado nos resultados do presente estudo onde foi revelado que os alelos HLA-DRB1*09 e DRB1*08 estão associados a persistência do vírus da hepatite B em indivíduos do sexo masculino com menos de 39 anos, sugere-se um maior empenho em colocar a implementação de medidas preventivas contra a Hepatite B.

Tabela 3 – Distribuição de frequência dos alelos HLA-DRB1* entre casos com HBV e controles.

ALELOS DRB1*	CONTROLES N(%DRB1*)	CASOS N(%DRB1*)	TOTAL N(%DRB1)	Valor de p
DRB1*01	50 (75,8%)	16 (24,2%)	66 (100%)	p=0,325
DRB1*03	47 (79,7%)	12 (20,3%)	59 (100%)	
DRB1*04	54 (81,8%)	12 (18,2%)	66 (100%)	
DRB1*07	54 (78,3%)	15 (21,7%)	69 (100%)	
DRB1*08	39 (70,9%)	16 (29,1%)	55 (100%)	
DRB1*09	13 (65,0%)	07 (35,0%)	20 (100%)	
DRB1*10	09 (90,0%)	01 (10,0%)	10 (100%)	
DRB1*11	66 (83,5%)	13 (16,5%)	79 (100%)	
DRB1*12	16 (94,1%)	01 (5,9%)	17 (100%)	
DRB1*13	63 (84,0%)	12 (16,0%)	75 (100%)	
DRB1*14	17 (73,9%)	06 (26,1%)	23 (100%)	
DRB1*15	59 (86,8%)	09 (13,2%)	68 (100%)	
DRB1*16	25 (75,8%)	08 (24,2%)	33 (100%)	
TOTAL	512 (80,0%)	128 (20,0%)	640 (100%)	

Tabela 4 – Distribuição das 78 possíveis combinações de alelos HLA-DRB1* na população de estudo segundo a presença/ausência de hepatite B.

COMBINAÇÕES ALÉLICAS	CONTROLES N(%)	CASOS N(%)	TOTAL N(%)
*01*01	01(0,4%)	01(1,6%)	02(0,6%)
*01*03	06(2,3%)	00(0,0%)	06(1,9%)
*01*04	06(2,3%)	02(3,1%)	08(2,5%)
*01*07	04(1,6%)	01(1,6%)	05(1,6%)
*01*08	03(1,2%)	02(3,1%)	05(1,6%)
*01*09	02(0,8%)	01(1,6%)	03(0,9%)
*01*11	06(2,3%)	03(4,7%)	09(2,8%)
*01*12	03(1,2%)	00(0,0%)	03(0,9%)
*01*13	06(1,3%)	01(1,6%)	07(2,2%)
*01*14	01(0,4%)	01(1,6%)	02(0,6%)
*01*15	08(3,1%)	02(3,1%)	10(3,1%)
*01*16	03(1,2%)	01(1,6%)	04(1,3%)
*03*03	00(0,0%)	01(1,6%)	01(0,3%)
*03*04	07(2,7%)	00(0,0%)	07(2,2%)
*03*07	05(2,0%)	01(1,6%)	06(1,9%)
*03*08	03(1,2%)	04(6,3%)	07(2,2%)
*03*09	01(0,4%)	01(1,6%)	02(0,6%)
*03*10	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*03*11	04(1,6%)	00(0,0%)	04(1,3%)
*03*12	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*03*13	04(1,6%)	03(4,7%)	07(2,2%)
*03*14	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*03*15	08(3,1%)	01(1,6%)	09(2,8%)
*03*16	03(1,2%)	00(0,0%)	03(0,9%)
*04*04	04(1,6%)	00(0,0%)	04(1,3%)
*04*07	04(1,6%)	04(6,3%)	08(2,5%)
*04*08	08(3,1%)	01(1,6%)	09(2,8%)
*04*09	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*04*10	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*04*11	04(1,6%)	01(1,6%)	05(1,6%)
*04*12	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*04*13	07(2,7%)	01(1,6%)	08(2,5%)
*04*14	00(0,0%)	02(3,1%)	02(0,6%)
*04*15	05(2,0%)	01(1,6%)	06(1,9%)
*04*16	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*07*07	03(1,2%)	00(0,0%)	03(0,9%)
*07*08	06(2,3%)	02(3,1%)	08(2,5%)
*07*09	01(0,4%)	02(3,1%)	03(0,9%)
*07*10	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*07*11	10(3,9%)	01(1,6%)	11(3,4%)
*07*13	03(1,2%)	02(3,1%)	05(1,6%)
*07*14	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*07*15	09(3,5%)	00(0,0%)	09(2,8%)

*07*16	03(1,2%)	02(3,1%)	05(1,6%)
*08*08	03(1,2%)	01(1,6%)	04(1,3%)
*08*09	00(0,0%)	01(1,6%)	01(0,3%)
*08*11	03(1,2%)	02(3,1%)	05(1,6%)
*08*13	04(1,6%)	01(1,6%)	05(1,6%)
*08*14	01(0,4%)	01(1,6%)	02(0,6%)
*08*15	04(1,6%)	00(0,0%)	04(1,3%)
*08*16	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*09*10	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*09*11	02(0,8%)	01(1,6%)	03(0,9%)
*09*15	03(1,2%)	00(0,0%)	03(0,9%)
*09*16	02(0,8%)	01(1,6%)	03(0,9%)
*10*11	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*10*12	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*10*13	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*10*15	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*10*16	00(0,0%)	01(1,6%)	01(0,3%)
*11*11	05(2,0%)	00(0,0%)	05(1,6%)
*11*12	03(1,2%)	00(0,0%)	03(0,9%)
*11*13	11(4,3%)	03(4,7%)	14(4,4%)
*11*14	03(1,2%)	00(0,0%)	03(0,9%)
*11*15	06(2,3%)	02(3,1%)	08(2,5%)
*11*16	03(1,2%)	00(0,0%)	03(0,9%)
*12*13	02(0,8%)	01(1,6%)	03(0,9%)
*12*15	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
*12*16	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*13*13	06(2,3%)	00(0,0%)	06(1,9%)
*13*14	04(1,6%)	00(0,0%)	04(1,3%)
*13*15	07(2,7%)	00(0,0%)	07(2,2%)
*13*16	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*14*15	02(0,8%)	01(1,6%)	03(0,9%)
*14*16	02(0,8%)	01(1,6%)	03(0,9%)
*15*15	02(0,8%)	00(0,0%)	02(0,6%)
*15*16	01(0,4%)	02(3,1%)	03(0,9%)
*16*16	01(0,4%)	00(0,0%)	01(0,3%)
TOTAL	256(100%)	64(100%)	320(100%)

p=0,314

Tabela 5 – Associação entre as 78 combinações possíveis encontradas entre os 13 alelos HLA-DRB1* e infecção pelo HBV.

<i>HLA-DRB1*</i>	<i>Casos HBV</i>	<i>Controles</i>	<i>X²</i>	<i>Valor de p</i>
Alelo DRB1*01				
Ausência	49(76,6%)	207(80,9%)	0,591	0,442
Presença	15(23,4%)	49(19,1%)		
Alelo DRB1*03				
Ausência	53(82,8%)	209(81,6%)	0,047	0,828
Presença	11(17,2%)	47(18,4%)		
Alelo DRB1*04				
Ausência	52(81,3%)	206(80,5%)	0,020	0,888
Presença	12(18,8%)	50(19,5%)		
Alelo DRB1*07				
Ausência	49(76,6%)	205(80,1%)	0,387	0,534
Presença	15(23,4%)	51(19,9%)		
Alelo DRB1*08				
Ausência	49(76,6%)	220(85,9%)	3,359	0,067
Presença	15(23,4%)	36(14,1%)		
Alelo DRB1*09				
Ausência	57(89,1%)	243(94,9%)	3,0	0,083
Presença	07(10,9%)	13(5,1%)		
Alelo DRB1*10				
Ausência	63(98,4%)	247(96,5%)	0,645	0,422
Presença	01(1,6%)	09(3,5%)		
Alelo DRB1*11				
Ausência	51(79,7%)	195(76,2%)	0,356	0,551
Presença	13(20,3%)	61(23,8%)		
Alelo DRB1*12				
Ausência	63(98,4%)	240(93,8%)	2,236	0,135
Presença	01(1,6%)	16(6,3%)		
Alelo DRB1*13				
Ausência	52(81,3%)	199(77,7%)	0,374	0,541
Presença	12(18,8%)	57(22,3%)		
Alelo DRB1*14				
Ausência	58(90,6%)	239(93,4%)	0,574	0,449
Presença	06(9,4%)	17(6,6%)		
Alelo DRB1*15				
Ausência	55(85,9%)	199(77,7%)	2,105	0,147
Presença	09(14,1%)	57(22,3%)		
Alelo DRB1*16				
Ausência	56(87,5%)	232(90,6%)	0,556	0,456
Presença	08(12,5%)	24(9,4%)		

Tabela 6 – Regressão logística multivariada de associação entre infecção pelo HBV e variáveis do locus DRB1*(*08,*09,*12,*15) estratificada por sexo.

<i>SEXO</i>	<i>Casos Hepatite</i>	<i>Controles</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>Valor de p</i>
FEMININO					
Alelo DRB1*08					
Ausência	12(75%)	54(85,7%)	1,0		
Presença	04(25%)	09(14,3%)	1,94	0,48 – 7,76	0,348
Alelo DRB1*09					
Ausência	15(93,8%)	57(90,5%)	1,0		
Presença	01(6,3%)	06(9,5%)	0,62	0,06 – 5,81	0,682
Alelo DRB1*12					
Ausência	16(100%)	61(96,8%)	1,0		
Presença	00(00%)	02(3,2%)	0,00	0,00 – 0,00	0,999
Alelo DRB1*15					
Ausência	13(81,3%)	51(81%)	1,0		
Presença	03(18,8%)	12(19%)	1,05	0,24 – 4,60	0,941
MASCULINO					
Alelo DRB1*08					
Ausência	37(77,1%)	166(86%)	1,0		
Presença	11(22,9%)	27(14%)	1,80	0,80 – 4,06	0,153
Alelo DRB1*09					
Ausência	42(87,5%)	186(96,4%)	1,0		
Presença	06(12,5%)	07(3,6%)	4,20	1,30 – 13,60	0,016
Alelo DRB1*12					
Ausência	47(97,9%)	179(92,7%)	1,0		
Presença	01(2,1%)	14(7,3%)	0,30	0,03 – 2,43	0,264
Alelo DRB1*15					
Ausência	42(87,5%)	148(76,7%)	1,0		
Presença	06(12,5%)	45(23,3%)	0,46	0,18 – 1,18	0,110

Tabela 7 – Regressão logística multivariada de associação entre hepatite B e variáveis do locus DRB1*(*08,*09,*12,*15) estratificada por idade.

<i>IDADE EM CATEGORIA</i>	<i>Casos Hepatite</i>	<i>Controles</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>Valor de p</i>
ATÉ 39 ANOS					
Alelo DRB1*08					
Ausência	32(72,7%)	128(87,7%)	1,0		
Presença	12(27,3%)	18(12,3%)	2,54	1,09 – 5,94	0,031
Alelo DRB1*09					
Ausência	39(88,6%)	137(93,8%)	1,0		
Presença	05(11,4%)	09(6,2%)	2,05	0,63 – 6,65	0,230
Alelo DRB1*12					
Ausência	43(97,7%)	136(93,2%)	1,0		
Presença	01(2,3%)	10(6,8%)	0,37	0,04 – 3,11	0,367
Alelo DRB1*15					
Ausência	37(84,1%)	113(77,4%)	1,0		
Presença	07(15,9%)	33(22,6%)	0,70	0,28 – 1,76	0,453
40 ANOS OU MAIS					
Alelo DRB1*08					
Ausência	17(85%)	92(83,6%)	1,0		
Presença	03(15%)	18(16,4%)	0,79	0,20 – 3,06	0,733
Alelo DRB1*09					
Ausência	18(90%)	106(96,4%)	1,0		
Presença	02(10%)	04(3,6%)	2,62	0,43 – 15,96	0,293
Alelo DRB1*12					
Ausência	20(100%)	104(94,5%)	1,0		
Presença	00(00%)	06(5,5%)	0,00	0,00 – 0,00	0,999
Alelo DRB1*15					
Ausência	18(90%)	86(78,2%)	1,0		
Presença	02(10%)	24(21,8%)	0,38	0,08 – 1,79	0,221

Referências

1. Powis SH & Geraghty DE. What is the MHC? *Immunol Today* 16: 466-468, 1995.
2. Riley E & Olerup O. HLA polymorphisms and evolution. *Immunol Today* 13: 333-335, 1992.
3. Clayton J & Gee H. Major histocompatibility complex: the evolutionary angle. *Nature* 365: 111-112, 1993.
4. Parham P. HLA, anthropology, and transplantation. *Transpl Proc* 25: 159-161, 1993.
5. Awata T; Kuzuya T; Matsuda T; Matsuda A; Iwamoto Y; Okuiama M & Juji T. High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DR β -chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 39 : 266-269, 1990.
6. Inoue D; Sato K; Enomoto T; Sugawa H; Maeda M; Inoko H; Tsuji K; Mori T & Imura H. Correlation of HLA types and clinical findings in Japanese patients with hyperthyroid Graves' disease: evidence indicating the existence of four subpopulations. *Clin Endocrinol* 36: 75-82, 1992.
7. Tiwari JL & Terasaki PI, eds HLA and disease association. Springer-Verlag, New York, 1985, 472 p.
8. Klein, J.; Sato, A. The HLA system: first of two parts. *The New England Journal of Medicine*, v.343, n.10, p.702-709, 2000.
9. Ward, S.; et al. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clinical and Experimental Immunology*, v.128, n.2, p.195-203, 2002.
10. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. Propriedades gerais das respostas imunológicas. In: *Imunologia celular e molecular*, 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005a. cap. 1, p. 3- 15.
11. Rood, J.J.V. Women, pregnancy and serendipity: A personal story about the discovery of HLA. *Journal of Nefrology*, v.17, n.3, p.467-474, 2004.

12. Harcourt, G.; et al. Effect of HLA class II genotype on T helper lymphocyte responses and viral control in hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, v.8, n.3, p.174-179, 2001.
13. Hong, X.; et al. Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, drb1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, v.11, n.46, p.7302-7307, 2005.
14. Lloyd, A.R.; et al. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunology and Cell Biology*, v.85, n.1, p.24-32, 2007.
15. Wang, L. Y.; et al. Human leukocyte antigen phenotypes and hepatitis C viral load. *Journal of Clinical Virology*, v.32, n.2, p.144-150, 2005.
16. Jeane Eliete Laguila Visentainer; Ana Maria Sell; Luiza Tamie Tsuneto; Márcia Machado de Oliveira Dalalio; Rafael Campos Bezerra; Ricardo Alberto Moliterno; Sueli Donizete Borelli; Fabiano Cavalcante de Melo; Helen Cristina da Silva; Marco Antonio Braga. Metodologia de genotipagem HLA SSO-Luminex no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, agosto 2005;27, suplemento 1:61-65.
17. Wang JS, Zhu QR. [Interruption of the transmission of hepatitis B virus from mother to babies]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2002; 10:308-10.
18. Thio CL, Thomas DL, Karacki P, et al. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol*. 2003; 77: 12083-7.
19. Crésio Alves, Thaisa Souza, Sâmia Veiga, Cândida Alves, Maria Betânia Toralles, Denise Lemaire. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 2005;27(4):274-86.

-
20. Meng XQ, Chen HG, Ma YL, et al. Influence of HLA classII molecules on the outcome of hepatitis B virus infection in population of Zhejiang Province in China. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2003; 2: 230-3.
 21. Jiang YG, Wang YM, Liu TH, et al. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*. 2003; 9: 2221-5.
 22. Ahn SH, Han KH, Park JY, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology*. 2000; 31: 1371-3.
 23. Thursz MR. Host genetic factors influencing the outcome of hepatitis. *J Viral Hepat* 1997; 4:215-20.
 24. Diepolder HM, Jung MC, Keller E, et al. A vigorous virus- specific CD4+ T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 244-51.
 25. Ye-Gui Jiang, Yu-Ming Wang, Tong-Hua Liu, Jun Liu. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9(10):2221-2225.
 26. Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 2004; 72: 17-25.
 27. Cotrina M, Buti M, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Campins M, Esteban R, Guardia J. Study of HLA-II antigens in chronic hepatitis C and B and in acute hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20: 115-118.
 28. Chloe L. Thio, David L. Thomas, Peter Karacki, Xiaojiang Gao, Darlene Marti, Richard A. Kaslow, James J. Goedert, Margaret Hilgartner, Steffanie A. Strathdee, Priya Duggal, Stephen J. O'Brien, Jacquie Astemborski, and Mary Carrington.

Comprehensive Analysis of Class I and Class II HLA Antigens and Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology*, Nov. 2003, p. 12083–12087.

29. Yong-Nian Han, Jin-Long Yang, Shui-Gen Zheng, Qun Tang, Wei Zhu. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World J Gastroenterol* 2005;11(36):5721-5724.

30. Lin HH, Liao HW, Lin SK, Wang LY. HLA and response to booster hepatitis B vaccination in anti-HBs-seronegative adolescents who had received primary infantile vaccination. *Vaccine*. 2008 Jun 25;26(27-28):3414-20.

31. Brasil -Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Hepatites Virais. In: Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª Ed, Editora do MS Brasília-DF; 2005;409- 433.

ANEXOS

A- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

	Comitê de Ética em Pesquisa Av. Joaquim Nabuco, 171 Graças Recife-PE. CEP: 52011.000- Tel: (81) 3182-4771 E-mail: cep_hemope@gmail.com	
---	--	--

1 - DADOS SOBRE O PROJETO**PARECER FINAL: N°. 050/2008**

Título do Projeto: Avaliação do Locus HLA-DRB1* e a Susceptibilidade Genética para a Infecção pelo Vírus da Hepatite B em Doadores de Sangue.

Instituição Solicitante: UFPE/Universidade Federal de Pernambuco e Fundação HEMOPE.

Pesquisador: Bruno de Melo Corrêa

Identidade: 5288528 **CPF:** 038.306.014-17

Endereço: Rua. Dr. João Marques, 100/1202- Ilha do Retiro- Recife – PE. CEP: 50750-320

Telefone: 81 – 3227-7011

Finalidade: Pós-graduação stricto sensu

Orientadores: Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto e Lúcia Helena Piron

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação HEMOPE - Unidade de Laboratórios Especializados -UNILABE

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo: Conhecer o locus HLA-DRB1* de doadores de sangue com três perfis (positivos, imunes e negativos para o vírus hepatite B) na Fundação HEMOPE no período de dezembro de 2008 a junho de 2009.

Objetivos Específicos: Descrever a frequência genotípica para o Locus HLA-DRB1* em amostras de doadores de sangue com diagnóstico para HBV e Descrever a associação dos alelos HLA do Locus DRB1* em três grupos de doadores de sangue: 1) anti-HBc e HbsAg positivos, 2) anti- HBc e anti-HBs positivos e 3) anti-HBc negativo.

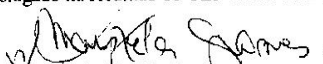
3 - PARECER DO RELATOR:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer n° 050/08, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 26/11/2008


Maria Emilia dos Santos
Coordenadora- CEP- HEMOPE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da Pesquisa: **AVALIAÇÃO DO LOCUS HLA-DRB1* E HEPATITE B EM
DOADORES DE SANGUE DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Eu, _____ abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade do pesquisador Bruno de Melo Corrêa, membro da Fundação Hemope, .

Assinando este termo de consentimento estou ciente de que:

- 1- O objetivo da pesquisa é descrever a frequência genotípica para os alelos HLA de classe II presentes no locus DRB1* em amostras de doadores de sangue com diagnóstico para HBV;
- 2- Durante o estudo será realizado coleta de sangue e será fornecido alguns dados epidemiológicos como: idade, sexo e outras informações relacionadas a doença que possam vir a ser necessárias ;
- 3- Obtive todas as informações necessárias para estar consciente sobre a minha participação na referida pesquisa;
- 4- Estou livre para interromper a qualquer momento minha participação na pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo ao atendimento.
- 5- Os autores da pesquisa garantem e se comprometem a preservar a minha privacidade e me asseguraram a confiabilidade dos dados e informações coletadas garantindo que os resultados obtidos serão utilizados para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluindo sua publicação na literatura científica especializada.
- 6- Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com a equipe da pesquisa nos telefones: 3182-4647-Hemope; 3227-0711- casa; 9245-5503. Ou também no endereço: Rua Joaquim Nabuco- 171- graças (HEMOPE).
- 7- Poderei contactar o comitê de Ética para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa ensaio clínico, através do telefone: 3182-5694, o qual tomará as medidas cabíveis.

Recife, de _____ de 200.....

(Voluntário)

RG _____

Pesquisador