



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR-RFLP PARA A DETECÇÃO DO
ALELO HLA-A*31:01 PARA A UTILIZAÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM A CARBAMAZEPINA**

LUCIANA LETÍCIA DA COSTA PIRES

BELÉM-PA
2017

LUCIANA LETÍCIA DA COSTA PIRES

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR-RFLP PARA A DETECÇÃO DO
ALELO HLA-A*31:01 PARA A UTILIZAÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM A CARBAMAZEPINA**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas. Linha de pesquisa: Biologia Molecular e Diagnóstico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Luciana Soares da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos

BELÉM-PA
2017

LUCIANA LETÍCIA DA COSTA PIRES

PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR-RFLP PARA A DETECÇÃO DO ALELO HLA-A*31:01 PARA A UTILIZAÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM A CARBAMAZEPINA

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Mestrado em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas. Linha de pesquisa: Biologia Molecular e Diagnóstico.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos
Universidade Federal do Pará (UFPA)-Titular

Prof^a. Dr^a. Vanessa Jóia de Mello
Universidade Federal do Pará (UFPA)-Titular

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena
Universidade Federal do Pará (UFPA)-Externo ao programa

Prof^a. Dr^a. Barbarella de Matos Macchi
Universidade Federal do Pará (UFPA)-Externo ao programa

DEDICATÓRIA

*Ao meu filho Matheus, meu estímulo maior.
Espero ser um exemplo de vida para você.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por tudo que sou e tudo que tenho, por me dar força e inspiração para realizar este trabalho, pelas oportunidades de crescer cada vez mais, além de me cercar de pessoas maravilhosas.

Quero expressar meus sinceros agradecimentos a todos que foram essências para a realização deste trabalho, como minha família, que eu amo mais que tudo, aos meus pais César e Antônia, exemplos de força e determinação, que sempre estiveram ao meu lado e me deram apoio durante toda minha trajetória acadêmica. Meu pai (meu fã número 1), por ser meu melhor amigo, sempre me ouvindo, compreendo todos os meus dramas. O senhor é literalmente o homem da minha vida que sempre faz todas minhas vontades, o homem que sempre me acolhe e aconselha, que sofre e sorri junto comigo, que diz “Vai dá tudo certo” e sempre deu, amo tanto você pai. Agradeço a Deus todos os dias por sua vida.

A minha mãe, por todo apoio em casa, por ser essa mãezona que cuida de tudo e todos sem exigir nada em troca. Obrigada por ser essa supermãe que é para o meu filho, por cuidar e amar ele mais que tudo. Por todo cuidado e atenção a ele. A senhora é mais mãe dele do que eu, e eu nunca vou conseguir pagar toda essa gratidão que sinto por você. Te amo minha mãe.

Ao meu irmão Rafael, pela torcida e compreensão. Por ter me dado forças do jeito que você sabe dá (foi muito importante para mim todas as palavras de apoio).

Ao meu filho Matheus que é meu amor maior e minha fonte de inspiração, o que me faz andar para a frente sempre.

Aos meus amigos que a Biomedicina me proporcionou conhecer: Joiciane e Layra, por sempre estarem comigo e apesar da distância nunca me esquecerem, isso foi muito importante pra mim. A Patrícia, os meus sinceros agradecimentos, não só pela amizade sincera e torcida constante, mas também pela ajuda nessa trajetória, além de outras questões profissionais das quais você sempre lembrou de mim, sempre me incentivando nos meus sonhos e nunca me deixando desanimar, obrigada mesmo amiga.

Aos meus amigos Caio e Beto, por me divertirem, serem meus amigos, me darem incentivo e carinho. Meu amigo Oberdan, que é quase um irmão mais velho, por toda torcida e carinho de sempre.

Ao meu namorado Antonio Neto, por todo apoio, compreensão, paciência (até demais), pela torcida, pelo carinho, por todo amor que vivemos nesses quase dois anos de história. Não sei o que o destino reserva para nós, espero que sejam coisas boas e que nossos caminhos continuem juntos. Você não foi só um namorado, mas também um amigo, onde muitas vezes

depositei todos meus dramas profissionais e pessoais, meus sonhos e planos futuros, você sem dúvida faz parte dessa minha trajetória e da minha vida e sempre vai ser alguém especial independente de qualquer coisa.

À minha família LGHM, que compreendem a luta diária na busca de realizar nossos sonhos e desejos profissionais. Ao meu amigo e parceiro de laboratório Sandro Pereira, meus agradecimentos pela cooperação e constante apoio durante a execução deste trabalho, compartilhando até mesmo os momentos de desespero. Aos meninos que estiveram comigo desde o começo desse projeto, Everton, Denison, Jessyca, Rafinha, Ana, Rebecca e em especial ao Marcos pelo apoio, incentivo, momentos de descontração, abrigo, pelo auxílio técnico impecável, entre outros fatores que foram fundamentais na execução do meu mestrado, aprendi muito com vocês, vocês são demais, e foram essenciais.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Andréa Luciana Soares da Silva, que foi minha grande companheira e incentivadora, registro meus agradecimentos pela oportunidade e pela dedicação a pesquisa, pela paciência, criteriosa e precisa orientação técnica e científica que tive a honra de receber em todas as etapas de execução deste trabalho. Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Eduardo, por me aceitar no seu grupo de pesquisa e por todas as conversas acadêmicas e informais que contribuíram de forma significativa no meu crescimento tanto profissional quanto pessoal. Sou muito grata aos dois pela confiança e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM).

Ao Laboratório Amaral Costa, pela bolsa a mim cedida durante esse período e pela experiência que adquiri no mesmo, obrigado aos amigos que fiz durante minha residência no laboratório, Larissa Giordano, Karina, Barbara Braga, Alain, Alex Saldanha, Wagner Gurjão, Luís, Helém, obrigado pelo apoio e amizade.

Aos amigos que fiz na turma do mestrado, Monyque, Sergiane, Georgete, Jessica, Alene, Mário.

Ao Hemopa, pelas amostras cedidas auxiliando nos processos do projeto. À Universidade Federal do Pará que me trouxe experiências incríveis, conhecimentos grandiosos, sou muito grato a essa instituição pelo conhecimento e profissionalismo que tenho hoje. Posso dizer com toda convicção que cresci muito não só intelectualmente, mas também como ser humano.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para elaboração deste trabalho, MUITO OBRIGADA.

EPÍGRAFE

“Para ser, sábio é preciso primeiro temer a Deus, o Senhor. Se você conhece o Deus Santo, então você tem compreensão das coisas. A sabedoria fará com que você tenha uma vida mais longa. Se você for sábio, o lucro será seu; se zombar de tudo, você mesmo sofrerá as consequências”.

Provérbios 9:10,11 e 12.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS | 9 |
| LISTA DE QUADROS | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 11 |
| RESUMO | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 GENES HLA E IMUNOGENÉTICA | 14 |
| 1.2 O COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL..... | 15 |
| 1.2.1 Funções Biológicas | 16 |
| 1.2.2 Organização Genética e Estrutura Molecular | 17 |
| 1.2.3 Polimorfismo Genético | 19 |
| 1.3 NOMENCLATURA DOS ALELOS HLA | 20 |
| 1.4 MARCADORES HLA COMO FATORES DE RISCO E PROGNÓSTICO | 22 |
| 1.4.1 Reações Adversas a Drogas | 22 |
| 1.4.2 Carbamazepina e risco genético de hipersensibilidade | 26 |
| 1.4.3 HLA-A*31:01 x Carbamazepina | 26 |
| 1.4.4 Farmacovigilância | 29 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 32 |
| 3. OBJETIVOS | 33 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 33 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| 4.1 DESENHO AMOSTRAL..... | 34 |
| 4.2 AS AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO HUMANO | 34 |
| 4.3 GENOTIPAGEM DO SNP RS3869066 USANDO PCR-RFLP..... | 34 |
| 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 38 |
| 5. RESULTADOS | 40 |
| 5.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO | 40 |
| 5.2 VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA..... | 41 |
| 6. DISCUSSÃO | 42 |
| 7. CONCLUSÕES | 48 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Região HLA, banda 6p21.3 | 16 |
| Figura 2: Desenho esquemático de uma molécula HLA de classe I e II..... | 17 |
| Figura 3: Gráfico mostrando o número de alelos nomeado por ano a partir de 1987 a março de 2017 | 20 |
| Figura 4: Nomenclatura oficial, designada aos genes do complexo MHC | 22 |
| Figura 5: Distribuição da frequência do haplótipo A*31:01 no Brasil | 27 |
| Figura 6: Mapas da região de desequilíbrio de ligação rs3869066 (ZNRD1-AS1) com HLA-A*31: 01 | 35 |
| Figura 7: Esquema exemplificando os padrões de bandas dos produtos de PCR formados pelos primers A3101F e A3101R, correspondente a região ZNRD1-AS1, de 662 pb..... | 36 |
| Figura 8: Mapa da região ZNRD1-AS1 contendo o locus rs3869066, na qual a enzima BtsCI reconhece o SNP e cliva gerando fragmentos de vários tamanhos. | 37 |
| Figura 9: Esquema exemplificando os padrões de bandas dos resultados da PCR-RFLP..... | 38 |
| Figura 10: Padrões de resultados obtidos após a PCR-RFLP..... | 40 |
| Gráfico 1: Distribuição da frequência do SNP/alelo HLA-A*31:01 na população onde os dados demográficos estão disponíveis..... | 43 |
| Gráfico 2: Distribuição da frequência do alelo HLA-A*31:01 na população da América Central e do Sul. | 45 |
| Gráfico 3: Distribuição da frequência do alelo HLA-A*31:01 no Brasil. | 46 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Classificação de reações adversas a medicamentos. | 24 |
| Quadro 2: Classificação de reações adversas quanto à frequência. | 24 |
| Quadro 3: Exemplo de ADRs, seus sintomas e principais drogas relacionadas. | 25 |
| Quadro 4: Iniciadores utilizados nas reações de PCR..... | 35 |
| Quadro 5: Cálculos e fórmulas utilizados na análise estatística e para determinação da frequência alélica..... | 39 |
| Quadro 6: Distribuição da frequência do alelo HLA-A*31:01 no mundo por continentes. ... | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADR- *Adverse Drug Reactions*
- AFND- Allele Frequencies Net Database
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCs- Células Apresentadoras de Antígenos
- BLAST- Basic Local Alignmet Search Tool
- CBZ- Carbamazepina
- DIHS- Síndrome de Hipersensibilidade Induzida por Drogas
- DL- Desequilíbrio de Ligação
- DNA- Ácido Desoxirribonucleico
- DRESS- Erupção cutânea medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos
- EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético
- EM- Eritema Multiforme
- HHV- Herpes Vírus Humano
- HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
- HLA- *Human Leucocytary Antigens*
- HSS- Síndrome de Hipersensibilidade Induzida por droga
- IMGT/HLA- *Immunogenetics HLA Sequence Database*
- LT- Linfócitos T
- MHC- *Major Histocompatibility Complex*
- MPE- Exantema Maculopapular
- NCBI- National Center for Biotechnology Information
- NOTIVISA- Notificações da Vigilância Sanitária
- OMS- Organização Mundial de Saúde
- PEGA- Pustulose Generalizada Aguda Exantemática
- PCR- *Polymerase Chain Reaction*
- PCR-RFLP- Reação em Cadeia da Polimerase por polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
- RAM- Reação Adversas a Medicamentos
- SNPs- Single Nucleotide Polymorphisms
- SSJ- Síndrome de Stevens-Johnson
- SUS- Sistema Único de Saúde
- TCR- receptor de célula-T
- TEN- Necrose Epidérmica Tóxica
- UMC- Uppsala Monitoring Centre
- WHO-World Health Organization
- α - Letra grega Alfa
- β - Letra grega beta;
- °C- medida em graus Celsius;
- μ l- Microlitros;
- min- minuto(s);
- PB- Pares de bases
- ng- Nanograma(s)

RESUMO

Reações adversas a drogas (ADRs; do inglês *Adverse Drug Reactions*) são qualquer efeito maléfico inesperado ao paciente originados da administração de drogas ou medicamentos. Um dos fatores mais fortemente associados a essas reações é a variabilidade de genes HLA. Os genes HLA são responsáveis pela apresentação de antígenos, sendo considerados importantes biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e preditivo de determinadas doenças, são os mais polimórficos do genoma humano, possuindo centenas de alelos já descritos. Estudos farmacogenéticos recentes, têm implicado a associação entre alelos específicos de HLA e o aumento do risco a ADR. O HLA-A*31:01 e HLA-B*15:02 são exemplos associados a ADRs em pacientes tratados com a Carbamazepina (CBZ), sendo esta a droga de primeira linha usada para o tratamento de determinadas doenças neurológicas como epilepsia e neuralgia trigeminal. No presente projeto, foi implementado e validado um método de caracterização molecular de biomarcador imunogenético com elevado valor diagnóstico e preditivo para ADRs, baseado em análise de tag-SNP, que consiste em usar o polimorfismo em absoluto desequilíbrio de ligação (DL=1) com o alelo HLA-A*31:01. O SNP rs3869066, mostrou-se em vários estudos em absoluto desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-A*31:01 podendo ser usado para sua genotipagem indireta, via PCR-RFLP. O alelo HLA-A*31:01, é de ampla distribuição com uma frequência mundial de aproximadamente 4,4%. Esta variante também é comum em várias populações indígenas americanas e no Brasil a frequência desse alelo chega em média de 5,6%, mesmo não se conhecendo esses números em diversos estados brasileiros, nos quais o Pará se inclui, atuando assim como um bom marcador para ADR. Neste estudo, para determinar a frequência em Belém, após a padronização e validação do método, foi genotipado um total de 104 indivíduos da população de Belém. A análise demonstrou que dos 104 indivíduos, 7 (3,3%) foram positivos para HLA-A*31:01 (todos heterozigotos). Assim, na população de Belém, o SNP rs3869066 tem a frequência de 3,3%. Como o SNP rs3869066 está em total desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-A*31:01, pode inferir-se que o alelo tem uma frequência próxima a do SNP. Dessa forma, é possível observar que o SNP e o alelo estão presentes na população de forma semelhante, possibilitando uma tipagem indireta em outras populações. Porém, maiores investigações são necessários para determinar se a suscetibilidade a ADRs em pacientes epiléticos que fazem tratamento com a CBZ está associada a presença do alelo HLA-A*31:01. Assim o rastreio do paciente através de sua tipagem HLA, antes do início do tratamento ou logo no início, é interessante para novos resultados, além de poder prevenir o risco de ADRs. Como estes marcadores ainda são pouco usados no Brasil e o sistema de saúde pública (SUS) não financia a realização destes testes, espera-se que a metodologia aqui aplicada, por ser um sistema simples de genotipagem do SNP rs3869066 via PCR-RFLP que geralmente consome menos tempo, é mais barato (custo médio de R\$ 10,00 a R\$ 15,00 por amostra), e não requer laboratórios especializados, possa ser uma alternativa para a tipagem do alelo HLA-A*31:01 para prevenir as ADRs causadas pela CBZ. No entanto, devemos ter em mente que nem a presença desses SNPs nem a presença do alelo HLA-A*31:01 pode prever todos os pacientes com ADRs relacionados a CBZ.

Palavra-chave: Imunogenética, Carbamazepina, *HLA-A*31:01*, Reações Adversas a Drogas.

ABSTRACT

Adverse Drug Reactions (ADRs) are any unexpected malevolent effects to the patient from the administration of drugs or medications. One of the factors most strongly associated with these reactions is the variability of HLA genes. HLA genes are responsible for the presentation of antigens, being considered important biomarkers for the diagnosis, prognosis and predictive of certain diseases, are the most polymorphic of the human genome, possessing hundreds of described alleles. Recent pharmacogenetic studies have implicated the association between specific HLA alleles and increased risk for ADR. HLA-A*31:01 and HLA-B*15:02 are examples associated with ADRs related to Carbamazepine (CBZ), being the first line drug used for the treatment of certain neurological diseases such as epilepsy and trigeminal neuralgia. In the present project, a method of molecular characterization of immunogenic biomarker with a high diagnostic and predictive value for ADRs, based on tag-SNP analysis, was implemented and validated, which consists in using polymorphism in absolute linkage disequilibrium (DL=1) with the HLA-A*31:01 allele. The SNP rs3869066, has been shown in several studies in absolute linkage disequilibrium with the HLA-A*31:01 allele and could be used for its indirect genotyping, via PCR-RFLP. The HLA-A*31:01 allele is widely distributed with a world frequency of approximately 4.4%. This variant is also common in several American Indian populations and in Brazil the frequency of this allele reaches an average of 5.6%, even though these numbers are not known in several Brazilian states, in which Pará is included, thus acting as a good marker for ADR. In this study, to determine the frequency in Belém, after standardization and validation of the method, a total of 104 individuals from the Belém population were genotyped. The analysis showed that of the 104 individuals only 7 (3.3%) were HLA-A*31:01 positive (all heterozygous). Thus, in the population of Belém, the SNP rs3869066 has a frequency of 3.3%. As the rs3869066 SNP is in total linkage imbalance with the HLA-A*31:01 allele, it can be inferred that the allele has a frequency close to that of the SNP. Thus, it is possible to observe that the SNP and allele are present in the population in a similar way, allowing an indirect typing in other populations. However, further investigations are needed to determine whether susceptibility to ADRs in epileptic patients receiving CBZ treatment is associated with the presence of the HLA-A*31:01 allele. Thus, screening the patient through their HLA typing prior to initiation of treatment or early on is interesting for new results, in addition to being able to prevent the risk of ADRs. As these markers are still little used in Brazil and the public health system (SUS) does not finance the accomplishment of these tests, it is expected that the methodology applied here, being a simple genotyping system of the SNP rs3869066 via PCR-RFLP that generally consumes less time, is cheaper (average cost of R \$ 10.00 to R \$ 15.00 per sample), and does not require specialized laboratories, may be an alternative for typing the HLA-A*31:01 allele to prevent the ADRs caused by CBZ. However, it should be borne in mind that neither the presence of these SNPs nor the presence of the HLA-A*31:01 allele can predict all patients with CBZ-related ADRs.

Keywords: Immunogenetics, Carbamazepine, *HLA-A*31:01*, Adverse Drug Reactions.

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENES HLA E IMUNOGENÉTICA

O Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano, MHC (Major Histocompatibility Complex), é composto por um conjunto de genes altamente polimórficos e intimamente relacionados, presentes em todos os vertebrados. No homem, por terem sido detectados inicialmente nos leucócitos, o MHC foi designado como antígeno leucocitário humano (HLA; do inglês Human Leukocyte Antigens) (Gruen, Weissman, 1997; Magalhães *et al.*, 2004; Trowsdale, 1995).

Os genes HLA, podem ser considerados importantes biomarcadores para o diagnóstico de determinadas doenças e valiosos fatores prognóstico e preditivo. Ocupam um papel de destaque e são um dos maiores grupos de genes estudados em imunogenética, que por sua vez, baseia-se no estudo de genes considerados imunorrelevantes, ou seja, genes que influenciam no equilíbrio saúde e doença de indivíduos e populações (Site: Nature, acesso: 2016; Chaplin, 2010; Dausset, 1958; Prugnolle *et al.*, 2005).

Estudos farmacogenéticos recentes, embora não completamente elucidados, têm implicado a associação entre alelos específicos de HLA e o aumento do risco a reações adversas a drogas (ADRs), podendo resultar no insucesso de tratamentos e muitas vezes levando a uma significativa morbidade e ocasionalmente mortalidade. O HLA-A*31:01 e HLA-B*15:02 são exemplos associados a ADRs, em pacientes epiléticos que fazem tratamento com a Carbamazepina e o HLA-B*58:01 diretamente ligado a reações graves em pacientes que utilizam Alopurinol no tratamento de Artrite Gotosa (Amstutz *et al.*, 2014).

As variações nas sequências das moléculas do MHC, muitas vezes estão ligadas à suscetibilidade a determinadas doenças como: doenças inflamatórias, por exemplo a espondilite anquilosante, associada ao HLA-B27; erros inatos do metabolismo, como a deficiência de 21-hidroxilase e doenças de origem auto-imune como a Diabetes Mellitus, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, miastenia gravis e artrite reumatoide (Magalhães *et al.*, 2004).

Essa suscetibilidade a doenças baseadas no MHC tem influenciado cada vez mais as análises imunogenéticas e na prática clínica, pois este ainda possui diversos genes que contribuem para muitas outras doenças, tanto de caráter hereditário, como na suscetibilidade a doenças que são resultados de ADRs em que o mecanismo ainda é incerto (Amstutz *et al.*, 2014).

1.2 O COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL

O sistema MHC foi identificado pelos cientistas, através de pesquisas sobre rejeição de tecidos transplantados entre camundongos, com a introdução de técnicas de prevenção a rejeição de tecidos e órgãos, mostrando assim que a principal responsável pela rápida rejeição de tecidos transplantados, é uma única região genética chamada de locus de histocompatibilidade principal (histo, de tecido) (Abbas & Lichtman, 2005; Snell, 1948; Trowsdale *et al.*, 2013).

A primeira descrição de uma molécula HLA, foi feita na década de 50 por Jean Dausset, um médico hematologista francês, que identificou o aloantígeno HLA-A2, que foi o primeiro antígeno de transplantação descrito. Nos anos de 1960 a 1970, foi descoberto a importância fundamental dos genes do MHC para todas respostas imunes, sendo responsáveis pela apresentação de antígenos, também foi descoberto posteriormente, que alelos particulares de MHC herdados estavam associados à muitas doenças autoimunes (Fernandes *et al.*, 2003; Oliveira, 2014). Em 1974, Lamm *et al.*, a partir de estudos familiares e análises com células somáticas híbridas, localizaram o sistema HLA no cromossomo 6 (Lamm *et al.*, 1974; Mayr, 1973). No mesmo ano, Rolf Zinkernagel e Peter Doherty, demonstraram que as moléculas HLA estavam envolvidas diretamente no reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T (Zinkernagen *et al.*, 1974). Os HLA-A e B foram os primeiros HLA descobertos, e logo em seguida o locus HLA-C (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1968). Nas décadas de 70 e 80, foram então introduzidos os termos de Classe I para descrever os antígenos HLA-A, -B e -C e Classe II para descrever os antígenos HLA -DR, DQ e DP (Klein, 1977; Thorsby, 2009).

Na região do MHC, em humanos, estão localizados os genes HLA, no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Contendo mais de 200 genes (loci), dos quais 40% estão envolvidos com o sistema imune, o que corresponde a 0,13% do genoma humano (Magalhães *et al.*, 2004; Shiina *et al.*, 2009). Esses genes estão dispostos em três regiões ou classes genômicas, sendo dividido de acordo com sua estrutura e função dos produtos gênicos, como: classe I, II e III (Goldberg, Rizzo, 2015; Shiina *et al.*, 2009). Apenas os genes de classe I e II estão envolvidos na apresentação de antígenos para os Linfócitos T (LT), ambas são expressas como heterotrímeros, ou seja, em que duas cadeias são as moléculas do MHC e a terceira é o peptídeo associado (Shiina *et al.*, 2004, Shiina *et al.*, 2009; Williams, 2001) (**Figura 1**).

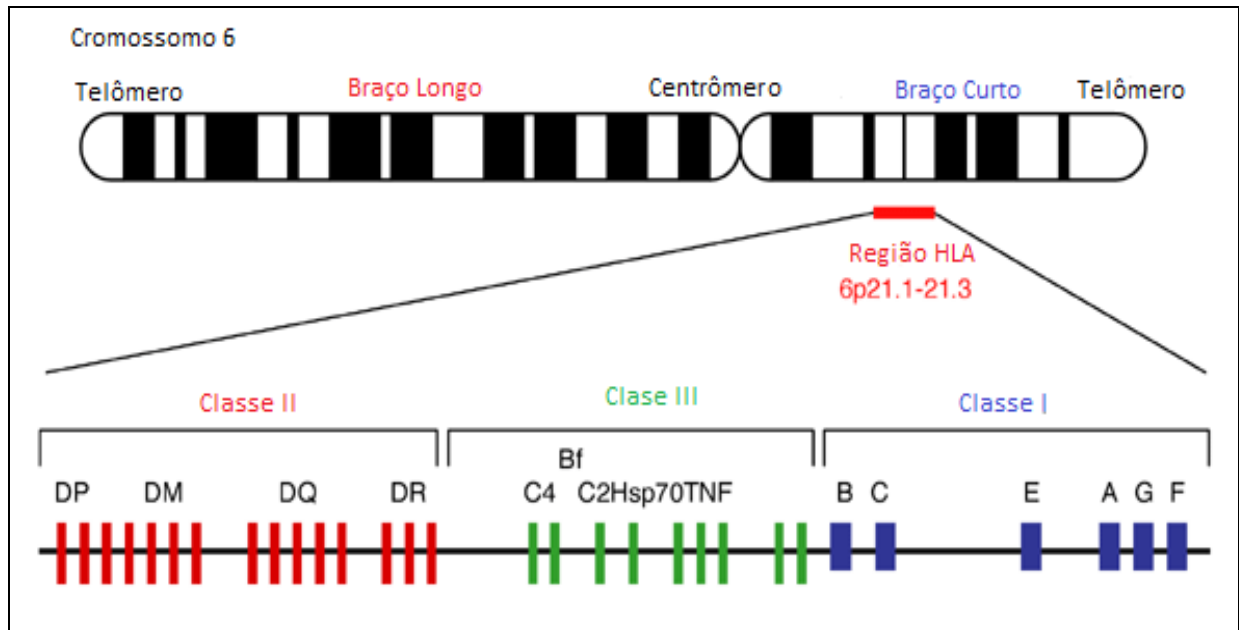


Figura 1: Região HLA, banda 6p21.3. Os genes e pseudogenes representados de acordo com a cor do seu grupo alélico. Fonte: Expert Reviews in Molecular Medicine© Cambridge University Press (Modificado), 2017.

1.2.1 Funções Biológicas

Suas funções biológicas foram inicialmente envolvidas unicamente com a compatibilidade tecidual relacionada à transplantes de órgãos e rejeição de tecidos transplantados, sendo chamado de “antígeno de transplantação”. Mais tarde, foi descoberto e demonstrado sua co-relação com mais de 40 doenças humanas (Gorodezky *et al.*, 2006).

As moléculas HLA tem como função básica promover o reconhecimento de peptídeos pelos linfócitos T CD8+ e T CD4+. Esse reconhecimento ocorre através do processamento dos antígenos que consiste basicamente na degradação de proteínas em peptídeos, que se ligam às moléculas do MHC, formando complexos peptídeo-MHC na superfície das células para o reconhecimento potencial pelas células T. Isso acontece tanto nas moléculas de classe I como na de classe II, através de 2 vias pelas quais o antígeno pode ser processado e assim se ligar à molécula do MHC: MHC de classe I para antígenos endógenos (via citosólica) e MHC de classe II para proteínas exógenas (via endolítica) (Magalhães *et al.*, 2004; Marsh *et al.*, 2000).

São moléculas de importância fundamental para inúmeras funções imunológicas, incluindo a seleção clonal das células T, indução de tolerância, imunidade mediada por células T, produção de anticorpos, respostas inflamatórias, produtos celulares como as citocinas e anticorpos, além de diversos outros fatores ligados ao sistema imune e seu funcionamento. Conseqüentemente, em função da sua enorme complexidade, sua influência na suscetibilidade ou resistência à diversas doenças autoimunes, o importante papel das moléculas do MHC

desperta grande interesse médico, pois além de estar diretamente envolvido com a rejeição de órgãos e tecidos, também influencia na suscetibilidade a patógenos, assim como na variabilidade individual e na suscetibilidade a doenças infecciosas e autoimunes (Trowsdale *et al.*, 2013).

1.2.2 Organização Genética e Estrutura Molecular

O MHC é dividido de acordo com a estrutura e a função dos produtos gênicos em três regiões, como: classe I, classe II e classe III (Shiina *et al.*, 2004). As regiões de classe I e II codificam dois grupos de proteínas bem distintas estruturalmente.

A região mais distante corresponde ao MHC de classe I, situa-se na direção mais telomérica em 6p, ocupa aproximadamente 1,8 Mb e contém 128 loci, dos quais 19 são loci HLA. Abriga, entre outros, os genes que codificam a síntese das cadeias pesadas α das moléculas de classe I considerados HLA clássicos HLA-A, B e C (Shiina *et al.*, 2009; Shiina *et al.*, 2004; Williams, 2001). Esses genes são caracterizados pelo grau de polimorfismos extraordinário, com 2.735 alelos nos loci em HLA-A, 3.455 alelos em HLA-B e 2.259 alelos em HLA-C. Existem também outros loci que são classificados como HLA de classe I não clássicos, que são menos variáveis, e codificam os genes HLA-E, -F, -G, HFE, e MICA e MICB (Goldberg, Rizzo, 2015). Todas as células nucleadas expressam moléculas de classe I em sua superfície celular, e cada indivíduo pode apresentar de três a seis diferentes tipos dessas moléculas na superfície de suas células (Germain, 1994).

Cadeias polipeptídicas formam as moléculas HLA de classe I: uma cadeia α pesada ancorada à membrana da célula, codificada pelo MHC, e uma cadeia β 2-microglobulina (β 2m), codificada no cromossomo 15. A molécula HLA de classe I é dividida em um total de quatro domínios: dois extracelulares, sendo um domínio aminoterminal de ligação com peptídeos, e outro semelhante à imunoglobulina, mais um domínio transmembrânico, e um domínio citoplasmático. A cadeia α é dividida em α 1, α 2 e α 3. O sítio de ligação com peptídeos encontra-se entre as cadeias α 1 e α 2 (Marsh *et al.*, 2000; Shiina *et al.*, 2009) (**figura 2**).

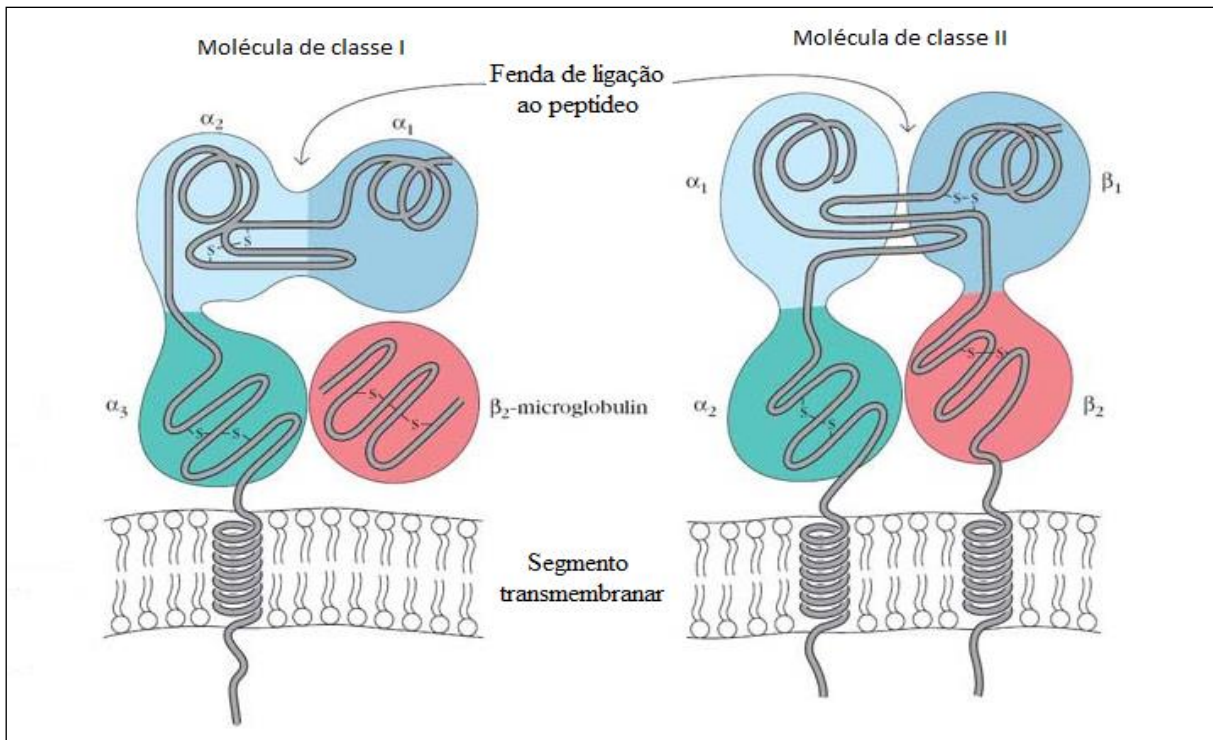


Figura 2: Desenho esquemático de uma molécula HLA de classe I e II. Fonte: <http://periobasics.com/major-histocompatibility-complex.html>. (Modificado), 2017.

Os genes do MHC de classe II, situa-se mais centromericamente. São predominantemente expressos em células apresentadoras de antígenos (APCs). Cada indivíduo pode apresentar cerca de 10 a 20 diferentes moléculas de classe II na superfície de suas APCs (Germain, 1994). As cadeias α e β são semelhantes entre si, e formam os heterodímeros funcionais das moléculas de classe II clássicas HLA-DR, HLA-DQ, e HLA-DP, e não clássicas HLA-DM e HLA-DO (Marsh *et al.*, 2000; Trowsdale *et al.*, 2001). A cadeia α é um pouco maior do que a β , as partes extracelulares das cadeias α e β são subdivididas em dois segmentos denominados α_1 e α_2 ou β_1 e β_2 . A região de ligação dos peptídeos na molécula HLA classe II é formada pela interação das duas cadeias, mais especificamente entre os segmentos α_1 e β_1 (Horton *et al.*, 2004) (**figura 2**).

Localizada entre os as regiões de classe I e II, uma terceira região genômica carrega numerosos genes não relacionados ao MHC, porém alguns com importantes funções imunológicas, cujos os produtos estão envolvidos nas respostas inflamatórias tais como: as proteínas do sistema complemento (C2, C4A e CBF), os genes de fatores de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β , LTA e LTB), e genes que codificam chaperonas, proteínas do choque térmico (Carroll *et al.*, 1987; Sargent *et al.*, 1989).

1.2.3 Polimorfismo Genético

Além da alta densidade e o agrupamento de genes com funções relacionadas ao sistema imune, uma das principais características do sistema HLA que surgiu a partir dos estudos dos genes do MHC humano é a extrema variação entre os indivíduos, chamada de polimorfismo. Os genes HLA são os mais polimórficos do genoma humano, possuindo centenas de alelos já descritos (Horton *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2013). É o conjunto de genes, dentre todos os loci do genoma humano, com maior variabilidade genética (Horton *et al.*, 2004; Shiina *et al.*, 2004).

As sequências de alelos dos genes polimórficos de classe I e II quando comparadas, mostra que as substituições de nucleotídeos ocorrem na região dos éxons que codificam a fenda de ligação ao peptídeo e o sítio de interação com o receptor de célula T. Essas substituições estão concentradas de forma seletiva, ou seja, nos locais em que alterações de nucleotídeos promovem mudanças dos aminoácidos que estão em contato direto com o peptídeo ou com o receptor de célula T (Parham, 1999). Essas diferenças de aminoácidos nas sequências de produtos de diferentes alelos de um gene não alteram a estrutura básica da molécula de classe I ou classe II. O polimorfismo concentra-se na parte superior da molécula, tanto nas moléculas da classe I quanto da classe II, nos resíduos de aminoácido do assoalho e/ou nas proximidades das α -hélices no sítio de ligação ao peptídeo, o que determina sua afinidade e especificidade de ligação. Aminoácidos conservados no sítio de ligação ao peptídeo permitem a formação de uma rede de pontes de hidrogênio com a cadeia principal do peptídeo, o que proporciona a maior parte da afinidade de ligação, permitindo assim, que as moléculas HLA apresentem um amplo espectro de peptídeo, para uma vigilância mais eficaz dos patógenos, porém essa diversidade é limitada (Magalhães *et al.*, 2004; Parham, 1999).

Essas características podem indicar, embora nunca definitivamente comprovado, que o polimorfismo é resultado de um processo de seleção natural, como uma consequência da resposta evolucionária dos vertebrados à invasão de microrganismos, assegurando assim a continuidade da espécie mesmo na presença de infecções emergentes. É provável que as pressões exercidas por grandes epidemias de doenças infecciosas tenham selecionado novos alelos HLA, assim, somente alguns indivíduos de uma espécie sobrevivem pelo efeito protetor do polimorfismo genético do MHC garantindo a perpetuação da espécie (Magalhães *et al.*, 2004; Parham, 1999). Nos loci HLA o tipo mais comum de variação é o polimorfismo de base única (SNP) (Horton *et al.*, 2004). São mecanismos de diversidade genética nos loci HLA, número variável de cópias e polimorfismos do tipo inserção ou deleção, e conversão gênica

(Chen *et al.*, 2009; Mccarroll *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 2008; Simon-sanchez *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2004; Street *et al.*, 2011; Trowsdale *et al.*, 2013).

Foram publicados em um banco de dados específico para sequências HLA, Immunogenetics HLA Sequence Database (IMGT/HLA) versão 3.28.0 desde 1987 até março de 2017 (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) um total 16,933 sequências de alelos HLA. Essa variabilidade, devido à descoberta de novos alelos, tem aumentado continuamente, podendo resultar na codificação de proteínas que diferem umas das outras em um ou mais aminoácidos (Pereira *et al.*, 2009). Entre os loci HLA Classe I, o HLA-B é o mais polimórfico com mais de 4.179 alelos descritos (Horton *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009). Na figura 3 encontramos o número de alelos nomeado por ano a partir de 1987 a março de 2017, representando o número crescente de alelos descritos durante os anos.

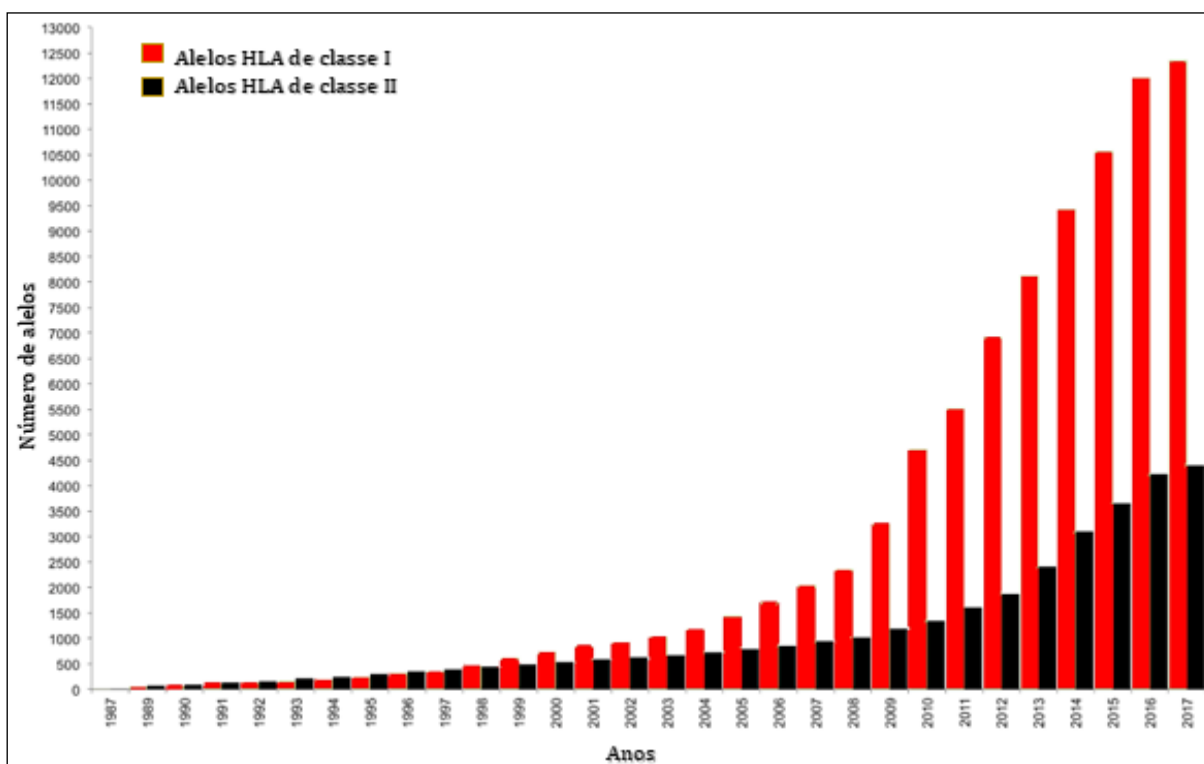


Figura 3: Gráfico mostrando o número de alelos nomeado por ano a partir de 1987 a março de 2017. Colunas em vermelho: alelos HLA classe I, coluna em preto: alelos HLA classe II. Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html> (IMGT/HLA, 2017) (Modificado) 2017.

1.3 NOMENCLATURA DOS ALELOS HLA

A normatização da nomenclatura dos alelos HLA é determinada pelo Comitê Internacional que se reúne periodicamente para denominar genes descobertos recentemente, e até mesmo mudar a estrutura de uma determinada nomenclatura (Donadi, 2000).

Em 1968, devido a elevada diversidade genética dos genes, e para normatização da denominação dos alelos de histocompatibilidade, o Comitê Internacional decidiu organizar a nomenclatura do sistema HLA, aumentando o número de dígitos e definindo a cadeia onde o polimorfismo é mais acentuado (WHO Nomenclature-Committee, 1968). As cadeias que formam os heterodímeros das moléculas de histocompatibilidade são designadas pelas letras gregas α ou β , ao passo que os genes que codificam essas cadeias são designados pelas letras A ou B. Uma vez que os loci de classe I apresentam polimorfismo apenas na cadeia α (gene A), o Comitê decidiu manter as designações HLA-A, HLA-B e HLA-Cw. No entanto, com a finalidade de abranger todo polimorfismo identificado, e ainda, aquele a ser definido no futuro, aumentou o número de dígitos para 4, sendo que o nome de cada alelo HLA tem um número único correspondente até quatro conjuntos de dígitos separados por dois pontos. Os 2 dígitos iniciais, colocados logo após a designação do locus, referem-se às tipificações definidas previamente por sorologia, e os 2 dígitos seguintes referem-se às denominações dos alelos específicos. Assim, o grupo de alelos que codifica o antígeno HLA-A1 passou a ser denominado genericamente de HLA-A*01, contendo os alelos HLA-A*01:01, *01:02 e *01:03. O grupo de alelos que codifica o antígeno HLA-B27 passou a ser chamado HLA-B*27, englobando os alelos HLA-B*27:01 até B*27:23, identificando pelo menos 23 variantes da molécula B27, e assim por diante (Bodmer *et al.*, 1991; Marsh *et al.*, 2010).

Os alelos de classe II apresentam polimorfismo tanto nas cadeias α e β , dessa forma foram acrescentadas as letras A e B na denominação do alelo. Da mesma forma que, para os alelos de classe I, os 2 dígitos iniciais indicam as especificidades prévias definidas pela sorologia, ao passo que as 2 últimas identificam o alelo. Assim, o gene que codifica a molécula HLA-DR1 passou a ser denominado genericamente de HLA-DRB1*01, abrangendo os alelos DRB1* 01:01 *01:02 e *01:03, sendo a letra B representativa da cadeia β , altamente polimórfica nos genes HLADR (Bodmer *et al.*, 1991; Marsh *et al.*, 2010). Em 1990, foi adicionado um quinto dígito para distinguir as sequências que diferem apenas por substituições nucleotídicas sinônimas (mutações silenciosas) (Bodmer *et al.*, 1991).

Um comitê internacional se reúne periodicamente para uniformizar a nomenclatura HLA onde o banco de dados IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>) é frequentemente atualizada. Contém uma compilação das sequências HLA humanas e ferramentas para a exploração desses dados, como o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Foi submetida à atualização nos últimos anos para acomodar o grande número de novos alelos. Resumindo, cada locus tem a sua própria nomeação seguida por um asterisco (como HLA-A* e HLA-C*), estes são sucedidos por nomeação dos alelos, que são números únicos que formam a

composição de um conjunto de até quatro dígitos separados por dois pontos (**figura 4**). A nomenclatura atual, também inclui um sufixo que pode ser adicionado ao nome do alelo para indicar estado de expressão, como sufixo (N) para proteínas nulas, (L) para os expressos em níveis baixos, (S) para aquelas que são secretadas, (C) para um produto expresso apenas no citoplasma, (A) de aberrante quando há alguma dúvida se qualquer proteína é expressa, ou (Q) de questionável para as mutações no alelo conhecidas que afetam os níveis normais de expressão (IMGT).



Figura 4: Nomenclatura oficial, designada aos genes do complexo MHC. Fonte: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> (Modificado), 2016.

1.4 MARCADORES HLA COMO FATORES DE RISCO E PROGNÓSTICO

1.4.1 Reações Adversas a Drogas

Os medicamentos são uma ferramenta terapêutica importante, ajudam na melhoria da qualidade e expectativa de vida do ser humano. Porém, para que a farmacoterapia seja eficaz e produza os resultados esperados, é indispensável que os medicamentos tenham qualidade, segurança, eficácia, e que sejam prescritos e utilizados de forma adequada (Marin *et al.*, 2003). Nas últimas décadas, alguns estudos têm mostrado que a morbidade e a mortalidade relacionado ao uso de medicamentos constituem um importante problema de saúde (OMS, 2004). É importante considerar que a ocorrência de reações adversas constitui-se em fator intrínseco ao

próprio uso do medicamento (Marin *et al.*, 2003).

Assim, qualquer efeito não relacionado com o objetivo do tratamento de um produto farmacêutico, sendo estas reações indesejáveis, porém previstas, mesmo que a droga seja usada em doses farmacologicamente corretas é denominado efeito colateral. Um exemplo de efeito colateral, são os anti-histamínicos que são capazes de causar sonolência, epigastralgia com aspirina, taquicardia com drogas adrenérgicas, etc (Motta, Giavina-Bianchi, 2005; OMS, 2004).

Por outro lado, as reações adversas a drogas (ADR; do inglês Adverse Drug Reactions) são efeitos maléficos ao paciente originados da administração de drogas ou medicamentos. É qualquer resultado menos provável e prejudicial que pode ocorrer após a administração do medicamento em doses recomendadas, para fins terapêuticos. Porém, mesmo quando usado de acordo com os métodos tradicionais e dentro das recomendações de administração, qualquer medicamento pode resultar em ADR (Ghirlinzoni *et al.*, 2012; Motta, Giavina-Bianchi, 2005; Pirmohamed *et al.*, 1998). No Brasil, essas reações são denominadas como RAMs (reação adversa ao medicamento). Para prevenir ou reduzir esses efeitos nocivos manifestados pelo paciente e melhorar as ações de saúde pública, é fundamental dispor de um sistema de farmacovigilância conforme define a OMS (Organização Mundial de Saúde) (ANVISA, 2001; OMS, 2004).

As ADRs ou RAMs, foram separadas em: reações do tipo A, que fazem parte do efeito da droga e são consideradas dose-dependentes, podem então ser prevenidos em sua maioria; e reações do tipo B, são raras sendo observadas na minoria dos pacientes (Ghirlinzoni *et al.*, 2012; Pirmohamed *et al.*, 1998). A origem das ADR tipo B não é completamente compreendida e incluem reações de base imune, podem ser sérias e levar a morte (McCormack *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Com a inclusão de novos tipos de ADRs, atualmente são considerados os tipo A, B, C, D, E, F. Ainda assim, nem sempre é possível classificar uma ADR nessas categorias, uma vez que o mecanismo que leva à sua ocorrência pode não ser conhecido (Edward, Aronson, 2000). O quadro seguinte apresenta essa classificação:

Quadro 1: Classificação de reações adversas a medicamentos.

| Tipo de reação | Mnemônico | Características | Exemplos |
|---|--|---|---|
| A-Relacionado à dose | Aumento | <ul style="list-style-type: none"> • Comum • Relacionada a um efeito farmacológico da droga • Esperada • Baixa mortalidade | <ul style="list-style-type: none"> • Efeitos tóxicos: intoxicação digitálica; síndrome serotoninérgica com ISRSs • Efeitos colaterais: efeitos anticolinérgicos de antidepressivos tricíclicos |
| B- Não relacionado à dose | Bizarro | <ul style="list-style-type: none"> • Incomum • Não relacionada a um efeito farmacológico da droga • Inesperada • Alta mortalidade | <ul style="list-style-type: none"> • Reações imunológicas: hipersensibilidade à penicilina • Reações idiossincráticas: porfiria aguda, hipertermia maligna, pseudoalergia (ex: rash em uso de ampicilina) |
| C- Relacionado à dose e ao tempo de uso | Crônico | <ul style="list-style-type: none"> • Incomum • Relacionada ao efeito cumulativo do fármaco | <ul style="list-style-type: none"> • Supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal por corticosteróides |
| D- Relacionada ao tempo de uso | Atraso (do inglês, <i>delayed</i>) | <ul style="list-style-type: none"> • Incomum • Normalmente relacionada a dose • Aparece algum tempo após o uso do medicamento | <ul style="list-style-type: none"> • Teratogênese (ex: adenocarcinoma associado ao dietilestilbestrol) • Carcinogênese • Discinesia tardia |
| E- Abstinência | Fim do uso (do inglês, <i>and of use</i>) | <ul style="list-style-type: none"> • Incomum • Ocorre logo após a suspensão do medicamento | <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de abstinência à opiáceos • Isquemia miocárdica (suspensão de β-bloqueador) |
| F- Falha inesperada da terapia | Falha | <ul style="list-style-type: none"> • Comum • Relacionado à dose • Frequentemente causado por interação dos medicamentos | <ul style="list-style-type: none"> • Dosagem inadequada de anticoncepcional oral particularmente quando utilizados indutores enzimáticos |

Fonte: Edward, Aronson, 2000. (Modificado), 2017.

Quanto à frequência das reações, são consideradas as categorias seguintes:

Quadro 2: Classificação de reações adversas quanto à frequência.

| | | |
|-----------------------|----------------------|------------------|
| Muito comum* | > 1/10 | >10% |
| Comum (frequente) | >1/100 e <1/10 | > 1% e < 10% |
| Incomum (infrequente) | >1/ 1.000 e <1/100 | > 0.1% e < 1% |
| Rara | >1/ 10.000 e <1/1000 | > 0.01% e < 0.1% |
| Muito rara | <1/1000 | <0.01% |

Fonte: Uppsala Monitoring Centre, 1991; Meyboom, Egberts; 1999.

São exemplos de ADRs consideradas como raras, porém importantes, a Necrose

Epidérmica Tóxica (TEN) e Síndrome de Stevens-Johnson (SSJ), que são de alta mortalidade de 1-5% em SSJ e de 20-30% para TEN. Estas são caracterizadas por destruição da epiderme e epitélio da mucosa e muitas vezes podem atingir os órgãos, (Aihara, 2011; Schneck *et al.*, 2008). Muitas drogas podem estar envolvidas na indução de SSJ e TEN como o Alopurinol, Anticonvulsivantes, anti-inflamatórios não esteroides e sulfonamida aromática entre outras (Bastuji-Garins *et al.*, 1993; Roujeau JC, 1997; Rzany *et al.*, 1996; Schneck *et al.*, 2008). Outras ADRs são a Síndrome de Hipersensibilidade Induzida por Drogas (DIHS) e a erupção cutânea medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos (DRESS). Em geral estas ocorrem 2 semanas ou mais após a administração da droga, e causam sintomas como febre, envolvimento de órgãos internos, alterações hematológicas, linfadenopatias, assim como reativação do herpes vírus humano (HHV) e menos frequente citomegalovírus (Kano *et al.*, 2006; Shiohara *et al.*, 2006; Tohyama *et al.*, 2007). São exemplos de drogas associadas com DIHS e DRESS as aminas aromáticas como a carbamazepina, fenitoína e fenobarbital, sendo estas as mais comuns (Aihara, 2011).

Quadro 3: Exemplo de ADRs, seus sintomas e principais drogas relacionadas.

| Exemplo de ADRs | TEN e SSJ | DIHS e DRESS |
|------------------------|---|---|
| Sintomas | <ul style="list-style-type: none"> • destruição da epiderme • epitélio da mucosa; • podem atingir órgãos | <ul style="list-style-type: none"> • febre • env. de órgãos internos • alter. hematológicas • linfadenopatias • reativação do herpes vírus humano (HHV) • menos citomegalovírus |
| Drogas | <ul style="list-style-type: none"> • Alopurinol • Anticonvulsivantes • anti-inflamatórios não esteroides • sulfonamida aromática entre outras | <ul style="list-style-type: none"> • aminas aromáticas como: carbamazepina, fenitoína e fenobarbital, sendo estas as mais comuns |

Fonte: Bastuji-Garins *et al.*, 1993; Roujeau JC, 1997; Rzany *et al.*, 1996; Schneck *et al.*, 2008; Aihara, 2011; Shiohara *et al.*, 2006; Tohyama *et al.*, 2007; Kano *et al.*, 2006.

Nos últimos anos as ADRs tem sido associadas não só a fatores imunológicos, mas também genéticos, e um dos fatores mais fortemente associado a elas é a variabilidade de genes HLA (Chung *et al.*, 2008). No Allele Frequencies Net Database (AFND) foram identificados 49 alelos HLA associados com ADR relacionados a 22 drogas, destes 20 alelos foram encontrados associados a apenas 3 drogas anticonvulsivantes usadas no tratamento da epilepsia (Carbamazepina, Lamotrigina e Phenytoina) (González-Galarza *et al.*, 2014).

1.4.2 Carbamazepina e risco genético de hipersensibilidade

Carbamazepina (CBZ) pertence à classe de antiepilépticos aromáticos. É a droga de primeira linha usada para o tratamento de determinadas doenças neurológicas como epilepsia e neuralgia trigeminal, em alguns países também para o tratamento de perturbações bipolares. Atua bloqueando os canais de sódio voltagem-dependentes em neurônios, liga-se à conformação inativa destes canais, abrandando a sua reativação. Dessa forma, com esse mecanismo, a CBZ reduz a frequência de disparo repetitivo dos potenciais de ação, impedindo a atividade anormal dos neurônios no cérebro (Amstutz *et al.*, 2014).

As reações de hipersensibilidade induzida por CBZ são reações adversas que ocorrem independente da dose administrada e envolvem habitualmente a pele, atingindo de 5-10% dos pacientes tratados com a CBZ e a maioria consistem em reações moderadas, como exantema maculopapular (MPE) e eritema multiforme (EM) que requerem a interrupção do tratamento com a droga (McCormack *et al.*, 2011; Pirmohamed *et al.*, 2004). No entanto, podem ocorrer, mesmo que raramente, as formas graves de ADR e com risco de vida, como SSJ, TEN, DIHS e pustulose generalizada aguda exantemática (PEGA) (Amstutz *et al.*, 2014; Pirmohamed *et al.*, 2004). Apesar de raro, aproximadamente de 1-10 para cada 10 mil doentes tratados com a CBZ, desenvolvem esses tipos de reações que podem ser fatais com uma mortalidade variando de 10% para SSJ e DIHS e de até 50% para as TEN (Amstutz *et al.*, 2014; Knowles, Shear, 2009; Mockenhaupt, 2011). Todas reações de hipersensibilidade induzidas por CBZ são geralmente retardado, ocorrendo vários dias após a primeira dose da droga administrada, por exemplo, a SSJ e TEN os sintomas se manifestam em geral após 1-3 semanas e HSS de 4-8 semanas. Essas reações também podem ter início em tempo mais curto em casos quando já ocorreu uma exposição anterior a droga, onde há uma sensibilização (Amstutz *et al.*, 2014).

1.4.3 HLA-A*31:01 x Carbamazepina

Como visto anteriormente, cada indivíduo tem na superfície de suas células uma combinação única de moléculas diferentes do MHC, como uma “impressão digital” possibilitando que o sistema imune reconheça as células que são do corpo como “próprio” e as diferencie do não-próprio (Aihara, 2011; Chung *et al.*, 2010; Lochareernkul *et al.*, 2008; McCormack *et al.*, 2011). O gene HLA-A, tem 3492 alelos descritos atualmente, dos quais 2480 formam proteínas distintas (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Destes alelos, estudos sugerem que dois, o HLA-A*31:01, relatado pela primeira vez em 2006 e o HLA-

B*15:02 em 2004, são de grande importância para o prognóstico e preditivos em ADR à anti-epiléticos como a CBZ. Apesar de ainda terem o mecanismo pouco esclarecido, se supõe que haja uma interação entre estes alelos HLA com uma molécula de CBZ de uma forma que eles são reconhecidos pelas células T como "não-próprio", o que desencadeia uma reação imune (Amstutz *et al.*, 2014).

O alelo HLA-B*15:02 está ausente no Brasil ou observado esporadicamente, sendo prevalentes em indivíduos do sudeste asiático e restrito a populações asiáticas e da Oceania. O alelo HLA-A*31:01, por sua vez, é de ampla distribuição com uma frequência de $\geq 3\%$ em diversas populações, indicando uma significância à nível mundial desta variante de risco. Em particular, esta variante é comum em várias populações indígenas americanas atuando como um bom marcador prognóstico/preditivo para ADR (Amstutz *et al.*, 2014) (figura 5).



Figura 5: Distribuição da frequência do haplótipo A*31:01 no Brasil. Fonte: http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=A*31:01. (Modificado), 2017.

As frequências traçadas no mapa correspondem à incidência do haplótipo A*31:01 em populações onde os dados demográficos estão disponíveis. No Brasil a frequência desse alelo é em média de $\cong 6\%$ na população, porém, não se conhece esses números em diversos estados brasileiros, nos quais o Pará se inclui (AFND, 2017).

Embora a associação do HLA-A*31:01 com ADR induzida por CBZ seja limitada e tenham uma menor magnitude, devido ao menor número de estudos disponíveis quando

comparado com HLA-B*15:02, estudos têm demonstrado resultados consistentes em diversas etnias (Amstutz *et al.*, 2014).

Já a associação do HLA-A*31:01 com SSJ e TEN induzida por CBZ apesar de incerta, dois estudos relataram uma alta frequência desse alelo em pacientes com SSJ/TEN, 5 de 6 pacientes japoneses e 5 entre 12 pacientes europeus (Ozeki *et al.*, 2011; McCormack *et al.*, 2011). Isso torna a associação entre HLA-A*31:01 com SSJ/TEN induzida por CBZ mais forte. Uma tendência significativa semelhante foi observado em um estudo coreano, em que 3 dos 7 pacientes com SSJ/TEN-CBZ eram portadores do HLA-A*31:01 (Kim *et al.*, 2011). No entanto, outro estudo em japoneses mostrou apenas 1 portador de HLA-A*31:01 entre 5 pacientes com SSJ/TEN-CBZ (Ikeda *et al.*, 2010). Devido à raridade destas reações e escassez de estudos, existem dados limitados sobre a frequência de CBZ-SSJ/TEN e HSS e também para CBZ-MPE, onde existe alguma incerteza sobre a sensibilidade do teste genético para a HLA-A*31:01, com estimativas que variam de 26% a 61% (Mallal *et al.*, 2008).

Como praticamente todos os pacientes epiléticos iniciam tratamento com a Carbamazepina, estamos falando, de uma frequência de aproximadamente 50 000 000 pessoas no mundo, em que 40 000 000 dos casos ocorreriam em países em desenvolvimento. Na maioria dos estudos a incidência anual ficam entre 40-70 para cada 100 mil habitantes. No Brasil os estudos mostram que as estimativas nacionais estão próximas às internacionais, entre 0,5% a 2%. Dessa forma espera-se que por ano ocorra de 12,2 mil a 19 mil novos casos de epilepsia no Pará, dos quais uma boa parte será tratada com a carbamazepina, o que constitui uma considerável demanda para um biomarcador de ADR (Neto, Marchetti 2005). Assim o rastreio do paciente através de sua tipagem HLA, antes do início do tratamento ou logo no início, pode reduzir bastante o risco de ADRs. No Reino Unido estatísticas mostram que 7-12% das entradas em hospital são decorrentes de ADR e 5% dos óbitos hospitalares. No Brasil o uso desses marcadores ainda está iniciando e esta estatística é desconhecida (Pirmohamed *et al.*, 2004; Sarker *et al.*, 2015).

Essa monitorização é feita pela farmacovigilância, que por sua vez é responsável por identificar, avaliar e monitorar a ocorrência desses eventos adversos relacionados ao uso dos medicamentos comercializados no mercado brasileiro, com o objetivo de garantir que os benefícios relacionados ao uso desses produtos, sejam maiores que os riscos por eles causados (OMS, 2000). Assim, apesar de evidências para uma associação de HLA-A*31:01 com SSJ/TEN-CBZ ainda ser classificado como baixo, devido a resultados em que há um pequeno número de casos em estudos individuais, isso torna provável que as conclusões extraídas de evidências atuais, baseadas em pesquisas futuras podem mudar (Amstutz *et al.*, 2014).

1.4.4 Farmacovigilância

A Organização Mundial da Saúde define farmacovigilância como o conjunto de atividades relativas à detecção, avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou outros problemas relacionados a medicamentos (OMS, 2005). Desde então, as ações de farmacovigilância vem crescendo e resultando em grande impacto a nível nacional e internacional, gerando dados sobre eventos adversos e uso racional de medicamentos, visando o bem-estar e segurança dos usuários (Santos *et al.*, 2012). Recentemente a OMS ampliou seu campo de atuação para incluir: produtos fitoterápicos; medicamentos tradicionais e complementares; hemoterápicos; produtos biológicos; produtos para a saúde e vacinas (Abbing, 1993; Craven *et al.*, 1997; Fracchia *et al.*, 2000; Meyboom *et al.*, 1999; OMS, 2002). Assim, seu objetivo principal é promover a diminuição das taxas de morbidade e mortalidade relacionada ao uso de medicamentos, através da detecção precoce de reações adversas e interações medicamentosas que ainda são desconhecidas, detecção do aumento de frequências de reações conhecidas; identificação de possíveis fatores de risco e mecanismos subjacentes as reações; estimativa de aspectos quantitativos da análise benefício/risco e disseminação de informações necessárias para melhorar a prescrição e regulação de medicamentos; promover o uso racional e seguro de medicamentos; efetuar a avaliação e comunicação dos riscos e benefícios dos medicamentos no mercado; educar e informar os pacientes para que haja uma seleção e o uso coerente dos medicamentos pelos profissionais de saúde (ANVISA, 2001; OMS, 2000).

A utilização do termo farmacovigilância surgiu especialmente após ter sido marcado por um episódio de reação adversa grave, ocorrida em uma jovem de quinze anos, em 1848, que faleceu após cirurgia de rotina na unha de pododáctilo. Ao que indica, sua morte ocorreu pelo desenvolvimento de fibrilação ventricular devido ao uso de clorofórmio como anestésico (Routledge, 1998). Em 1961, começaram-se as preocupações com as questões de segurança dos medicamentos, após a tragédia causada pela talidomida. Naquela época, devido ao uso de um medicamento inseguro indicado para mulheres grávidas para combater enjoos, milhares de crianças nasceram com má-formação congênita como resultado da exposição (Dias, 2008; OMS, 2004).

Em 1968 foi criado o Projeto de Pesquisa Piloto, o Programa Internacional de Monitorização de Medicamentos da OMS, devido a necessidade de ações imediatas para a promoção de uma rápida disseminação de informações sobre ADRs. Com a extensão desse projeto, ele passou a fazer parte do Programa Internacional de Monitorização de Medicamentos

da Organização Mundial da Saúde, coordenado pelo The Uppsala Monitoring Centre (UMC) em Uppsala, Suécia (Dias, 2008; OMS, 2005; UMC, 2005). Seu propósito era desenvolver um sistema aplicável em esfera internacional, para identificar previamente esses efeitos desconhecidos ou pouco estudados (WHO, 1972; WHO, 1973). O número de centros nacionais que participam do Programa Internacional de Monitorização de Medicamentos da OMS começou envolvendo 10 países, em 1968, nos quais estavam presentes: Austrália, Canadá, Dinamarca, Alemanha, Irlanda, Holanda, Nova Zelândia, Suécia, Reino Unido e EUA (OMS, 2004; UMC, 2005). Sua atividade principal é a coleta de notificações espontâneas de suspeitas de ADRs. Atualmente são 86 países participantes do programa da OMS. O Brasil foi inserido neste programa no ano de 2001 (OPAS, 2002; Petramale, 2002). Outra função deste centro colaborador é receber notificações de todos os países que mantêm uma base de dados mundial sobre RAMs que atualmente, contêm mais de três milhões de notificações (OMS, 2004; UMC, 2005).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e o Ministério da Saúde, criaram o Projeto Hospitais Sentinela, objetivando a construção de uma rede de notificações da vigilância sanitária (NOTIVISA) através de um sistema informatizado na plataforma web para receber as notificações de eventos adversos e queixas técnicas relacionadas com os produtos sob vigilância sanitária, garantindo melhores produtos no mercado e maior segurança e qualidade para pacientes e profissionais de saúde (Bezerra *et al.*, 2009). A realidade é que em muitos hospitais só são identificadas as ADRs que causam grande dano ao paciente. As ADRs consideradas de menor proporção acabam não sendo notificados devido a inexistência de processos de identificação, notificação e registro das mesmas, ou até mesmo por medo da exposição e punição (Silva *et al.*, 2011).

Centros universitários de farmacologia e farmácia tem desempenhado papel importante por meio de ensino, capacitação, pesquisa, desenvolvimento de políticas, investigações clínicas, comitês de ética e dos serviços clínicos que proporcionam (Moore, 2001). Em muitas instituições médicas, particularmente nos países desenvolvidos, a monitorização de ADRs é reconhecida como uma atividade essencial de garantia da qualidade, porém é preciso que haja ainda maior integração da farmacovigilância com a prática clínica, pois, ainda hoje o acesso a informações atualizadas e clinicamente relevantes sobre medicamentos ainda é inadequado. A pesquisa e a capacitação em cursos de pós-graduação nessa área permanecem negligenciadas por muitas escolas de Ciências da Saúde. (Hall *et al.*, 1995). Além disso, apesar de ser recomendado aos pacientes que em caso de suspeita de terem sido afetados por uma ADR, comuniquem a seus médicos para que os mesmos possam notificar

ao centro de farmacovigilância, estima-se que apenas 5% dos médicos participam desse sistema (Egberts *et al.*, 1996).

A ausência dessas informações dificulta os gestores em avaliar os custos adicionais proporcionados pela ADR, como: aumento do tempo de internamento, solicitação de exames adicionais e medicamentos e/ ou procedimentos necessários para retratar os pacientes lesados. Assim, bancos de dados dos hospitais servem como subsídios para os gestores, permitindo dimensionar os custos e propor medidas práticas na melhoria dos serviços prestados (Nunes, 2000). Além disso, é necessário mais atenção na capacitação dos profissionais da saúde no que se refere a diagnóstico, gerenciamento e prevenção de ADRs, para se alcançar algo mais próximo da prática ideal. (Meyboom *et al.*, 1997).

2. JUSTIFICATIVA

A família de genes HLA são considerados genes imunorrelevantes que desempenham funções importantes no equilíbrio saúde-doença de indivíduos ou populações.

Estudos farmacogenéticos recentes, têm implicado a associação entre alelos específicos de HLA e o aumento do risco a reações adversas a drogas (ADRs), podendo resultar no insucesso de tratamentos e muitas vezes levando a uma significativa morbidade e ocasionalmente mortalidade. O alelo HLA-A*31:01, é de ampla distribuição em diversas populações, inclusive brasileira, indicando uma significância à nível mundial desta variante de risco. Em particular, esta variante é comum em várias populações indígenas americanas atuando como um bom marcador prognóstico/preditivo para ADR.

Porém, estes marcadores ainda são pouco usados no Brasil e o sistema de saúde pública (SUS) não financia a realização destes testes, os quais são apenas disponíveis em laboratórios particulares de diagnóstico a custos bastante inacessíveis a maioria dos usuários do SUS. Assim, motivados por este cenário, é proposto no presente projeto o desenvolvimento, padronização e validação de um teste acurado e de baixo custo, sendo este um método simples de caracterização molecular com elevado valor prognóstico para ADRs (para detecção do HLA-A*31:01) para ser oferecido para pacientes epiléticos da rede pública, guiando o regime inicial da droga (Carbamazepina), aumentando sua eficácia e evitando simultaneamente ADRs.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e validar um método de caracterização molecular de biomarcador imunogenético com elevado valor diagnóstico e preditivo para reação adversa a drogas, disponibilizando-o a custo acessível a usuários do sistema público de saúde.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um Protocolo utilizando a Técnica de PCR-RFLP para Detecção do Alelo HLA*A-31:01.
- Validar a Tipagem do Alelo HLA*A-31:01;
- Determinar a frequência do alelo HLA-A*31:01/SNP rs3869066 na população de Belém;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO AMOSTRAL

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) na Universidade Federal do Pará (UFPA), Brasil. As amostras foram divididas em 2 grupos: Sendo um grupo de 5 amostras de portadores do alelo HLA-A*31:01, obtidas da fundação HEMOPA, usadas como controle positivo para a padronização do método e um segundo grupo, correspondente a um total de 178 amostras de indivíduos da população de Belém, todas oriundas do banco de amostras do LGHM, para validação e determinação da frequência alélica.

4.2 AS AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO HUMANO

As amostras foram coletadas em tubos com anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) e o DNA genômico isolado de todo o sangue usando o Pure Link™ Genomic DNA mini Kit da Invitrogen, de acordo com o protocolo do fabricante.

4.3 GENOTIPAGEM DO SNP RS3869066 USANDO PCR-RFLP

Objetivando padronizar e validar um método que melhor se adequava nos pré-requisitos de baixo custo e menor complexidade laboratorial, com elevado valor diagnóstico e preditivo para ADRs, disponibilizando-o a custo acessível a usuários do sistema público de saúde, além de utilizar o mesmo para determinar a frequência do alelo HLA-A*31:01 na população de Belém. O método desenvolvido para tipagem de HLA-A*31:01 foi baseado no trabalho de Maekawa *et al.*, 2015, que descreveu uma metodologia baseada em análise de tag-SNP, que consiste em usar polimorfismos em absoluto desequilíbrio de ligação ($DL=1$) com o alelo HLA-A*31:01.

Os polimorfismos de base única (SNPs, do inglês Single Nucleotide Polymorphism) são uma das mais comuns fontes de variações genéticas. Tag-SNPs estão ligadas a alelos específicos de HLA, porém localizados fora da região do gene HLA (de Bakker *et al.*, 2006). Um exemplo é o SNP rs2395029 em HCP5, que está em absoluto DL com o HLA-B*57:01, um alelo de risco para a síndrome de hipersensibilidade induzida (HSS) por abacavir em diversas populações, que deverão ser utilizados como ferramentas de rastreamento para prevenir HSS induzida por abacavir nos casos em que tipagem HLA não está disponível (Colombo *et al.*, 2008; Galvan *et al.*, 2011).

No estudo de Maekawa *et al.*, 2015, foi demonstrado que três SNPs (rs1150738, rs3869066 e rs259945) fora da região HLA-A estavam em DL com o HLA-A*31:01. Destes três, o SNP rs3869066 localizado na região ZNRD1-AS1, ligado ao gene HLA-A, mostrou-se em absoluto desequilíbrio de ligação (DL=1) com o alelo HLA-A*31:01 podendo ser usado para sua genotipagem indireta, via um PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase por polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição), onde este SNP é reconhecido pela enzima de restrição (He *et al.*, 2015; Aouacheria *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2001; Maekawa *et al.*, 2015). Sendo este usado como um marcador substituto, que permitiria a triagem barata de pacientes em risco de ADRs relacionada a CBZ. O primeiro segmento genômico amplificado foi da região de ZNRD1-AS1 contendo o locus rs3869066 SNP, de 662 pb (**figura 6**).

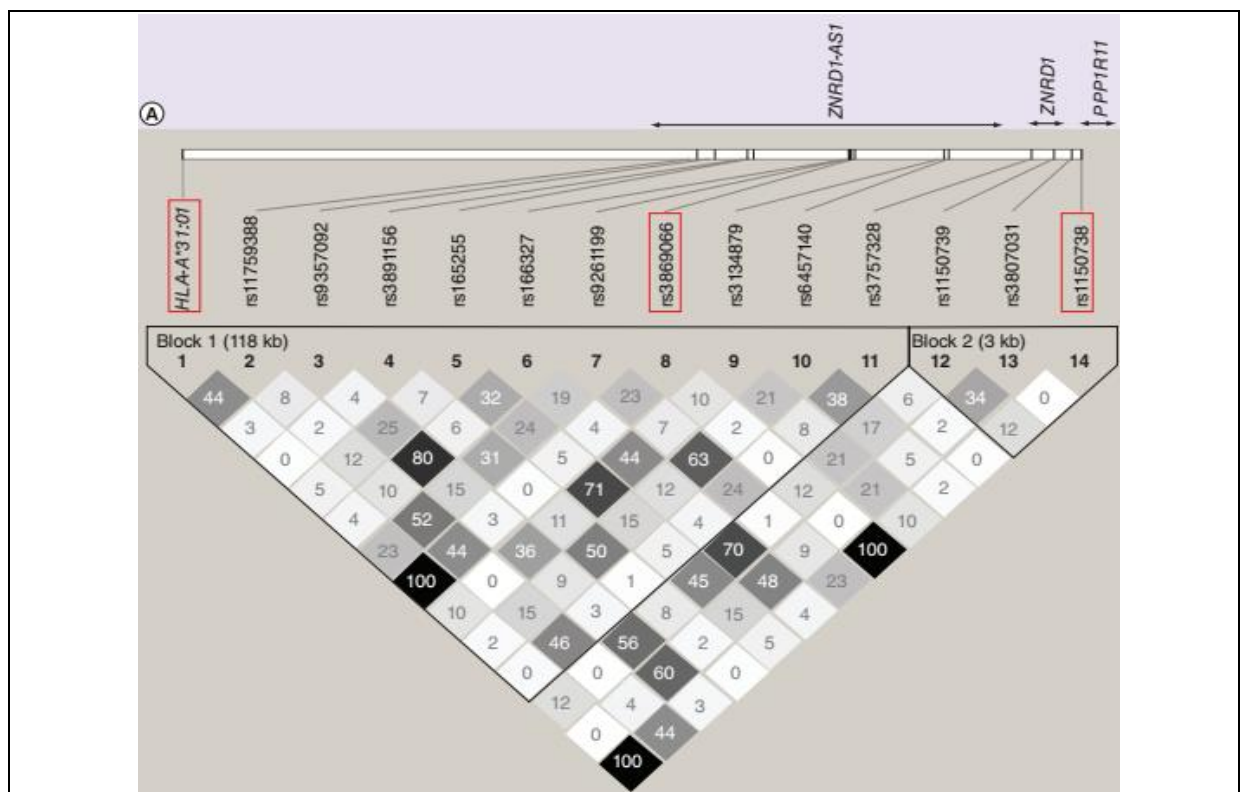


Figura 6: Mapas da região de desequilíbrio de ligação rs3869066 (ZNRD1-AS1) com HLA-A*31: 01. Fonte: Maekawa *et al.*, 2015.

Essa região alvo foi amplificada utilizando o conjunto de primers:

Quadro 4: Iniciadores utilizados nas reações de PCR.

| Primer | Sequência 5'-3' |
|---------------------------|------------------------------|
| A3101F (<i>Forward</i>) | 5'- CATCTGGTGGTGGATATGAC -3' |
| A3101R (<i>Reverse</i>) | 5'- AGTTGCAGGAAATCCTTGAC -3' |

Cada reação conteve (50ng) 3µl de DNA genômico; 11,875µl de H₂O ultra pura; 2,5µl de Tampão (10x PCR Rxn Buffer-Invitrogen Brazil); 1,5µl de MgCl₂; (1,25µM) 1,0µl de DNTPs; (0,2µM) 2,5µl de cada primer (A3101F e A3101R) e; (0,625 units) 0,125µl de Taq polymerase (Platinum Taq DNA polymerase- Invitrogen) em volume final de 25µl para cada amostra.

O programa de amplificação consistiu em 1 ciclo de 94°C durante 5 min (desnaturação fora do ciclo); seguido por 30 repetições dos ciclos: 94°C durante 1 min (desnaturação dentro do ciclo), 61°C durante 1 min (anelamento) e 72°C durante 1 min (distensão dentro do ciclo), por fim mais 1 ciclo de 72°C por 5 min (distensão fora do ciclo).

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de acrilamida 7% (16,2 mL de H₂O, 2,2 mL de TEB 10X, 3,96 mL de acrilamida 40%, 20 µL de TEMED e 200 µL de Persulfato de amônio a 30%). As amostras foram aplicadas no gel numa proporção de 3µl de azul de bromofenol (Bromophenol Blue solution) para 6µl de template, submetido a tensão de 80V, uma corrente de 200 mA por 1h. Após a migração eletroforética, o gel foi corado com fixador ácido acético (100 mL de álcool absoluto + 5 mL de ácido acético glacial + q.s.p. 1L de H₂O) por 20 min; nitrato de prata (1,7 g para 1L de H₂O) por 20 min e; hidróxido de sódio (30 g de NaOH para 1L de H₂O), respectivamente.

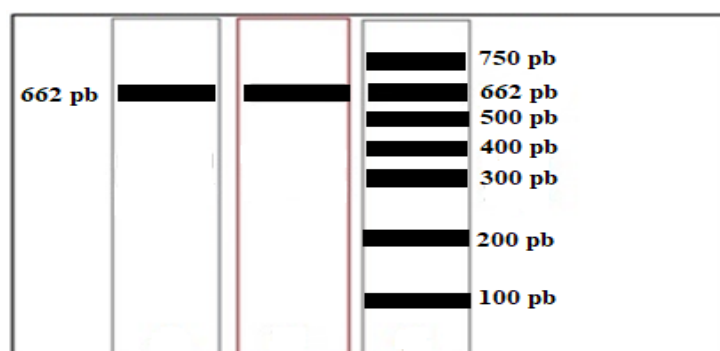


Figura 7: Esquema exemplificando os padrões de bandas correspondente a região ZNRD1-AS1, de 662 pb.

Em seguida, as amostras que foram amplificadas e visualizadas no gel de acrilamida (7%) foram submetidas a digestão enzimática por enzimas de restrição, usando a técnica de PCR-RFLP. Onde foram usados, 6µL de alíquotas dos produtos de PCRs, digeridos com (5 unidades) 0,25µl da enzima BtsCI (New England Biolabs, MA, EUA) e 3,75µl de tampão diluído 1x (CutSmartTMBuffer) em volume final de 10 µl, a 50°C durante 1 h e 80°C durante 20 min.

A enzima BstCI tem a vantagem adicional de atuar rapidamente (5-15 min) e nenhuma

atividade de degradação de DNA em comparação com a enzima FokI (Maekawa *et al.*, 2015). A enzima de restrição reconhece sítios específicos na sequência do DNA que é clivada somente quando o sítio está presente, gerando fragmentos de vários tamanhos que são separados e analisados por eletroforese, sendo possível identificar se o genótipo é hetero ou homozigoto (figura 8).

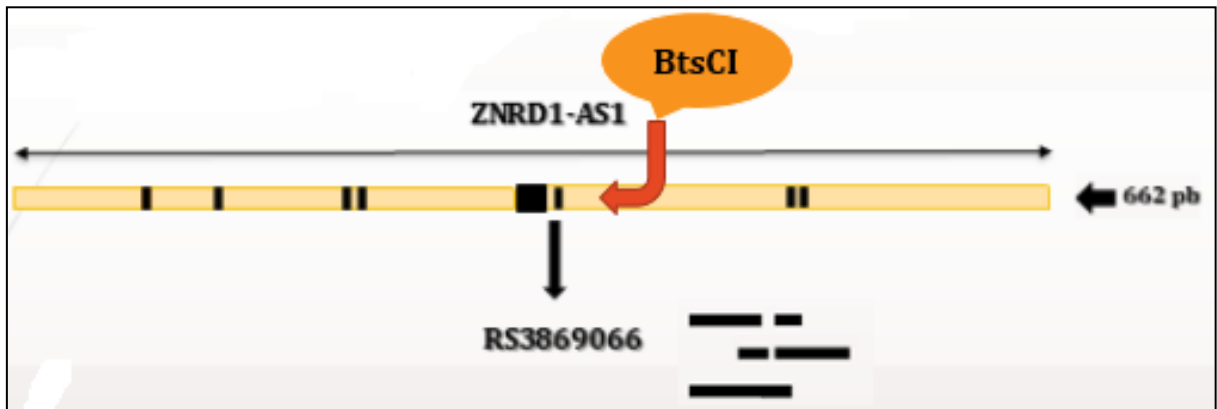


Figura 8: Mapa da região ZNRD1-AS1 contendo o locus rs3869066, na qual a enzima BtsCI reconhece o SNP e cliva gerando fragmentos de vários tamanhos.

A visualização dos fragmentos também foi realizada por eletroforese em gel de acrilamida 7%, submetido a tensão de 80V, uma corrente de 200 mA por 1h, após a migração eletroforética, o gel foi corado com fixador ácido acético (100 mL de álcool absoluto + 5 mL de ácido acético glacial + q.s.p. 1L de H₂O) por 20 min; nitrato de prata (1,7 g para 1L de H₂O) por 20 min e; hidróxido de sódio (30 g de NaOH para 1L de H₂O), respectivamente. Posteriormente visualizado colocando o gel num transiluminador.

A presença dos rendimentos de alelos, foram dois fragmentos digeridos de 499pb e 163pb em homozigotos, em heterozigotos de três fragmentos de DNA, um maior contendo 662pb e dois menores de 499pb e 163pb, em indivíduos negativos para a tipagem, o rendimento obtido após a digestão é de apenas um fragmento de 662pb, correspondente a região alvo ZNRD1-AS1, como exemplificado no esquema da figura 9 (Maekawa *et al.*, 2015).

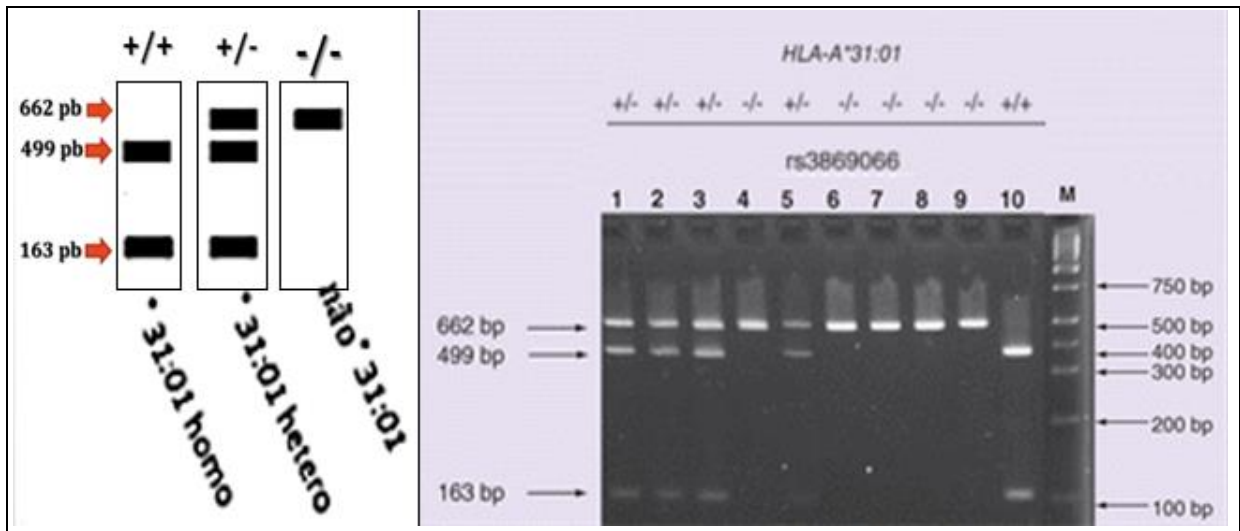


Figura 9: Esquema exemplificando os padrões de bandas dos resultados da PCR-RFLP. Se o padrão observado for (+/+) o indivíduo é homozigoto para o alelo HLA-A*31:01; (+/-) é heterozigoto para os alelos HLA-A*31:01; (-/-) indica que o paciente não tem o HLA-A*31:01. Fonte: Maekawa et al., 2015. (Modificado), 2017.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações de frequências alélicas e genotípicas foram realizadas por teste exato de Fisher. Os genes que apresentaram valor de p estatisticamente significativo ($p < 0,05$) foram submetidos à correção para múltiplos testes quando necessário, para obtenção do valor corrigido de p (pc). Equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequências alélicas, haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre os loci foram estimados pelo programa BIOSTAT versão 5.0 (Ayres et al., 2010), podendo ser estimados on line na homepage do programa genpop (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

Para criar uma estimativa das frequências alélicas para a população de Belém, como variância alélica e limite de confiança foram utilizadas fórmulas já estabelecidas, descritas no quadro baixo (Sebbenn, Seoane, 2005).

Quadro 5: Cálculos e fórmulas utilizados na análise estatística e para determinação da frequência alélica.

| CÁLCULOS | FÓRMULAS | OBSERVAÇÕES |
|--|---|---|
| ✓ Frequência Alélica | $P = \frac{AP}{AT}$ | *P: Frequência Alélica *AP: Alelos Positivos *AT: Total de Alelos |
| ✓ Cálculo de variância | $\theta^2 p = \frac{P \cdot (1 - P)}{2n}$ | * $\theta^2 p$: Variância *P: Frequência do Alelo *n: Número de Amostras |
| ✓ Desvio Padrão | $DP = \sqrt{\theta^2 p}$ | *DP: Desvio Padrão * $\sqrt{\theta^2 p}$: Raiz quadrada da variância |
| ✓ Intervalo de Confiança • Limite Inferior | $l.i = P - 2.DP$ | *l.i: Limite Inferior *P: Frequência *DP: Desvio Padrão |
| ✓ Intervalo de Confiança • Limite Superior | $l.S = P + 2.DP$ | *l.S: Limite Superior *P: Frequência *DP: Desvio Padrão |

Fonte: Sebbenn, Seoane, 2005.

5. RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

Para padronizar e validar a metodologia que melhor se adequava nos pré-requisitos já descritos, foi utilizado como base o trabalho de Maekawa *et al.*, 2015, que descreveu uma metodologia de baixo custo e complexidade laboratorial, baseado em análise de tag-SNP, que consiste em usar polimorfismos em absoluto desequilíbrio de ligação (DL=1) com o alelo HLA-A*31:01.

O SNP rs3869066, mostrou-se em absoluto desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-A*31:01 podendo ser usado para sua genotipagem indireta, via um PCR-RFLP (He *et al.*, 2015; Aouacheria *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2001), por isso foi utilizado como marcador alternativo, por estar em plena associação com o alelo em questão.

O fragmento de PCR de 662pb contendo o SNP rs3869066 foi amplificado utilizando o DNA genômico de 5 indivíduos portadores do HLA-A*31:01, obtidos de colaboradores da fundação HEMOPA, identificadas previamente através de sequenciamento, para implementação e validação do método. Em seguida os produtos de PCR foram tratados com enzima de restrição BtsCI produzindo três bandas contendo, 662pb, 499pb e 163pb (**figura 10**). Obtendo resultados positivos (todos heterozigotos) como o esperado, garantido a funcionalidade da técnica e a padronização da metodologia.

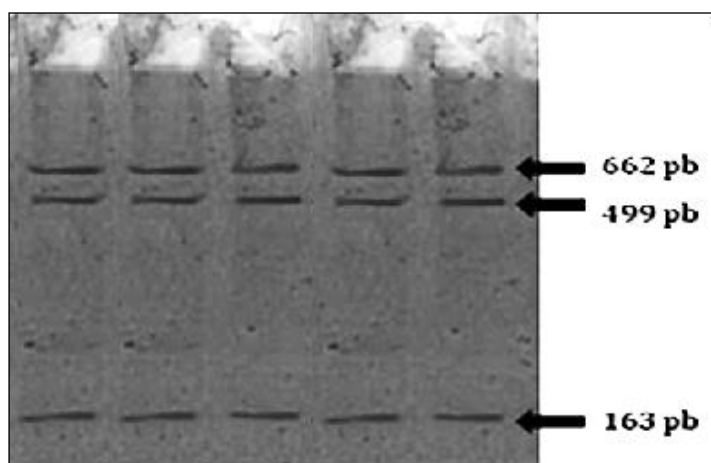


Figura 10: Padrões de resultados obtidos após a PCR-RFLP nas 5 amostras de indivíduos portadores do HLA-A*31:01 obtidas da Fundação HEMOPA.

5.2 VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA

Após a padronização, foi genotipado um total de 178 amostras da população de Belém, oriundas do banco de amostras do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará, 74 amostras provenientes de indivíduos portadores de artrite reumatoide e 104 de indivíduos aparentemente saudáveis.

Primeiramente foram genotipados os 74 indivíduos, no qual 10 (6,75%) foram HLA-A*31:01 positivos (todos heterozigotos), enquanto que dos 104 restantes apenas 7 (3,3%) foram HLA-A*31:01 positivos (todos heterozigotos). Isso demonstrou uma frequência elevada da presença do SNP rs3869066 maior nos indivíduos portadores de artrite reumatoide do que nas 104 amostras de indivíduos “saudáveis” podendo existir uma possível relação de dependência. Para confirmar se essa relação era verdadeira, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Contudo os genes apresentaram o valor de “p” estatisticamente não significativo ($p > 0,05$), confirmando que não existe relação entre o alelo e a artrite reumatoide.

Para se conhecer as frequências alélicas, em indivíduos ao acaso aparentemente saudáveis, foram incluídas apenas as 104 amostras tipadas, do total de 178.

Dos 104 indivíduos envolvidos nesse estudo, apenas 7 ($p=0,033$) apresentaram-se positivos (heterozigotos) para o alelo, como já relatado anteriormente. Houve significância estatística após implementação da correção para múltiplos testes. Foram estimadas por contagem direta e posteriormente as frequências genotípicas foram comparadas de acordo com as expectativas de Hardy-Weinberg, que deram em equilíbrio. Dessa forma, foi possível confirmar que não houve erro na tipagem das amostras.

Observou-se que a significância da associação foi perdida quando analisada no Teste Exato de Fisher, ($p=0,2061$). Porém, todas as frequências genotípicas estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (nota: se $p > 0,05$ é consistente com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg).

Assim, a frequência das amostras tipadas no presente trabalho é de 3,3%. O valor encontrado ficou dentro do intervalo de confiança (95%) que variou de 0,8% a 5,7%.

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, devido a associação de alelos específicos de HLA com o aumento do risco a reações adversas a drogas (ADRs) (Amstutz *et al.*, 2014), os genes HLA, tem sido usados como biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de determinadas doenças (Site: Nature, acesso: 2016; Chaplin, 2010; Dausset, 1958; Prugnolle *et al.*, 2005). Segundo a AFND, foram identificados 20 alelos associados com ADRs relacionados a 3 drogas anticonvulsivantes usadas no tratamento da epilepsia (Carbamazepina, Lamotrigina e Fenitoína) (González-Galarza *et al.*, 2014). Destes alelos estudos sugerem que o HLA-A*31:01 é de grande importância para o prognóstico e preditivo em ADR à anti-epiléticos como a CBZ, que é a droga de primeira linha usada para o tratamento de determinadas doenças neurológicas, incluindo a epilepsia (Amstutz *et al.*, 2014).

No presente estudo, o alelo HLA-A*31:01 esteve associado a presença do SNP rs3869066. O indivíduo só é considerado portador do alelo na presença do SNP rs3869066 que está em absoluto desequilíbrio de ligação (DL=1) com o alelo HLA-A*31:01, sendo o mesmo um gene associado ao risco de ADRs como SJS/TEN em pacientes epiléticos que fazem o tratamento com a CBZ. Nos últimos anos, várias metodologias alternativas para tipagem do HLA foram relatados (Aoki *et al.*, 2012; Cheung *et al.*, 2014), vários SNPs tem sido estudados quanto ao seu DL com o alelo HLA-A*31:01, os mesmos podem possibilitar um método de genotipagem alternativo de baixo custo e menor complexidade laboratorial. No estudo de Maekawa *et al.*, 2015, por exemplo, foi demonstrado que três SNPs (rs1150738, rs3869066 e rs259945) todos localizados fora da região HLA-A estavam em absoluto DL com o HLA-A*31:01 em 210 indivíduos japoneses com SJS/TEN. Isso confirma que essas ADRs induzidas pela CBZ, estavam associadas a presença desses SNPs, e que os mesmos estão diretamente ligados a presença do alelo HLA-A*31:01 (Maekawa *et al.*, 2015).

Por outro lado, Kitajima *et al.*, 2012, relatou que o rs1150738 não era eficaz para tipagem indireta do alelo HLA-A*31:01, pois não estava em DL absoluto com HLA-A*31:01 ($R^2 = 0,93$). Em 2011, segundo Erlich *et al.*, o rs259945 e a sua ligação absoluta com HLA-A*31:01 continua sendo avaliada. Dos três SNPs, o rs3869066 mostrou-se em vários estudos, em absoluto desequilíbrio de ligação (DL=1) com o alelo HLA-A*31:01 podendo ser usado para sua genotipagem indireta, via um PCR-RFLP (He *et al.*, 2015; Aouacheria *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2001).

No ano de 2015, finalmente foi demonstrado um método de genotipagem do SNP rs3869066 localizado na região ZNRD1-AS1, utilizando PCR-RFLP onde este SNP é

reconhecido pela enzima de restrição (Maekawa *et al.*, 2015). Por isso, foi utilizado como um marcador alternativo no presente trabalho, por estar em plena associação com o alelo em questão, usado para sua genotipagem indireta via PCR-RFLP (He *et al.*, 2015; Aouacheria *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2001). Sendo este um marcador de baixo custo (custo médio de R\$ 10,00 a R\$ 15,00 por amostra) quando comparado com as demais técnicas existentes, como o sequenciamento que é de alta especificidade e sensibilidade, porém possui um custo elevado (podem custar até dez vezes mais) e aparelhos altamente especializados, além da entrega demorada dos resultados. Assim, o presente método, além de ser menos complexo, permitiria a triagem barata de pacientes em risco de ADRs relacionada a CBZ, além de ser utilizado para determinação da frequência do alelo HLA-A*31:01 na população de Belém (Bierhals *et al.*, 2016).

Apesar das frequências do SNP rs3869066 e do alelo HLA-A*31:01 em escala mundial ainda serem bastante discrepantes, devido ao fato de que em muitas populações não foram tipadas o SNP e em outras não foram tipadas o alelo, como SNP rs3869066 está em total desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-A*31:01, pode inferir-se que o alelo tem uma frequência próxima a do SNP. Isto pode ser observado em populações em que o alelo foram tipados de forma direta quanto indireta, usando o SNP, como demonstrado no gráfico 1 (NCBI, AFND, 2017). Dessa forma, é possível observar que o SNP e o alelo estão presentes na população de forma semelhante, possibilitando uma tipagem indireta em outras populações.

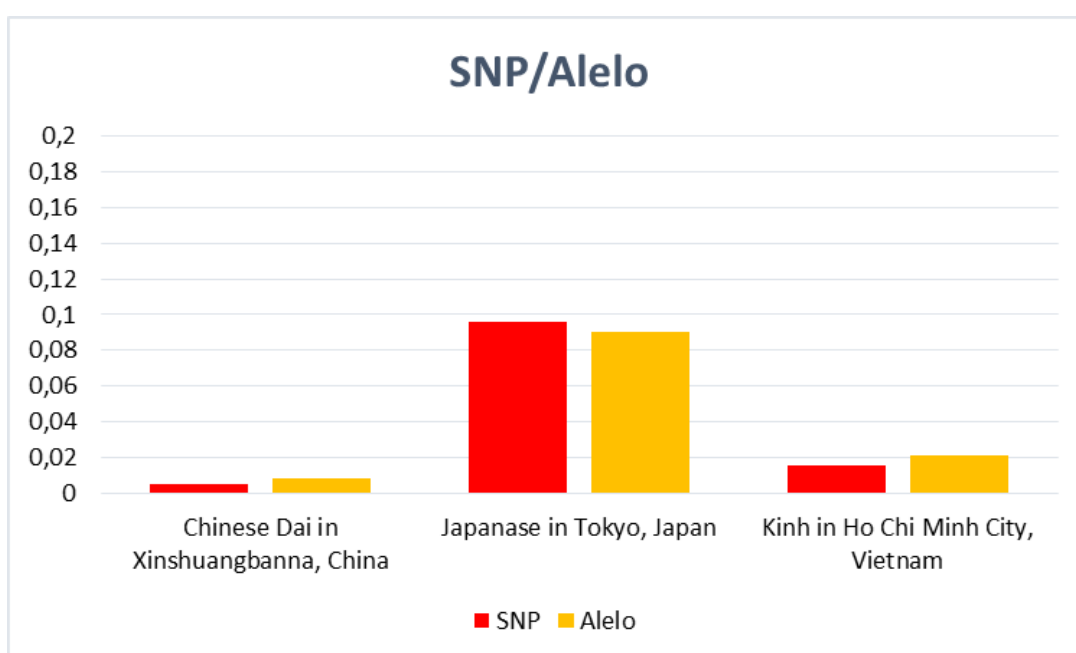


Gráfico 1: Distribuição da frequência do SNP/alelo HLA-A*31:01 na população onde os dados demográficos estão disponíveis. Fonte: NCBI, AFND, 2017.

As estimativas das frequências do alelo foram obtidas através dos critérios disponíveis no site www.allelefreqencies.net. Este alelo é de ampla distribuição com uma frequência de $\geq 3\%$ em diversas populações, essa frequência varia 1-11% de acordo com os continentes, com uma média de frequência mundial de aproximadamente 4,4%. No quadro 5 é demonstrada a distribuição da frequência média do alelo HLA-A*31:01 no mundo em populações onde os dados demográficos estão disponíveis, de acordo com os continentes.

Quadro 6: Distribuição da frequência do alelo HLA-A*31:01 no mundo por continentes.

| Continente | HLA-A*31:01 (n%) |
|---------------------------------|-----------------------------|
| Oceania | 2,4 |
| Ásia | 3,0 |
| Europa | 2,8 |
| África | 1,4 |
| América do Norte | 4,9 |
| América Central e do Sul | 11 |
| Média mundial | 4,4 |

Fonte: <http://www.allelefreqencies.net> (AFND, 2017).

Em particular, na América Central e do Sul incluindo a população brasileira, a frequência desta variante chega à 11%, devido esta ser comum em várias populações indígenas americanas. O que coloca esse grupo de continentes em primeiro lugar com a maior frequência encontrada do alelo HLA-A*31:01 (**gráfico 2**).

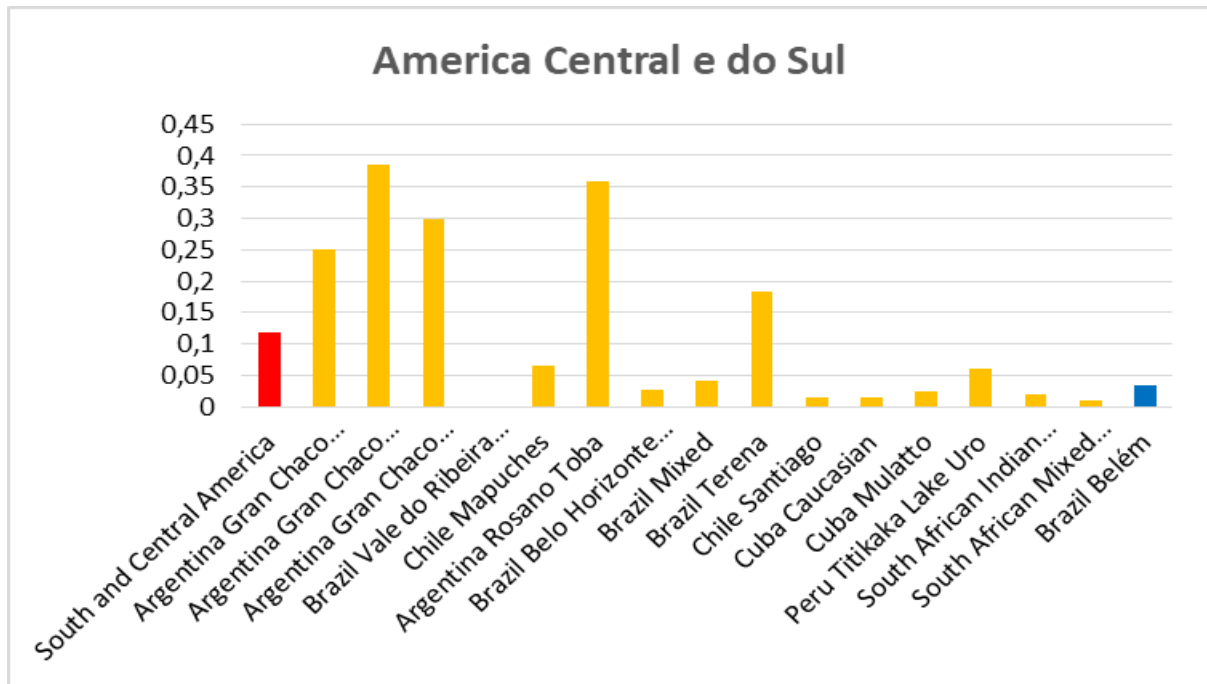


Gráfico 2: Distribuição da frequência do alelo HLA-A*31:01 na população da América Central e do Sul. Fonte: <http://www.allelefrequencies.net> (AFND, 2017).

No Brasil a frequência desse alelo chega em média de 5,6%, mesmo não se conhecendo esses números em diversos estados brasileiros (AFND, 2017), atuando assim como um bom marcador para ADR. A distribuição da frequência do haplótipo no Brasil é de 0% no Vale do Ribeira (Quilombos), 2,6% em Belo Horizonte (caucasianos), 4% em Brasil (misturado) e 18,3% (Terena) (AFND, 2017). Em Belém, a frequência do alelo ainda é desconhecida, porém, utilizando o método padronizado no presente trabalho pode inferir-se que numa mesma população amostral o alelo tem uma frequência próxima ou igual a do SNP aqui apresentado (3,3%) (**gráfico 3**).

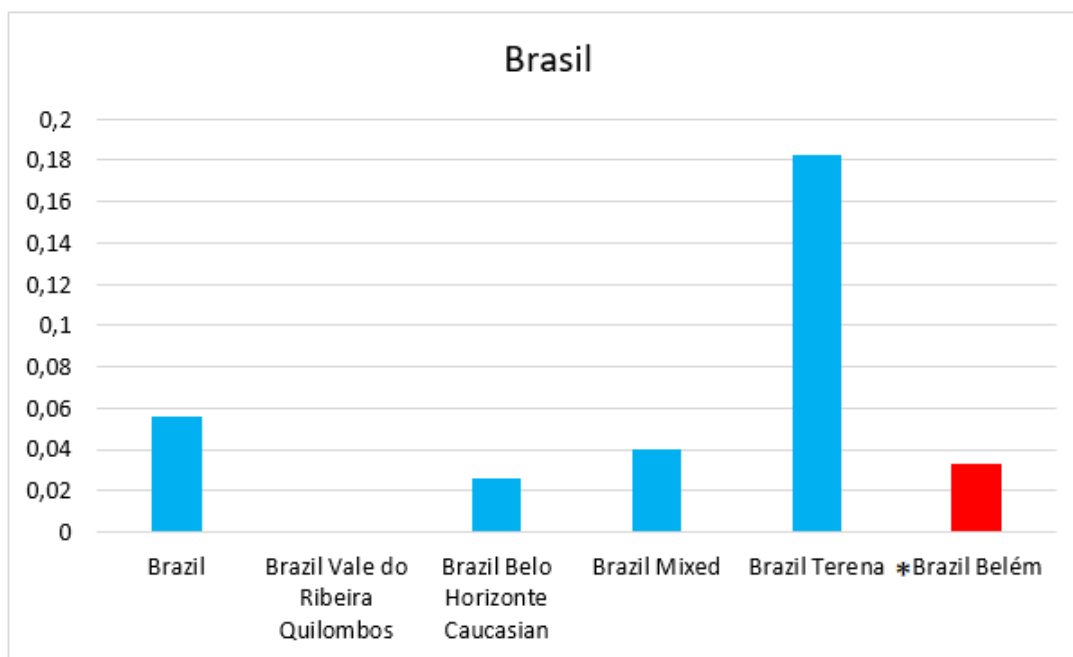


Gráfico 3: Distribuição da frequência do alelo HLA-A*31:01 no Brasil. *Frequência do SNP rs3869066 em Belém. Fonte: <http://www.allelefreqencies.net> (AFND, 2017).

Como relatado anteriormente, a padronização foi feita utilizando o DNA genômico de 5 indivíduos portadores do HLA-A*31:01, obtendo resultados positivos, garantido a funcionalidade da técnica e a padronização da metodologia, indicando que este é um método de genotipagem eficaz. Após a padronização, afim de validar e determinar a frequência do SNP em Belém com uma quantidade amostral robusta, foi genotipado um total de 178 amostras da população de Belém, onde 74 eram de indivíduos “portadores de artrite reumatoide” e 104 de indivíduos “aparentemente saudáveis”, resultando em 10 (6,75%) e 7 (3,3%) positivos (todos heterozigotos), respectivamente. Assim, os resultados mostraram que existia uma prevalência maior do SNP rs3869066 em indivíduos portadores de artrite reumatoide do que em indivíduos “saudáveis”, podendo existir algum tipo de associação. Por isso, para se verificar se existia uma relação de dependência entre o alelo HLA-A*31:01 e artrite reumatoide, foi utilizado o Teste Exato de Fisher pois as associações encontradas precisaram ser testadas quanto à sua independência. O teste de Fisher é um teste não paramétrico, usado para amostras pequenas, que permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, de elas serem independentes. Como resultado, os genes exibiram o valor de “p” estatisticamente não significativo ($p > 0,05$), confirmando que não existe relação entre o alelo e a artrite reumatoide. Para se conhecer a frequência, avaliando a concordância das frequências alélicas, haplotípicas e padrões de desequilíbrio de ligação em indivíduos ao acaso aparentemente saudáveis, como descrito na literatura e sistematicamente disponibilizado no

AFND, foram incluídas nesse estudo apenas as 104 amostras tipadas. Desses 104 indivíduos, apenas 7 ($p=0,033$) deram positivos (heterozigotos) para o alelo. Todas as frequências genotípicas estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (nota: se $p > 0,05$ é consistente com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg). Isso mostra que essas frequências gênicas permanecem inalteradas e as proporções genotípicas atingiram um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo, confirmando que não houve erro na tipagem das amostras, pois as mesmas estão dentro do esperado segundo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Como resultado, além da padronização e validação do método, a determinação da frequência do SNP rs3869066/HLA-A*31:01 na população de Belém é de 3,3%. Assim, a frequência mundial, a do Brasil e a frequência das amostras tipadas no presente estudo ficaram dentro do intervalo de confiança que variou de 0,8% a 5,7%.

A associação entre os casos graves relacionados a CBZ e ao alelo HLA-A*31:01 foi relatada pela primeira vez por Kashiwagi *et al.*, 2008. Embora essa associação ainda seja limitada devido ao menor número de estudos disponíveis quando comparado com HLA-B*15:02, estudos têm demonstrado resultados consistentes em diversas etnias (Amstutz *et al.*, 2014). Porém, maiores investigações são necessários para determinar se a suscetibilidade a ADRs em pacientes epiléticos que fazem tratamento com a CBZ está associada a presença do alelo HLA-A*31:01. Assim o rastreamento do paciente através de sua tipagem HLA, antes do início do tratamento ou logo no início, é interessante para novos resultados, além de poder prevenir o risco de ADRs. Como estes marcadores ainda são pouco usados no Brasil e o sistema de saúde pública (SUS) não financia a realização destes testes espera-se que a metodologia aqui aplicada, por ser um sistema simples de genotipagem do SNP rs3869066 via PCR-RFLP que geralmente consome menos tempo, é mais barato, e não requer laboratórios especializados, possa ser uma alternativa para a tipagem do alelo HLA-A*31:01 para prevenir as ADRs causadas pela CBZ. No entanto, devemos ter em mente que nem a presença desses SNPs nem a presença do alelo HLA-A*31:01 pode prever todos os pacientes com ADRs relacionados a CBZ.

7. CONCLUSÕES

O SNP rs3869066 foi utilizado como marcador alternativo, sendo usado para uma genotipagem indireta do alelo HLA-A*31:01.

Foi então, padronizado um método de caracterização molecular simples, usando PCR-RFLP para a genotipagem do SNP rs3869066.

Essa genotipagem de SNP geralmente consome menos tempo, além de ser um método mais barato, podendo assim ser disponibilizado a custo acessível a usuários do sistema público de saúde.

A frequência do SNP rs3869066/HLA-A*31:01 na população de Belém utilizando o método padronizado no presente trabalho foi de 3,3%, onde mesma ficou dentro do intervalo de confiança (95%).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Cellular and Molecular Immunology, 5ed., Saunders, 2005.

ABBING, H.D.C.R. Legal aspects of medical devices: Study on regulatory mechanisms for safety control. Health Services Research. IOS Press: 358-361, 1993.

AIHARA, MICHIKO. Pharmacogenetics of cutaneous adverse drug reactions. The Journal of dermatology 38.3 (2011): 246-254.

AMSTUTZ, U.; SHEAR, N.H.; RIEDER, M.J.; HWANG, S.; FUNG, V.; NAKAMURA, H., et al. Recommendations for HLA - B*15:02 and HLA - A*31:01 genetic testing to reduce the risk of carbamazepine - induced hypersensitivity reactions. Epilepsia 55.4 (2014): 496-506.

AMSTUTZ U, Ross CJ, Castro-Pastrana LI, et al. HLA-A*31:01 and HLA-B*15:02 as genetic markers for Carbamazepine hypersensitivity in children. Clin Pharmacol Ther 2013;94:142–149.

ANVISA, Gerência Geral de Produtos para a Saúde Pós-Comercialização. Unidade de Farmacovigilância. Projeto Piloto Hospitais Sentinela In: Farmacoepidemiologia, Brasília. ANVISA, 2001.

AOUACHERIA, A. In silico whole-genome scanning of cancer-associated nonsynonymous SNPs and molecular characterization of a dynein light chain tumour variant. Oncogene. 24 (40):6133-6142. 2006.

BASTUJI-GARINS, S.; RZANY, B.; STERN, R.S., et al. Clinical Classification of cases of toxic epidermal necrolysis, StevensJohnson syndrome, and erythema multiforme. Arch Dermatol 1993; 129: 92–96.

BEZERRA, A.L.Q.; SILVA, A.E.B.C., et al. Análise de queixas técnicas e Eventos Adversos notificados em um hospital sentinela. Rev. Enferm, 2009,17(4):467-72.

- BIERHALS, Nayanna Dias; BERNARDY, João Pedro; RENNER, Jane Dagmar Pollo. RELAÇÃO DE CUSTO DA PCR CONVENCIONAL E PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE HPV. **Seminário de Iniciação Científica**, p. 30, 2016.
- BODMER J. G., et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 37: 97–104. 1991.
- CARROLL, M. C., et al. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84.23 (1987): 8535-8539.
- CHAPLIN, D.D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125.2 (2010): S3-S23.
- CHEN, M. J., et al. Detection of a novel HLA - B27 allele, B*2740, in Taiwanese volunteer bone marrow donors by sequence - based typing: curiosity rewarded. *International journal of immunogenetics* 36.4 (2009): 207-211.
- CHUNG, W. H.; HUNG S.I.; YANG J.Y., et al. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nat Med* 2008; 14: 1343–1350.
- CHUNG, W. H.; HUNG, S.I.; CHEN, Y.T. Genetic predisposition of lifethreatening antiepileptic-induced skin reactions. *Expert Opin Drug Saf* 2010;9:15–21.
- COLOMBO, S., et al. The HCP5 single-nucleotide polymorphism: a simple screening tool for prediction of hypersensitivity reaction to abacavir. *The Journal of infectious diseases* 198.6 (2008): 864-867.
- CRAVEN, B.M.; STEWART, G.T.; KHAN, M.; CHAN, T.Y.K. Monitoring the safety of herbal medicines. *Drug Safety*; 17(4): 209-215, 1997.
- DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. *Acta haematologica* 20.1-4 (1958): 156-166.

- DE BAKKER, PAUL, I.W., et al. A high resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nature genetics* 38.10 (2006): 1166.
- DIAS, M.F. Introdução a Farmacovigilância. In *Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008:46-63p.
- DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)* 33.1 (2000): 7-18.
- EDWARDS, I.R.; ARONSON, J.K. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*, v. 356, p. 1255 –1259, 7 out. 2000.
- EGBERTS, G.P.G.; SMULDERES, M.; DE KONIG, F.H.P. et al. Can adverse drug reactions be detected earlier: a comparison of reports by patients and professionals. *British Medical Journal*; 313: 530 – 31, 1996.
- ERLICH, R. L., et al. Next-generation sequencing for HLA typing of class I loci. *BMC genomics* 12.1 (2011): 42.
- FRACCHIA, G.N.; THEOFILATOU, M.; MEHTA, U.; MILSTIEN, J.B.; DUCLOS, P.; FOLB P.I. Developing a national system for dealing with adverse events following immunization. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(2), 170-177, 2000.
- FERNANDES, Ana P. M., et al. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq. bras. endocrinol. metab* 47.5 (2003): 601-611.
- GALVÁN, C. A., et al. Rapid HCP5 single-nucleotide polymorphism genotyping: a simple allele-specific PCR method for prediction of hypersensitivity reaction to Abacavir. *Clínica química acta* 412.15 (2011): 1382-1384.
- GERMAIN, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76.2 (1994): 287-299.

- GHIRLINZONI, C.; CRUZ, F.F.; COSTA, E. Reações cutâneas a drogas em pacientes internados: relato de uma série de casos identificados pela farmacovigilância. *Rev. bras. alerg. imunopatol* 35.1 (2012): 30-38.
- GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. V. Estrutura do MHC e função-apresentação de antígenos. Parte 2. *Einstein* (16794508) 13.1 (2015).
- GONZÁLEZ-GALARZA, F. F., et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic acids research* 43.D1 (2014): D784-D788.
- GORODEZKY, C., et al. HLA and autoimmune diseases: type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmunity Reviews* 5.3 (2006): 187-194.
- GOTO Y. et al. A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'untranslatedregion of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clinical Cancer Research*. 2001, 7(7):1952-1956.
- GRUEN, J. R.; WEISSMAN, S. M. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 90.11 (1997): 4252-4265.
- HALL, M.; MCCORMACK, P.; ARTHUR, N.; FEELY, J. The spontaneous reporting of RAMs by nurses. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 40: 173 – 175, 1995.
- HE, Y.; JANELLE, M.; CAMPBELL, H.; WAGNER, K. Accuracy of SNPs to predict risk of HLA alleles associated with drug-induced hypersensitivity events across racial groups. *Pharmacogenomics*. 2015;16:817–24.
- HORTON R., et al. Gene map of the extended human MHC. 2004. *Nat Rev Genet*, 5(12):889-899.
- IKEDA, H.; TAKAHASHI, Y.; YAMAZAKI, E., et al. HLA class I markers in Japanese patients with carbamazepine-induced cutaneous adverse reactions. *Epilepsia* 2010;51:297–300.

- IMGT / HLA. Nomenclatura para Fatores de HLA System.2013 [Citado de 2016]; Disponível em: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>.
- KANO Y.; HIRAHARA K.; SAKUMA K., et al. Several herpesviruses can reactivate in a severe drug-induced multiorgan reaction in the same sequential order as in graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* 2006; 155: 301–306.
- KIM, S.H.; LEE, K.W.; SONG, W.J., et al. Carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions and HLA genotypes in Koreans. *Epilepsy Res* 2011;97:190–197.
- KISSMEYER-NIELSEN, F.; SVEJGAARD A.; HAUGE M. Genetics of the human HL-A transplantation system. *Nature* 219.5159 (1968): 1116-1119.
- KITAJIMA, H.; SONODA, M.; YAMAMOTO K. HLA and SNP haplotype mapping in the Japanese population. *Genes and immunity* 13.7 (2012): 543.
- KLEIN, J. Evolution and function of the major histocompatibility system: Facts and speculations. *The major histocompatibility system in man and animals*. Springer Berlin Heidelberg, 1977. 339-378.
- KNOWLES S, SHEAR NH. Clinical risk management of Stevens–Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis spectrum. *Dermatol Ther* 2009;22:441–451.
- LAMM, L. U., et al. Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome n. 6 in a family with a pericentric inversion. *Human heredity* 24.3 (1974): 273-284.
- LOCHARERNKUL, C., et al. Carbamazepine and phenytoin induced Stevens - Johnson syndrome is associated with HLA - B*1502 allele in Thai population. *Epilepsia* 49.12 (2008): 2087-2091.
- MAEKAWA, K., et al. Development of a simple genotyping method for the HLA-A*31:01-tagging SNP in Japanese. [10.2217/pgs.15115](https://doi.org/10.2217/pgs.15115) Future Medicine Ltd. *Pharmacogenomics* (2015) 16 (15), 1689-1699.

- MAGALHÃES, P. S. C.; BÖHLKE, M.; NEUBARTH F. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. *Rev. Med. UCPEL (Pelotas)* 2.5 (2004): 59.
- MALLAL, S.; PHILLIPS, E.; CAROSI, G., et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* 2008;358:568–579.
- MARIN, N., et al. Assistência farmacêutica para gerentes municipais. Assistência farmacêutica para gerentes municipais. Organização Pan-Americana da Saúde, 2003.
- MARSH, S.G.E.; PARHAM, P.; e BARBER L. D. HLA class I antigens and alleles: workshop and nomenclature. *The HLA facts book*. Nova Iorque: Academic Press, 2000, pp. 14-25.
- MARSH S. G. E., et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Human Immunol*; 62:418-68.
- MARSH S. G. E., et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, 75: 291-455.
- MATSUMURA, YASUHIRO, AND HONNAVARA N. Ananthaswamy. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert reviews in molecular medicine* 4.26 (2002): 1-22.
- MAYR, W. R., et al. Genetic analysis and biological properties of products of the third SD (AJ) locus of the HL-A region. *Transplantation proceedings*. Vol. 5. No. 4. 1973.
- MCCARROLL, S. A., et al. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nature genetics* 38.1 (2006): 86-92.
- MCCORMACK M., et al. HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *N Engl J Med* 2011;364:1134–1143.

- MEYBOOM, R.H.B.; HEKSTER, Y.A.; EGBERTS, A.C.G.; GRIBNAU, F.W.J.; EDWARDS, I.R. Casual or Causal? The role of causality assessment in pharmacovigilance. *Drug Safety*; 16:374-389, 1997.
- MEYBOOM, R.H.B.; EGBERTS, A.C.G.; GRIBNAU, F.W.J.; HEKSTER, Y.A. Pharmacovigilance in perspective. *Drug Safety*; 21(6): 429-447, 1999.
- MEYBOOM, R.H.B; EGBERTS, A.C.G. Comparing therapeutic benefit and risk. *Thérapie*, v. 54, n. 1, p. 29-34, jan./fev.1999.
- MOCKENHAUPT, M. The current understanding of Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7:803–813;quiz814-805.
- MOORE, N. The role of the clinical pharmacologist in the management of RAMs. *Drug Safety*; 24(1): 1-7, 2001.
- MOTTA A.A.; GIAVINA-BIANCHI P. Reações adversas a drogas (R.A.D.). *Rev Med (São Paulo)*. 2005 jan.-mar.;84(1):10-7.
- NETO, J.G.; MARCHETTI, R.L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2005;27(4):323–8.
- NUNES, A.M.C. Conceitos básicos de Farmacovigilância. In: CASTRO, C.G.S.O. (Coord.). *Estudos de utilização de medicamentos: noções básicas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 106-126, 2000.
- OLIVEIRA, R. A. F. Antígenos leucocitários humanos (HLA) na avaliação imunológica para a seleção de receptor-doador para transplantes. Belo Horizonte (2014).
- OMS - Organização Mundial da Saúde. *Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos. La farmacovigilancia: garantía de seguridad en el uso de los medicamentos*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2004.

- OMS - Organização mundial da saúde. A importância da Farmacovigilância: Monitorização da segurança dos medicamentos. Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília, 2005, 1-47p.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Segurança dos medicamentos: um guia para detectar e notificar reações adversas a medicamentos. Por que os profissionais de saúde precisam entrar em ação / Organização Mundial da Saúde. Brasília: OPAS/OMS, 18 p., 2004.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Safety monitoring of medicinal products. The importance of pharmacovigilance. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2002.
- OPAS - Organização Panamericana de Saúde. Termo de referência para reunião do grupo de trabalho: Interface entre Atenção Farmacêutica e Farmacovigilância. Brasília: OPAS, 2002.
- OTTENSOOSER, F. Analysis of trihybrid populations. American journal of human genetics 14.3 (1962): 278.
- OZEKI, T.; MUSHIRODA, T.; YOWANG, A., et al. Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. Hum Mol Genet 2011;20:1034–1041.
- PARHAM, P. Virtual reality in the MHC. Immunol. Rev., 1999, 167, pp 5-15.
- PEREIRA N. F.; MORAES M. E.; LIMA M. G. Imunogenética no Transplante de Células-tronco Hematopoéticas. 1a ed. São Paulo: Editora Atheneu, pg (2009) 93-113.
- PERRY, G. H., et al. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. The American Journal of Human Genetics 82.3 (2008): 685-695.
- PETRAMALE, C.A. Rede de hospitais sentinelas. II Oficina sobre Uso Seguro e Vigilância de Medicamentos em Hospitais. 2002.

- PIRMOHAMED, M., et al. Fortnightly review: adverse drug reactions. *BMJ: British Medical Journal* 316.7140 (1998): 1295.
- PIRMOHAMED, M., et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *Bmj* 329.7456 (2004): 15-19.
- PRUGNOLLE, F.; MANICA, A.; CHARPENTIER, M.; GUÉGAN, J.F.; GUERNIER, V.; BALLOUX, F. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current Biology* 15.11 (2005): 1022-1027.
- ROBINSON J.; HALLIWELL J. A.; MCWILLIAM H.; LOPEZ R.; PARHAM P.; MARSH S. G. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res*: 41:D1222-7. 2013.
- ROUJEAU J. C. Stevens-Johnson Syndrome and toxic epidermal necrolysis are severity variants of the same disease which differs from erythema multiforme. *J Dermatol* 1997; 24: 726–729.
- ROUTLEDGE P. 150 years of pharmacovigilance. *The Lancet*, 1998, 351:1200-1201.
- RZANY B., et al. Epidemiology of erythema exudativum multiforme majus, StevensJohnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis in Germany (1990–1992): structure and results of a population-based registry. *J Clin Epidemiol* 1996; 49:769–773.
- SANTOS, N.P.C., et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 - insertion - deletion (INSEL) ancestry - informative marker (AIM) panel. *Human mutation* 31.2 (2010): 184-190.
- SANTOS, L., et al. Descrição das notificações de queixas técnicas de medicamentos recebidas pela farmacovigilância do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 32, n. 4 (2012), p. 490-495 (2012).*
- SARGENT, C. A., et al. Identification of multiple HTF-island associated genes in the human major histocompatibility complex class III region. *The EMBO journal* 8.8 (1989): 2305.

- SARKER, A., et al. Utilizing social media data for pharmacovigilance: A review. *Journal of biomedical informatics* 54 (2015): 202-212.
- SCHNECK J.; STAT D.; FAGOT J-P., et al. Effects of treatments on the mortality of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a retrospective study on patients included in the prospective EuroSCAR Study. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58: 33–40.
- SEBBENN, Alexandre Magno; SEOANE, Carlos Eduardo Sicole. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. *Revista Árvore*, v. 29, n. 1, p. 1-8, 2005.
- SHIINA, T.; INOKO, H.; J. K. KULSKI, J. K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *HLA* 64.6 (2004): 631-649.
- SHIINA, T.; HASOMICHI, K.; INOKO, H.; KULSKI, J.K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics* 54.1 (2009).
- SHIOHARA T.; INAOKA M.; KANO Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reaction induced by a complex interplay among herpesvirus and antiviral and antidrug immune responses. *Allerg Int* 2006; 55: 1 – 8.
- SILVA, A.E.B.C.; REIS, A.M.M.; MIASSO, A.I., et al. Eventos adversos a medicamentos em um hospital sentinela do estado de Goiás, Brasil. *Rev Latino-Am Enfermagem*, 2011,19(2): 01-09p.
- SIMON-SANCHEZ, J., et al. Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Human molecular genetics* 16.1 (2006): 1-14.
- SNELL, G. D. Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of Genetics* 49.2 (1948): 87-108.
- STEWART, C. A., et al. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome research* 14.6 (2004): 1176-1187.

- STREET, J., et al. A novel HLA - B* 40 sequence - B* 40: 92. *International journal of immunogenetics* 38.2 (2011): 161-166.
- TANAKA, K. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc Biol.* 1994;56(5):571-5. Review.
- TERASAKI, P. I. E MCCLELLAND, J. .D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 1964,204,pp.998-1000.
- THORSBY E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*, 74(2):101-16. 2009.
- TOHYAMA, M.; HASHIMOTO, K.; YASUKAWA, M., et al. Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 2007; 157: 934–940.
- TROWSDALE, J. Both man & bird & beast: comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* 41.1 (1995): 1-17.
- TROWSDALE, J.; CAMPBELL R.D. Human MHC genes and products. *Current protocols in immunology* (2001): A-1K. WILLIAMS, T. M. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *The Journal of Molecular Diagnostics* 3.3 (2001): 98-104.
- TROWSDALE, J.; BECK, S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res*, 14(6):1176-1187. 2004.
- TROWSDALE, J.; KNIGHT J.C. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics* 14 (2013): 301-323.
- UMC - UPPSALA MONITORING CENTRE. Definitions. Setembro 1991. Disponível em: <<http://www.who-umc.org/defs.html>>
- UMC - The Uppsala Monitoring Centre. *The Uppsala Monitoring Centre & WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring.* 2005.

WHO-Nomenclature Committee. Nomenclature for factors of the HL-A system. Bull. Wld. Hlth. Org. 39: 483–486. 1968.

WHO- International Drug Monitoring: The Role of National Centres (WHO Technical Report Series No. 498). Geneva: World Health Organization, 1972.

WHO- Handbook of resolutions and decisions of the World Health Assembly and Executive Board, Vol 11948-1972. Geneva: World Health Organization, WHA16.36 Clinical and pharmacological Evaluation of Drugs, 1973.

WHO - World Health Organization. Safety monitoring of medicinal products. Technical Report. Series, Geneva, 2000.

WILLIAMS, F.F.W.; DARK, A.; ACOSTA, A.S.; DAAR, A.S.; GORODEZKY, C.; HAMMOND, M.; NASCIMENTO, E.; MIDDLETON, D. Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. Human immunology 62.6 (2001): 645-650.

ZHANG Y. L, MEI H, WANG Q, XIE J. A, LV J, PAN X. C, et al. Peptide binding specificities of HLA-B*5701 and B*5801. Sci China Life Sci. 2012;55(9):818–25.

ZINKERNAGEL, R. M., e DOHERTY, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248.5450 (1974): 701-702.

Site acessados:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/44853> acessado em 06/07/2016.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553908>; acessado em 06/06/2016.

<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>;

<https://www.ufpe.br/biolmol/Aula-Imunogenetica/aula-imuno-05.htm>;

<http://www.allelefreqencies.net/hla6006a.asp>;

<http://genepop.curtin.edu.au>;

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<http://periobasics.com/major-histocompatibility-complex.html>

Quadro 7