



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR-RFLP PARA A  
DETECÇÃO DO ALELO *HLA\*B-58:01* PARA UTILIZAÇÃO EM  
PACIENTES SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ALOPURINOL**

Sandro Wilson Gomes Pereira

Andréa Luciana S. Silva

Eduardo José Melo dos Santos

**Produto Técnico/Tecnológico do Mestrado PPGAC/UFPA**

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR-RFLP PARA A  
DETECÇÃO DO ALELO *HLA\*B-58:01* PARA UTILIZAÇÃO EM  
PACIENTES SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ALOPURINOL**

Produto Técnico/Tecnológico produzido como parte da Dissertação de Mestrado de Sandro Wilson Gomes Pereira, orientado pela Profa. Dra. Andréa Luciana S. Silva, no Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará, 2019.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMUNOGENÉTICA E GENES HLA

A imunogenética baseia-se no estudo de genes denominados imunorrelevantes, devido sua influência na homeostasia do organismo, no que diz respeito ao equilíbrio saúde e doença, dentre esses, encontram-se os genes de antígenos leucocitários humanos (HLA: *Human Leucocytary Antigens*) ocupando uma posição de destaque. Os genes HLA estão localizados no complexo principal de histocompatibilidade (MHC: *Histocompatibility Complex*), este complexo foi descrito pela primeira vez em 1958 na França por Dausset, médico hematologista, que identificou o aloantígeno denominado HLA-A2. Atualmente, define-se como um conjunto de locos gênicos ligados intimamente e localizados no braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.3) (SHIINA *et. al.*, 2009; CHAPLIN, 2010; DAUSSET, 1958).

Com a descoberta de Dausset, vários pesquisadores passaram a estudar o complexo e a partir de então, encontros ocorreram para discutir dados de pesquisas, técnicas, reagentes, propostas, comparar resultados e comunicar novas descobertas relacionadas ao HLA. O primeiro encontro, ocorreu em 1964 nos Estados Unidos com o objetivo principal de comparar técnicas para detectar antígenos leucocitários usados por diferentes pesquisadores da época (AMOS, 1965). Outros encontros aconteceram estabelecendo uma importante linha de pesquisa e após a terceira reunião, em 1968, um Comitê da Organização Mundial da Saúde foi criado para padronizar a nomenclatura HLA. Este Comitê é o responsável por nomear oficialmente os alelos e loci HLA.

Os primeiros loci HLA descobertos foram os HLA-A e -B (KISSMEYER-NIELSEN *et. al.*, 1968), logo em seguida descoberto o *locus* HLA-C (SOLHEIM *et. al.*, 1973), estes antígenos passaram a ser classificados como HLA de classe I. A descoberta do locus HLA-D foi divulgada no sexto encontro de pesquisadores em 1975 (THOTSBY & PIAZZA, 1975). Estudos posteriores mostraram que o *locus* HLA-D, consistia de vários *loci* diferentes fortemente ligados entre si, que codificavam três diferentes séries de determinantes, denominados de DR, DQ e DP, sendo estes, posteriormente classificados como HLA de classe II (KLEIN, 1977; THORSBY, 2009).

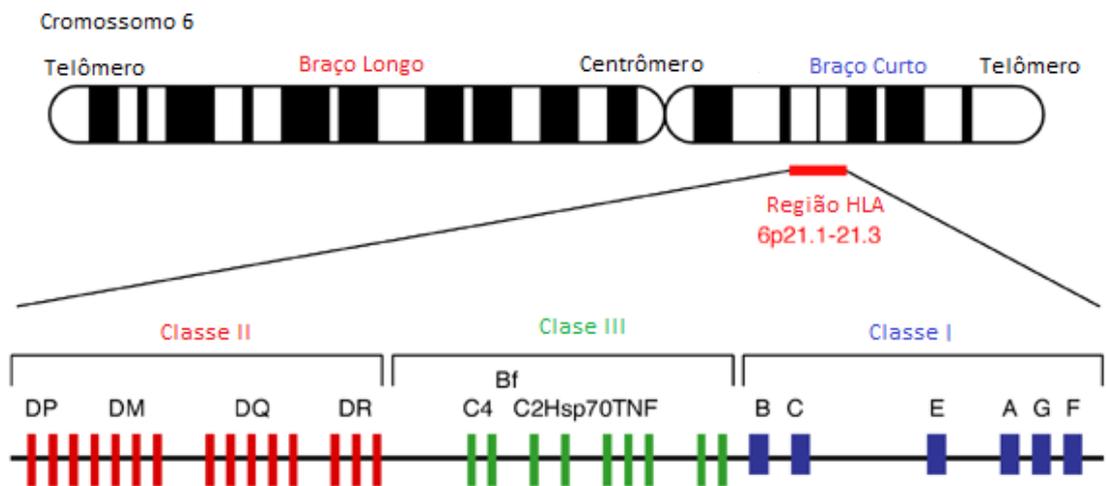
No ano de 1986, Goulmy *et al.*, (1977) demonstraram a restrição do MHC para a resposta imune mediada por linfócitos T em humanos, trabalhando com linfócitos T citotóxicos e Bergholtz *et al.*, (1977) com linfócitos T *helper*; Bjorkman *et al.*, (1987a, 1987b) forneceram em seus trabalhos explicações que mudaram o paradigma da imunologia em geral,

demonstraram a estrutura da molécula HLA-A2 e de peptídeo desconhecido encontrado em um sítio dessa molécula, utilizando cristalografia de raios X. Esses estudos contribuíram de forma significativa com achados de que as moléculas HLA eram apresentadoras de peptídeos.

Desde a década de 50, os estudos e descobertas científicas na área do HLA demonstraram que os antígenos de histocompatibilidade, possuem papel essencial na imunologia pelo seu envolvimento, em toda fase indutora da resposta imune celular e humoral. As primeiras linhas de estudo relacionadas a genes HLA eram associadas a enxertos e transplantes de órgão e tecidos, onde a compatibilidade dos genes HLA estava ligada sobrevida do enxerto em longo prazo e a incompatibilidade HLA envolvida a processos de rejeição celular ou humoral (OPELZ & DÖHLER, 2007) posteriormente várias outras descobertas foram direcionando linhas variadas de pesquisa envolvendo o complexo HLA.

## 1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE-MHC

O MHC humano está localizado no braço curto do cromossomo 6, ocupando ~4Mb, correspondente a 0,13% de todo genoma humano e contém ~0,5% (~160) dos ~32000 genes codificadores de proteínas conhecidas, 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.*, 2009).



**Figura 1:** Mapa da região HLA (banda 6p21.3 do cromossomo 6). Os genes e pseudogenes estão representados de acordo com a cor do seu grupo alélico.

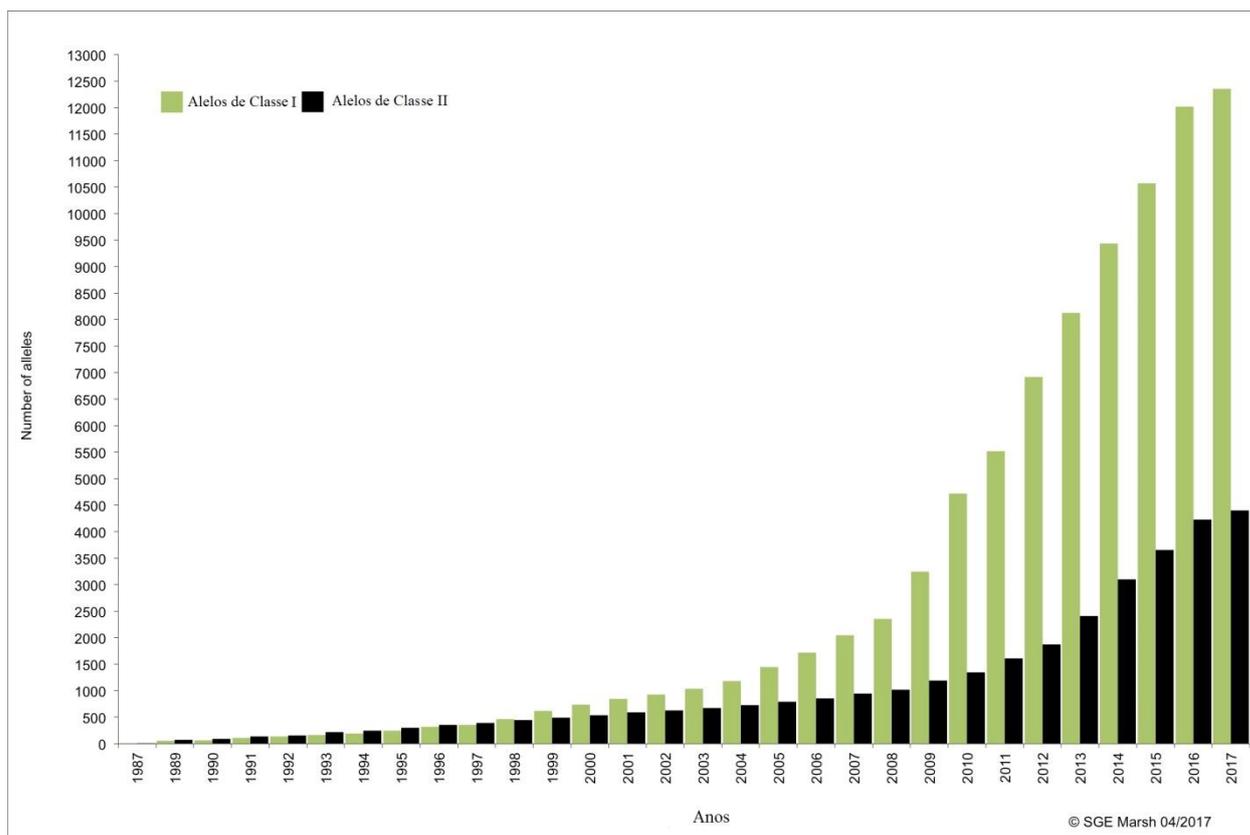
**Fonte:** ©Cambridge University Press (modificado), 2003.

A região de classe I; constituída de seis genes e onze pseudogenes, sendo três deles os chamados clássicos, *HLA-A*, *B* e *C*, os quais tem maior relevância clínica e são mais variáveis,

cada um contendo mais de dois mil alelos responsáveis pela expressão de glicoproteínas de superfície celular, que são encontradas na membrana das células nucleadas do organismo e determinam o reconhecimento do antígeno pelo linfócito T, como parte do mecanismo do sistema imune para a identificação e resposta a antígenos próprios e não próprios (CHAPLIN, 2010); os genes HLA de classe II (DR, DQ e DP) expressam-se em linfócitos B, macrófagos, monócitos, linfócitos T ativados e células dendríticas foliculares, determinando as interações celulares durante a resposta imunológica; a região de classe III contém muitos genes responsáveis por várias funções, incluindo proteínas do sistema complemento (C2, C4 e fator B), enzimas (21-hidroxilase e as enzimas glicosiladoras de moléculas HLA, fator de necrose tumoral alfa e beta, dentre outras), além de outros genes, cujos produtos ainda não foram definidos (CHAPLIN, 2010; HANSEN *et. al.*, 1993).

Os produtos gênicos do MHC participam tanto da resposta imune adaptativa, no processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T, na inflamação e também participam na resposta imune inata por meio da interação com as células “*Natural Killer*” (NK) (SHIINA *et. al.*, 2009), sendo responsáveis por diversas funções, incluindo a seleção clonal, indução de tolerância, imunidade mediada por células T, resposta inflamatória e produtos celulares como as citocinas e anticorpos. Consequentemente, há grande interesse médico no papel do MHC, pois está diretamente relacionado com a rejeição de órgãos e tecidos e a suscetibilidade para algumas doenças infecciosas, autoimunes e reações adversas à medicamentos (TROWSDALE & KNIGHT, 2013).

O polimorfismo do sistema HLA é enorme; cada loco HLA (A, B, C, DR, DQ e DP) pode ser ocupado alternativamente por uma série de genes alélicos. Os *HLA-A*, *B* e *C*, os quais tem maior relevância clínica, possuem uma grande variedade alélica, cada um contendo mais de dois mil alelos. Os genes HLA de classe II conhecidos são 19 e em conjunto apresentam mais de 3600 alelos já descritos, como mostrado no gráfico 1, sendo os genes *HLA-DRB* e *DQB* os mais polimórficos, apresentando conjuntamente mais de 2000 alelos conhecidos (hla.alleles.org).



**Gráfico 1:** Gráfico mostrando o número de alelos descritos por ano de 1987 a Março de 2017. Em verde claro alelos do HLA de classe 1 e em preto alelos do HLA de classe 2.

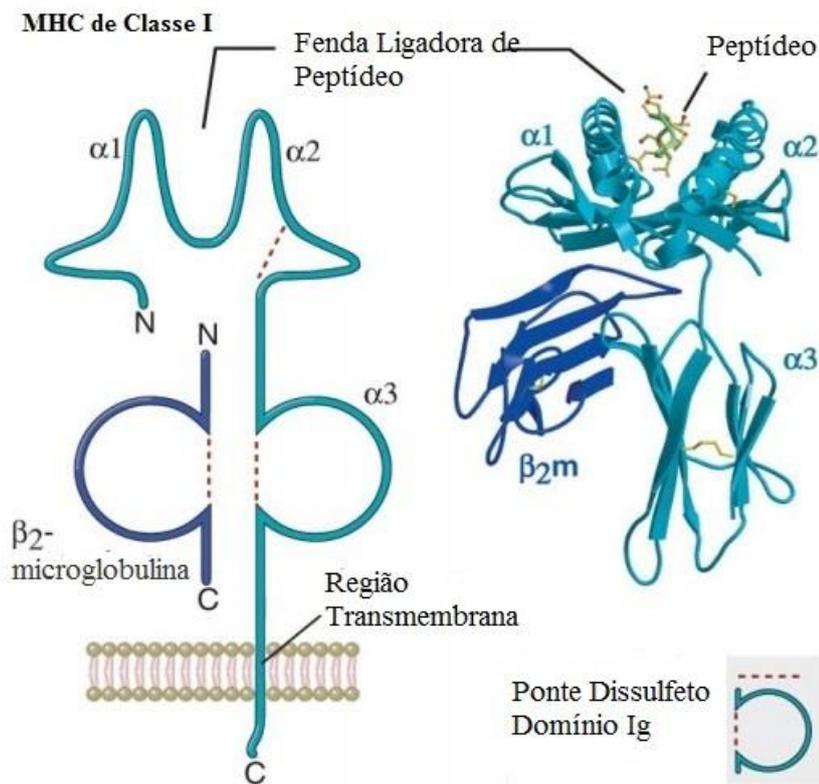
**Fonte:** [hla.alleles.org/nomenclature/stats.html](http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html), 2017(Modificado).

### 1.3 ESTRUTURA MOLECULAR E FUNÇÕES DO HLA

Os *loci* HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6 na banda 6p21.3 formando um complexo sistema de genes funcionalmente relacionados entre si (BENDER *et. al.*, 1983). O sistema HLA, com cerca de 4 Mb (megabases) de extensão, está subdividido em três regiões: classe I, classe II e classe III, de acordo com a estrutura e função dos seus genes.

As moléculas HLA da classe I são formadas por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia  $\alpha$  (pesada) e a cadeia  $\beta$  (leve). A cadeia  $\alpha$  é codificada por genes localizados na porção mais telomérica do sistema HLA, são constituídos por vários éxons, intercalados por íntrons e possui peso molecular de 44kD, e uma cadeia  $\beta$  codificada no cromossomo 15, com peso molecular de 12 kD, como mostrado na figura 2. A cadeia  $\alpha$  é formada por um polipeptídeo central contendo um ou dois oligossacarídeos. A cadeia  $\beta$  interage não covalentemente com a porção extracelular da cadeia  $\alpha$ , não possuindo uma ligação direta com a célula (MARSH *et.*

*al.*, 2000). A região de classe I é dividida em quatro domínios: um domínio extracelular aminoterminal altamente polimórfico formado a partir dos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  de ligação com peptídeos, um domínio extracelular altamente conservado tipo imunoglobulina  $\alpha 3$  ao qual se liga os linfócitos T CD8+, um domínio transmembranar contendo aminoácidos hidrofóbicos pelos quais a molécula é ancorada na membrana celular e um domínio citoplasmático contendo sítios de fosforilação e de ligação a elementos do citoesqueleto (HORTON *et. al.*, 2004).



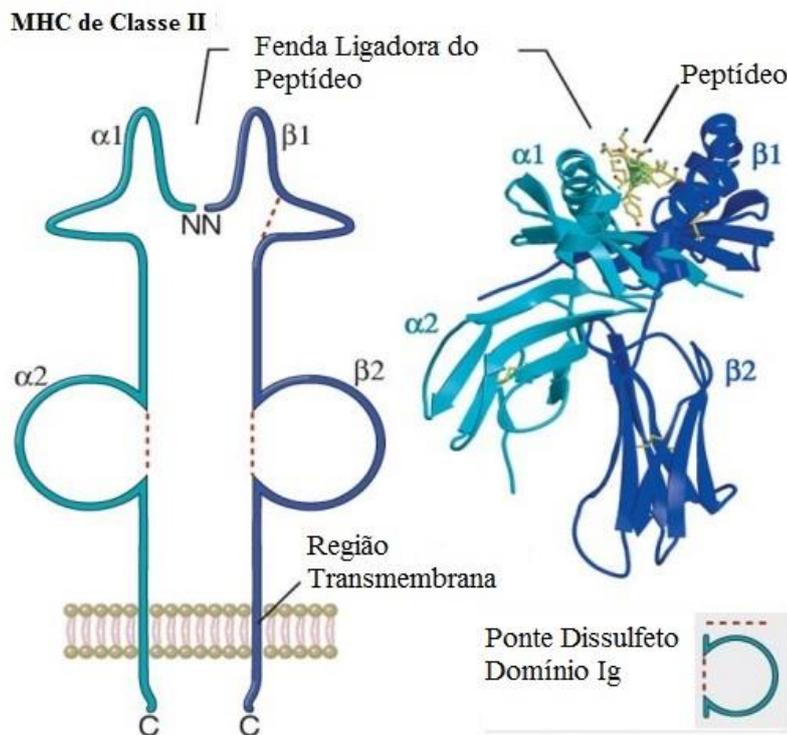
**Figura 2** :Desenho esquemático da estrutura molecular de MHC de classe I, dividida em quatro domínios: um extracelular aminoterminal, formado a partir dos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , um domínio extracelular tipo imunoglobulina  $\alpha 3$  e um domínio transmembranar contendo aminoácidos hidrofóbicos.

**Fonte:** ABBAS *et. al.*, 2005.

Os polimorfismos nos genes classe I localizam-se essencialmente nos éxons 2 e 3, os quais codificam as estruturas moleculares  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  do receptor membranar onde se localiza o sítio de ligação aos antígenos (MALISSEN *et. al.*, 1982). Estes receptores membranares na porção  $\alpha 3$  interagem com linfócitos T CD8+ positivos, que detectam alterações de expressão nas células, alterações estas que podem ocorrer devido a infecções ou ao desenvolvimento de células tumorais. Desta forma os linfócitos T (CD8+) reconhecem as células que deverão

atacar para combater o avanço de uma determinada infecção ou de um tumor (DOHERTY *et. al.*, 1975).

As Moléculas de MHC-I e MHC-II exibem forte similaridade estrutural. Assim, como mostrado na figura 3, o heterodímero de classe I é formado por uma cadeia  $\alpha$  pesada e a  $\beta$ 2-microglobulina, as moléculas de classe II são também heterodímeros formados por cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , codificadas pelos genes A e B, respectivamente (GOLDBERG *et. al.*, 2004).



**Figura 3:** Desenho esquemático da estrutura molecular do MHC de classe II. Domínios aminotermiais extracelulares (N) e carboxitermiais intracelulares (C), cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são subdivididas em dois segmentos denominados  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 ou  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2.

**Fonte:** ABBAS *et. al.*, 2005.

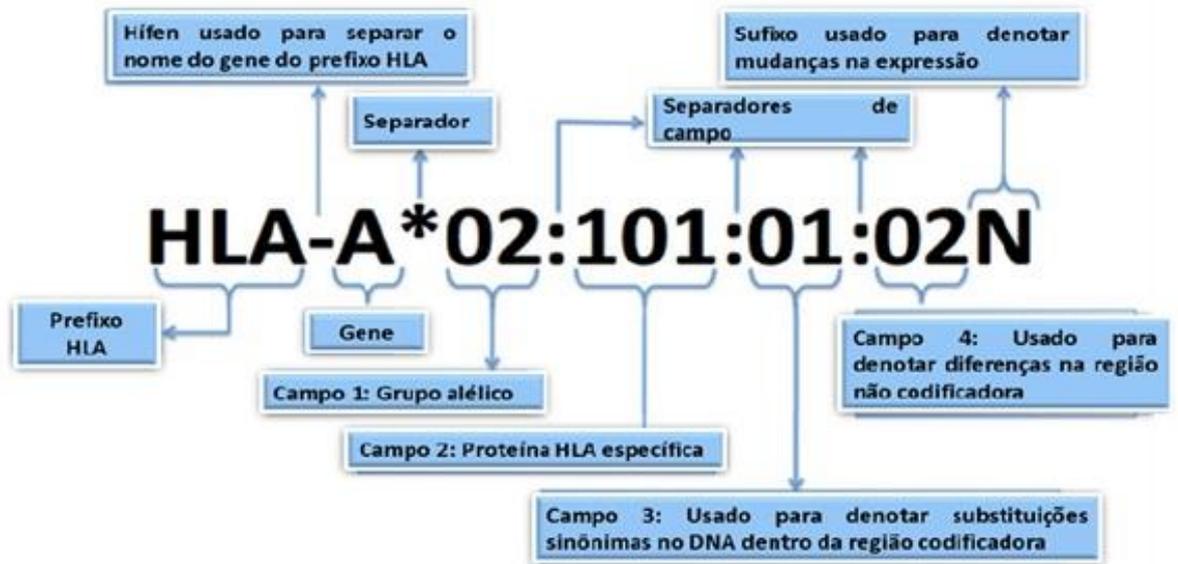
#### 1.4 NOMENCLATURA

Com a grande variedade genética dos genes HLA, tornou-se necessário estabelecer uma padronização para a nomenclatura destes *loci*, tendo sido organizado, em 1968, o primeiro encontro do Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1968). O nome de cada alelo HLA tem um número único correspondente a até quatro conjuntos de dígitos separados por dois pontos. O nome do alelo HLA é dependente da sequência de DNA do alelo e do seu mais próximo alelo HLA relacionado. Todos os alelos

HLA recebem um nome com pelo menos quatro dígitos, ou seja o nome HLA mais o Grupo alélico (A, B, C etc.) mais os dois primeiros conjuntos de dígitos após o asterisco (MARSH *et. al.*, 2010).

Após a primeira reunião do comitê para estabelecer as regras de nomenclatura dos HLA, foi desenvolvido um padrão baseado em campos ([hla.alleles.org](http://hla.alleles.org)). O primeiro campo determina o grupo alélico, como no seguinte exemplo *HLA-B\*58*. Dentro deste grupo alélico há diversos outros alelos, como é o caso dos *HLA-B\*58:01* e *HLA-B\*58:05*. A utilização de um asterisco depois da designação do nome do *locus* permitiu distinguir a caracterização alélica por métodos moleculares ou por métodos sorológicos. O segundo campo define alelos que determinam alterações na sequência proteica. Um terceiro campo pode ser usado para determinar substituições nucleotídicas sinônimas ou mutações sinônimas na região codificante que não modificará a proteína produzida, como por exemplo, *HLA-B\*58:01:01* e *HLA-B\*58:01:02* (que significa que estes alelos codificam a mesma sequência peptídica que dará origem à proteína, mas diferem por mutações sinônimas). Um quarto campo pode ainda ser usado, para descrever mutações em regiões não codificantes, como em íntros e regiões reguladoras ou promotoras (BODMER *et. al.*, 1991; Site: [hla.alleles.org](http://hla.alleles.org)).

Em uma visão simplificada, cada *locus* tem a sua própria designação seguida por um asterisco (tais como HLA-A\* e HLA-C\*). Estes são seguidos por designações de alelos, que são números exclusivos que compõem até quatro conjuntos de dígitos separados por dois pontos. Um sufixo, também, pode ser adicionado ao nome do alelo para indicar proteínas como, nula (N) ou baixa expressão (L) e aquelas que são secretadas (S) no citoplasma (C), aberrante (A), ou questionável (Q), como exemplificado na figura a seguir.



**Figura 4:** Nomenclatura oficial, designada aos genes do complexo MHC.

**Fonte:** hla.alleles.org (Modificado), 2016.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Padronizar um Protocolo utilizando a Técnica de PCR-RFLP para Detecção do Alelo *HLA\*B-58:01*, com a finalidade de triagem clínica e terapêutica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronizar e validar a Tipagem do Alelo *HLA\*B-58:01*;
- ✓ Determinar a Frequência do alelo *HLA\*B-58:01* em um grupo da População de Belém;
- ✓ Avaliar as frequências do alelo *HLA\*B-58:01* encontradas em um grupo amostral da população de Belém e do SNP utilizado para detecção e verificar se as frequências são compatíveis.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS

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\*B-58:01*, obtidas da fundação HEMOPA, usadas como controle positivo para a padronização do método e um segundo grupo, correspondente a 37 amostras de indivíduos da população de Belém, todas oriundas do banco de amostras do LGHM-UFPA, para validação e determinação da frequência alélica nesse grupo.

Os controles positivos, referentes as 5 amostras *HLA\*B-58:01* positivas foram disponibilizadas pelo Laboratório de Imunogenética da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (LIG-Hemopa): este serviço é referência para cadastramento de candidatos a doadores de medula óssea no Estado do Pará, no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME), realiza tipagem para HLA, o qual disponibilizou amostras de pacientes conhecidas através de sequenciamento, para a realização da padronização do teste.

#### 3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de DNA genômico, foram obtidas através de leucócitos do sangue periférico, coletadas em tubos com EDTA anticoagulante (Ácido Etilenodiaminotetracético) e o DNA genômico foi isolado do restante do sangue utilizando o Pure Link™ Genimic DNA mini Kit (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 3.3 PCR-RFLP

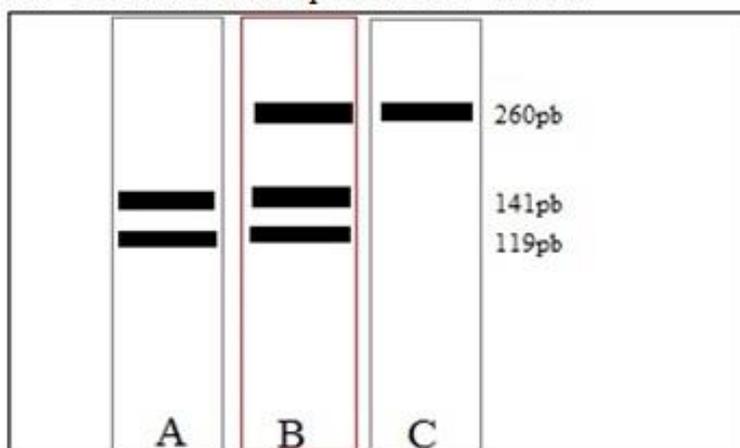
O único método na literatura para tipagem de *HLA-B\*58:01* que preenche os pré-requisitos de baixos custo e complexidade laboratorial é baseado em análise de tag-SNP, que consiste em usar polimorfismos em absoluta ligação com o alelo *HLA-B\*58:01*. O SNP rs9263726, encontrado no gene candidato de suscetibilidade a psoríase (PSORS1C1), ligado ao gene HLA-B, mostrou-se em absoluto desequilíbrio de ligação com o alelo *HLA-B\*58:01* e pode ser usado para sua genotipagem indireta, via uma Reação em Cadeia da Polimerase por

Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) (MAKAWA *et. al.*, 2012; VIDAL *et. al.*, 2015).

A genotipagem por rs9263726 foi realizada usando uma técnica de PCR-RFLP, em uma região alvo de 260pb dentro do gene PSORS1C1 que foi amplificado na PCR, utilizando 50ng de DNA e um par de iniciadores de oligonucleotídeos a 0,2 $\mu$ M (para: AAGCTCCATCCACCCCTGGT; Rev: ACACATTGGGTGGGGGACAT). A PCR foi realizada utilizando 0,625 unidades de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e foi realizada usando as seguintes condições no termociclador: em alta temperatura de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C / 1 minuto (desnaturação), 56°C / 1 minuto (emparelhamento/hibridização) e 72°C / 1 minuto (alongamento/extensão), seguida de 5 minutos 72°C para a finalização da reação.

O produto de PCR foi digerido utilizando a enzima FokI (R0109S-New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.) em um volume total de reação de 25  $\mu$ l, usando 0,625 unidades de enzima de restrição (FokI). A reação foi incubada a 37°C durante 120 minutos, seguido de desativação da enzima durante 20 min a 65°C. A presença dos rendimentos de alelos, foram dois fragmentos digeridos de 119pb e 141pb em homozigotos, em heterozigotos de três fragmentos de DNA, um maior contendo 260pb e dois menores de 119pb e 141pb, em indivíduos negativos para a tipagem, o rendimento obtido após a digestão é de apenas um fragmento de 260 pb, correspondente a região alvo amplificada como exemplificado no esquema da figura 5 (VIDAL *et. al.*, 2015).

Padrões de Resultado para *HLA-B\*58:01*.



**Figura 5:** Esquema exemplificando os padrões de bandas para *HLA-B\*58:01*, formadas a partir de fragmentos do produto de PCR após a digestão pela enzima FOK1. Em A, indivíduo positivo homozigoto para o alelo, em B indivíduo positivo heterozigoto e em C indivíduo negativo para o alelo.

Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, no qual, as amostras foram aplicadas em poços separados junto à solução azul de bromofenol (*Bromophenol Blue Solution*) na proporção de 8µl para 2µl respectivamente, foi utilizado também um poço sem amostra (identificado como branco) para controle de contaminantes e um poço com marcador de peso molecular.

Após a aplicação, o gel através da cuba de eletroforese imerso em Tampão (TEB 1x), sofreu ação de corrente elétrica de 250µA, a 80v por 40 minutos. Após a migração dos produtos, o gel foi fixado em solução de ácido acético e álcool etílico por 20 minutos, logo após em Nitrato de Prata a 20 minutos em agitação, lavado com água destilada 1x, e mantido em Hidróxido de sódio por 20 minutos em agitação, acrescentando após, gotas de formol a 10% até que o gel escureça e as bandas de DNA possam ser visualizadas para análise, modificações da técnica podem ocorrer no decorrer do trabalho, baseadas em outros estudos e para melhorar a análise e interpretação dos resultados.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA

A validação foi realizada com material de 5 indivíduos portadores do *HLA\*B-58:01* que foi obtido de colaboradores do Laboratório de Imunogenética da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (LIG-Hemopa).

Foram genotipadas 37 amostras aleatórias de indivíduos da população de Belém, para se conhecer as frequências alélicas, avaliando a concordância das frequências alélicas, haplotípicas e padrões de desequilíbrio de ligação com o descrito na literatura e sistematicamente disponibilizado no AFND.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações de frequências alélicas e genotípicas foram realizadas por teste exato de Fisher. 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 online na homepage do programa genepop (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Para criar uma estimativa das frequências alélicas para a população de Belém, para ambos os alelos, como variância alélica e limite de confiança

foram utilizadas fórmulas já estabelecidas, descritas no quadro baixo (SEBBENN & SEOANE, 2005).

**Quadro 1:** Cálculos e fórmulas utilizados na análise.

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 • <b>Limite Inferior</b>	$l.i = P - 2 \cdot DP$	*l.i: Limite Inferior *P: Frequência *DP: Desvio Padrão
✓ Intervalo de Confiança • <b>Limite Superior</b>	$l.S = P + 2 \cdot DP$	*l.S: Limite Superior *P: Frequência *DP: Desvio Padrão

**Quadro 1:** Cálculos e fórmulas utilizados na análise estatística e para determinação da frequência alélica.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para a padronização e validação da metodologia que melhor se adequava nos pré-requisitos de baixo custo, complexidade laboratorial e praticidade, foi utilizado como base o trabalho de Maekawa *et al.*, (2012) com algumas adaptações para a execução dos testes. Em seu trabalho a descrição é de uma metodologia com os pré-requisitos já citados, baseado em análise de tag-SNP, que consiste em usar polimorfismos em absoluto desequilíbrio de ligação (DL=1) com o alelo *HLA-B\*58:01*.

O SNP rs9263726, encontrado no gene candidato de suscetibilidade a psoríase (PSORS1C1), ligado ao gene HLA-B, mostrou-se em absoluto desequilíbrio de ligação com o alelo *HLA-B\*58:01* na população japonesa, ou seja sempre que o polimorfismo for presente o alelo também estará, logo, pode ser utilizado para sua genotipagem indireta, via uma Reação em Cadeia da Polimerase por Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) (MAEKAWA *et al.*, 2012; VIDAL *et al.*, 2015). Por isso foi utilizado como marcador alternativo, por estar em plena associação com o alelo em questão e ser menos polimórfico, reduzindo as chances de resultados falsos positivos.

Após a escolha do método a ser utilizado, foram recebidas amostras de 5 indivíduos portadores do *HLA-B\*58:01*, obtidas de colaboradores da fundação HEMOPA, identificadas através de sequenciamento, para a padronização e validação do método. Obtendo resultados positivos como o esperado, obedecendo a um padrão de heterozigose para o alelo nas 5 amostras, através da detecção do polimorfismo utilizado para a tipagem indireta, garantido então a funcionalidade da técnica e a padronização da metodologia, todos os resultados foram confirmados em duplicata.

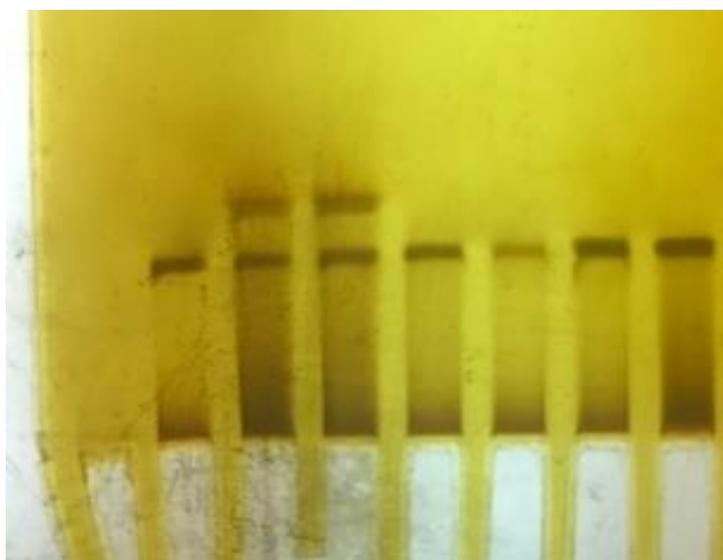
### 4.2 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA

O Próximo passo a partir da padronização foi a genotipagem das amostras oriundas do banco de amostras do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará (LGHM-UFGPA). Com o objetivo de definir a frequência do alelo no grupo da população de Belém, foram utilizadas um total de 37 amostras, provenientes de indivíduos aparentemente saudáveis.

Das 37 amostras tipadas, 7 foram positivas para o alelo, sendo todos heterozigotos, apresentando um padrão de três bandas de fragmentos de DNA, como o esperado, uma banda de 260pb resultante da amplificação da PCR e outras duas de 141pb e 119pb respectivamente, resultantes da digestão enzimática confirmando a presença do polimorfismo, alcançando uma frequência de 9,45% para o SNP rs9263726 indiretamente ligado ao *HLA-B\*58:01*.

Todos os testes foram realizados em duplicata para confirmar esses resultados. E para garantir que não houve erro durante a tipagem, foi utilizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo programa BIOSTAT versão 5.0 e através deste teste, foi possível confirmar que a frequência alélica está dentro do esperado e de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (tendo um  $p > 0,05$ ).

Desta forma, o resultado de frequência de 9,45% encontrado nas amostras testadas encontra-se dentro do intervalo de variância estimado, dando suporte ao resultado dos testes.



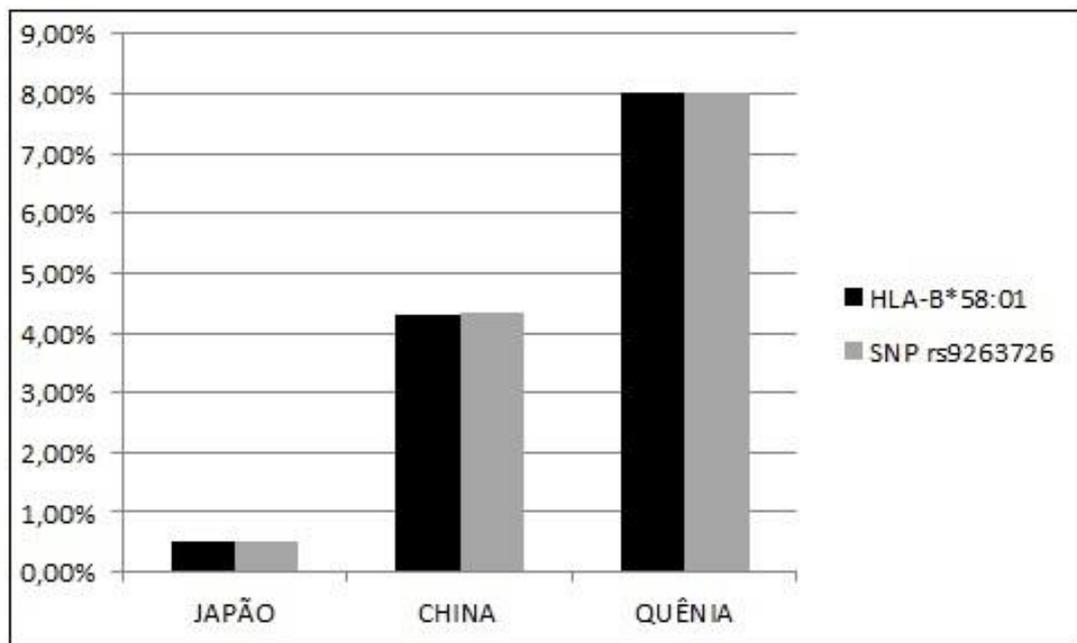
**Figura 6:** Imagem referente ao gel de poliacrilamida a 6%, mostrando os padrões de bandas encontrados. O poço 1 (da esquerda para direita) é o controle branco apenas com reagentes, do poço 2 ao 8 amostras de pacientes testadas, onde os poços 3 e 4 foram positivos para a tipagem, mostrando um padrão de 3 bandas.

#### 4.3 *HLA-B\*58:01* E SNP rs9263726, FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL

Para verificar e comparar as frequências do alelo *HLA-B\*58:01* e do SNP rs9263726, foram utilizados critérios disponíveis nos sites AFND e [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (NCBI) e consulta de alguns trabalhos que estimaram o desequilíbrio de ligação entre alelo e SNP. Os

indivíduos portadores do alelo *HLA-B\*58:01* também são portadores do SNP rs9263726, na maior parte das populações estudadas e identificadas. Com exceção de um grupo australiano segundo o trabalho de Vidal *et al.* (2016), no entanto, muitas populações podem ter o alelo em total desequilíbrio de ligação com o SNP rs9263726, como mostrado no **gráfico** a seguir, em que as populações do Japão e Quênia foram tipadas tanto para o alelo quanto para o SNP e possuem a mesma frequência média entre os dois, evidenciando total desequilíbrio de ligação, reforçando a ideia de utilizar o SNP para a detecção do alelo.

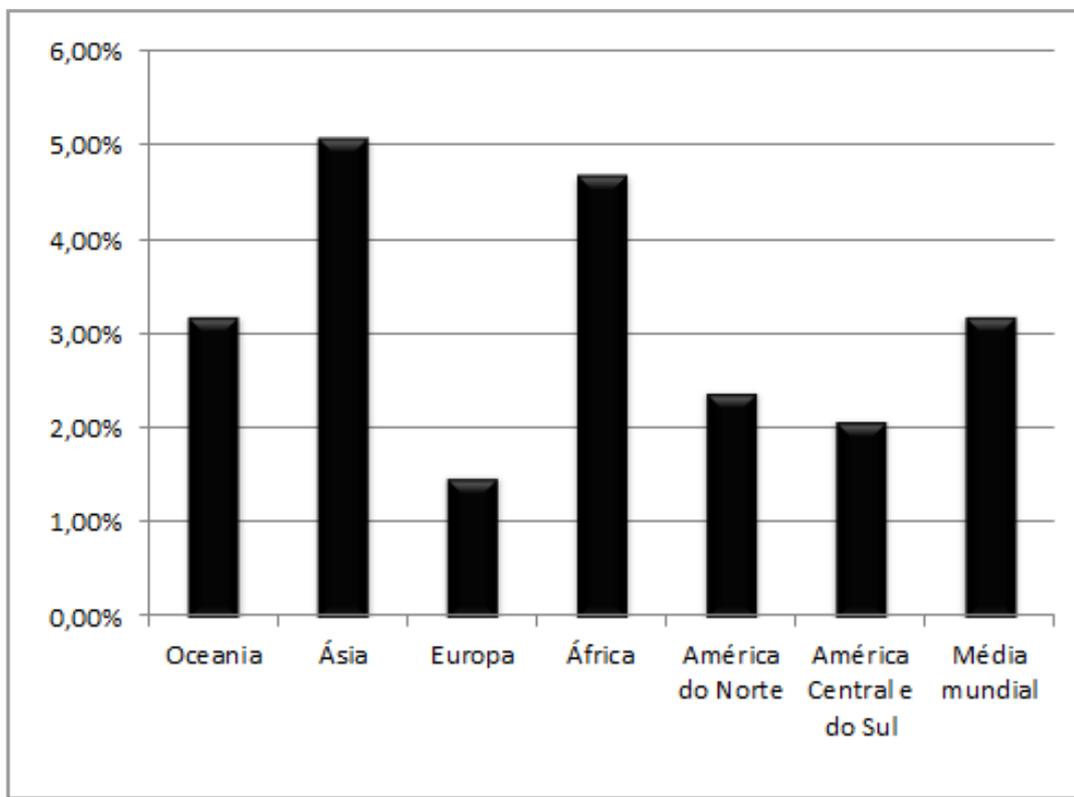
**Gráfico 2:** Gráfico mostrando desequilíbrio de ligação entre *HLA-B\*58:01* e do SNP rs9263726 nas populações do Japão, chineses-americanos e Quênia.



**Gráfico 2:** Esquema exemplificando as populações encontradas em total desequilíbrio de ligação para *HLA-B\*58:01* e o SNP rs9263726, em que alelo e SNP apresentam a mesma Frequência média na População, com base em dados do AFND e NCBI.

Para verificar a média da frequência do alelo de acordo com os continentes do mundo, foram utilizados dados disponíveis no site AFND e calculada a média dentre as populações tipadas de acordo com os continentes.

**Gráfico 3:** Gráfico mostrando a média da frequência do *HLA-B\*58:01* nos continente e no mundo.



**Gráfico 3:** Esquema mostrando a média da frequência do alelo *HLA-B\*58:01* nas populações tipadas de acordo com seus continentes.

## 5 DISCUSSÃO

Durante muitas décadas, as linhas de estudo relacionadas a genes HLA eram associadas apenas a enxertos e transplantes de órgãos e tecidos, onde a compatibilidade dos genes HLA estava ligada a sobrevida do enxerto em longo prazo e a incompatibilidade do HLA envolvida a processos de rejeição celular ou humoral (OPELZ & DÖHLER, 2007). A partir da década de 50, os estudos e descobertas científicas na área do HLA demonstraram que os antígenos de histocompatibilidade, possuíam papel essencial na imunologia, pelo seu envolvimento em toda fase indutora da resposta imune celular e humoral, direcionando várias outras vertentes envolvendo os genes HLA e o MHC (OPELZ & DÖHLER, 2007).

Com base nas novas linhas de pesquisas desenvolvidas nesse período, surgiu a imunogenética, que baseia-se no estudo de genes denominados imunorrelevantes, devido sua influência na homeostasia do organismo, no que diz respeito ao equilíbrio saúde e doença, evidenciando a associação entre antígenos HLA com mais de 40 doenças humanas além da relação importante do HLA com reações adversas a certos medicamentos, como é o caso do

*HLA-B\*58:01* diretamente ligado a pré-disposição a reações graves como a SSJ e NET em pacientes que utilizam Alopurinol no tratamento de artrite gotosa e outras patologias (CHAPLIN, 2010).

Percebeu-se então que indivíduos que possuíam esse alelo eram 97 vezes mais susceptíveis para ao desenvolvimento de RAMs que pacientes que possuíam outro HLA, onde a taxa de mortalidade para NET chega a 50% dos casos e 5% para a SSJ (MOCKENHAUPT & SCHÖPF, 1996).

Pela descoberta dessas associações, pela alta taxa de mortalidade dos pacientes acometidos por essas reações e pela falta de testes diagnósticos preditivos mais acessíveis que evitem esses acontecimentos, surgiu o interesse do presente trabalho, em desenvolver um método rápido, de baixo custo e complexidade laboratorial com o objetivo de triar os pacientes que necessitem utilizar o medicamento, diminuindo os riscos do surgimento de RAMs.

Para isso, foi buscado um método que se enquadrasse nos pré-requisitos citados e então encontrado o método de PCR-RFLP descrito por MAEKAWA *et. al.*,( 2012) e outro estudo que descrevia uma variação da metodologia evidenciado por VIDAL *et. al.*,(2015), que serviram como base para a padronização do protocolo.

Com as informações obtidas da metodologia dos dois trabalhos e de outros materiais consultados, foram feitas modificações na reação de PCR, obtendo resultados significativos, reprodutivos e satisfatórios, com testes em amostras controles para o alelo, obtidas de colaboradores do hemocentro do Pará, apresentando resultados compatíveis com os já detectados, determinando o sucesso na padronização do novo protocolo.

Evidenciando também o baixo custo da técnica em comparação a métodos já existentes, como sequenciamento que é de alta especificidade e sensibilidade, no entanto, possui um custo altíssimo e aparelhos altamente especializados, além da demora na entrega dos resultados, e segundo VIEIRA (2011) uma reação de PCR completa (extração de DNA+PCR+Eletroforese) pode custar bem menos que uma reação sorológica, devido ao alto preço de alguns anticorpos comerciais e menos de um terço do valor da reação de sequenciamento, por ser menos complexa e não exigir reagentes e materiais com valores tão altos como tais reações.

Uma PCR convencional custa aproximadamente R\$ 7,00 por amostra, a técnica utilizada no seguinte trabalho tem custo médio de R\$ 10,00 a R\$ 15,00 por amostra devido a utilização de enzima de restrição, enquanto que outras técnicas podem custar até dez vezes

mais, além de ter também alta especificidade e sensibilidade, corroborando com a importância do nosso estudo para a eficiência do diagnóstico e redução de gastos (VIEIRA, 2011; BIERHALS *et. al.*, 2016).

Por outro lado a técnica utilizada faz a detecção de um SNP supostamente ligado ao alelo *HLA-B\*58:01* e a comunidade científica e as grandes indústrias farmacêuticas exigem que as reações de PCR sejam altamente específicas, de total eficiência e total reprodutibilidade (VIEIRA, 2011). Portanto, para um protocolo padronizado atingir o status descrito acima, deve no mínimo, atender a estas condições.

Para isso, estudos em diversas populações e sites de bancos de dados de genética foram consultados para confirmar que *HLA-B\*58:01* e SNP rs9263726 estavam em total desequilíbrio de ligação, significando dizer que sempre que o SNP está presente o alelo em questão também estará.

Como resultado, na maior parte das populações estudadas que identificaram o alelo *HLA-B\*58:01* e SNP rs9263726 através de tipagem, possuíam frequências compatíveis com desequilíbrio de ligação absoluto segundo dados do AFND e NCBI, entretanto um estudo mostrou que em um grupo australiano essa hipótese não é verdadeira, segundo o trabalho de Vidal *et al.* (2015); evidenciando pacientes negativos para o alelo e positivos para o polimorfismo (falsos positivos), e pacientes positivos heterozigotos para o alelo sem o SNP (falsos negativos), com tudo esse foi um caso isolado, muitas populações podem ter o alelo em total desequilíbrio de ligação com o SNP rs9263726, como mostrado por MAEKAWA *et. al.*, (2012) que evidenciou esse total desequilíbrio de ligação entre o *HLA-B\*58:01* e SNP rs9263726 em uma população japonesa, confirmado posteriormente por TOHKIN *et. al.*, (2013) que observou a mesma relação em japoneses e em uma população de americanos com descendência chinesa. No Brasil não se tem conhecimento desses dados, tampouco nas diversas populações do país, exaltando a necessidade de estudos como o do presente trabalho.

Em outro trabalho MAEKAWA *et. al.*, (2015) também mostrou essa relação de total desequilíbrio de ligação entre *HLA-A\*31:01* e o SNP rs3869066, já que este alelo, aumenta os riscos de RAMs em pacientes que utilizam Carbamazepina (MAEKAWA *et. al.*, 2015), sugerindo que SNPs podem ser utilizados para a detecção indireta de alelos HLA, por serem menos polimórficos, quando comprovado o desequilíbrio de ligação.

Para afirmar e comprovar que o mesmo desequilíbrio ocorre na população de Belém e do Brasil, são necessário estudos mais aprofundados entre as diferentes populações, tipando tanto o SNP como o alelo, para estabelecer se ambas as frequências são compatíveis, como na

maioria das populações, a exemplo do Quênia que segundo dados do AFND comparados com informações do NCBI possui a mesma média de frequência tanto para o alelo quanto para o SNP como mostrado anteriormente no gráfico 2. Assim como as populações japonesa e chinesa (MAEKAWA *et. al.*, 2015; TOHKIN *et. al.*, 2013), reforçando a ideia da utilização do SNP, menos polimórfico, para detectar o *HLA-B\*58:01* diminuindo as chances de resultados falso positivos e falso negativos.

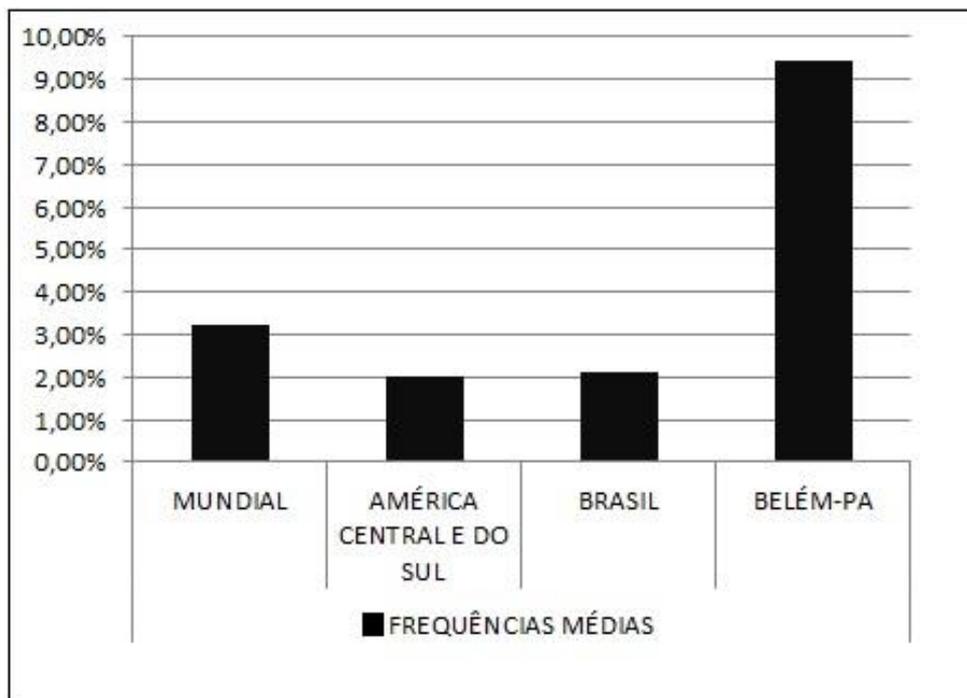
De acordo com os dados obtidos do AFND, foi feita a consulta da frequência do *HLA-B\*58:01* nos países que possuíam informações disponibilizadas no banco de dados. Foi evidenciado que o alelo está presente em maiores frequências médias na Ásia, seguido de África, Oceania, América e Europa, como mostrado no gráfico 3. Já é bem descrito que as maiores frequências do *HLA-B\*58:01* são encontradas em populações de países asiáticos, no entanto alguns estudos demonstram a presença desse tipo específico de HLA em países da Europa, como a Itália (YEO, 2013), sugerindo que o *HLA-B\*58:01* pode ser encontrado em frequências maiores em diversas populações. Além do mais, nem todos os países notificam e fomentam os bancos de dados de genética, deixando faltar informações necessárias para se obter as frequências precisas desse alelo em cada população.

Muitos dos números relacionados a essas frequências são adquiridos de redes de doadores de medula óssea (REDOME) e trabalhos de pesquisa soltos, atualizando essas informações de forma lenta e nem sempre precisas devido à precariedade de estudos envolvendo alelos HLA em diversos países, expondo a autenticidade e importância do seguinte trabalho, além de ser o primeiro trabalho no Brasil nesta linha de pesquisa a propor um método diagnóstico para a detecção do alelo.

Com o objetivo de verificar a frequência do *HLA-B\*58:01* na população de Belém através da detecção indireta pelo SNP, foram selecionadas amostras aleatórias do banco de amostras do LGHM-UFPA para aplicação dos testes e identificação da frequência alélica.

Do total de 40 amostras selecionadas, apenas 37 amplificaram através da PCR-RFLP e destas, 7 foram heterozigotos positivos para o SNP ligado ao *HLA-B\*58:01* e 30 foram negativas, representando uma frequência de 9,45% sob o total de amostras testadas, e de acordo com os testes estatísticos encontra-se compatível com equilíbrio Hardy-Weinberg e dentro dos limites de confiança, que formam o intervalo de 2,6% a 16,18%. Confirmando que os resultados obtidos das tipagens, estão de acordo com o esperado e encontram-se dentro do intervalo de confiança estimado, dando suporte ao resultado dos testes (SEBBENN & SEOANE, 2005).

Todavia, a frequência encontrada no grupo amostral de Belém foi bem superior à média das frequências do continente americano e do Brasil, assim como a média mundial, como mostrado a seguir no gráfico 4.



**Gráfico 4:** Esquema exemplificando a média da frequência do *HLA-B\*58:01* no mundo, na América Central e do Sul e no Brasil, com base em dados do AFND e NCBI, comparando-as a frequência encontrada na população de Belém no presente trabalho via detecção indireta através do SNP rs9263726.

A frequência encontrada pode ter tido esse número, devido a quantidade de amostras testadas ou pelo fato de não se ter conhecimento exato desses números nos continentes, pois informações em relação a frequência do *HLA-B\*58:01* no Brasil, se tem apenas em poucas regiões como mostrado na tabela a seguir, não podendo estimar com precisão esses dados (AFND, 2017), além do mais, sabe-se que frequências muito superiores a essas médias e a encontrada no presente trabalho, já foram estimadas em diversas populações, como a China que é responsável pela maior frequência mundial do alelo, alcançando 17% em uma determinada população e também possui o alelo em total desequilíbrio de ligação com o SNP (TOHKIN *et. al.*, 2013).

**Tabela 1:** Frequências do *HLA-B\*58:01* em algumas regiões do Brasil.

POPULAÇÃO	Nº DE AMOSTRAS	FREQUÊNCIA
-----------	----------------	------------

<b>BELO HORIZONTE (CAUCASIANOS)</b>	95	2,10%
<b>BRASIL (VARIADO)</b>	108	2,20%
<b>VALE DO RIBEIRA (QUILOMBOLA)</b>	144	0%
<b>BELÉM (VARIADO)</b>	37	9,45%

**Tabela 1:** Tabela mostrando a frequência do *HLA-B\*58:01* em algumas populações do Brasil, relacionando-as ao número de amostras testadas, comparadas a frequência de Belém encontrada no presente trabalho.

Outros dados também corroboram com nossos resultados mostrando que as altas frequências do alelo não se encontram apenas em países orientais ou asiáticos, pois as outras duas maiores frequências mundiais encontradas estão na Índia e República de Camarões, ambos apresentando até 15% de frequência alélica para o *HLA-B\*58:01*, e Taiwan que chega a 10,7% (AFND, 2017), evidenciando que em diversas populações a frequência desse alelo pode ser aumentada, associando a presença do alelo ao risco de desenvolvimento de RAMs em caso de utilização do Alopurinol e reforçando a necessidade de um método de triagem para pacientes que precisam utilizar a medicação já que a presença do *HLA-B\*58:01* aumenta em quase 100 vezes as chances de desenvolver reações que podem levar a morte (CHAPLIN, 2010; LIN *et. al.*, 2015).

Uma triagem preditiva em pacientes que iniciarão o tratamento com o Alopurinol é de extrema necessidade, haja vista que é comprovado sua relação com reações graves em quem possui *HLA-B\*58:01*, e a triagem auxiliaria os profissionais de saúde em uma terapêutica eficaz e segura para o paciente no tratamento pretendido, reduzindo os riscos do desenvolvimento de RAMs relacionados ao alelo. É um dos medicamentos de segunda linha que poderia substituir o Alopurinol seria o Febuxostat (MULLEN *et. al.*, 2015), que possui o mesmo efeito farmacológico através de uma estrutura molecular diferente, e que pode ser um medicamento alternativo para os pacientes *HLA-B\*58:01* positivos, embora novos estudos sejam necessários para provar que o uso do Febuxostat não venha a desenvolver reações graves nesses pacientes, o que se sabe certamente é que RAMs relacionadas ao Febuxostat não estão associados ao *HLA-B\*58:01*, garantindo eficácia na substituição do Alopurinol nesses pacientes (MAEKAWA *et. al.*, 2012).

Além da triagem preditiva nos pacientes pré-tratamento com o Alopurinol, nosso método tem como objetivo a redução das taxas de morbidade e mortalidade, em relação ao *HLA-B\*58:01* e o uso do Alopurinol, redução de custos hospitalares referentes aos pacientes

que necessitem de cuidados especiais em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), haja vista que pacientes que desenvolvem SSJ/NET necessitam de cuidados em UTI, que além da necessidade de tratamento nessas unidades é sugerido que se possível envie o paciente para unidade de queimados (BULISANI *et. al.*, 2006) como relatado em vários estudos.

O custo médio da diária em UTI em hospital público, segundo o estudo de DE SÁ *et. al.*,(2015) gira em torno de R\$ 4.000,00 (DE SÁ *et. al.*, 2015) de acordo com o grau de gravidade do paciente e o quadro clínico em que se encontra, vale ressaltar também que o tratamento para essas moléstias duram de dias a meses e que nem sempre tem um resultado satisfatório evoluindo ao óbito do paciente (MOCKENHAUPT & SCHÖPF, 1996).

Outro dado de grande relevância são os números relativos ao percentual de internações hospitalares causadas por RAMs que no Reino Unido apontam para até 12% das admissões em hospitais e 5% de todos os óbitos hospitalares (PIRMOHAMED *et. al.*,2004; SARKER *et. al.*,2015). Com isso ressalta-se a falta de conhecimento sobre esses dados no Brasil, evidenciando um dos objetivos do presente trabalho, alertar os profissionais de saúde para o reconhecimento do desenvolvimento dessas RAMs em pacientes que utilizam Alopurinol, contribuindo assim para o rápido diagnóstico e introdução da terapia de reversão do quadro. Outro benefício seria o reconhecimento de unidades de farmacovigilância para notificações de possíveis casos, pois a falta de notificação desses quadros negligenciam ainda mais estudos como o do nosso grupo.

O presente trabalho faz parte de uma rede de Imunogenética que busca constantemente meios diagnósticos e de reconhecimento de patologia e quadros clínicos, relacionados a genes HLA, buscando identificar, relatar e retardar o aparecimento dessas patologias e de reações ligadas a esses genes, buscando melhorar a qualidade de vida dos pacientes com o rápido diagnóstico e reduzir significativamente o número de sequelas e mortes causadas.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados e discutidos permitem concluir, que houve sucesso na padronização do protocolo de PCR-RFLP para detecção indireta do *HLA-B\*58:01* através de SNP rs9263726, uma vez que as amostras controle apresentaram resultados compatíveis com os já estabelecidos através de sequenciamento; o alelo *HLA\*B-58:01* obteve frequência de 9,45% no grupo de amostras da população de Belém por detecção indireta sob o total de amostras testadas pelo método padronizado em equilíbrio Hardy-Weinberg e dentro do

intervalo de confiança estimado; a frequência encontrada foi superior a média das frequências continentais e mundial como relatado em outras populações, no entanto, apresentou-se dentro do intervalo de confiança alélica; o método foi padronizado e está pronto para testes e posterior implantação e validação.

## 7 REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K. Imunodeficiências Congênitas e Adquiridas. In: Lichtman; Pillai; Abbas. 7. Ed. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier:458-469. 2012.
2. ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H. **Cellular and Molecular Immunology**, 5ed., Saunders, 2005.
3. 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.
4. ADKINSON, N.F; FRIEDMANN, P.F. AND PONGRACIC, J.A. Drug allergy. In: Holgate ST, Church MK, Lichtenstein LM, ed Allergy 3rd ed **Mosby Elsevier**. 157-166. 2006.
5. AMOS, D. B.; PEACOCKE, N. Leukoagglutination technique, Histocompatibility Testing. Publication 1229. **National Academy of Sciences—National Research Council, Washington, DC**, 1965.
6. AMSTUTZ, U. SHEAR, N.H. RIEDER, M.J. HWANG, S. FUNG, V. NAKAMURA, H. *et al*. Recommendations for HLA-B15:02 and HLA-A31:01 genetic testing to reduce the risk of carbamazepine-induced hypersensitivity reactions. **Epilepsia**. 55(4):496–506. 2014.
7. ANVISA, Gerência Geral de Produtos para a Saúde Pós-Comercialização. Unidade de Farmacovigilância. Projeto Piloto Hospitais Sentinela In: **Farmacoepidemiologia**, ANVISA, Brasília. 2001.
8. BENDER, Welcome et al. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. **Journal of molecular biology**, v. 168, n. 1, p. 17-33, 1983.
9. BERGHOLTZ, B. O.; THORSBY, E. Macrophage-Dependent Response of Immune Human T Lymphocytes to PPD In Vitro Influence of HLA-D Histocompatibility. **Scandinavian journal of immunology**, v. 6, n. 8, p. 779-786, 1977.
10. BERND, L.A.G. Alergia a medicamentos. **Rev. bras. alerg. imunopatologia**; 28(3): 125-132. 2005.

11. 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.
12. BJORKMAN, P. J. et al. antigen, HLA-A2. **Nature**, v. 329, p. 5, 1987.
13. BJORKMAN, P. J. et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions. **Nature**, v. 329, p. 512-518, 1987.
14. BODMER, Julia G. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. **Human immunology**, v. 41, n. 1, p. 1-20, 1994.
15. BRUNNER, L. S.; SUDDARTH, D. S. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgico**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.
16. BUSON, Paul. **Tratado de medicina interna**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1997.
17. CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Allergy Clinic Immunology**: 125p (2 SUPPL. 2); 2010.
18. CHAO, J.; TERKELTAUB, R. A critical reappraisal of allopurinol dosing, safety, and efficacy for hyperuricemia in gout. *Curr Rheumatol Rep*. Apr; 11(2):135-140, 2009.
19. CORONA, C.A. Allopurinol tablet [package insert]. **Watson Pharma**; Disponível em: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=2298ed2a-e01b-4f7c-9902-7c58a6e06b7a>. 2009.
20. 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.
21. CRUZ, B.A. Gota Gout. **Revista Brasileira de Reumatologia**;46:419–22, 2006.
22. DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. **Acta baemat.**, v.20, p,156-66, 1958.
23. DEAN, Laura. Allopurinol Therapy and HLA-B\* 58: 01 Genotype. 2016.
24. DIAS, M.F & et al. Fontes de notificação em farmacovigilância. **Rev. Farm. Med.**, São Paulo, v. 34, no 6, 2005.
25. DIAS, M.F. *et al.* Sensibilização dos Profissionais de Saúde para o Programa Brasileiro de farmacovigilância . ANVISA. In: **I Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária**, no 1, 2002 , de 02 a 04 de Dezembro , São Paulo. Resumo de Trabalhos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 10 set. 2016.
26. De Sá, C. A. L; Rocha, J. S; Almeida, S. F. ANÁLISE DE CUSTO-LEITO DE UTI HOSPITALAR, **Anais do IV SINGEP** ,São Paulo – SP – Brasil -08, 09 e 10/11/2015.

27. DOHERTY, Peter C.; ZINKERNAGEL, Rolf M. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. **Nature**, v. 256, n. 5512, p. 50-52, 1975.
28. 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.
29. ERICE, S. Effective communications in Pharmacovigilance. **The Erice Report**. International Conference on Developing Effective Communications in Pharmacovigilance, 24-27 September, quando foram desenvolvidas as diretrizes políticas conhecidas como Declaração Erice, 1997.
30. ETTINGER, B. *et al.* Randomized trial of allopurinol in the prevention of calcium oxalate calculi. *The New England Journal of Medicine*. Nov, 439 – 442, 1986.
31. FAM, A.G. Managing problem gout. *Ann Acad Med Singapore*. Jan; 27(1): 93-99, 1998.
32. FRACCHIA, G.N., THEOFILATOU, M (eds); MEHTA, U., MILSTIEN, J.B., DUCLOS, P., and FOLB PI. **Developing a national system for dealing with adverse events following immunization**. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(2), 170-177, 2000.
33. FRITSCH, P.O., SIDOROFF. A, – Drug induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. **Am J Clin Dermatol**, 1:349-360; 2000.
34. GATTI, Evelina; PIERRE, Philippe. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 4, p. 468-473, 2003.
35. GOLDBERG, Anna Carla; RIZZO, Luiz Vicente. Estrutura do MHC e função–apresentação de antígenos. Parte 2. **Einstein (16794508)**, v. 13, n. 1, 2015.
36. GOULMY, E. TERMIJTELEN, A. BRADLEY, B.A. VAN ROOD, J.J. Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA. **Nature**, 266: 544–5, 1977.
37. GRUCHALLA, R. DRUG ALLERGY. **J ALLERGY Clin Immunol**; 111 (2); S548-559. 2003.
38. GUIMARÃES, M. Carolina S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 2, p. 117-120, 1985.

39. HALL, M.; MCCORMACK, P.; ARTHUR, N.; FEELY, J. The spontaneous reporting of RAMs by nurses. **British Journal of Clinical Pharmacology**; 40: 173 – 175, 1995.
40. HANSEN, T.H., CARRENO, B.M., SACHS, D.H. In: PAUL, W.E., ed. **Fundamental Immunology**. 3 ed., Raven Press: New York, p.577-628, 1993.
41. HAROON, Nigil. Does a positive HLA-B27 test increase your risk of mortality? 2015.
42. HERSHFIELD, M. S. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Human Leukocyte Antigen-B Genotype and Allopurinol Dosing. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 2, p. 153-158, 2013.
43. HOOD, Harkens; DINCHER, Judith. **Fundamentos e prática de enfermagem**. Atendimento completo ao paciente. 8.ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1995.
44. HORTON, Roger et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 12, p. 889-899, 2004.
45. HORTON, Roger et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 12, p. 889-899, 2004.
46. KISSMEYER-NIELSEN, F.; SVEJGAARD, A.; HAUGE, M. Genetics of the human HL-A transplantation system. **Nature**, v. 219, p. 1116-1119, 1968.
47. JEHA, S. Tumor lysis syndrome. *Semin Hematol.*; 38(4 Suppl 10): 4-8 8. Rampello E, Fricia T, Oct, 2001.
48. KLEIN, J. Evolution and function of the major histocompatibility system: Facts and speculations. In: **The major histocompatibility system in man and animals**. Springer Berlin Heidelberg, 1977. p. 339-378.
49. LAPORTE, J.R. & CARNÉ, X. Metodología epidemiológica básica en farmacovigilancia. In: LAPORTE, J.R & TOGNONI, G. (Org.). **Principios de Epidemiologia del Medicamento**. Barcelona: Masson-Salvat, p. 111-130. 1993.
50. LAZAROU, J.; POMERANZ, B.H.; COREY, P.N.; Incidence of RAMs in Hospitalized Patients: A Meta-analysis of Prospective Studies. **Journal of the American Medical Association**; 279:1200-1205, 1998.
51. LIN, Chia-Hsien et al. Immunologic basis for allopurinol-induced severe cutaneous adverse reactions: HLA-B\* 58: 01-restricted activation of drug-specific T cells and molecular interaction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 4, p. 1063, 2015.
52. MACK, Steven J. et al. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. **Tissue antigens**, v. 81, n. 4, p. 194-203, 2013.
53. MAEKAWA, K. NISHIKAWA, J. KANIWA, N. SUGIYAMA, E, KOIZUMI, T. KUROSE, K. *et al.* Development of a Rapid and Inexpensive Assay for Detecting a

- Surrogate Genetic Polymorphism of HLA-B\*58:01: A Partially Predictive but Useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. **Drug Metab. Pharmacokinet** ; 27(4):447-50. Epub Jan 24, 2012.
54. MAEKAWA K. et al. Development of a simple genotyping method for the HLA-A\*31:01-tagging SNP in Japanese.10.2217/pgs.15115 ©2015 Future Medicine Ltd. *Pharmacogenomics* 16 (15), 1689-1699. 2015.
  55. MALAGUARNERA, M. The management of tumor lysis syndrome. *Nat Clin Pract Oncol.*; 3(8): 438-47, Aug, 2006.
  56. MALISSEN, Bernard et al. Human cytotoxic T cell structures associated with expression of cytolysis. I. Analysis at the clonal cell level of the cytolysis-inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies. **European journal of immunology**, v. 12, n. 9, p. 739-747, 1982.
  57. MARSH, J. Lawrence et al. Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in *Drosophila*. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 1, p. 13-25, 2000.
  58. MARSH, S. PARHAM, P. BARBER, L. The HLA Facts Book: London, **Academic Press**, p.73-83. 2000.
  59. MARSH, Steven GE et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. **Tissue antigens**, v. 75, n. 4, p. 291-455, 2010.
  60. MCCORMACK, M. ALFIREVIC, A. BOURGEOIS, S. FARRELL, J.J. KASPERAVIČIŪTĖ, D. CARRINGTON, M. *et al.* Reactions in Europeans. **N Engl J Med.** ;364(12):1134-43. 2011.
  61. 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.
  62. 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.
  63. MOCKENHAUPT M, SCHÖPF E. Epidemiology of drug-induced severe skin reactions. **Semin Cutan Med Surg.** Dec;15(4):236-43, 1996.
  64. MOCKENHAUPT, Maja; SCHÖPF, Erwin. Epidemiology of drug-induced severe skin reactions. In: **Seminars in cutaneous medicine and surgery**. WB Saunders. p. 236-243, 1996.
  65. MOORE, N. The role of the clinical pharmacologist in the management of RAMs. **Drug Safety**; 24(1): 1-7, 2001.

66. MULLEN, L.M.; CHAMBERLAIN, G.; SACRE, S. Pattern recognition receptors as potential therapeutic targets in inflammatory rheumatic disease. **Arthritis Res Ther**; 2015.
67. 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.
68. OKAMOTO, K. Inhibitors of xanthine oxidoreductase. *Nippon Rinsho*. 66(4): 748-753; Apr, 2008.
69. OMS - Organização Mundial da Saúde. Safety monitoring of medicinal products. **The importance of pharmacovigilance**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2002.
70. OMS - 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.
71. OPAS - Organização Panamericana de Saúde. Termo de referência para reunião do grupo de trabalho: **Interface entre Atenção Farmacêutica e Farmacovigilância**. Brasília: OPAS, 2002.
72. OPELZ, Gerhard; DÖHLER, Bernd. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. **Transplantation**, v. 84, n. 2, p. 137-143, 2007.
73. PETRAMALE, C.A. Rede de hospitais sentinelas. **II Oficina sobre Uso Seguro e Vigilância de Medicamentos em Hospitais**. Período: 7 a 10 de abril de 2002. Disponível em: <[http://www.Anvisa.gov.br/farmacovigilancia/oficinas/oficina\\_2/programa.htm](http://www.Anvisa.gov.br/farmacovigilancia/oficinas/oficina_2/programa.htm)> Acesso em: 20 Jan. 2017.
74. POUYANNE, P.; HARAMBURU, F.; IMBS, J.L.; BÉGAUD, B. Admissions to hospital caused by RAMs: cross sectional incidence study. **British Medical Journal**; 320:1036, 2000.
75. PIRMOHAMED, Munir et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. **Bmj**, v. 329, n. 7456, p. 15-19, 2004.
76. PRUGNOLLE F, MANICA A, CHARPENTIER M, GUÉGAN JF, GUERNIER V, BALLOUX F. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. **Curr Biol** [Internet]. Jun 7 [cited 2014 Sep 29];15(11):1022–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936272>. 214. 2005.
77. RIZZO, Mauro. **Plantão médico: urgência e emergência**. Rio de Janeiro: Biologia e Saúde. 1998.

78. ROUJEAU, J.C., KELLY, J.P., NALDI, L. *et. al.* - Medication use and the risk of Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. **N Engl J Med**,;333:1600-1607, 1995.
79. SAITO, Yoshiro et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for human leukocyte antigen B (HLA-B) genotype and allopurinol dosing: 2015 update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 36-37, 2016.
80. SARKER, Abeed et al. Utilizing social media data for pharmacovigilance: A review. **Journal of biomedical informatics**, v. 54, p. 202-212, 2015.
81. SCHLESINGER, N.; Dalbeth, N.; Perez-Ruiz, F. Gout - what are the treatment options. *Expert Opin Pharmacother.*; 10(8): 1319-1328. Jun, 2009.
82. 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.
83. SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J. K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. **Tissue antigens**, v. 64, n. 6, p. 631-649, 2004.
84. SHIINA, Takashi et al. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. **Journal of human genetics**, v. 54, n. 1, p. 15-39, 2009.
85. SODEMAN, A. W.; SODEMAN, M. T. **Biblioteca médica básica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1993.
86. SOLHEIM, B. G. et al. Further Evidence of a Third HL-A Locus. **HLA**, v. 3, n. 6, p. 439-453, 1973.
87. STAMP L.K. DAY R.O. YUN J. Allopurinol hypersensitivity: investigating the cause and minimizing the risk. **Nat Rev Rheumatol**. [PubMed: 26416594] 2015.
88. STAMP, Lisa K. et al. Starting dose is a risk factor for allopurinol hypersensitivity syndrome: a proposed safe starting dose of allopurinol. **Arthritis & Rheumatology**, v. 64, n. 8, p. 2529-2536, 2012.
89. STAMP, Lisa K.; DAY, Richard O.; YUN, James. Allopurinol hypersensitivity: investigating the cause and minimizing the risk. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 4, p. 235-242, 2016.
90. SUZUKI, I *et al.* Allopurinol, an inhibitor of uric acid synthesis - Can it be used for the treatment of metabolic syndrome and related disorders? *Drugs Today (Barc)*. 45(5): 363-368; May, 2009.

91. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **The MHC sequencing consortium**. Nature [Internet]. 1999;401(6756):921–3. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/44853> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553908>, acesso em 22/11/16.
92. THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM<sup>1</sup>, Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex; **Nature** **401**, 921-923 (28 October 1999) | doi:10.1038/44853; Received 20 July 1999; Accepted 26 August 1999.
93. THE, M. H. C. et al. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature**, v. 401, n. 6756, p. 921-923, 1999.
94. THORSBY, E. On the future of HLA. **Tissue Antigens**, v. 78, n. 4, p. 229-240, 2011.
95. THORSBY, E.; PIAZZA, A. Joint report from the sixth international histocompatibility workshop conference. II. Typing for HLA-D (LD-1 or MLC) determinants. **Histocompatibility testing**, v. 1975, p. 414-458, 1975.
96. TOHKIN, M. KANIWA, N. SAITO, Y. SUGIYAMA, E. KUROSE, K. NISHIKAWA, J. *et al.* A wholegenome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. **Pharmacogenomics**;13:60e9, J, 2013.
97. TROWSDALE, John; KNIGHT, Julian C. Major histocompatibility complex genomics and human disease. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 14, p. 301-323, 2013.
98. UMC - The Uppsala Monitoring Centre. The Uppsala Monitoring Centre & WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring. 2005. Disponível em: <<http://www.who-umc.org/umc.html>> acesso em: 10 Dez. 2016.
99. VAN DEN BEMT, P.M.L.A.; EGBERTS, T.C.G.; DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W.; BROUWERS, J.R.J.B. Drug-related problems in hospitalized patients. **Drug Safety**; 22(4): 321-333, 2000.
100. VIDAL, C. *et al.*, A polymorphism within the psoriasis susceptibility 1 candidate 1 (PSORS1C1) gene is not linked to HLA-B\*58:01 in an Australian cohort, **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dmpk.2015.08.007>. 2015.
101. WHO - Safety monitoring of medicinal products. **Technical Report**. World Health Organization. Series, Geneva, 2000.

102. 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.
103. WHO- **International Drug Monitoring**: The Role of National Centres (WHO Technical Report Series No. 498). Geneva: World Health Organization, 1972.
104. WHO-Nomenclature Committee. Nomenclature for factors of the HL-A system. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39: 483–486. 1968.
105. WIJNANDS, J.M.A.; VIECHTBAUER, W.; THEVISSSEN, K.; ARTS, I.C.W.; DAGNELIE, P.C.; STEHOUWER, C.D.A.; *et al.* Determinants of the prevalence of gout in the general population: a systematic review and meta-regression. **Eur J Epidemiol.** 19–33; 2014.
106. WYNGAARDEN, James B.; SMITH, H. **Tratado de medicina interna**. 16.ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 1986.
107. WOLKENSTEIN, P., LATARJET, J., ROUJEAU, J.C.; *et al* - Randomised comparison of thalidomide versus placebo in toxic epidermal necrolysis. **Lancet**,;352:1586-1589. 1998.
108. XIE, Biao; DAVIDSON, Wallace N.; DADALT, Peter J. Earnings management and corporate governance: the role of the board and the audit committee. **Journal of corporate finance**, v. 9, n. 3, p. 295-316, 2003.
109. Yeo, S.I. HLA-B\*5801: utility and cost-effectiveness in the Asia-Pacific region. **Int J Rheumatic Dis**;16:254e7, 2013
110. YUN, J. et al. Human leukocyte antigens (HLA) associated drug hypersensitivity: consequences of drug binding to HLA. **Allergy**, v. 67, n. 11, p. 1338-1346, 2012.
111. ZHANG, YaLan et al. Peptide binding specificities of HLA-B\* 5701 and B\* 5801. **Science China Life Sciences**, v. 55, n. 9, p. 818-825, 2012.
112. ZINEH, Issam et al. Allopurinol pharmacogenetics: assessment of potential clinical usefulness. **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 12, p. 1741-1749, 2011.