



## AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE INDEL 14-PB (rs371194629) NO GENE *HLA-G* EM PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA NO SUL DO BRASIL

Luiz Carlos Nascimento<sup>1</sup>  
Jonas Michel Wolf<sup>2</sup>  
Daniel Simon<sup>3</sup>  
Vagner Ricardo Lunge<sup>4</sup>

### Resumo

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é um grave problema de saúde pública. A progressão da infecção pelo HBV apresenta uma importante relação com a resposta imunológica do hospedeiro. O complexo do antígeno leucocitário humano (HLA) está relacionado à resposta imunológica para a eliminação e controle do HBV. Especificamente, o polimorfismo Indel-14pb (rs371194629) no gene *HLA-G* têm sido associado com a hepatite B por afetar este processo. Este estudo objetivou avaliar se o polimorfismo Indel-14pb apresenta associação com a infecção crônica pelo HBV em uma amostra de pacientes cronicamente infectados do Sul do Brasil. O delineamento foi caso-controle e inclui 260 casos de hepatite B crônica e 260 controles oriundos de serviços de saúde da cidade de Caxias do Sul (RS), de 2014 a 2016. Amostras de sangue foram coletadas destes indivíduos e o DNA genômico foi extraído. A genotipagem do polimorfismo Indel-14pb foi realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os dados foram avaliados pelo teste do qui-quadrado e razão de chances (RC) com intervalo de confiança (IC95%). Até o momento 216 casos e 214 controles foram genotipados. O genótipo Ins/Ins foi mais frequente no grupo de casos em comparação com os controles (22,0% vs. 11,6%; RC= 2,01; IC95%: 1,14–3,85), assim como a presença do alelo Ins (48,6% vs. 42,6%; RC= 1,30; IC95%: 1,01–1,69). As frequências genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,050$ ). Em conclusão, o polimorfismo Indel-14pb no gene *HLA-G* foi associado com hepatite B crônica em uma amostra caso-controle de Caxias do Sul.

**Palavras-chave:** Hepatite B crônica; polimorfismo genético; *HLA-G*; caso-controle.

<sup>1</sup> Bolsista do curso de graduação Luiz Carlos Nascimento – Bolsista FAPERGS – luizcarlos1425@hotmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Diagnóstico Molecular da ULBRA – jonasmwolf@gmail.com

<sup>3</sup> Laboratório de Genética Molecular Humana da ULBRA - daniel.simon@ulbra.br

<sup>4</sup> Laboratório de Diagnóstico Molecular da ULBRA – vagner.lunge@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) ocorre em todas as regiões do mundo e é considerada um grave problema de saúde pública. Em termos mundiais, se estima que haja entre 250 a 350 milhões de pessoas infectadas cronicamente (WHO, 2015). Nesse sentido, dados indicam que mais de 800 mil indivíduos morrem anualmente em decorrência da hepatite B (NIEDERAU, 2014).

O complexo do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) está diretamente relacionado à resposta imunológica para a eliminação e controle do HBV. Polimorfismos nos genes que codificam as proteínas do complexo HLA têm sido investigados e fortemente relacionados com a infecção persistente pelo HBV, assim como, com a evolução clínica para a cronicidade. Nesse aspecto, GWAS (do inglês, *Genome-Wide Association Studies*) têm revelado associações de variantes genéticas localizadas na região cromossômica do HLA com a infecção crônica pelo HBV, no entanto, ainda há algumas lacunas com relação ao entendimento de alelos de suscetibilidade e mecanismos genéticos envolvidos nesse desfecho clínico (WANG et al., 2016).

Especificamente, no Brasil, há uma escassez de estudos que objetivaram avaliar contribuições de propensão genética para a hepatite B nos genes que codificam proteínas do complexo HLA. Evidências em amostras africanas e brasileiras denotam associações entre a inserção/deleção de 14 pares de bases (Indel-14pb) do gene *HLA-G* com uma maior taxa de replicação do HBV (LAARIBI et al., 2015) e persistente antigenemia para HbeAg, respectivamente (DA COSTA FERREIRA et al., 2016). O presente estudo objetivou investigar o polimorfismo Indel-14pb em uma amostra de pacientes cronicamente infectados pelo HBV no Sul do Brasil.

## METODOLOGIA

Este estudo possui delineamento caso-controle. O local de coleta das amostras controles foi no Centro Especializado em Saúde e para os casos no Hospital Geral, ambos são instituições localizadas na cidade de Caxias do Sul (RS). As coletas foram realizadas no período de 2014 a 2016. O número amostral foi estimado com o *software* Epi Info<sup>TM</sup> versão 7.1.5.2. A partir disso, foram coletados 260 casos e 260 controles. Todos os casos e controles foram pareados por idade, sexo e etnia autodeclarada.

Os critérios de inclusão para os casos foram serem maiores de 18 anos, que possuíssem exames confirmatórios de hepatite B na chegada ao serviço (HBsAg+, Anti-HBS e IgG+) e que concordassem em participar da pesquisa mediante a assinatura do Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os controles foram selecionados por serem HBsAg negativo e Anti-HBS IgM negativo. Foram excluídos os controles que apresentaram as seguintes doenças: colangite esclerosante primária, doença de Wilson, hepatites virais, cirrose, síndrome da imunodeficiência adquirida, hipertensão, câncer e doenças autoimunes. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da Universidade Luterana do Brasil (nº de protocolo 32075314.3.0000.5349). Foram utilizados questionários padronizados e validados anteriormente para a coleta de dados sociodemográficos e para coleta de dados relacionados à hepatite B (PEREIRA et al., 2017).

O sangue total foi colhido em tubos de coleta vacuettes. Todas as amostras foram submetidas à detecção de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B (HBsAg, anti-HBc IgG e IgM) por imunocromatografia de fluxo lateral (Architect®, Abbott Diagnostics, Sligo, Ireland) seguindo as instruções do fabricante, e após foram armazenadas a -20°C. A extração do DNA genômico das amostras foi realizada pelo método de adsorção em sílica, descrito por BOOM et al. (1990). A detecção e quantificação do HBV foi realizada de acordo com WELZEL et al. (2006). O polimorfismo Indel-14pb no gene *HLA-G* foi genotipado de acordo com DA COSTA FERREIRA et al. (2016). A detecção dos genótipos foi efetuada a partir de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e eletroforese em gel de poliacrilamida. Controles positivos e negativos foram utilizados em todos os experimentos realizados.

Os dados foram compilados e analisados com *software* SPSS® (23.0 version, Chicago, IL *Statistical Package for the Social Sciences*). As frequências alélicas e genotípicas foram determinadas pela contagem direta dos alelos, e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, pelo teste de qui-quadrado de Pearson. Para verificar a possível associação entre o polimorfismo Indel-14pb com a cronificação da hepatite B, foram estimadas RCs, com intervalos de 95% de confiança (IC95%). Todos os testes empregados foram bilaterais e os valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A média de idade geral dos pacientes infectados pelo HBV foi de  $47,6 \pm 12,2$  anos, e um maior percentual de casos e controles apresentou entre 41-60 anos (56,9%). A etnia autodeclarada branca (88,1%) e o gênero masculino (55,0%) foram predominantes na amostra avaliada. As variáveis mais frequentemente demonstradas pelos casos em relação aos controles foram: status civil casado (78,1% vs. 64,2%;  $p < 0,001$ ), ter escolaridade de ensino fundamental ou menos (61,1% vs. 81,5%;  $p < 0,001$ ) e ter residido em área rural (71,0% vs.

43,0%;  $p < 0,001$ ).

Até o presente momento, o polimorfismo Indel 14-pb (rs371194629) foi avaliado em 214 casos e 216 controles. No grupo de casos, as frequências genotípicas observadas foram de 22,0% para Ins/Ins, 24,8% para Del/Del e 53,3% para Ins/Del. Por outro lado, no grupo de controles, um perfil diferente foi observado ( $p = 0,015$ ). Neste grupo, as frequências foram de 11,6% para Ins/Ins, 27,3% para Del/Del e 61,1% para Ins/Del. Em comparação entre casos e controles, foram identificadas frequências para o alelo Del de 51,4% vs. 57,9% e para Ins de 48,6% vs. 42,1% ( $p = 0,048$ ), respectivamente. A tabela 1 ilustra essas diferenças, onde o genótipo Ins/Ins foi estatisticamente mais frequente no grupo de casos (RC= 2,01; IC95%: 1,14–3,85;  $p = 0,010$ ), assim como a presença do alelo Ins (RC= 1,30; IC95%: 1,01–1,69;  $p = 0,048$ ). As frequências genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,050$ ).

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Indel-14pb nos grupos de casos e controles avaliados na cidade de Caxias do Sul (RS)

| Variáveis | Grupos          |      |                     |      | RC (IC 95%)        | Valor de $p$ |
|-----------|-----------------|------|---------------------|------|--------------------|--------------|
|           | Casos (n = 214) |      | Controles (n = 216) |      |                    |              |
|           | n               | %    | n                   | %    |                    |              |
| Genótipos |                 |      |                     |      |                    |              |
| Del/Del   | 53              | 24,8 | 59                  | 27,3 | 1,00 (Ref.)        | -            |
| Ins/Del   | 114             | 53,3 | 132                 | 61,1 | 0,96 (0,61 - 1,50) | 0,863        |
| Ins/Ins   | 47              | 22,0 | 25                  | 11,6 | 2,01 (1,14 - 3,85) | 0,010        |
| Alelos    |                 |      |                     |      |                    |              |
| Del       | 220             | 51,4 | 250                 | 57,9 | 1,00 (Ref.)        | -            |
| Ins       | 208             | 48,6 | 182                 | 42,1 | 1,30 (1,01 - 1,69) | 0,048        |

RC (IC 95%): Razão de chances (intervalo de confiança de 95%); Ref. Categoria de referência.

No presente estudo, o polimorfismo Indel-14pb (rs371194629) no gene *HLA-G* foi associado com o desfecho de hepatite B crônica em uma amostra caso-controle oriunda da cidade de Caxias do Sul, RS. O polimorfismo Indel-14pb já foi associado com susceptibilidade ao carcinoma hepatocelular em estudos conduzidos com amostras de brasileiros (TEIXEIRA et al., 2013) e chineses. Variações no *HLA-G* têm sido relacionadas com doenças virais, pois atuam corroborando com o escape viral do sistema imune (JIANG et al., 2011). A plausibilidade biológica do polimorfismo Indel-14pb está intimamente relacionada com a estabilidade do RNAm. Este processo atua corroborando para a progressão da infecção pelo HBV, devido a não expressão do produto do gene *HLA-G* (LAARIBI et al., 2015).

No presente estudo, mais amostras estão sendo coletadas, na cidade de Caxias do Sul, objetivando um maior poder estatístico de análise. Além disso, outros polimorfismos no

sistema HLA serão estudados, visando uma melhor compreensão da relação entre a imunogenética e a hepatite B crônica.

## CONCLUSÃO

O polimorfismo Indel-14pb (rs371194629) no gene *HLA-G* foi associado com a hepatite B crônica em uma amostra caso-controle de Caxias do Sul, RS.

## REFERÊNCIAS

BOOM RCJA, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

DA COSTA FERREIRA S, et al. The HLA-G 14-base pair deletion allele and the deletion/deletion genotype are associated with persistent HBe antigenemia in chronic hepatitis B infection. **Human immunology**, v. 78, n. 2, p. 166-171, 2017.

JIANG Y, et al. Association of HLA-G 3' UTR 14-bp insertion/deletion polymorphism with hepatocellular carcinoma susceptibility in a Chinese population. **DNA and cell biology**, v. 30, n. 12, p. 1027-1032, 2011.

LAARIBI AB, et al. Association of an HLA-G 14-bp Insertion/Deletion polymorphism with high HBV replication in chronic hepatitis. **Journal of viral hepatitis**, v. 22, n. 10, p. 835-841, 2015.

NIEDERAU C. Chronic hepatitis B in 2014: great therapeutic progress, large diagnostic deficit. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 33, p. 11595, 2014.

PEREIRA VRZB, et al. Risk factors for hepatitis B transmission in South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 544-550, 2017.

TEIXEIRA, A. C. et al. The 14bp-deletion allele in the HLA-G gene confers susceptibility to the development of hepatocellular carcinoma in the Brazilian population. **HLA**, v. 81, n. 6, p. 408-413, 2013

WANG L, ZOU ZQ, WANG K. Clinical relevance of HLA gene variants in HBV infection. **Journal of immunology research**, 2016.

WELZEL TM, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3325-3333, 2006.

WHO, World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection, 2015. Disponível em: [[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059_eng.pdf)]. Acessado em: junho de 2018.