

Associação do Alótipo Raro C4A6 do Sistema Complemento com a Doença Cardíaca Reumática^(*)

Association of the C4A6 Rare Allotype with Rheumatic Heart Disease

Iara Jose de Messias-Reason⁽¹⁾, Ednéia Cavalcanti⁽¹⁾ e Sebastião César Radominski⁽²⁾

RESUMO

Objetivo: determinar se os alótipos do Fator B (BF), C2 e C4 (C4A e C4B) do sistema complemento poderiam ser marcadores para a doença cardíaca reumática (DCR) na população brasileira. **Métodos:** foram estudados 49 pacientes com DCR crônica. Os controles incluíram 65 indivíduos saudáveis, não aparentados, pareados com a amostra dos pacientes de acordo com o sexo, idade e grupo racial. Os alótipos de BF, C2, C4A e C4B foram determinados por técnicas-padrão, incluindo Western blot para a determinação das variantes de C2 e C4, utilizando-se anticorpos monoclonais e policlonais. **Resultados:** este estudo demonstrou um significativo aumento do alelo raro C4A*6 ($p=0,003$ RR=11,85) e diminuição de C4A*3 nos pacientes, quando comparados com os controles. Além disso, alelos nulos de C4 e raros de C4 e BF foram observados com maior frequência nos pacientes. **Conclusões:** considerando-se que foram avaliados somente pacientes com DCR, mais estudos serão necessários para que se possa esclarecer se o alelo C4A6 pode ser um marcador da forma cardíaca ou da própria doença.

Palavras-chave: complemento, variabilidade alotípica, doença cardíaca reumática, febre reumática.

INTRODUÇÃO

Embora a prevalência e a gravidade da febre reumática (FR) tenham diminuído consideravelmente nas últimas décadas na América do Norte e Europa, esta doença continua a ocorrer em proporção epidêmica em muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Aproximadamente 30% dos pacientes com FR desenvolvem a forma cardíaca

ABSTRACT

Objective: to determine whether the allotypes of complement proteins Factor B (BF), C2, C4A and C4B could be markers of rheumatic heart disease (RHD) in the Brazilian population. **Methods:** forty-nine patients with chronic RHD were studied. The controls included 65 healthy individuals, matched with the patients according to sex, age and ethnical background. BF, C2, C4A and C4B allotypes were studied by standard techniques including Western blots for C2 and C4 variants with monoclonal and polyclonal antibodies. **Results:** this study showed a significantly elevated frequency of the rare C4A6 allotype ($p=0.03$ RR=11.85) and a decrease of C4A3 in the patients when compared to controls. In addition, C4 null and BF and C4 rare allotypes were more frequent in patients than in controls. **Conclusions:** considering that only RHD patients were included, further investigations are necessary in order to clarify whether C4A6 may be a marker of the cardiac form or of the disease itself.

Keywords: complement, allotypes, rheumatic heart disease, rheumatic fever.

(DCR), que constitui a mais importante e séria manifestação da doença. No Brasil, de acordo com dados oficiais do governo, em 1990 aproximadamente 40% das cirurgias cardíacas foram realizadas para corrigir seqüelas cardíacas causadas pela DCR, representando um grave problema de saúde neste país.

Embora haja evidências de que uma potencial causa da FR e da DCR seja uma resposta imune anormal a uma

* Disciplina de Reumatologia, Departamento de Clínica Médica, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. Este trabalho contou com o apoio do Fundo de Auxílio à Pesquisa e Ensino em Reumatologia da Sociedade Brasileira de Reumatologia. Recebido em 27/11/2003. Aprovado, após revisão, em 28/4/2004.

1. Laboratório de Imunopatologia, Departamento de Patologia Médica, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
2. Disciplina de Reumatologia, Departamento de Clínica Médica, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Endereço para correspondência: Iara de Messias Reason. Departamento de Patologia Médica/UFPR. Rua Padre Camargo, 280, CEP 80.069-900, Curitiba-PR, Brasil.
E-mail: iaramessias@yahoo.com.br

infecção estreptocócica, os mecanismos precisos envolvidos na sua patogênese ainda não são bem conhecidos⁽¹⁾. Vários estudos apontam a influência genética na susceptibilidade da FR e da DCR⁽¹⁻³⁾. Além da influência familiar⁽²⁻⁴⁾, associações significantes têm sido encontradas em diferentes populações, especialmente com antígenos da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)⁽⁵⁻⁷⁾. Vários estudos demonstram significativa associação entre diferentes alótipos do complemento e doenças autoimunes e infecciosas, tais como artrite reumatóide, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Chagas e hanseníase⁽⁸⁻¹²⁾. Os componentes do complemento C2, fator B (BF) e C4 estão entre as proteínas codificadas pela região da classe III do MHC. O C4 consiste em duas isoproteínas designadas como C4A e C4B, codificadas por dois *loci* interligados; BF e C2 são codificados por apenas um gene⁽¹³⁾. A proteína BF é essencial na ativação da via alternativa do complemento, enquanto que C2 e C4 constituem a principal enzima ativadora de C3 da via clássica. Conseqüentemente, estes componentes desempenham um importante papel na ativação do complemento e na geração das subseqüentes atividades biológicas mediadas por este sistema, tanto na resposta imunológica quanto nas reações inflamatórias. Neste estudo investigou-se se os alótipos de BF, C2 e C4 poderiam ser marcadores para a DCR na população brasileira.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram estudados 49 pacientes atendidos pela clínica de Reumatologia e Cardiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com doença valvar cardíaca reumática, apresentando história prévia de FR. O envolvimento cardíaco foi baseado em achados clínicos e laboratoriais, comprovados através de radiografia do tórax, eletrocardiografia, ecocardiografia, e, em alguns casos, cateterismo. Entre os 49 pacientes, 23 eram homens e 26 mulheres, com idade entre 13 e 50 anos (média de 24 anos). Desse total, 43 (88%) eram de origem caucasóide, 5 (10%) eram mulatos e 1 (2%) era negro. Como controles, foram analisados 65 indivíduos saudáveis não aparentados (28 mulheres e 37 homens), com idade entre 18 e 54 anos (média de 28,8 anos). O grupo controle foi pareado com os pacientes de acordo com a origem étnica, sendo 57 (88%) deles caucasóides, 6 (9%) mulatos e 2 (3%) negros. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR.

Soro – Foram coletados 10 ml de sangue venoso de cada indivíduo, após consentimento informado. Depois de coaguladas, as amostras foram centrifugadas a 4°C e o soro dividido em alíquotas e armazenado a -70°C, até serem utilizadas.

Alotipagem do complemento – A tipagem de BF foi realizada através de eletroforese de alta voltagem em gel de agarose (HVAGE) e imunofixação com anticorpo anti-BF humano (Atlantic Antibodies, Scarborough, ME, USA), de acordo com Geserick *et al.*⁽¹⁴⁾. A tipagem de C2 foi executada utilizando-se focalização isoelétrica, seguida por teste hemolítico funcional de acordo com Alper⁽¹⁵⁾ e por Western Blot como descrito por Uring Lambert *et al.*⁽¹⁶⁾. A tipagem de C4A e C4B foi determinada em plasma com EDTA, tratado com neuraminidase e carboxipeptidase B (Sigma, St Louis, MO, USA). Após eletroforese de alta voltagem (HVAGE), os alótipos de C4A e C4B foram determinados por imunofixação com anti-C4 humano (Atlantic Antibodies) e teste hemolítico⁽¹⁷⁾. Para a definição de alguns alelos, foram empregados eletroforese prolongada em gel e Western blot, usando anticorpos monoclonais específicos contra alelos de C4A e C4B^(17,18). A estimativa de alelos não expressos de C4A e C4B foi feita por avaliação semiquantitativa das placas de eletroforese e pelo método MASC (qui-quadrado mínimo)^(19, 20).

RESULTADOS

A distribuição dos alótipos de BF e de C2 entre os pacientes de DCR e o grupo controle não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figuras 1 e 2). O alótipo S07 foi observado em dois pacientes (4,4%) no fenótipo SS07, e em um indivíduo controle (1,5%) no fenótipo FS07. O outro alótipo incomum BFF1 foi observado em um indivíduo controle no fenótipo F1S. Além dos alótipos comuns C2C e C2B, nenhum outro alótipo de C2 foi observado nos pacientes e controles.

Com relação à distribuição dos alótipos de C4A e C4B, foram observadas duas duplicações no *locus* C4A, uma em um paciente e outra em um controle: C4A 3,12,1 e C4A 4,3,2 respectivamente (Figuras 3 e 4). Os alótipos raros C4B28 e B6 estavam presentes em dois diferentes pacientes, enquanto o B22 estava presente em um indivíduo controle. No *locus* C4A foi observada a diminuição de C4 A3 nos pacientes ($p=0,03$ RR=0,3), entretanto este número não foi significativo após correção para o número de alelos observados. Por outro lado, o alótipo raro C4 A6 esteve

significativamente aumentado nos pacientes (6/44; 13,6%) quando comparados aos controles (0/65; $p=0,003$ $RR=11,85$). Além disso, o alótipo raro C4A5 esteve presente em um indivíduo controle. As frequências de alelos de C4 não expressos (A*Q0 e B*Q0) foram mais elevadas entre os pacientes (AQ0=14/44; 31,8% e BQ0=13/44;

29,5%) quando comparadas com as dos controles (AQ0=14/65; 2,01% e BQ0=13/65; 20,0%), entretanto estes valores não foram estatisticamente significantes. Deficiência homozigótica para o *locus* C4A foi observada em um paciente e em um controle, enquanto que para o *locus* C4B foi observada em um paciente.

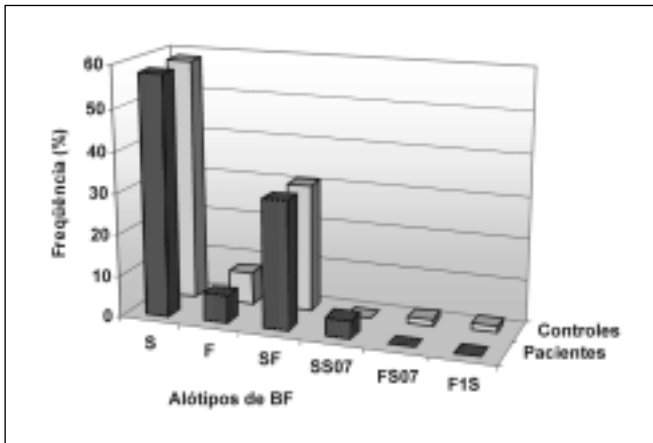


FIGURA 1 – Frequência dos alótipos de BF nos pacientes com DCR e nos controles normais. Todos os alótipos de BF não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

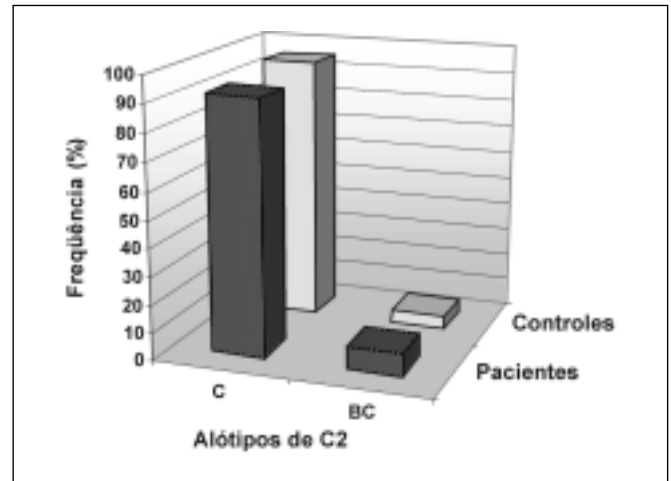


FIGURA 2 – Frequência dos alótipos de C2 nos pacientes com DCR e nos controles normais. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos alótipos de C2 entre pacientes e controles ($p>0,05$).

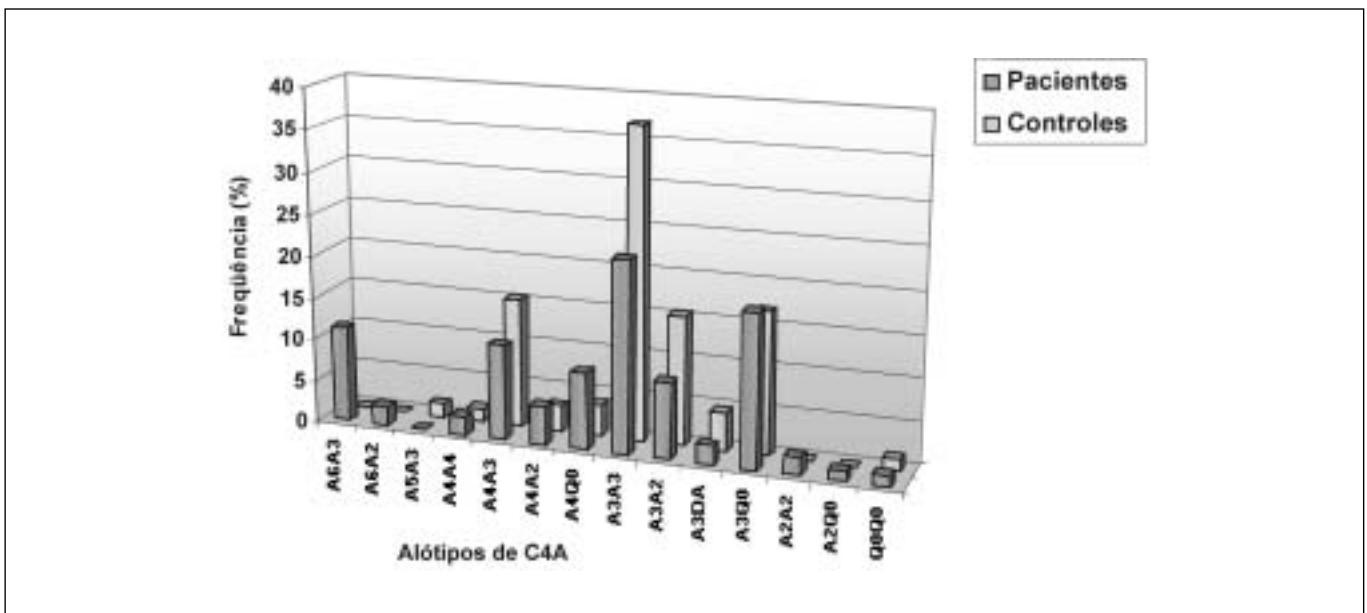


FIGURA 3 – Frequência dos alótipos de C4A nos pacientes com DCR e nos controles normais. DA=alelo duplicado; Q0=alelo nulo; * $p=0,003$; $RR=11,85$.

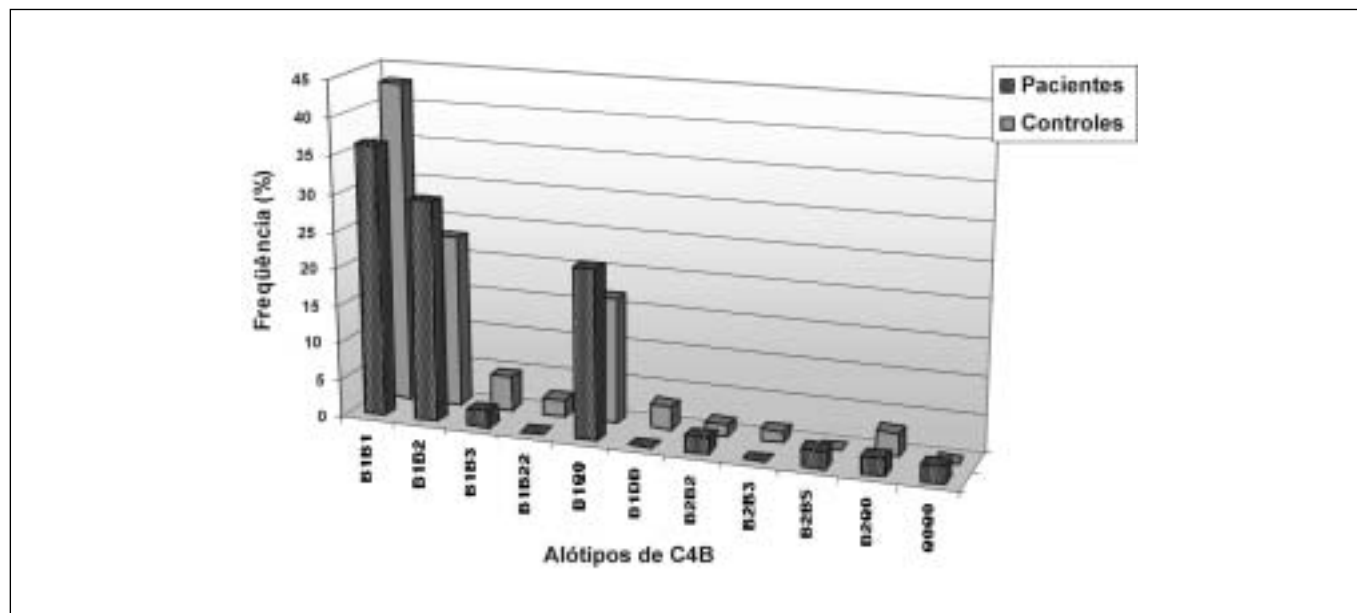


FIGURA 4 – Frequência dos alótipos de C4B nos pacientes com DCR e nos controles normais. DB=alelo duplicado; Q0=alelo nulo; p=ns para todos os alelos de C4B.

DISCUSSÃO

Acredita-se que a FR seja desencadeada por uma resposta imunológica anormal, contra antígenos do estreptococo do grupo A, em indivíduos geneticamente suscetíveis. O fato de somente um pequeno número de indivíduos expostos a estes microorganismos desenvolverem a FR ou a DCR aponta para a existência de mecanismos naturais de resistência à doença em indivíduos com resposta imunológica eficiente^(1,3). Paralelamente, a diversidade nas manifestações clínicas sugere o envolvimento de vários fatores na susceptibilidade da doença, tais como fatores genéticos, sociais e econômicos, além daqueles relacionados com a virulência do estreptococo.

Após achados de estudos epidemiológicos e imunológicos, sugerindo que a doença se manifeste em pessoas predispostas, vários investigadores têm procurado estabelecer uma associação entre distintos marcadores genéticos e a FR/DCR⁽²¹⁻²³⁾. Um dos achados mais interessantes foi o aumento significativo do antígeno D8/17 dos linfócitos B em pacientes com FR, o qual se mostrou fortemente associado à doença em diferentes populações⁽²¹⁻²⁴⁾.

Durante os últimos 30 anos, vários estudos têm analisado a associação dos antígenos do MHC com a FR. Estudos iniciais investigaram diferentes antígenos da classe I⁽²⁵⁻²⁷⁾. Entretanto, associações significativas foram demonstradas com os antígenos da Classe II em grupos raciais distintos^(5,6).

Os significantes achados relacionados com os antígenos DR têm sugerido que outros genes de susceptibilidade, situados próximos desta região do MHC, poderiam estar envolvidos na resposta imune anormal contra os antígenos estreptocócicos. Em razão da proximidade dos genes da classe III do complemento a esta região do MHC e a significativa associação de diferentes alótipos do complemento com doenças auto-imunes descrita na literatura, a variabilidade alotípica destes componentes foi determinada num grupo de pacientes com DCR e controles.

No presente estudo, foi observada uma associação estatisticamente significativa do alelo raro C4A*6 com a DCR. Além disso, a presença de alelos nulos de C4 e outros alelos raros de BF e C4 foi mais frequentemente observada nos pacientes do que no grupo controle. Embora a presença de C4A*6 não tenha ocorrido na maioria dos pacientes investigados, sua frequência foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle ($p=0,003$ RR=11,85) e com a população sul brasileira⁽²⁸⁾ (13,63% vs 3,48%). É possível que o alótipo C4A*6 seja relevante para um subgrupo de pacientes com DCR. Além disso, a maior frequência de outros alótipos raros de C4 e de BF nos pacientes pode sugerir um papel imunogenético dos alótipos raros do complemento na DCR.

O sistema complemento é um dos primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro e ocupa um importante papel tanto

na opsonização quanto na lise de membranas celulares de patógenos, além de atuar como um sistema efetor de anticorpos. Recentemente, Saeland *et al.*⁽²⁹⁾ demonstraram que o complemento tem um papel central na proteção mediada por anticorpos contra a infecção pelo *Streptococcus pneumoniae* “*in vivo*”. *Streptococcus* reumatogênicos apresentam mecanismos de evasão à atividade lítica do complemento, através da aquisição de moléculas regulatórias do hospedeiro como fator H e proteína ligante de C4b⁽³⁰⁾. Além disso, diferentes cepas secretam proteínas/enzimas que, além de inibir a ativação do complemento, inibem a quimiotaxia e ativação fagocitária induzida por produtos de ativação do complemento, como C5a e C3a⁽³⁰⁾. As proteínas BF, C2 e C4 ocupam um papel essencial nas primeiras etapas da ativação do complemento e na subsequente opsonização, transporte e solubilização de complexos imunes⁽⁸⁾. Sabe-se que diferentes alótipos de BF, C2 e C4 apresentam diferenças em suas atividades funcionais ou em seus níveis plasmáticos.

A associação de doenças com alelos silenciosos e raros dessas proteínas sugere possível diferença funcional entre os alótipos na ação do complemento contra agentes infecciosos e nas reações imunes^(10,31). Um aumento do alelo

C4A*6 foi observado entre pacientes com hanseníase virchiowiana na Tailândia⁽³²⁾. Há evidências de que C4A*6 não se liga eficientemente à C3b para formar a C5 convertase da via clássica⁽³³⁾, impedindo a ativação desta via.

Observou-se que complexos imunes circulantes estão presentes na maioria dos pacientes com FR aguda⁽³⁴⁾, podendo-se sugerir que fragmentos de C4 de alótipos A6 estariam envolvidos na ineficiente solubilização e opsonização de complexos imunes estreptocócicos, sendo um fator a mais de predisposição para as seqüelas cardíacas imunopatológicas da DCR. Enquanto a participação de antígenos das classes I e II do MHC na interação celular da resposta imunológica na FR é um conceito já estabelecido, alótipos de complemento poderiam exercer uma função regulatória em diferentes estágios da doença, desde o reconhecimento dos antígenos estreptocócicos até a efetiva eliminação pelo sistema efetor humoral específico. Considerando-se que neste estudo foram incluídos somente pacientes com DCR, outros estudos envolvendo pacientes com FR sem cardite, com o objetivo de esclarecer se C4A6 é um marcador para a forma cardíaca ou para a doença em si.

REFERÊNCIAS

1. Senitzer D, Freimer EH: Autoimmune mechanisms in the pathogenesis of Rheumatic fever. *Rev Infect Dis* 6: 832-9, 1984.
2. Cheadle WR: Harveian lectures on the various manifestations of the rheumatic state as exemplified in childhood and early life. *Lancet* 371: 821-7, 1889.
3. Ayoub EM: The search for host determinants of susceptibility to rheumatic fever: the missing link. *Circulation* 69: 197-201, 1984.
4. Paul JR: The rheumatic family. In: The epidemiology of rheumatic fever. New York, American Heart Association, chapter 14: 125-30, 1957.
5. Ayoub EM, Barret DJ, Maclaren NK, Krischer JP: Association of class II human histocompatibility leukocyte antigens with rheumatic fever. *J Clin Invest* 77: 2019-26, 1986.
6. Visentainer JE, Pereira FC, Dalalio MM, Tsuneto LT, Donadio PR, Moliterno RA: Association of HLA-DR7 with rheumatic fever in the Brazilian population. *J Rheumatol* 27: 1518-20, 2000.
7. Olmez U, Turgay M, Ozenirler S, et al: Association of HLA class I and class II antigens with rheumatic fever in a turkish population. *Scand J Rheumatol* 22:49-52, 1992.
8. Puttick AH, Briggs DC, Welsh KI, et al: Genes associated with rheumatoid arthritis and mild inflammatory arthritis. I Major Histocompatibility complex class I, II and III allotypes. *Ann Rheum Dis* 49: 219-24, 1990.
9. Schroder R, Zander H, Andreas A, Mauff G: Multiple sclerosis: immunogenetic analysis of sibpair double case families II. Studies on the association of the multiple sclerosis with C2, C4, BF, C3, C6 and Gm polymorphism. *Immunobiology* 164: 160- 70, 1983.
10. Messias IJT, Santamaria J, Brenden M, Reis A, Mauff G: Association of C4B deficiency (C4B*Q0) with erythema nodosum in leprosy. *Clin Exp Immunol* 92: 284-7, 1993.
11. Fielder AHL, Walport MJ, Batchelor JR, et al: Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Br Med J* 286: 425-8, 1983.
12. Messias-Reason IJ, Urbanetz L, Pereira da Cunha C: Complement C3F and BF S allotypes are risk factors for Chagas Disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 62:1-5, 2003.
13. Colten HR, Garnier G: Regulation of Complement protein Gene Expression. In: The human complement system in health and disease, eds. Volanakis JE, Frank MM, New York 217-240, 1998.
14. Geserick G, Abbal M, MauffG, Siemens I: Factor B (BF) nomenclature statement. *Complement Inflamm* 7: 255-260, 1990.
15. Alper CA: Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and BF. *J Exp Med* 144: 1111-4, 1976.
16. Uring-Lambert B, Gas S, Goetz J, et al: Detection of the genetic polymorphism of human C2 (native proteinand C2a fragment) by immunoblotting after polyacrylamide gel isoelectric focusing. *Complement* 2: 185-92, 1985.
17. Mauff G, Alper CA, Dawkins R, et al: C4 nomenclature statement (1990). *Complement Inflamm* 7: 261-8, 1990.
18. Doxiadis G, Grosse-Wilde H: Allotyping by prolonged gel electrophoresis and immunoblotting using monoclonal and polyclonal antibodies. *Complement Inflamm* 7: 269-76, 1990.
19. Mauff G: Application of the MHC-class III complement markers to populations genetics. In Ohayon E, Cambon-Thomsem A (Ed). *Human Population Genetics*. Paris, Les Editions INSERM, 143-66, 1986.

20. Clegert-Darpoux F, Babron MC, Prum B, Lathrop GM, Deschamps I, Hors J: A new method to test genetic models in HLA associated diseases: The MASC method. *Ann Hum Gen* 52: 247-58, 1988.
21. Patarroyo ME, Winshester RJ, Vejerano A, et al: Association of a B-cell alloantigen with susceptibility to rheumatic fever. *Nature* 278: 173-4, 1979.
22. Khanna AK, Buskirk DR, Williams RC Jr, et al: Presence of a non-HLA B cell antigen in Rheumatic Fever Patients and their families as defined by a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 83: 1710-6, 1989.
23. Anastasiou-Nana M, Anderson JL, Carlquist JF, Nanas JN: HLA-DR typing and lymphocyte subset evaluation in rheumatic heart disease: A search for immune response factors. *Am Heart J* 112: 992-7, 1986.
24. Harel L, Zeharia A, Kodman Y, Straussberg R, Zabriskie JB, Amir J: Presence of the d8/17 B-cell marker in children with rheumatic fever in Israel. *Clin Genet* 61: 293-8, 2002.
25. Caughey DE, Douglas R, Wilson W, Hassal IB: HLA antigens in Europeans and Maoris with rheumatic fever and rheumatic heart disease. *J Rheumatol* 2: 319-22, 1975.
26. Gorodezky C, Ulloa-LS, Escobar-Gutierrez A: Hla antigens and rheumatic heart disease in Mexico (abstract). *J Rheumatol* 4 (Suppl 3): 112, 1977.
27. Leirisalo M, Laitinen O, Tiilikainen A: HLA phenotypes in patients with rheumatic fever, rheumatic heart disease and Yersinia arthritis. *J Rheumatol* 4 (Suppl 3): 78-83, 1977.
28. Messias IJT, Reis A, Almeida PT, Mauff G: Genetic variability of the MHC Class III Complement proteins C2, BF, C4A and C4B in Southern Brazil. *Exp Clin Immunogenet* 11: 192-6, 1994.
29. Saeland E, Vidarsson G, Leusen JH, et al: Central role of complement in passive protection by human IgG1 and IgG2 anti-pneumococcal antibodies in mice. *J Immunol* 170: 6158-64, 2003.
30. Jarva H, Jokiranta TS, Wurzner R, Meri S: Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol Immunol* 40 (2-4): 95-107, 2003.
31. Alper CA, Rosen FS: Inherited deficiencies of complement proteins in man. *Springer Semin Immunopathol* 7: 251-61, 1984.
32. Greiner J, Weber FJ, Mauff G, Bauer MP: Genetic polymorphism of properdin factor B (Bf), the second component (C2), and the fourth component (C4) of component in leprosy patients and healthy controls from Thailand. *Immunobiology* 158:134-8, 1980.
33. Dodds AW, Law SK, Porter RR: The origin of the very variable haemolytic activities of the common human complement component C4 allotypes, including C4A6. *EMBO J* 4:2239-44, 1985.
34. Yoshinoya S, Pope RM: Detection of immune-complexes in acute rheumatic fever and their relationship to HLA B5. *J Clin Invest* 65:136-45, 1980.