

Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde

Vânia Lourenço Gomes

Interação entre os Serotipos HLA - A23/HLA-A24 e a Demência em Idosos: Associação com o Aumento das Moléculas Solúveis de HLA Classe I no Plasma

out | 2023

GUARDA
POLI
TÉCNICO



POLI TÉCNICO GUARDA

Escola Superior de Saúde

INTERAÇÃO ENTRE OS SEROTIPOS HLA-A23/HLA-A24 E A DEMÊNCIA EM IDOSOS: ASSOCIAÇÃO COM O AUMENTO DAS MOLÉCULAS SOLÚVEIS DE HLA CLASSE I NO PLASMA

PROJETO DE INVESTIGAÇÃO
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
ESPECIALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Vânia Lourenço Gomes
Outubro / 2023

Escola Superior de Saúde

**INTERAÇÃO ENTRE OS SEROTIPOS HLA-A23/HLA-A24 E A
DEMÊNCIA EM IDOSOS: ASSOCIAÇÃO COM O AUMENTO
DAS MOLÉCULAS SOLÚVEIS DE HLA CLASSE I NO PLASMA**

PROJETO DE INVESTIGAÇÃO
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
ESPECIALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Professora Orientadora: Professora Doutora Elsa M. Cardoso

Professor Coorientador: Professor Doutor Fernando A. Arosa

Vânia Lourenço Gomes

Outubro / 2023

Este trabalho foi realizado com o apoio e colaboração do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, e da empresa de biotecnologia *HLA Protein*.



COMUNICAÇÕES

Congressos

- Vânia Lourenço-Gomes, André J. Esgalhado, Débora Reste-Ferreira, Adriana Sousa, Ana Paula Amaral, António Martinho, Jorge M. R. Gama, Ignacio Verde, Olga Lourenço, Ana M. Fonseca, Fernando A. Arosa, Elsa M. Cardoso. Soluble HLA Class I molecules in the plasma of elderly volunteers from the ebicohort. Poster apresentado no XVII International CICS-UBI Symposium, realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde, da Universidade da Beira Interior, de 20 a 21 de julho de 2022, Covilhã.
- Vânia Lourenço-Gomes, Elsa M. Cardoso, André J. Esgalhado, Débora Reste-Ferreira, Nádía Oliveira, Ana Saraiva Amaral, António Martinho, Jorge M. R. Gama, Ignacio Verde, Olga Lourenço, Ana M. Fonseca, Rico Buchli, Fernando A. Arosa. Interação entre os serotipos HLA-A23/HLA-A24 e a demência em idosos: associação com o aumento das moléculas solúveis de HLA classe I no plasma. VII Jornadas de Educação e Investigação em Saúde, 2 de março de 2023, Guarda.

Artigo de Revista

- Cardoso, E. M., Lourenço-Gomes, V., Esgalhado, A. J., Reste-Ferreira, D., Oliveira, N., Amaral, A. S., Martinho, A., Gama, J. M. R., Verde, I., Lourenço, O., Fonseca, A. M., Buchli, R., & Arosa, F. A. (2023). HLA-A23/HLA-A24 serotypes and dementia interaction in the elderly: Association with increased soluble HLA class I molecules in plasma. *HLA* Jul 3, doi: 10.1111/tan.15149. Epub ahead of print.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, à minha orientadora, a Professora Doutora Elsa Cardoso, pela sua orientação neste trabalho, mas acima de tudo pela sua inteira disponibilidade para me ajudar nesta jornada. A sua partilha de muitos e bons conhecimentos fez de mim uma profissional, estudante e pessoa melhor.

Em segundo lugar ao meu coorientador, Professor Doutor Fernando Arosa, dotado de conhecimentos de grande valor e com uma experiência fundamental ao longo deste trabalho.

Agradeço ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, por me permitir a realização da parte experimental deste projeto e a todos os profissionais que dele fazem parte.

À empresa HLA *Protein*, especializada em biotecnologia e no desenvolvimento e comercialização de tecnologias relacionadas ao sistema de antígeno leucocitário humano, pela incrível ajuda na obtenção de todos os materiais necessários para realização do projeto prático.

À minha família, particularmente à minha mãe, por estar sempre comigo e tantas vezes ter compreendido as minhas ausências, à minha irmã Mónica e ao Roberto, pela preocupação, força e acompanhamento incondicional.

Ao Alexandre, pelo marido incrível que é, pela força, pelas vezes que acreditou em mim mesmo nos momentos menos bons, pela sua compreensão em todos os momentos que deixei de estar presente, e acima de tudo pelo amor que me demonstrou.

À minha estrela brilhante, o meu pai, mesmo num lugar longínquo sei que me acompanhou, guiando-me como sempre fez ao longo da sua vida.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, pelas vezes que me ouviam e partilhavam os seus conhecimentos comigo, em especial à colega e amiga Dr^a Joana Marta Martins.

Aos meus amigos, que se preocuparam e que me acompanharam neste percurso, em especial à minha Rita Loureiro, companheira de muitas aventuras ao longo da vida e esta não foi exceção.

A todos os que de alguma forma me permitiram a realização deste trabalho manifesto o meu sincero agradecimento.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, o meu exemplo de dedicação, trabalho, força e luta pelos sonhos.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE-R	<i>Addenbrooke's Cognitive Examination</i> (Exame cognitivo de <i>Addenbrook</i>)
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Célula apresentadora de antígeno)
AR	Artrite reumatóide
β_2m	β_2 microglobulina
CI	<i>Cognitive impairment</i> (comprometimento cognitivo)
CMV	Citomagalovírus
D	Demência
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
EC ₅₀	Metade da concentração máxima efetiva
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetracético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
EM	Esclerose múltipla
EPM	Erro padrão da média
GDS	<i>Global Deterioration Scale</i> (Escala de deterioração global)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
LE	Lúpus eritematoso
Máx	Máximo
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i> (Declínio cognitivo leve)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo major de histocompatibilidade)
Mín	Mínimo
NCI	<i>No cognitive impairment</i> (Sem comprometimento cognitivo)
ND	Não disponível
NK	Células <i>natural killer</i> (Célula assassina natural)

NpD	Normal ou pré-demência
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
rpm	Rotações por minuto
sHLA-I	<i>Soluble Human leukocyte antigen class I</i> (Antigénio leucocitário da classe I humano solúvel)
TCR	<i>T-cell receptor</i> (Recetor da célula T)
UA	Uveíte anterior

RESUMO

Introdução: o complexo major de histocompatibilidade é considerado o conjunto de genes mais polimórfico entre os mamíferos. Nos humanos este conjunto denomina-se antígenios leucocitários humanos. Os genes deste complexo fazem parte do supra-*locus* no cromossomo 6p21 conhecido como sistema de antígenios leucocitários humanos, dividindo-se em três regiões distintas: classes I, II e III. Neste trabalho, a nossa atenção recai sobre as moléculas solúveis HLA-I. As moléculas sHLA-I podem ser libertadas da superfície celular e encontradas no plasma humano associadas à β_2m (conformação fechada) ou numa forma livre de β_2m (conformação aberta). O seu potencial como biomarcadores tem aberto novas portas e demonstrado elevado interesse nomeadamente em doenças neurodegenerativas, causadoras de declínio cognitivo e até mesmo incapacitantes a este nível. Apesar destes avanços e de demonstrada a sua relação com o envelhecimento não existem estudos dos níveis plasmáticos das moléculas sHLA-I e sua relação com o estado cognitivo ou demência em idosos.

Objetivos: quantificar os níveis sHLA-I no plasma de idosos com diferentes graus de défice cognitivo e estudar a interação dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e o estado cognitivo com os níveis de sHLA-I.

Métodos: numa amostra de 56 indivíduos, divididos de acordo com o comprometimento cognitivo apresentado, foram quantificados os níveis de sHLA-I, através do método ELISA *sandwich*. Os resultados obtidos foram comparados entre os diferentes grupos e avaliada a interação do fator demência com serotipos HLA-A23 ou HLA-A24, considerando estatisticamente significativo, valores de $p < 0.05$.

Resultados: Os níveis de sHLA-I foram mais elevados no grupo dos idosos com demência ($p=0.028$), ou com os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 ($p < 0.001$) em comparação com os que não tinham estes serotipos, enquanto os fatores idade ou sexo revelaram não ter influência estatisticamente significativa. No grupo dos idosos com demência, a percentagem com os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24, foi cerca do dobro (39,2%) daquela observada no grupo normal ou com pré-demência (17,8%), embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Avaliando os dados, através de um modelo

multivariável, percebeu-se que os níveis elevados de sHLA-I estavam associados a uma interação entre os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a demência ($p=0.003$).

Discussão: no que ao fator idade diz respeito, os resultados revelaram-se contrários ao expectável, não encontrando relação entre a idade e níveis elevados de sHLA-I. Relativamente aos níveis de sHLA-I, sugere-se que, por um lado, a secreção de sHLA-I pode refletir uma resposta imune que é prejudicial para a função cognitiva, ou, por outro lado, refletir uma resposta imunomoduladora desencadeada numa tentativa de neutralizar o processo neurodegenerativo em curso, tendo em conta o serotipo do indivíduo.

Conclusão: a interação entre os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e demência revelou-se interessante, deixando aberta uma nova porta para futuras investigações.

Palavras-chave: estado cognitivo, demência, HLA classe I solúvel, serotipos HLA-A23 ou HLA-A24

ABSTRACT

Introduction: the major histocompatibility complex is considered the most polymorphic set of genes among mammals. In humans, this set is called human leukocyte antigens. The genes of this complex are part of the *supra-locus* on chromosome 6p21, known as the human leukocyte antigen system, divided into three distinct regions: classes I, II, and III. In this work, our attention falls on the soluble HLA-I molecules. sHLA-I molecules can be released from the cell surface and found in human plasma associated with β_2m (closed conformation) or in a free form of β_2m (open conformation). Their potential as biomarkers has opened new doors and shown great interest, essentially in neurodegenerative diseases, which cause cognitive decline and are even disabling at this level. Despite these advances and the demonstrated relationship with aging, there are no studies on plasma levels of sHLA-I molecules and their relationship with cognitive status or dementia in the elderly.

Objectives: to quantify sHLA-I levels in the plasma of elderly people with different degrees of cognitive impairment and to study the interaction of HLA-A23 or HLA-A24 serotypes and cognitive status with sHLA-I levels.

Methods: in a sample of 56 individuals, divided according to the cognitive impairment presented, the levels of sHLA-I were quantified using the ELISA Sandwich method. The results obtained were compared between the different groups and the interaction of the dementia factor with HLA-A23 or HLA-A24 serotypes was evaluated, considering statistically significant p values <0.05 .

Results: the levels of sHLA-I were higher in the group of elderly with dementia ($p=0.028$), or with HLA-A23 or HLA-A24 serotypes ($p<0.001$) compared to those who did not have these serotypes, while factors of age or sex revealed no statistically significant influence. In the group of elderly people with dementia, the percentage with HLA-A23 or HLA-A24 serotypes was about double (39.2%) that was observed in the normal or pre-dementia group (17.8%), although this difference was not statistically significant. Evaluating the data using a multivariate model, it was found that high levels of sHLA-I were associated with an interaction between HLA-A23 or HLA-A24 serotypes and dementia ($p=0.003$).

Discussion: concerning the age factor, the results were contrary to expectations, not finding a relationship between age and high levels of sHLA-I. Regarding sHLA-I levels, it is suggested that, on the one hand, sHLA-I secretion may reflect an immune response that is detrimental to cognitive function, or, on the other hand, reflect an immunomodulatory response triggered in an attempt to counteract the ongoing neurodegenerative process, taking into account the individual's serotype.

Conclusion: the interaction between HLA-A23 or HLA-A24 serotypes and dementia proved to be interesting, opening a new door for future investigations.

Keywords: cognitive status, dementia, soluble HLA class I, HLA-A23 or HLA-A24 serotypes

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa genético da região HLA, sua representação no cromossoma 6 e as classes em que se divide (I, II, III).	20
Figura 2. Comparação das estruturas das moléculas HLA classe I e classe II.....	21
Figura 3. Ilustração dos estados conformacionais das moléculas HLA-I.....	22
Figura 4. Representação das três formas de moléculas HLA-I solúveis, origem e suas características.....	23
Figura 5. Interação entre o HLA-I e o TCR.	23
Figura 6. Processo de desenvolvimento de demência.....	25
Figura 7. Representação do método utilizado. Diferentes passos ocorridos na realização da técnica de ELISA para quantificação de sHLA-I.....	36
Figura 8. Representação esquemática da aplicação das diluições do padrão na placa de ELISA.	38
Figura 9. Representação das diluições seriadas das amostras na placa de mistura.....	39
Figura 10. Resumo do protocolo utilizado para quantificação das moléculas sHLA-I pelo método de ELISA.....	41
Figura 11. Estratégia para determinação da concentração sHLA-I no plasma.	46
Figura 12. Relação entre as concentrações de sHLA-I e a idade.....	48
Figura 13. Relação da concentração de sHLA-I e o sexo dos voluntários.	49
Figura 14. Relação da concentração de sHLA-I e os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24....	49
Figura 15. Relação da concentração de sHLA-I com o estado cognitivo.....	50
Figura 16. Definição dos subgrupos e o peso das variáveis.....	52
Figura 17. Relação da concentração de sHLA-I e a demência.....	54
Figura 18. Representação da interação entre os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a demência, na concentração de sHLA-I.	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Moléculas HLA de classe I clássicas solúveis no plasma ou soro no envelhecimento ou em doenças selecionadas.....	30
Tabela 2. Caracterização dos voluntários da amostra.	47
Tabela 3. Caracterização dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e dos níveis de sHLA-I na amostra em estudo após reclassificação dos grupos da amostra.....	53
Tabela 4. Valores de p obtidos usando o teste de ANCOVA bidirecional para os efeitos principais e interação nos níveis de sHLA-I.	54
Tabela 5. Comparação níveis de sHLA-I nos diferentes grupos, classificados de acordo com a presença dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a presença de demência.....	55

Índice

COMUNICAÇÕES	IV
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Breve introdução às moléculas HLA.....	19
1.2 Moléculas HLA classe I	21
1.3 Breve contextualização da demência.....	24
1.4 Influência das moléculas HLA-I em diferentes patologias	25
1.4.1 Doenças neurodegenerativas.....	25
1.4.2 Doenças infecciosas	27
1.4.3 Medicina transfusional.....	27
1.4.4 Outras doenças inflamatórias e cancro.....	28
1.5 Moléculas de HLA-I e o envelhecimento.....	29
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Obtenção de amostras	34
3.2 Quantificação das moléculas sHLA-I	35
3.2.1 Revestimento	37
3.2.2 Bloqueio	38
3.2.3 Preparação do padrão	38
3.2.4 Preparação das amostras	39
3.2.5 Incubação com anticorpo de deteção.....	40
3.2.6 Preparação do complexo avidina/peroxidase biotilada e incubação na placa.....	40
3.2.7 Reação do substrato, desenvolvimento de cor e paragem da reação.....	40
3.2.8 Leitura de resultados e análise de dados.....	41
3.3 Análise estatística.....	42
4. RESULTADOS	44
4.1 Estratégia para quantificação moléculas sHLA-I	45
4.2 Caracterização demográfica, bioquímica e genética da amostra em estudo	46

4.3	Níveis elevados de sHLA-I não estão associados à idade ou sexo, mas sim à presença dos sorotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e tendencialmente ao comprometimento cognitivo	48
4.3.1	Os níveis de sHLA-I não correlacionam com a idade	48
4.3.2	Os níveis de sHLA-I não estão associados com o sexo	48
4.3.3	Os níveis de sHLA-I estão aumentados nos idosos com sorotipos HLA-A23 ou HLA-A24	49
4.3.4	Os níveis de sHLA-I estão tendencialmente aumentados nos idosos com comprometimento cognitivo	50
4.4	Reclassificação dos grupos na nossa amostra.....	50
4.5	Interação entre os sorotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a demência nos níveis de sHLA-I	54
5.	DISCUSSÃO	57
6.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	62
7.	CONCLUSÃO	64
8.	BIBLIOGRAFIA	66
9.	ANEXOS	77
	Anexo 1	78

1. INTRODUÇÃO

Nesta introdução são abordados em primeiro lugar alguns aspetos importantes sobre antígeno leucocitário humano (HLA), dando enfoque às moléculas de HLA classe I. Segue-se uma breve contextualização da demência e por fim uma revisão de estudos onde se investigou o papel das moléculas HLA-I em diversas patologias.

1.1 BREVE INTRODUÇÃO ÀS MOLÉCULAS HLA

O complexo major de histocompatibilidade (MHC) é considerado um conjunto de genes altamente polimórfico entre os mamíferos (Radwan et al., 2020). Nos humanos, estes genes denominam-se antígenos leucocitários humanos (HLA) e possuem um grande número de *loci*, que codificam genes funcionais. O sistema HLA foi descrito em 1958, por Jean Dausset que veio a ganhar o prémio Nobel de Medicina ou Fisiologia por esta mesma descrição em 1980 (Goldberg & Rizzo, 2015). As moléculas de MHC foram primeiramente descritas como antígenos de transplantação, por estarem envolvidos na rejeição de tecidos e associadas a complicações relacionadas com a transfusão. Posteriormente, entendeu-se que esta região do genoma é uma das mais variáveis, e, portanto, uma das mais complexas do genoma humano, sendo estudada a sua relação com inúmeras patologias (Gensterblum-Miller et al., 2018) (Trowsdale & Knight, 2013).

Desde aproximadamente o ano de 2010, a evolução da tecnologia usada a nível laboratorial e a revolução da sequenciação de nova geração têm contribuído, embora a um ritmo considerado lento, para uma melhor compreensão da diversidade ao nível genético do MHC nas populações, bem como da variação da região não codificante dos *loci* HLA (Kulski et al., 2019).

A nível genético sabe-se que os genes do MHC fazem parte do supra-*loci* no cromossoma 6p21 conhecido então, como sistema de antígenos leucocitários humanos (Figura 1). As moléculas aqui codificadas estão envolvidas em vários e importantes processos, como a apresentação de antígenos, resposta imune inata e adaptativa, e também na regulação de processos inflamatórios. Este complexo conta com mais de 200 genes anotados e

pseudogenes, dividindo-se em três regiões distintas: classes I, II e III, que diferem na sua estrutura (Figura 2) (Shiina et al., 2004).

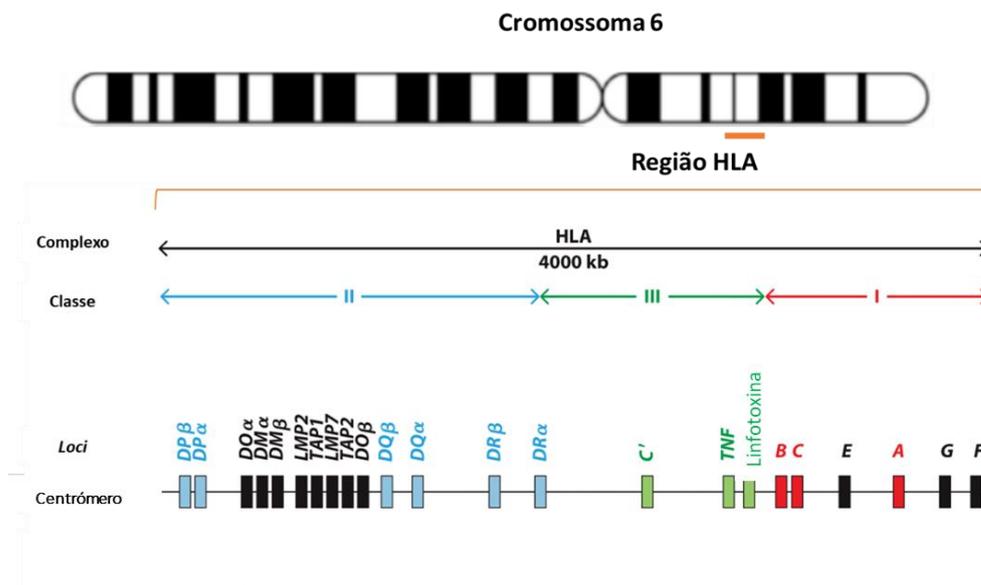


Figura 1. Mapa genético da região HLA, sua representação no cromossoma 6 e as classes em que se divide (I, II, III) (adaptado de Mossad, 2015).

Ao passo que as moléculas de MHC classe I apresentam antígenos às células T que expressam a glicoproteína de superfície CD8, as moléculas de MHC de classe II apresentam antígenos às células T que expressam a glicoproteína de superfície celular CD4 (Pickle et al., 1993). As moléculas de HLA classe I, ligam-se a peptídeos no retículo endoplasmático, enquanto que as moléculas de HLA classe II ligam-se a peptídeos de antígenos extracelulares em endossomas (Danchin et al., 2004). A região de classe III, contém genes não imunes, e ainda genes que codificam mediadores de imunidade inata, como por exemplo o fator de necrose tumoral (Trowsdale & Knight, 2013).

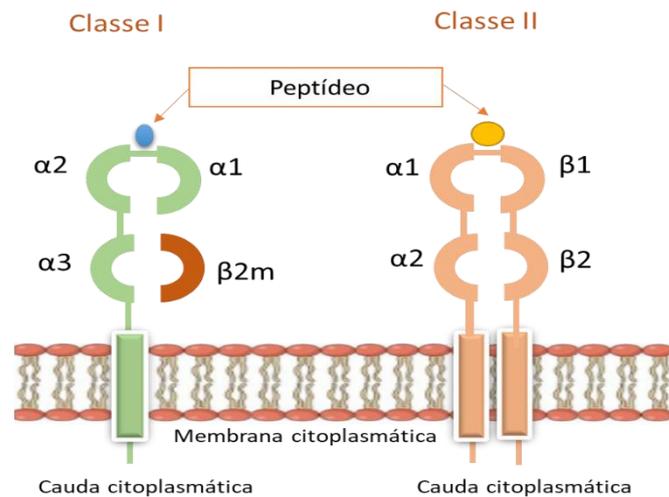


Figura 2. Comparação das estruturas das moléculas HLA classe I e classe II (Adaptado de Arosa et al., 2021).

1.2 MOLÉCULAS HLA CLASSE I

As moléculas HLA classe I estão expressas na superfície de todas as células nucleadas e podem ser amplamente subdivididas em duas classes, as clássicas, que incluem HLA-A, HLA-B e HLA-C, e as não clássicas, contendo as moléculas HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H. Estas últimas são menos polimórficas quando comparadas com as clássicas (Wyatt et al., 2019).

Estudos de biologia molecular permitiram revelar a estrutura das moléculas HLA classe I. Estas são heterodímeros com uma estrutura trimérica, constituída por uma cadeia pesada, que atravessa a bicamada da membrana, ligada de forma não covalente, a uma cadeia leve, designada β_2 -microglobulina e um peptídeo com cerca de 8 a 12 aminoácidos (Bjorkman & Parham, 1990). A parte extracelular está organizada em 3 domínios, α_1 , α_2 e α_3 , sendo este último conservado e os dois primeiros altamente polimórficos (Figura 3). Devido à variabilidade dos aminoácidos nas regiões α_1 e α_2 , diferentes moléculas de HLA-I ligam diferentes peptídeos (Hewitt, 2003). As moléculas HLA-I podem apresentar duas conformações principais diferentes, a conformação fechada, que está ligada à β_2m e o peptídeo, e a conformação aberta, onde ocorre a perda destes últimos componentes (Arosa et al., 2021).

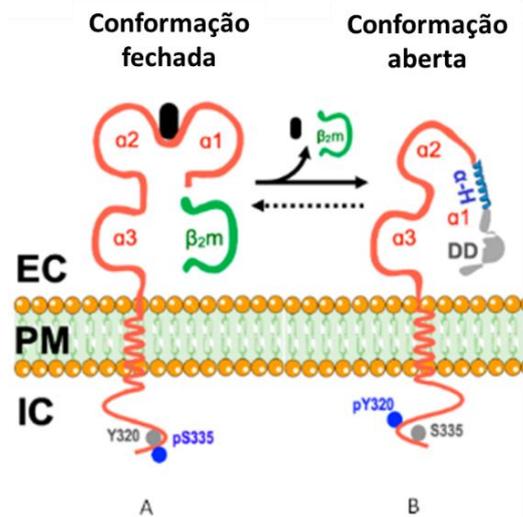


Figura 3. Ilustração dos estados conformacionais das moléculas HLA-I. A) conformação fechada: representação dos três domínios associados a uma cadeia leve β_2m e um peptídeo. B) conformação aberta: dissociação da fração β_2m e do peptídeo. EC, meio extracelular; IC, meio intracelular; PM, membrana plasmática (Adaptado de Arosa et al., 2021).

Para além da forma membranar, as moléculas HLA classe I podem também existir em formas solúveis (sHLA-I). Estas por sua vez podem ser de três tipos distintos: uma forma pesada, que contém o domínio membranar e é libertada através de vesículas ou exossomas secretados pela célula; uma forma produzida por *splicing* alternativo, que resulta na ausência do domínio transmembranar; e uma forma gerada por digestão enzimática (Figura 4) (Arosa et al., 2021) (Kessler et al., 2020).

As moléculas de HLA-I funcionam como recetores de peptídeos apresentando-os ao recetor das células T (TCR) dos linfócitos T CD8 (Figura 5) (Arosa et al., 2007). Estruturalmente o TCR, é um heterodímero composto por uma cadeia α e uma cadeia β , com tamanhos semelhantes. Cada uma destas cadeias possui também uma região constante e uma variável. Esta última região é que determina a especificidade para os antígenos apresentados, sendo que cada linfócito T possui um TCR de uma única especificidade. Para ativação dos linfócitos T, ainda é necessário a interação de

moléculas acessórias coestimuladoras, como é exemplo o recetor CD28 nas células T que interage com os recetores CD80 e CD86 expressos pela célula apresentadora de antígeno (Mariuzza et al., 2019).

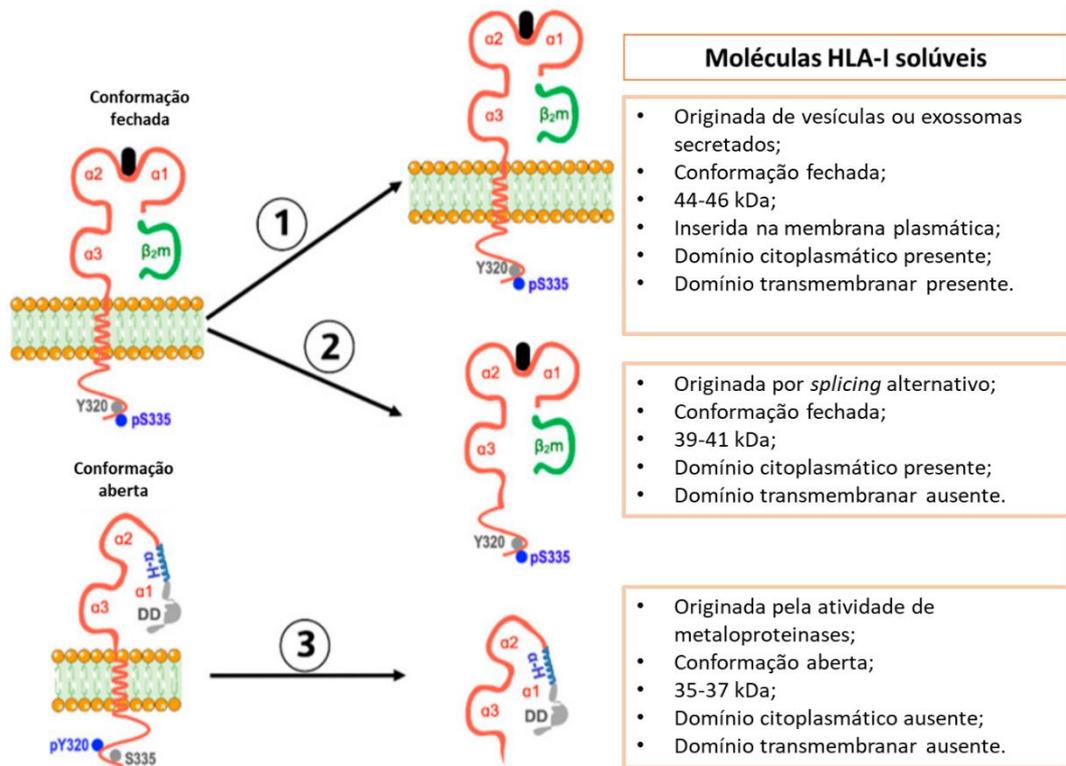


Figura 4. Representação das três formas de moléculas HLA-I solúveis, origem e suas características, sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel. (Adaptado de Arosa et al., 2021).

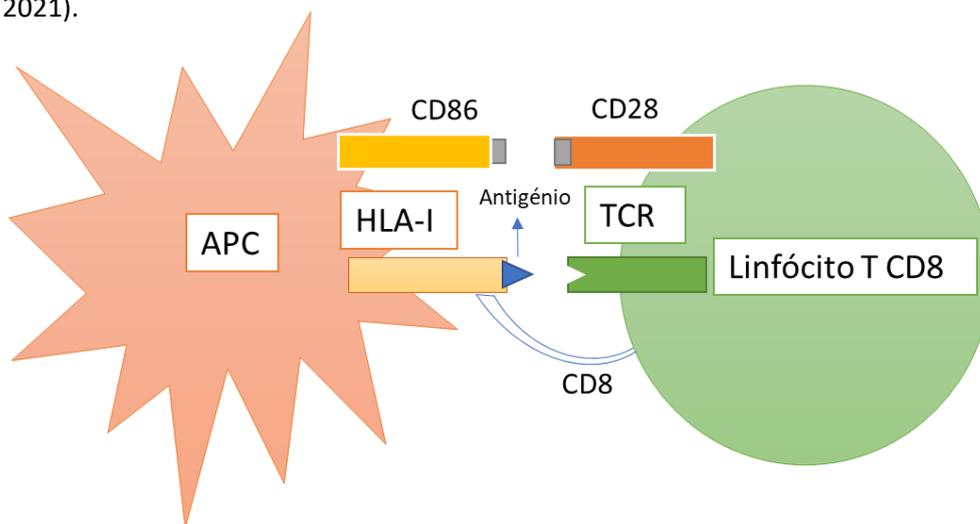


Figura 5. Interação entre o HLA-I e o TCR. A célula apresentadora de antígeno (APC) expressa na sua superfície HLA-I, que interage com o recetor da célula T (TCR) e com a molécula CD8. Para o desencadeamento de uma resposta imune, são necessárias outras interações, como a interação entre os recetores CD86 da célula APC e CD28 do linfócito T (Adaptado de He et. al., 2020).

1.3 BREVE CONTEXTUALIZAÇÃO DA DEMÊNCIA

Para o trabalho apresentado, é importante entender alguns conceitos relacionados com a demência. Demência define-se como qualquer declínio cognitivo que tenha efeito suficiente para interferir no funcionamento diário independente de um indivíduo (Gale et al., 2018). A demência é geralmente de natureza crónica e progressiva, resultando na deterioração cognitiva. De uma forma geral afeta o pensamento, a memória, a orientação, a linguagem e a compreensão, o que leva a alterações de humor, de controlo emocional e comportamental (Organização Mundial da Saúde, 2021).

As causas da demência, que se pode apresentar de várias formas, ainda não são conhecidas de forma clara. Ainda assim, sabe-se que é causada pela interação de vários fatores, como fatores genéticos e fatores ambientais (Figura 6) (Campbell et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta como comportamentos de risco a inatividade física, o tabagismo, o alcoolismo, e como doenças com risco associado a depressão, hipertensão, diabetes e obesidade. Adicionalmente, é também fator de risco a poluição atmosférica, e a falta de acesso à educação (Organização Mundial da Saúde, 2021).

Dados da OMS apontam para que, em 2019, aproximadamente 55,2 milhões de pessoas vivessem com demência. Nesse mesmo ano, a demência foi a sétima causa de morte em todo o mundo, resultando em aproximadamente 28,3 milhões de mortes. Relativamente à Europa, a OMS estima uma prevalência de 6,5% em pessoas com idade superior a 60 anos. Estes números, relativamente à população europeia, representam uma especial preocupação, pois a Europa é região com números de prevalência mais elevados, quando comparados com o resto do mundo, como por exemplo com a Ásia (prevalência aproximada de 2,9%). Estimativas para 2050, apontam para um número total na população global de cerca de 139 milhões, duas vezes mais do que o reportado em 2019 (Organização Mundial da Saúde, 2021).

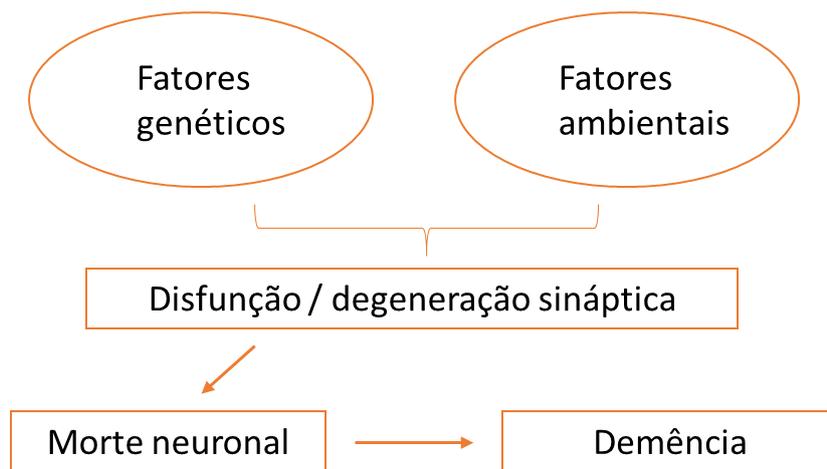


Figura 6. Processo de desenvolvimento de demência (Adaptado de Chaves et al., 2008).

1.4 INFLUÊNCIA DAS MOLÉCULAS HLA-I EM DIFERENTES PATOLOGIAS

1.4.1 Doenças neurodegenerativas

Os biomarcadores serológicos para doenças neurológicas são ansiosamente procurados e aguardados, devido ao seu carácter menos invasivo (quando comparado com o líquido cefalorraquidiano, por exemplo) e menos caro (quando comparado com técnicas imagiológicas como tomografia). Estudos em modelos animais mostraram que as moléculas MHC-I, além das suas importantes funções no sistema imunológico, também parecem ter um papel regulador na atividade cerebral (Oliveira et al., 2004). Assim, numerosos estudos têm mostrado o envolvimento das moléculas MHC-I no desenvolvimento neuronal e na plasticidade sináptica (Cebrián et al., 2014) (Elmer e McAllister, 2012). Para além disso, foi também já mostrado que os níveis de β_2m no sangue aumentam com a idade e que a injeção exógena de β_2m em ratinhos jovens impede a neurogénese e a função cognitiva (Smith et al., 2015). Em humanos foi reportado que doentes de Alzheimer exibiam níveis mais elevados de β_2m plasmática do que controlos sem declínio cognitivo (Dominici et al., 2018). Recentemente, encontrou-se uma maior prevalência do serotipo HLA-B8 em idosos com declínio cognitivo do que em idosos sem declínio cognitivo (Esgalhado et al., 2020).

Na desafiante doença de Alzheimer (DA), a causa mais comum de demência, cujo mecanismo patológico ainda tem muitos caminhos por desvendar, foi já mostrado o importante papel das moléculas HLA-I. Em 2006 Listi et al., mostraram que o alelo HLA-A2, é um alelo de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, uma vez que a sua prevalência era superior nestes doentes quando comparado com controlos saudáveis (Listi et al., 2006). Outro estudo mostrou que os doentes de Alzheimer portadores do alelo HLA-A2, tiveram um início de doença 2,4 anos mais cedo do que os não portadores (Ma et al., 2008). Por outro lado, o alelo HLA-A1 revelou estar associado a um início mais tardio da doença de Alzheimer (Guerini et al., 2009).

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa, caracterizada essencialmente por tremores grosseiros e rigidez muscular (Reed et al., 1983), cuja etiologia e mecanismos associados ao declínio cognitivo nestes doentes ainda não são claramente explicados (Aarsland et al., 2021). Um estudo de Payami e colaboradores mostrou que o haplótipo contendo alelos HLA-B7-Cw7 está associado positivamente com o risco de desenvolver doença de Parkinson, enquanto que o alelo HLA-Cw3 apresentou-se como um alelo protetor (Weissmann et al., 2013).

A esclerose múltipla (EM) continua a ser uma patologia com processos pouco conhecidos, e a necessitar de novas estratégias de tratamento (Doshi e Chataway, 2016). O estudo de biomarcadores que a ela possam estar associados, revela-se de grande importância para melhor conhecimento da patologia, do seu curso natural e, assim, poder atuar ao nível da prevenção e do tratamento. Os mecanismos autoimunes são, de facto, preponderantes no curso desta doença, e é pertinente associar os níveis de sHLA-I com a esclerose múltipla. Um estudo mostrou que as concentrações séricas destas moléculas eram maiores em doentes com esclerose múltipla do que em indivíduos saudáveis (Filaci et al., 1997). A nível genético, alguns alelos HLA-I revelaram conferir risco (HLA-A3 e HLA-B7), enquanto que outros revelaram-se protetores (HLA-A2 e HLA-B44) para a esclerose múltipla (Martin et al., 2021). Dois estudos com a colaboração de Fainardi em 2002 e em 2006, avaliaram a relação de moléculas séricas de HLA-I com a esclerose múltipla. Ambos relataram uma maior concentração de sHLA-I no soro de doentes com esclerose múltipla quando comparados com controlos saudáveis (Tabela 1) (Fainardi et al., 2002) (Fainardi et al., 2006).

1.4.2 Doenças infecciosas

No âmbito das doenças infecciosas, parece também existir uma relação entre moléculas sHLA-I e o curso da doença infecciosa. As células *natural killer* (NK) têm um papel chave na resposta imune antiviral e a sua função é regulada pela interação dos recetores inibitórios das células NK e as moléculas de MHC classe I. Com efeito, estas interações influenciam o curso de doenças infecciosas, assim como a sua resposta à terapêutica. Em doentes com infeção persistente pelo vírus da hepatite C, mostrou-se uma tendência para frequências baixas do genótipo HLA-C2C2 (homozigótico para C2) e interações fortes a moderadas do complexo NK-HLA (Montes-Cano et al., 2005). Relativamente à infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), foi já demonstrado que as moléculas de sHLA-I funcionam como inibidores das propriedades funcionais de células dendríticas, que desempenham papéis críticos na gestão de respostas imunes (Huang et al., 2012). Ainda, nesta área, o acompanhamento ao longo de vários anos de doentes positivos para VIH, onde foi monitorizado os níveis sHLA-I no soro, mostrou-se a existência de uma correlação entre o aumento destas moléculas e a progressão da doença, sugerindo a utilidade do estudo destas moléculas para inferir sobre o prognóstico da doença (Tabela 1) (Puppo et al., 1994).

Em 1994, foi também encontrada uma associação da tuberculose com os níveis séricos de sHLA-I, sendo que indivíduos com esta patologia, apresentaram uma média superior da concentração de sHLA-I, comparativamente com um grupo de indivíduos sem a doença (Tabela 1) (Inostroza et al., 1994).

1.4.3 Medicina transfusional

Sendo que o sucesso do transplante de células hematopoéticas é influenciado pela incompatibilidade de HLA e variação da região do MHC, para além de outros fatores, o estudo das moléculas de sHLA-I tem também, desde há algum tempo, revelado ter impacto na área da transplantação (Petersdorf, 2013). Rheyne et al. verificaram que aumentos transitórios de sHLA-I ocorreram em casos de rejeição ou infeção pós transplante, existindo um aumento de sHLA-I em 80% das rejeições ocorridas e em 83%

dos episódios de infecção desenvolvidos nos doentes transplantados (Rheynes et al., 1993).

1.4.4 Outras doenças inflamatórias e cancro

Os níveis de sHLA-I têm sido investigados noutras doenças inflamatórias (Tabela 1). Em 1998, um estudo cuja amostra incluía indivíduos de diferentes etnias, mostrou existir maiores níveis séricos de sHLA-I em doentes com lúpus eritematoso do que no grupo controlo ou outras doenças reumáticas, e sugeriu que a secreção de sHLA-I parece diferir entre várias patologias reumáticas assim como entre os diversos grupos étnicos (Wolf et al., 1998). Posteriormente, num estudo conduzido por Muñoz-Fernández et al. em 2001 associou a presença de moléculas sHLA-I à artrite reumatoide, sendo que a concentração sérica destas moléculas nos doentes foi superior à concentração no grupo controlo, porém sem atingir significância estatística (Muñoz-Fernández et al., 2001).

Patologias dermatológicas têm sido também alvo de estudo relativamente à sua relação com moléculas sHLA-I. Na dermatite atópica a concentração média de sHLA-I revelou estar significativamente elevada nos doentes comparativamente aos controlos (Moore et al., 1997).

Para além das patologias mencionadas anteriormente, em 2004, Heiligenhaus et al., mostraram que a concentração de moléculas sHLA-I em doentes com uveíte anterior (UA) estava significativamente aumentada comparativamente ao grupo controlo (Heiligenhaus et al., 2004).

Muitos estudos têm-se focado na quantificação de sHLA-I em diversas patologias malignas sólidas ou hematológicas, por isso não foi inserido nesta introdução, remetendo-se para o artigo de revisão de Kessler et al. (Kessler et al., 2020).

1.5 MOLÉCULAS DE HLA-I E O ENVELHECIMENTO

Relativamente ao envelhecimento, apenas se encontrou um estudo que mostrou um aumento dos níveis séricos de moléculas sHLA-I em pessoas com idade superior a 50 anos, comparando com um grupo de pessoas mais jovens (Le Morvan et al., 2001).

Porém, como vimos nos parágrafos anteriores, o estudo de moléculas sHLA-I tem dado contributos importantes no estudo de patologias infecciosas, a nível da medicina transfusional e outras doenças inflamatórias e cancro. Curiosamente, não encontramos qualquer estudo que relacionasse diretamente as moléculas sHLA-I com demência ou estados cognitivos. Apenas encontramos um estudo sobre moléculas solúveis de HLA-E (HLA-I não-clássica), que reportou níveis aumentados em doentes com esquizofrenia e doença bipolar (Boukoauci et al., 2021). Assim, é pertinente estudar moléculas sHLA-I e a sua relação com o estado cognitivo, sendo este um dos objetivos do presente estudo, podendo vir a dar um contributo importante e inovador numa área pouco explorada de biomarcadores sanguíneos associados ao declínio cognitivo.

Tabela 1. Moléculas HLA de classe I clássicas solúveis no plasma ou soro no envelhecimento ou em doenças selecionadas.

Patologia/ condição	Amostra (n/idade, anos)	Tipo de amostra	Anticorpo de captura	Anticorpo de deteção	Padrão	Níveis de sHLA-I em pacientes Média±EMP ou DP (ng/ml)	Níveis de sHLA-I nos controles Média±EMP ou DP (ng/ml)	Conclusões	Referência
Artrite reumatoide	AR 122/ 55 (22-79) 66/ semelhante AR	Soro	W6/32	Anti-β ₂ m monoclonal	HLA solubilizado com papaína	1209 ± 920	1060 ± 600	A concentração média de sHLA-I foi ligeiramente maior em doentes com AR do que no grupo controlo, mas não atingiu significância estatística.	Muñoz-Fernández et al. 2001
Dermatite atópica	DA 14 / 3,7±2,6 C 27 /7,9±2,7	Soro	W6/32	Anti-β ₂ m policlonal	HLA-B27 solúvel liofilizado	2070 ± 1140	1000 ± 220	Os níveis de sHLA-I estavam significativamente aumentados em doentes com dermatite atópica comparativamente com controlos (<i>p</i> <0,0001).	Moore et al. 1997
Envelhecimento	Meia idade/idosos 45≥51 Jovens 35≤50	Plasma	W6/32	Anti-β ₂ m policlonal	Plasma normal agrupado contendo uma concentração conhecida de sHLA	429 ± 301	126 ± 85	O sHLA-I estava significativamente aumentado no grupo de idosos (<i>p</i> =0,00001).	Le Morvan et al. 2001
Esclerose múltipla	EM 46/36 C 20/ND	Soro	W6/32	Anti-β ₂ m monoclonal (NAMB-1)	ND	2300 ± 1900	1400 ± 1100	As concentrações séricas de sHLA-I foram significativamente maiores em pacientes com esclerose múltipla do que em indivíduos saudáveis (<i>p</i> <0,05).	Filaci et al. 1997
	EM 103 / 39,5±11,8 C 82 /41,6±7,4	Soro	W6/32	Anticorpo monoclonal anti-HLA classe I	Antigénios HLA solúveis liofilizados	1872 ± 749	517,9 ± 343,0	Os níveis de sHLA-I foram maiores na EM do que nos controlos (<i>p</i> <0,05).	Fainard et al. 2002
	EM 103 / 39,59±11,8 C 82/ND	Soro	W6/32	Anti-β ₂ m policlonal	Antigénios HLA solúveis liofilizados	872 ± 749	517,99 ± 343,0	O sHLA-I sérico foi significativamente maior em pacientes com EM do que em controlos (<i>p</i> <0,05).	Fainardi et al. 2006
HIV	HIV 320/ND C 45/ND	Soro	Q6/64	Anti-β ₂ m policlonal	HLA-I purificado a partir de PBMCs	>5000 (ND)	~2000 (ND)	Níveis mais altos em pacientes com HIV do que controlos (<i>p</i> <0,0001).	Puppo et al. 1994
Lúpus eritematoso	LE 128 / ND C 189 /ND	Soro	W6/32	Anti-β ₂ m monoclonal (L368)	HLA-ABC purificado do líquido peritoneal	486 (ND)	254 (ND)	A concentração de sHLA-I foi significativamente maior nos doentes LE, comparado com o grupo controlo (<i>p</i> <0,0001).	Wolf et al. 1998
Tuberculose	T 60/35 (15 a 74) C 55 /32 (25-42)	Soro	W6/32	Anti-β ₂ m policlonal	HLA-B27 solúvel liofilizado	1304 ± 110	990 ± 160	Os níveis de sHLA-I foram significativamente superiores em doentes comparados com os controlos (<i>p</i> <0,0001).	Inostroza et al. 1994
Uveíte anterior	UA 60/ND C 128/ND	Plasma	W6/32	Anti-β ₂ m policlonal	HLA-B27 recombinante	720 ± 60	610 ± 40	A níveis de sHLA-I em doentes com UA foram significativamente maior do que nos controlos (<i>p</i> =0,03).	Heiligenhaus et al. 2004

AR, artrite reumatoide; C, controlo; DA, dermatite atópica; DP, desvio padrão; EM, esclerose múltipla; EPM, erro padrão da média; HIV, vírus da imunodeficiência humana; HLA, antígeno leucocitário humano; LE, lúpus eritematoso; n, número de voluntários; ND, não disponível; PBMC, células mononucleares do sangue periférico; T, tuberculose; UA, uveíte anterior;

2 . OBJETIVOS

Este projeto teve por objetivo investigar se os níveis de moléculas HLA-I solúveis no plasma poderão ser utilizados como biomarcadores de déficit cognitivo em idosos da Beira Interior e em específico, pretende-se também relacionar estes níveis com possíveis serotipos e diferentes graus de demência.

Assim, os objetivos específicos são:

1. Quantificar os níveis sHLA-I no plasma de idosos com diferentes estados cognitivos.
2. Estudar a associação entre os serotipos HLA-I, o estado cognitivo e os níveis plasmáticos de sHLA-I.

3 . MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Para este projeto de investigação foi utilizada uma amostra de 56 idosos (de um total de 86 voluntários) de lares e centros de dia da Região da Beira Interior (EBIcohort, <https://icon-cics.weebly.com/ebicohort-english.html>).

Foram obtidos dados demográficos dos participantes, como a idade e sexo através de um questionário. Estes dados foram armazenados de acordo com os regulamentos de proteção de dados e diretrizes legais. Todos os participantes, ou seu representante legal, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). O estudo regeu-se pelos princípios da declaração de Helsínquia e teve aprovação pela Comissão de Ética da Universidade da Beira Interior (CE-UBI-Pj-2017-012).

Os voluntários foram avaliados por uma equipa especializada que caracterizou o estado cognitivo dos idosos, usando a Escala de Deterioração Global (GDS) (Reisberg, 2007), a versão revista do Exame Cognitivo de Addenbrook (ACE-R) (Amaral-Carvalho & Caramelli, 2012) e informação clínica.

Os critérios de exclusão aplicados foram: infeções diferentes do citomegalovírus, doentes com acidente vascular cerebral prévio, doenças autoimunes, neoplasias, doenças psiquiátricas, epilepsia, trauma ou ausência de dados, que de diferentes formas podem interferir nos resultados em estudo.

Numa fase inicial os idosos foram divididos em três grupos: A) idosos sem défice cognitivo, com estágios 1 ou 2 na GDS, com pontuação ACE-R indicativa de ausência de défice cognitivo e sem indicações clínicas de doenças envolvendo perda de capacidade cognitiva (NCI, n=13); B) idosos com défice cognitivo leve, que apresentaram estágio 3 na GDS e com valores na ACE-R ligeiramente abaixo do mínimo considerado normal (MCI, n=15); C) idosos com défice cognitivo moderado a severo, com estágios 4 ou superior (CI, n=28), que incluíam 19 idosos que realizaram o teste ACE-R e 9 idosos com informação clínica indicativa de demência ou de doença de Alzheimer, aos quais não foi possível aplicar o teste ACE-R. Seis dos 28 idosos com comprometimento cognitivo estavam diagnosticados com doença de Parkinson. Numa fase mais avançada do

trabalho de investigação, os grupos iniciais foram refeitos, essencialmente por dois motivos. Primeiro, depois de realizada uma análise de *clusters* da amostra, com o método *Two Step*, foram criados dois grupos com qualidade razoável (medida de silhueta de 0,3). Um grupo incluía todos os voluntários sem défice cognitivo ou com pré-demência, e o outro os doentes com défice cognitivo moderado a severo. O segundo motivo foi que nos anteriores grupos A) e B) havia apenas 3 e 2 indivíduos com HLA-A23 ou HLA-A24, respetivamente. O reagrupamento dos indivíduos, permitiu também juntar num só grupo estes casos (aumentado o seu número para 5), permitindo aumentar o número e assim avaliar estatisticamente a interação entre as variáveis serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a demência, sendo estas variáveis de relevante e primordial interesse na investigação. Assim sendo, os idosos dos grupos A) e B) fundiram-se num só, ficando a amostra agrupada em dois grupos: normal ou com pré-demência (N/pD, n=28) e Demência (D, n=28).

As amostras de sangue foram colhidas em tubos EDTA, foi atribuído um código de identificação e foram processadas poucas horas após a sua colheita, para obtenção de plasma. O sangue total foi centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 15 minutos à temperatura ambiente. O plasma obtido foi, novamente, centrifugado a 6000 rpm durante 5 minutos, e alíquotas de cerca de 1 ml foram criopreservadas numa arca a -80 °C, para estudos posteriores. Os idosos também já estavam caracterizados para os serotipos HLA-I (usando o kit OneLambda LABTypeSSO e tecnologia Luminex) e a seropositividade para o citomegalovírus (por ELISA) (Esgalhado et al., 2020).

3.2 QUANTIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS sHLA-I

Os níveis das moléculas sHLA-I foram quantificados no plasma pelo método imunoenzimático ELISA *sandwich* (Figura 7) seguindo as especificações do fornecedor para os reagentes utilizados e para o protocolo. Foi utilizado o kit W6/32-anti- β_2m^{bio} ELISA (HLA Protein/Pure Protein, LLC, OK, USA), sendo um método de ELISA de fase

sólida para a determinação qualitativa e também quantitativa de proteínas solúveis, baseado em dois anticorpos que se ligam a epitopos diferentes na proteína HLA-I.

O anticorpo W6/32 é um dos anticorpos monoclonais mais usados para caracterizar moléculas de histocompatibilidade de classe I humanas. O paratopo deste anticorpo é direcionado contra um determinante monomórfico que reconhece apenas moléculas complexadas com a β_2m e o peptídeo, e estruturalmente intactas. É produzido em murganhos e provém de um hibridoma. Por sua vez, o anticorpo anti- β_2m humana biotinilado é policlonal e reconhece a β_2m livre e complexada, sendo proveniente de coelho. As ligações destes anticorpos às moléculas sHLA-I estão representadas nos passos 2 e 3 da Figura 7.

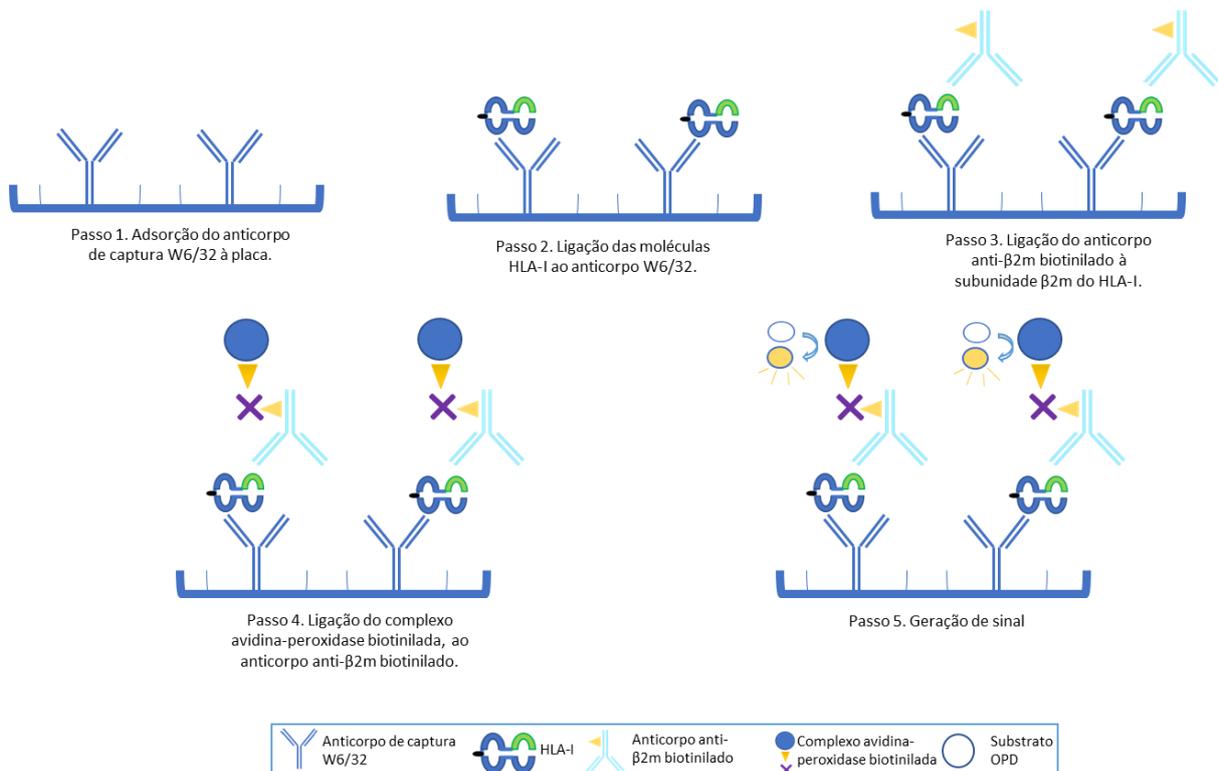


Figura 7. Representação do método utilizado. Diferentes passos ocorridos na realização da técnica de ELISA para quantificação de sHLA-I (HLA Pure Protein, 2021).

No final a intensidade do complexo colorido produzido é proporcional à concentração de sHLA-I presente nas amostras e padrões. A absorvância do complexo de cor é então medida, e os valores obtidos para cada padrão permitem gerar uma curva padrão. Esta curva padrão pode ser usada para determinar com precisão a concentração de sHLA-I em qualquer amostra testada. Apresenta-se, a seguir, os oito passos principais necessários para a realização do protocolo.

3.2.1 Revestimento

Inicialmente, foi necessário preparar a solução de revestimento. Para tal diluiu-se o anticorpo de captura monoclonal W6/32 para ficar à concentração final de 12,5 µg/ml em tampão de revestimento de fosfato (10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,2). Esta solução foi vertida num recipiente de solução com fundo em V (Thermo Scientific™ 8094) adequado para pipetar com pipeta multicanal e, de seguida, foi pipetado 100 µl de solução para cada poço de uma placa de ELISA de 96 poços de fundo raso (Nunc™ 439454 Immuno 96-Well, Flat-Bottom Wells, MaxiSorp Treated Clear Polystyrene for Solid Phase Immuno Assays). Bateu-se suavemente a placa para garantir que a solução fosse distribuída uniformemente dentro de cada poço. Selou-se a placa com uma película selante para microplacas (Thermo Scientific™ ASF0020100) e deixou-se a incubar durante a noite a 4 °C.

No dia seguinte, removeu-se a solução de revestimento invertendo e sacudindo a placa na pia de laboratório. Para remover os últimos vestígios de solução, enxugou-se a placa invertida sobre papel absorvente de laboratório. A remoção completa da solução e a lavagem eficaz em cada etapa é essencial para minimizar possíveis ruídos de fundo indesejados.

Prosseguiu-se com 5 ciclos de lavagem. E cada ciclo utilizou-se 200 µl de tampão de lavagem TPBS (PBS 1x: 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 137 NaCl, 2,68 mM KCl, pH 7,4 + 0,05% Tween-20) em cada poço secando sempre a placa no final, com ajuda de papel absorvente.

3.2.2 Bloqueio

Depois do anticorpo de captura W6/32 estar ligado ao fundo do poço procedeu-se ao bloqueio que permite a saturação dos locais de ligação livres na placa, para evitar ruído de fundo indesejado. Assim verteu-se 20 ml de tampão de bloqueio 3 % BSA (em PBS 1x) num recipiente de solução de fundo em V, e com a pipeta multicanal, colocou-se 200 µl em cada poço da placa.

Selou-se novamente a placa e incubou-se 2 horas à temperatura ambiente.

Após incubação lavou-se 5 vezes, como o descrito anteriormente.

3.2.3 Preparação do padrão

Para determinar a quantidade absoluta de sHLA-I, os valores são comparados com uma curva padrão. É necessário e fundamental que, as diluições do padrão abranjam o maior intervalo de concentrações requeridas pelo ensaio.

O padrão utilizado foi a proteína recombinante e truncada do antigénio leucocitário humano (sHLA-A*02:01) a 1,0 µg/ml (HLA1stD024, lote #024, HLAProtein/Pure Protein LLC). Prepararam-se sete duplicados de diluições deste padrão (960, 320, 160, 80, 40, 20, 10 ng/ml) em 3% caseína (Cat. # 40320024-1 BioPLUSTM, bioWORLD, OH, USA) e, aplicou-se 50 µl em cada poço nas duas primeiras colunas da placa de ELISA (Figura 8). Nos últimos dois poços (H1 e H2) aplicou-se apenas 50 µl da solução 3% caseína, sendo referenciada como concentração 0 ng/ml e funciona como controlo negativo na nossa experiência (branco).

			S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
50 µl por poço	Padrão	Padrão	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	960	960										
B	320	320										
C	160	160										
D	80	80										
E	40	40										
F	20	20										
G	10	10										
H	0	0										

Figura 8. Representação esquemática da aplicação das diluições do padrão na placa de ELISA.

3.2.4 Preparação das amostras

De forma a garantir uma quantificação precisa e para que estejam dentro da gama da curva padrão, as amostras devem ser avaliadas usando diluições seriadas. Estas diluições são, também, realizadas com tampão de caseína a 3%.

As amostras de plasma foram descongeladas e mantidas em gelo. Depois de descongelar, foram novamente centrifugadas durante 5 minutos a 6000 rpm. Numa placa de mistura (placa de 96 poços com fundo em U, HTS MS-9096MZ), as amostras foram diluídas de 2 a 256 vezes, colocando em cada poço 60 µl de solvente, e na primeira linha da placa 60 µl de cada amostra (obtendo a primeira diluição de 2 vezes (Figura 9)), e transferindo sucessivamente da linha anterior 60 µl para a próxima, obtendo diluições em série das amostras. Para a placa de ELISA original foi transferido 50 µl para cada poço.

Após aplicação dos padrões e das amostras, selou-se novamente a placa e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente.

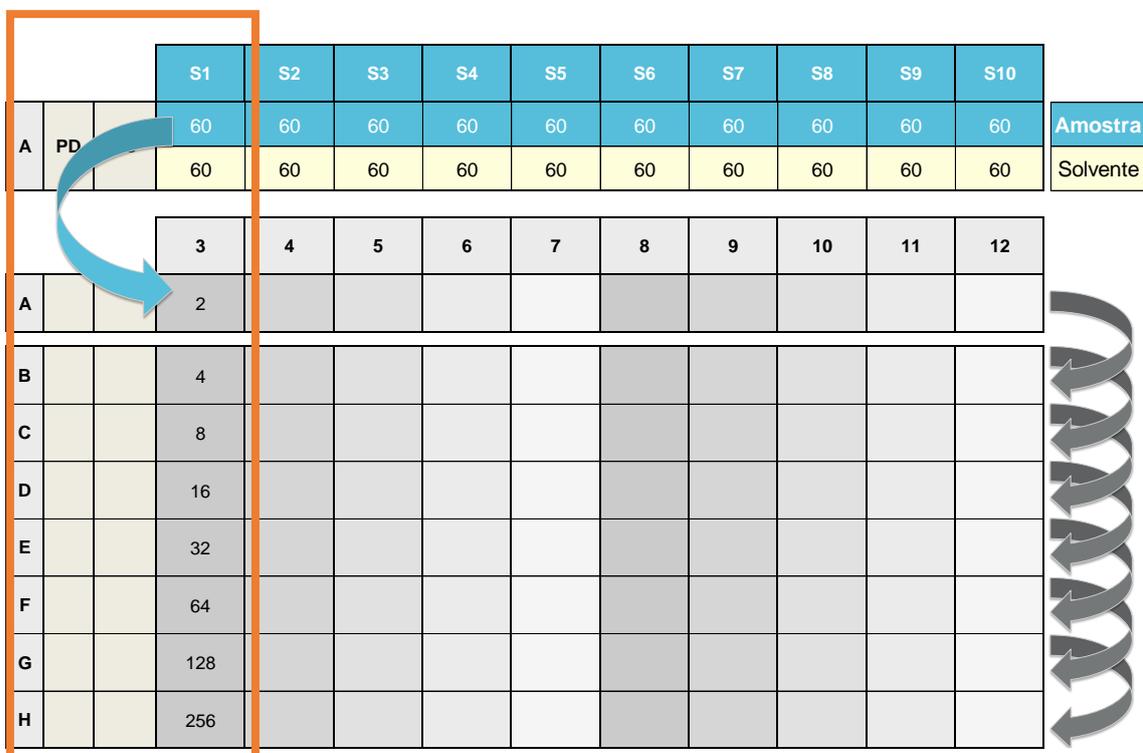


Figura 9. Representação das diluições seriadas das amostras na placa de mistura.

3.2.5 Incubação com anticorpo de detecção

Misturou-se o anticorpo anti- β_2m^{bio} (625 $\mu\text{g/ml}$, HLA Protein/Pure Protein LLC) com 3% BSA, num tubo de tipo Falcon em polipropileno de 15 ml, diluindo-se 1:500 para uma concentração final de 1,25 $\mu\text{g/ml}$. Lavou-se novamente cinco vezes a placa como descrito anteriormente. De seguida adicionou-se a solução de anticorpo de detecção diluído num recipiente de solução com fundo em V, e com uma pipeta multicanal pipetou-se par a placa de ELISA 50 μl por poço. Selou-se de novo e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente.

De imediato preparou-se a solução de detecção (ver ponto seguinte).

3.2.6 Preparação do complexo avidina/peroxidase biotinizada e incubação na placa

Preparou-se de imediato a solução de detecção, adicionando 25 μl de reagente A e 25 μl de reagente B (VECTASTAIN Elite ABC- HRP Kit, Peroxidase, PK-6100, Vector Laboratories, CA, USA) em 10 ml de PBS 1x. Esta solução requer uma pré-incubação de 1 hora à temperatura ambiente antes de ser utilizada. O reagente de marcação ABC é um complexo de avidina e peroxidase de rábano biotinizada capaz de se ligar à biotina do anticorpo de detecção anti- β_2m^{bio} , e gerar uma reação colorimétrica.

Lavou-se de novo a placa, e após a pré-incubação da mistura ABC, aplicou-se na placa de ELISA 100 μl por poço. Selou-se novamente e incubou-se novamente 1 hora à temperatura ambiente.

3.2.7 Reação do substrato, desenvolvimento de cor e paragem da reação

Para preparar a solução de substrato, dissolveu-se um comprimido de dihidroclorato o-fenilenediamina (OPD, ThermoFisher Scientific, Cat. #34006, MA, USA,) em 12,5 ml de tampão citrato fosfato (50 mM Na_2HPO_4 e 25mM citrato, pH 5,0) e adicionou-se, após a dissolução completa, 5 μl de peróxido de hidrogénio a 30%.

Realizou-se novamente os 5 ciclos de lavagem, e adicionou-se a cada poço 100 µl da solução de substrato. Incubou-se durante exatamente 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz, devido à fotossensibilidade dos reagentes utilizados.

Para parar a reação, utilizou-se uma solução STOP (3N H₂SO₄), aplicando-se 100 µl em cada poço. A cor obtida no final variou entre o amarelo-claro e o castanho-alaranjado.

3.2.8 Leitura de resultados e análise de dados

Levou-se a placa ao espectrofotómetro para leitura da absorvância num comprimento de onda de 490 nm. O equipamento utilizado foi o espectofetómetro de absorvância de microplacas da BioRad (BioRad Mark™ Microplate AbsorbSpectrophotometer, BioRad, CA, EUA) e o *software* “Microplate Manager 6.3” (BioRad). Na Figura 10 encontra-se um resumo de todo o processo utilizado.

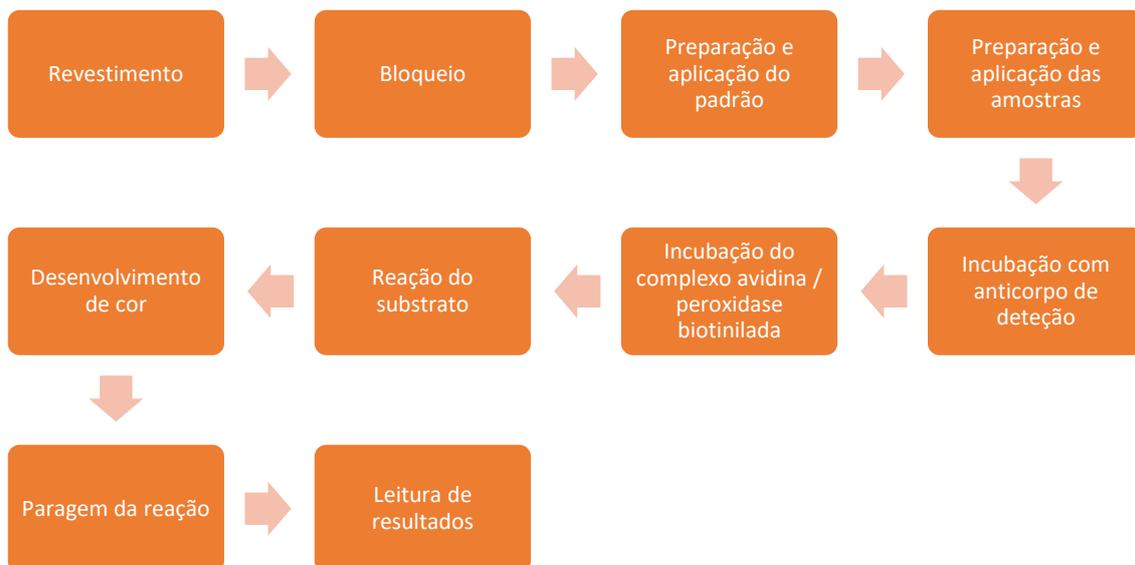


Figura 10. Resumo do protocolo utilizado para quantificação das moléculas sHLA-I pelo método de ELISA.

A análise dos dados foi feita nos programas *GraphPad Prism 8.0* (GraphPad Software, CA, USA) e *Microsoft Excel*. Foram construídas curvas de dose-resposta usando regressões logísticas de 4 parâmetros (4PL). As curvas ajustadas de cada placa de ELISA foram construídas e sobrepostas num único gráfico para comparação visual. Assim, os

dados experimentais foram colocados num gráfico com o eixo horizontal (eixo x) representando aos logaritmos das diferentes diluições, e as respostas (medidas) no eixo vertical (eixo y), representando a percentagem do sinal máximo para cada diluição experimental. A medida de concentração de sHLA-I (ng/ml) foi retirada e calculada a partir de metade das concentrações máximas efetivas (EC_{50}), que se referem à concentração de sHLA-I que induziu uma resposta a meio caminho entre a assíntota inferior e superior, e que é o ponto com maior precisão para o cálculo da concentração.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram colocados numa base de dados, juntamente com outras variáveis da amostra em estudo (idade, sexo, serotipo HLA-I, etc.).

Na análise estatística, para expressar as variáveis contínuas utilizou-se a média \pm erro padrão da média (EPM) e a mediana, mínimo e máximo (mín-máx). Foi usado o teste de *Kolmogorov Smirnov* para avaliar a normalidade das variáveis contínuas. As variáveis contínuas foram comparadas entre os três primeiros grupos definidos (NCI, MCI, CI), através da análise de variância ANOVA unidirecional para variáveis com distribuição normal (idade), e a análise *Kruskal-Wallis* para variáveis sem distribuição normal (sHLA-I). Para comparar os grupos no que diz respeito às variáveis serotipo HLA-I, sexo e seropositividade para CMV, foi utilizado o teste exato de *Fisher-Freeman-Halton* para tabelas de contingência não 2x2 (NCI, MCI ou CI) ou o teste exato de *Fisher* para tabelas de contingência 2x2 (NpD ou D). Para examinar as correlações entre a variável sHLA-I e a idade, recorreu-se à correlação de *Spearman*. Para subdivisão da nossa amostra em dois grupos (normal/ pré-demência e demência) foi realizado o método *two step* (dois passos), utilizando duas variáveis categóricas (estado cognitivo e serotipo HLA-I) e duas variáveis contínuas (sHLA-I e idade). O teste *U-Mann-Whitney* foi usado para comparar a diferença nos níveis moléculas sHLA-I entre dois grupos, e a análise de covariância (ANCOVA) utilizada para examinar a influência da idade, demência e serotipos HLA-I nos níveis de sHLA-I. Os níveis de sHLA-I também foram comparados entre os quatro grupos definidos de acordo com a presença de serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a demência,

isto é Não/Não; Não/Sim; Sim/Não; Sim/Sim, utilizando a ANCOVA com o teste *Post Hoc de Gabriel*.

A análise estatística realizou-se com recurso ao *software IBM SPSS Statistics* (versão 26, IBM) O valor de p admitido para significância estatística foi $p < 0,05$. Os gráficos, apresentados ao longo do trabalho, foram realizados utilizando o *software GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, San Diego, CA).

4. RESULTADOS

4.1 ESTRATÉGIA PARA QUANTIFICAÇÃO MOLÉCULAS sHLA-I

Na Figura 11 encontram-se ilustrados os resultados de uma experiência exemplificativa da estratégia usada para a quantificação de moléculas sHLA-I no plasma. A disposição das diluições do padrão, das amostras e do branco está indicada na Figura 11 A). Primeiro representou-se graficamente as absorvâncias em função das concentrações do padrão (Figura 11 B) e das amostras (não mostrado). Após isso, construiu-se um segundo gráfico (C) representando a percentagem do sinal máximo, obtido para cada diluição (no eixo dos y), e o fator de diluição numa escala logarítmica, no eixo dos x. Desta forma obteve-se uma curva sigmoidal para o padrão e para cada uma das amostras. As curvas do padrão e das amostras foram colocadas sobrepostas no mesmo gráfico para uma comparação visual. Para chegar ao valor da concentração de sHLA-I, utilizou-se o valor $\log EC_{50}$, que corresponde a metade da concentração efetiva máxima e comparou-se com a curva do padrão (curva vermelha no gráfico C), que é tomado como referência. O cálculo do logaritmo da concentração de cada amostra é deduzido através do desvio que apresenta relativamente ao padrão. A qualidade ajuste para as curvas de titulação sigmoidal foi R^2 sempre superior a 0,9. No caso da Figura 11, o valor da concentração na EC_{50} do padrão foi de 217,0 ng/ml. Tomando como exemplo a amostra 10, a qual tem um desvio no $\log EC_{50}$ igual a 0,521 face à referência do controlo [$\log EC_{50}$ (amostra) – $\log EC_{50}$ (referência)], correspondendo a um fator de desvio de $10^{0,521} = 3,322$, e desta forma calculou-se a concentração: $3,322 * 217,0 \text{ ng/ml} = 720,8 \text{ ng/ml}$. Este método de quantificação foi realizado para todas as amostras e assim a absorvância lida foi convertida na concentração de sHLA-I para cada amostra dos grupos em estudo, e posterior tratamento estatístico com as variáveis deste trabalho.

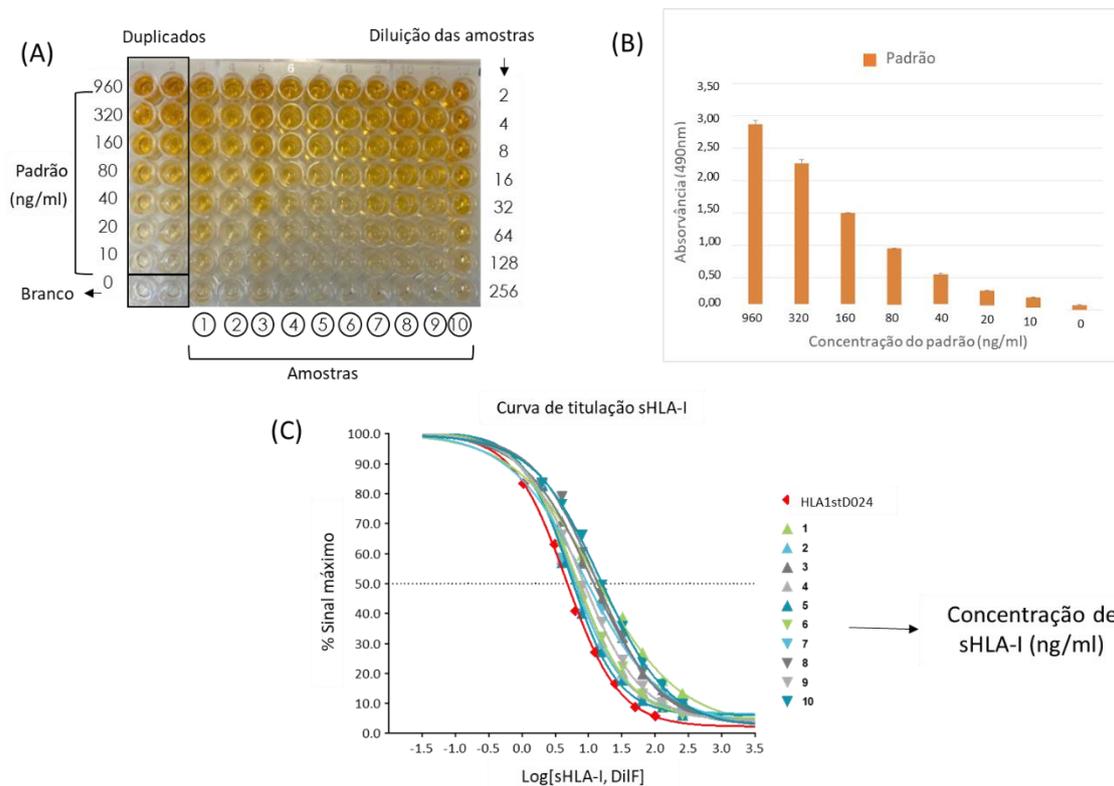


Figura 11. Estratégia para determinação da concentração sHLA-I no plasma. (A) Representação de uma placa de ELISA no final do processo; (B) Gráfico das absorvâncias lidas (eixo dos y) para cada uma das concentrações do padrão (eixo do x); (C) Gráfico da percentagem do sinal máximo lido (eixo do y), em função do logaritmo das diluições (eixo do x). sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

4.2 CARATERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA, BIOQUÍMICA E GENÉTICA DA AMOSTRA EM ESTUDO

A Tabela 2 resume os dados demográficos, bioquímicos e genéticos principais dos voluntários em estudo, e a diferenças das variáveis estudadas entre os três grupos em que se dividia a nossa amostra, com respetivo valor de *p* obtido. Caracterizando a amostra em estudo, os 56 indivíduos estudados tinham idades compreendidas entre 64 e 101 anos, com uma média±EPM de idades de 83,3±1,1 anos de vida. Relativamente à idade, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos de voluntários, sendo o expectável tendo em conta que a nossa amostra é no seu todo constituída por indivíduos idosos.

Do total dos indivíduos em estudo, 39 (69,6%) são do sexo feminino e 17 (30,4 %) são do sexo masculino. A variável sexo apresentou significância estatística entre grupos,

sendo perceptível uma maior frequência de voluntários do sexo feminino no grupo com comprometimento cognitivo (CI). Relativamente à variável seropositividade para citomegalovírus (CMV), a diferença entre grupos não foi significativa tendo em conta que apenas um (pertencente ao grupo NCI) dos 56 indivíduos é negativo. Relativamente à concentração de sHLA-I apesar de não apresentar significância estatística entre os três grupos, constatou-se que a média da concentração foi tendencialmente superior nos voluntários que apresentaram comprometimento cognitivo. Analisando separadamente cada grupo, notou-se que entre o grupo CI e MCI a diferença se revelou ser estatisticamente significativa ($p=0,046$, teste de *U-Mann-Whitney*). Importa ainda olhar para o serotipo, e apesar de a diferença entre grupos não ser estatisticamente significativa, percebe-se que a prevalência de indivíduos com este serotipo é elevada dentro do grupo com comprometimento cognitivo (39,3%), cerca de 2x e 3x maior do que nos grupos NCI e MCI, respetivamente.

Tabela 2. Caracterização dos voluntários da amostra.

	NCI (n=13)	MCI (n=15)	CI (n=28)	Valor de p
Idade (anos), Média±EPM	83,7±2,4	82,5±2,1	83,6±1,7	0,906 ^a
Sexo (Masculino/Feminino), n	8/5	3/12	6/22	0,029^b
Seropositividade para CMV (n, %)	12 (92,3)	15 (100,0)	28 (100,0)	0,232 ^b
sHLA-I (ng/ml) Média ± EPM	343,3±32,1	317,5±25,2	456,8±41,9	0,081 ^c
Mediana (mín-máx)	330,5 (200,1- 622,0)	298,2 (170,5- 525,8)	389,8 (164,1- 975,9)	
HLA-A23 ou HLA-A24 (n, %)	3 (23,1)	2 (13,3)	11 (39,2)	0,138 ^b

^aTeste de ANOVA unidirecional. ^bTeste *exato de Fisher-Freeman-Halton*. ^cTeste de *Kruskal-Wallis*. CI, comprometimento cognitivo moderado a severo; CMV, citomegalovírus; EPM, erro padrão da média; MCI, comprometimento cognitivo leve; Mín, mínimo; Máx, máximo; n, número de voluntários; NCI, sem comprometimento cognitivo; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

4.3 NÍVEIS ELEVADOS DE sHLA-I NÃO ESTÃO ASSOCIADOS À IDADE OU SEXO, MAS SIM À PRESENÇA DOS SOROTIPOS HLA-A23 OU HLA-A24 E TENDENCIALMENTE AO COMPROMETIMENTO COGNITIVO

4.3.1 Os níveis de sHLA-I não correlacionam com a idade

Tendo em conta que já tinha sido relatado um aumento nos níveis de sHLA-I em indivíduos mais velhos quando comparados com mais novos (Le Morvan et al., 2001), estudou-se o efeito do fator idade na nossa amostra. Como se constata na Figura 12 nos indivíduos em estudo neste trabalho esta associação não existe. Com efeito, depois de aplicar o teste estatístico de correlação de *Spearman*, percebeu-se que o efeito da idade não tem valor estatisticamente significativo ($p=0.229$). Assim, a idade não está diretamente relacionada com níveis elevados de sHLA-I na nossa amostra.

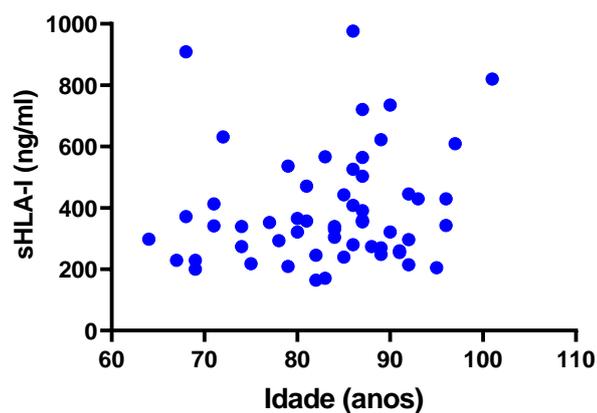


Figura 12. Relação entre as concentrações de sHLA-I e a idade; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

4.3.2 Os níveis de sHLA-I não estão associados com o sexo

A Figura 13 ilustra a comparação dos níveis de sHLA-I entre o sexo feminino e masculino. No sexo feminino a média \pm EPM de sHLA-I foi de 394,2 \pm 26,1 ng/ml, e a mediana de 357,0 ng/ml com valor mínimo e máximo de 164,1 e 819,6 ng/ml, respetivamente. No sexo masculino a média \pm EPM de sHLA-I foi de 390,7 \pm 55,4 ng/ml, e a mediana de 330,5 ng/ml com valor mínimo de 200,1 ng/ml e máximo de 975,9 ng/ml. O teste *U-Mann-Whitney*

mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,417$).

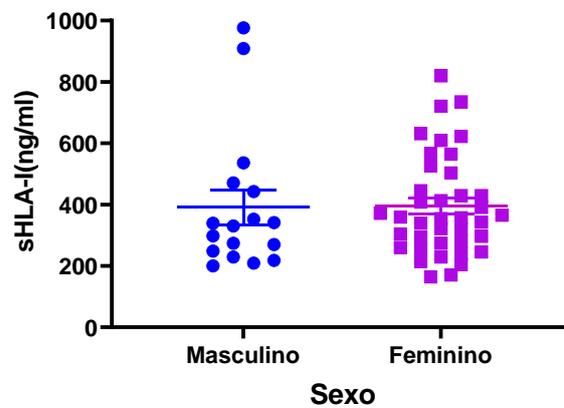


Figura 13. Relação da concentração de sHLA-I e o sexo dos voluntários; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

4.3.3 Os níveis de sHLA-I estão aumentados nos idosos com serotipos HLA-A23 ou HLA-A24

A análise dos níveis de sHLA-I de acordo com os serotipos HLA-I revelou que os voluntários com HLA-A23 ou HLA-A24 tinham níveis de sHLA-I plasmáticos mais elevados quando comparados com os voluntários HLA-A23/A24 negativos (média±EPM/mediana (mín-máx) 555,2±59,6 ng/ml /565,5 (239,4-975,9) ng/ml vs. 328,3±15,0 ng/ml / 326,0 (164,1-720,8) ng/ml (teste de *Mann-Whitney*, $p<0,001$) (Figura 14).

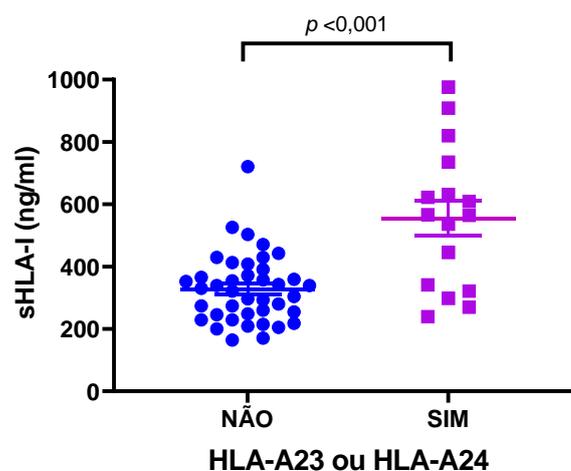


Figura 14. Relação da concentração de sHLA-I e os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

4.3.4 Os níveis de sHLA-I estão tendencialmente aumentados nos idosos com comprometimento cognitivo

Como referimos anteriormente no ponto 4.2 (Tabela 2), notou-se que no grupo dos idosos com comprometimento cognitivo, encontravam-se os valores mais elevados de sHLA-I. Ainda assim, não se verificou diferença estatisticamente significativa quando se comparou as medianas dos 3 grupos ($p=0,081$, teste de *Kruskal-Wallis*). Porém, a comparação entre os grupos separadamente revelou significância estatística entre o grupo MCI e CI ($p=0,04$, teste de *U-Mann-Whitney*). Na Figura 15 podemos ver graficamente esta tendência.

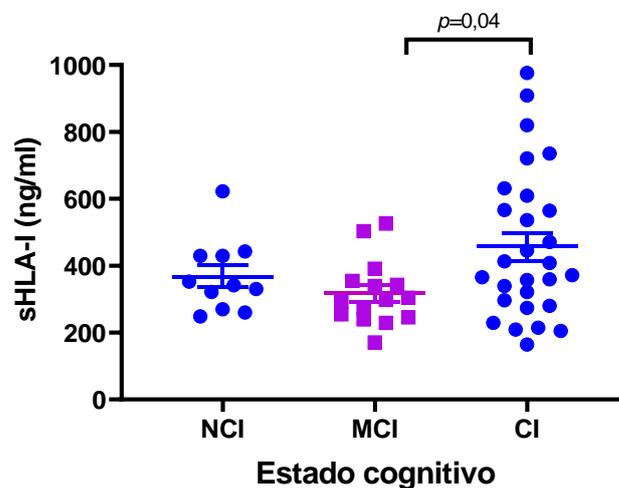


Figura 15. Relação da concentração de sHLA-I com o estado cognitivo. CI, comprometimento cognitivo; MCI, comprometimento cognitivo leve; NCI, sem comprometimento cognitivo; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

4.4 RECLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS NA NOSSA AMOSTRA

Tendo em conta a análise bidimensional anteriormente apresentada, pretendemos analisar a existência de *clusters* (grupos) dentro da nossa amostra. Assim, aplicamos uma análise de *clusters Two-Step*, usando duas variáveis categóricas - o serotipo (HLA-A23/-A24, sim/não) e o estado cognitivo (NCI, MCI e CI), e duas variáveis contínuas (sHLA-I e idade). Apesar da idade não ter revelado uma associação com os níveis de sHLA-I, foi incluída nesta análise devido ao facto de ter sido anteriormente reportado que poderia influenciar os níveis de sHLA-I (Le Morvan et al., 2001). Como resultado,

estes indivíduos foram reagrupados em dois grupos, o primeiro *cluster* incluía os voluntários sem comprometimento cognitivo ou com comprometimento cognitivo leve, e o segundo *cluster* incluía todos os voluntários com declínio cognitivo moderado a severo. Então, a seguir aplicamos a classificação que foi desenvolvida por Reisberg para a avaliação degenerativa primária, que fornece uma visão geral dos estados da função cognitiva. Esta avaliação é dividida em 7 estados diferentes, os estados 1-3 são os de pré-demência. Os estados 4-7 são os estágios da demência (Reisberg et al., 2020). Assim, nomeamos um grupo com 28 indivíduos considerados normais (do ponto de vista cognitivo) ou com pré-demência (NpD) e outro grupo com igual número, isto é, 28 idosos com demência (D) (Figura 16).

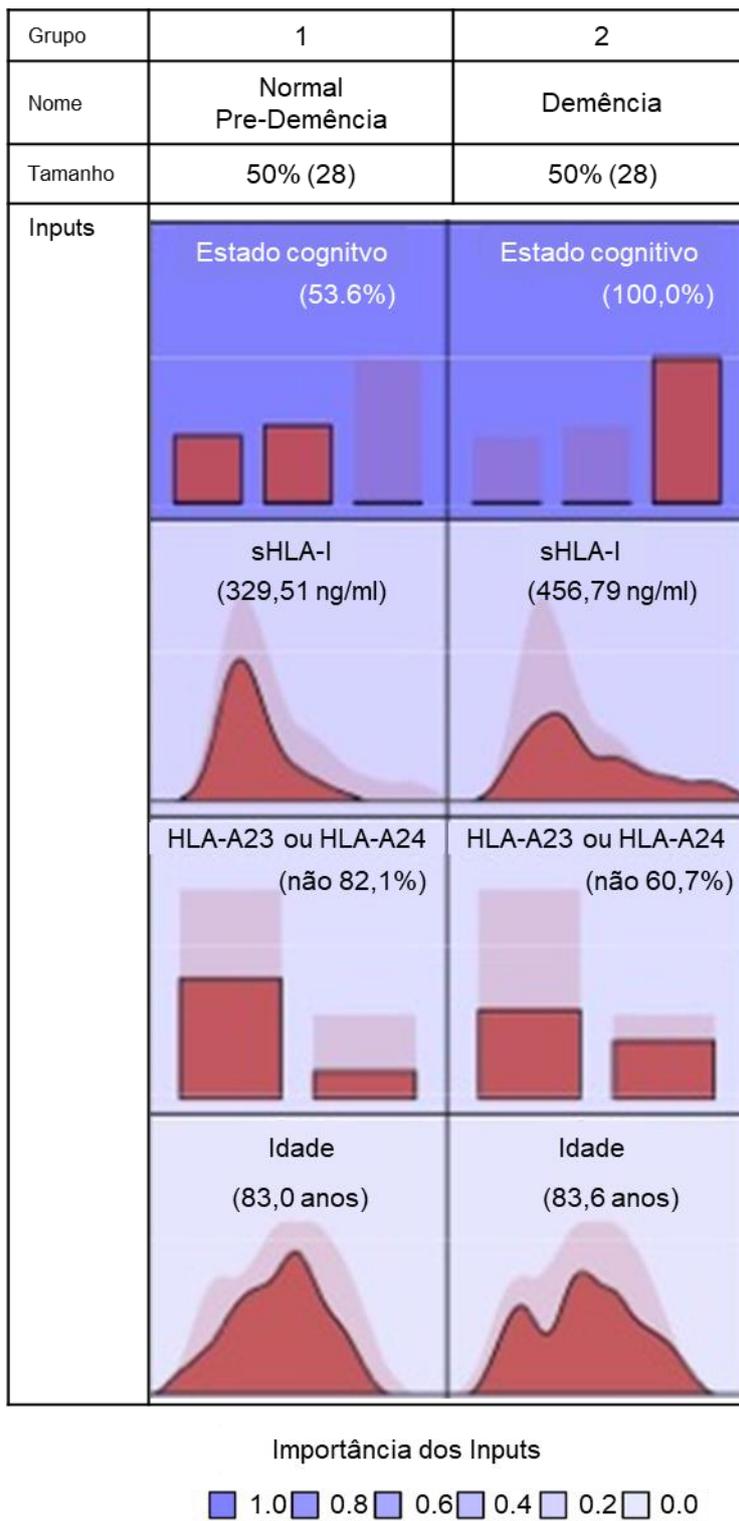


Figura 16. Definição dos subgrupos e o peso das variáveis. sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

Na Tabela 3 encontra-se a caracterização dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e dos níveis de sHLA-I no plasma tendo em conta este novo reagrupamento da amostra.

Tabela 3. Caracterização dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e dos níveis de sHLA-I na amostra em estudo após reclassificação dos grupos da amostra.

Dados bioquímicos e genéticos	Normal ou pré-Demência (NpD, n=28)	Demência (D, n=28)	Valores de <i>p</i>
HLA-A23 ou HLA-A24 (n, %)	5 (17,8)	11 (39,2)	0,138 ^a
sHLA-I (ng/ml) média ± EPM	329,5 ± 19,9	465,8 ± 41,9	0,028^b
mediana (mín-máx)	312,6 (170,5-622,0)	389,8 (164,1-975,9)	

D, demência; EPM, Erro Padrão da Média; Mín, mínimo; Máx, máximo; n, número de indivíduos; NpD, normal ou pré-demência sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel;^a Teste exato de *Fisher* ^bTeste *U-Mann-Whitney*

Relativamente à presença dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 a prevalência no grupo com demência foi mais do dobro daquela encontrada no grupo NpD. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa entre os dois grupos (Tabela 3).

No que respeita aos níveis de sHLA-I, os idosos com demência apresentaram concentrações mais elevadas (média±EPM / mediana (min-máx) 456,8±41,9 ng/ml / 389,8 (164,1-975,9) ng/ml), comparativamente aos idosos sem demência ou com pré-demência (média±EPM / mediana (min-máx) 329,5±19,9 ng/ml / 312,6 (170,5-622,0) ng/ml), verificando-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.028$, teste de *U-Mann-Whitney*). Como se pode ver na Figura 17, alguns voluntários com demência apresentam baixa concentração de sHLA-I no plasma, e assim sendo é importante perceber numa análise multivariável quais são os fatores que poderão influenciar os níveis de sHLA-I. Por outras palavras, qual será o impacto de ter demência e apresentar os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 nos níveis de sHLA-I?

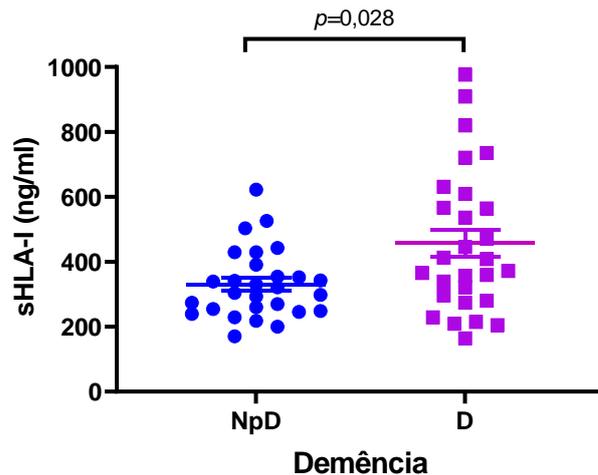


Figura 17. Relação da concentração de sHLA-I e a demência. D, demência; NpD, normal ou pré-demência; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

4.5 INTERAÇÃO ENTRE OS SEROTIPOS HLA-A23 OU HLA-A24 E A DEMÊNCIA NOS NÍVEIS DE sHLA-I

Tendo em conta que se percebeu que, tanto os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 (Figura 14) como a presença de demência (Figura 17), influenciam os níveis de sHLA-I no plasma considerou-se importante estudar a interação entre estes dois fatores. Para este feito aplicou-se uma análise multidimensional, nomeadamente o teste de ANCOVA bidirecional, onde foi avaliada a interação entre estas duas variáveis. Apesar de não termos encontrado associação entre os níveis de sHLA-I e a idade, esta variável foi incluída pelo facto de ter sido reportado num estudo que podia influenciar os níveis de sHLA-I no plasma (Le Morvan et al., 2001), como tinha sido já referido anteriormente. Esta análise, revelou que os efeitos principais para as variáveis serotipos e demência, mas não para a idade, apresentavam significância estatística (Tabela 4). Além disso, a interação entre os serotipos e a demência, também revelou influenciar os níveis de sHLA-I ($p=0.003$).

Tabela 4. Valores de p obtidos usando o teste de ANCOVA bidirecional para os efeitos principais e interação nos níveis de sHLA-I.

Variável	Efeitos principais			Interação
	Idade	HLA-A23 ou HLA-A24	Demência	HLA-A23 ou HLA-A24 e Demência
sHLA-I	0,569	<0,001	0,001	0,003

Teste de ANCOVA bidirecional; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

Deste modo, de seguida, analisamos os níveis de sHLA-I em 4 grupos, classificados de acordo com a presença dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a demência. No primeiro grupo, sem demência e sem a presença dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24, os níveis de sHLA-I foram de $324,2 \pm 19,9$ ng/ml (média \pm EPM) / 321,4 (170,5-525,8) ng/ml (mediana (mín-máx)); no segundo grupo, apenas com demência, a média de sHLA-I foi de $333,9 \pm 32,0$ ng/ml e a mediana 339,3 (164,1-720,8) ng/ml; no terceiro apenas com os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 a média foi de $354,0 \pm 69,1$ ng/ml e a mediana 298,2 (239,4-622,0) ng/ml; e por último, no quarto grupo com os serotipos HLA-A23 e HLA-A24 e com demência a média foi de $646,7 \pm 59,4$ ng/ml e a mediana 609,2 (321,0-975,9) ng/ml. A análise estatística usando o teste de ANCOVA bidirecional, revelou existir diferenças estatisticamente significativa com $p < 0.001$ (Tabela 4). Com efeito, usando o teste *Post-Hoc de Gabriel*, das 6 comparações entre os 4 grupos, apenas o quarto grupo apresentou concentrações de sHLA-I estatisticamente superiores aos 3 primeiros grupos ($p < 0.001$) (Figura 18A). No gráfico *Heatmap* (mapa de calor), consegue-se ter uma perceção visual da intensidade do calor das médias de cada subgrupo, sendo visivelmente muito “calor” no subgrupo que tem os dois fatores em estudo, e mais reduzido no grupo de indivíduos que não apresentavam demência nem serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 (Figura 18B).

Tabela 5. Comparação níveis de sHLA-I nos diferentes grupos, classificados de acordo com a presença dos serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a presença de demência.

Variável	Grupos				Valor de p
	Não		Sim		
HLA-A23/HLA-A24	Não		Sim		
Demência	Não	Sim	Não	Sim	
sHLA-I média \pm EMP	$324,2 \pm 19,9$	$333,9 \pm 32,0$	$354,0 \pm 69,1$	$646,7 \pm 59,4$	
mediana	321,4	339,3	298,2	609,2	<0,001^a
(mín-máx)	(170,5-525,8)	(164,1-720,8)	(239,4-622,0)	(321,0-975,9)	

^a Teste ANCOVA bidirecional; EMP, erro padrão da média; mín, mínimo; máx, máximo; sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

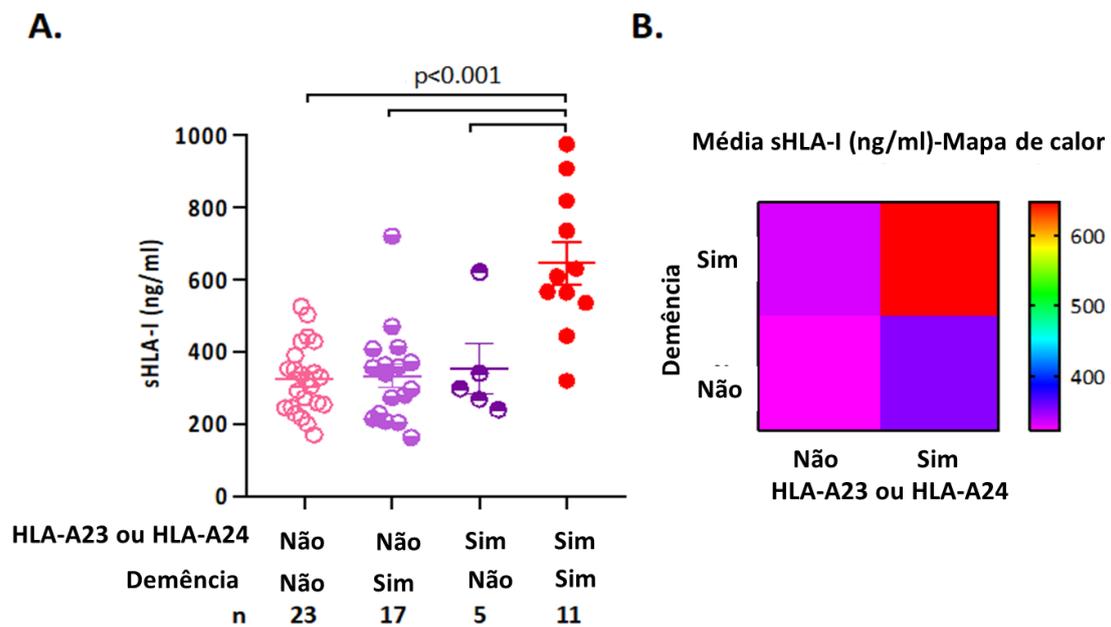


Figura 18. Representação da interação entre os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e a demência, na concentração de sHLA-I. (A) Gráfico de comparação entre os grupos, verificando-se diferença estatisticamente significativa do grupo com os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e com demência, em relação a todos os outros grupos. (B) Intensidade de calor da concentração média de sHLA-I dentro de cada grupo. Maior intensidade no grupo com os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e com demência. sHLA-I, Antígeno leucocitário da classe I humano solúvel.

5. DISCUSSÃO

Um dos objetivos do presente estudo foi quantificar os níveis de sHLA-I em idosos e relacioná-los com o estado cognitivo apresentado pelos indivíduos da amostra. Para isso utilizou-se técnica de ELISA *sandwich*, um método semelhante ao utilizado em outros trabalhos anteriores (Tabela 1). Para além disso, o estudo dos serotipos associados a estes grupos também foi incluído.

Relativamente à técnica, apesar do anticorpo de captura utilizado no método de ELISA poder reconhecer moléculas de sHLA-I não clássicas, a concentração destas é muito inferior às moléculas sHLA-I clássicas, e assim, os nossos resultados deverão refletir na sua maioria sHLA-A, sHLA-B e sHLA-C (Kessler et al., 2020).

A divisão dos indivíduos em grupos de acordo com o estado cognitivo previamente avaliado, permitiu a comparação entre os mesmos e, assim, inferir sobre a relação dos níveis de sHLA-I e a demência, tal como a interação da demência com os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24, e o seu efeito nos níveis de sHLA-I. Cada um dos grupos, criados após a análise de *clusters*, continha o mesmo número de elementos (n=28), o que permite uma comparação equilibrada, acabando assim por se revelar uma vantagem.

Uma das questões que se levanta é a influência da infeção por CMV nos resultados como já havia sido relatado (Esgalhado et al., 2020). Porém 55 do total dos 56 indivíduos em estudo revelaram ser seropositivos para CMV, e desta forma podemos considerar que este não será um fator que interfira com as conclusões obtidas, sendo que em praticamente toda a amostra, se verificou um princípio de igualdade no que a este fator diz respeito.

Impacto da idade e do sexo nos níveis sHLA-I

Neste estudo não encontramos uma associação entre o fator idade e os níveis de sHLA-I, ao contrário daquilo que foi relatado por um grupo em 2001 (Le Morvan et al., 2001). Nesse estudo mostrou-se que a concentração de sHLA-I foi superior no grupo de indivíduos com mais de 50 anos, sugerindo que a variação apresentada de sHLA-I poderá contribuir para a falta de resposta do sistema imunitário no envelhecimento.

Investigou-se, também se existia na nossa amostra alguma diferença nos níveis de sHLA-I de acordo com a variável sexo. Apesar de não haver diferença relativamente aos níveis de sHLA-I, verificou-se uma frequência estatisticamente significativa maior de mulheres no grupo com comprometimento cognitivo. Este resultado não é surpreendente, tendo em conta que alguns estudos têm relatado uma maior prevalência de demência em mulheres evidenciando que existem diferenças entre homens e mulheres em relação aos distúrbios cognitivos (Bain et al., 2021) (De Silva et al., 2003). Ainda assim, outros trabalhos não têm corroborado esta hipótese do sexo feminino estar associado a um maior fator de risco para demência (Kukull et al., 2002) (Chene et al., 2015). Apesar de estudos de prevalência indicarem um maior risco para as mulheres, este poderá ser explicado pela maior taxa de sobrevivência (Ertekin et al., 2015). Para além disso, a nossa amostra é constituída por voluntários provenientes da Beira Interior, região na qual existe uma maior prevalência de mulheres vivas, e desta forma estes dados demográficos relativamente ao sexo feminino ajudam a explicar a maior prevalência de mulheres na amostra (Pordata, 2023).

Impacto do fator genético nos níveis de sHLA-I: serotipos HLA-A23 ou HLA-A24

Estudos anteriores já tinham identificado que indivíduos com serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 apresentavam altos níveis de moléculas sHLA-I (Adamashvili et al., 2005; Doxiadis et al., 1989). Com efeito, Kao et al., mostrou que indivíduos com HLA-A23 ou HLA-A24 apresentaram concentrações médias de sHLA-I 1,9 e 1,4 vezes superiores, respetivamente comparado com indivíduos sem estes alelos (Kao et al., 1988). Os nossos resultados vão ao encontro destes estudos, uma vez que foi possível perceber que em indivíduos com os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24, o aumento dos níveis de sHLA-I foi notório, sendo mais evidente e estatisticamente significativo no grupo com demência (D). Mais recentemente, o serotipo HLA-A24 foi associado à doença de Alzheimer, como um possível fator de risco para o desenvolvimento desta doença (Ma et al., 2008).

Impacto da demência nos níveis de sHLA-I

Neste trabalho os níveis de sHLA-I revelaram-se aumentados no grupo de voluntários com demência. Não encontramos em toda a bibliografia consultada, estudos que investigassem os níveis de sHLA-I em indivíduos com demência. Assim, os nossos resultados representam uma associação com interesse pertinente e inovador, uma vez que será a primeira evidência desta associação. Ainda assim, trabalhos realizados com outras patologias neurológicas apontam neste sentido, isto é, de existir uma associação entre sHLA-I e essas mesmas patologias, como mostrado ao longo da introdução deste trabalho.

Impacto da interação do serotipo e da demência associado aos níveis elevados de sHLA-I

Tendo em conta os resultados discutidos nos pontos anteriores, avaliou-se também, o efeito da interação dos sorotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e da demência nos níveis de sHLA-I. O resultado desta interação traduziu-se em níveis aumentados nos voluntários que ao mesmo tempo tinham estes dois fatores quando comparados com voluntários sem serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 e sem demência ou quando comparados com voluntários que apresentaram apenas um destes fatores. Desta forma sugere-se que os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24 funcionam como uma predisposição genética para o aumento de sHLA-I, associado a outro fator, que funcionará como iniciador/desencadeador (como a demência e a neurodegeneração que lhe está associada).

Níveis de sHLA-I plasmáticos aumentados, prejudicial ou benéfico?

Numa situação fisiológica normal, a presença de moléculas de sHLA-I no plasma deve-se a um processo de tráfego intracelular e reciclagem das moléculas de HLA-I encontradas na superfície das células, incluindo células T e células dendríticas

(Donaldson e Williams, 2009). Além disso, vários mecanismos referidos na introdução deste trabalho originam as formas solúveis de moléculas HLA-I (Figura 4).

Num processo inflamatório em desenvolvimento, uma parte das moléculas não é expressa na superfície das células, e acaba por ser secretada. Por outro lado, neste processo existe também um aumento da transcrição do gene de HLA-I, aumentando assim não só a expressão de moléculas de superfície celular, mas também aumentando a sua secreção (Aulitzky et al., 1991). Desta forma, os níveis aumentados no plasma do grupo com demência poderão ser desencadeados pelos processos inflamatórios associados a processos neurodegenerativos em curso, e subsequente estimulação da secreção das moléculas de sHLA-I (Puppo et al., 1995; Pontes et al., 1998).

Por outro lado, tem sido evidenciado nas últimas décadas, que as moléculas sHLA-I possuem propriedades imunorreguladoras (Zavazava et al., 1990). Com efeito, as moléculas sHLA-I mostraram ser capazes de inibir as células T CD8+ citotóxicas e as células NK (Puppo et al., 1995; Contini et al., 2005; Arosa et al., 2021). Assim, podemos pensar que a resposta imune e a secreção de sHLA-I, é uma tentativa de minimizar a neuroinflamação causada por linfócitos efectores citotóxicos.

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O trabalho descrito reflete essencialmente a importância dos fatores genéticos e de demência ou comprometimento cognitivo nos níveis de sHLA-I plasmático. Neste âmbito, uma das limitações deste estudo é o tamanho relativamente reduzido da amostra (56), e ainda a falta de resultados relativamente às moléculas de HLA-I não associadas a β_2m , a conformação aberta, sendo que a nossa técnica recai sobre a quantificação da conformação fechada (ligada à β_2m).

O recurso a uma amostra de estudo maior e a quantificação também da conformação aberta das moléculas de HLA-I, poderão confirmar, reforçar e ampliar os resultados encontrados.

7. CONCLUSÃO

Os mecanismos subjacentes à relação entre demência nos idosos, os serotipos HLA-A23 ou HLA-A24, e os níveis de sHLA-I ainda não são bem claros. Ainda assim, com os resultados obtidos podemos propor que, a presença de um processo neurodegenerativo ativo e de um determinado serotipo HLA-I, favorece um aumento significativo dos níveis de sHLA-I plasmático. A justificativa baseia-se na interação encontrada e descrita neste trabalho entre a demência e os serotipos HLA-A23 e HLA-A24 associada a elevados níveis de sHLA-I em idosos. Assim, estes dois fatores sugerem ser codeterminantes no aumento de sHLA-I.

Os níveis aumentados de sHLA-I poderão refletir duas hipóteses, aparentemente contraditórias entre si. Por um lado, uma resposta imune inflamatória prejudicial à função cerebral poderá ser responsável pela secreção aumentada de sHLA-I; ou, por outro lado, podemos pensar que a resposta imune e a secreção de sHLA-I é uma tentativa de minimizar a neuroinflamação. Assim, este trabalho deixa uma porta aberta e mais estudos serão necessários para entender esta associação.

8. BIBLIOGRAFIA

-
- Aarsland, D., Batzu, L., Halliday, G. M., Geurtsen, G. J., Ballard, C., Ray Chaudhuri, K., & Weintraub, D. (2021). Parkinson disease-associated cognitive impairment. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 47. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00280-3>
 - Adamashvili, I., Kelley, R. E., Pressly, T., & McDonald, J. C. (2005). Soluble HLA: patterns of expression in normal subjects, autoimmune diseases, and transplant recipients. *Rheumatology international*, 25(7), 491–500. <https://doi.org/10.1007/s00296-005-0585-y>
 - Allavena, P., Signorelli, M., Chieppa, M., Erba, E., Bianchi, G., Marchesi, F., Olimpio, C. O., Bonardi, C., Garbi, A., Lissoni, A., de Braud, F., Jimeno, J., & D'Incalci, M. (2005). Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer research*, 65(7), 2964–2971. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4037>
 - Amaral-Carvalho, V., & Caramelli, P. (2012). Normative data for healthy middle-aged and elderly performance on the Addenbrooke Cognitive Examination-Revised. *Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology*, 25(2), 72–76. <https://doi.org/10.1097/WNN.0b013e318259594b>
 - Arosa, F. A., Esgalhado, A. J., Reste-Ferreira, D., & Cardoso, E. M. (2021). Open MHC Class I Conformers: A Look through the Looking Glass. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 9738. <https://doi.org/10.3390/ijms22189738>
 - Arosa, F. A., Santos, S. G., & Powis, S. J. (2007). Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules. *Trends in immunology*, 28(3), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.002>
 - Aulitzky, W. E., Grosse-Wilde, H., Westhoff, U., Tilg, H., Aulitzky, W., Gastl, G., Herold, M., & Huber, C. (1991). Enhanced serum levels of soluble HLA class I molecules are induced by treatment with recombinant interferon-gamma (IFN-gamma). *Clinical and experimental immunology*, 86(2), 236–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb05802.x>

-
- Bjorkman, P. J., & Parham, P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual review of biochemistry*, 59, 253–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.001345>
 - Boukouaci, W., Lajnef, M., Richard, J. R., Wu, C. L., Bouassida, J., Rafik, I., Foiselle, M., Straczek, C., Mezouad, E., Naamoune, S., Salah, S., Bencharif, M. A., Ben Chaaben, A., Barau, C., Le Corvoisier, P., Leboyer, M., & Tamouza, R. (2021). HLA-E circulating and genetic determinants in schizophrenia and bipolar disorder. *Scientific reports*, 11(1), 20260. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99732-9>
 - Campbell, N. L., Unverzagt, F., LaMantia, M. A., Khan, B. A., & Boustani, M. A. (2013). Risk factors for the progression of mild cognitive impairment to dementia. *Clinics in geriatric medicine*, 29(4), 873–893. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.009>
 - Cebrián, C., Loike, J. D., & Sulzer, D. (2014). Neuronal MHC-I expression and its implications in synaptic function, axonal regeneration and Parkinson's and other brain diseases. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 114. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00114>
 - Chaves M, Finkelsztein A, Stefani MA. *Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia*. Porto Alegre: Artmed; 2008.
 - Chêne, G., Beiser, A., Au, R., Preis, S. R., Wolf, P. A., Dufouil, C., & Seshadri, S. (2015). Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 11(3), 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.10.005>
 - Contini, P., Ghio, M., Merlo, A., Poggi, A., Indiveri, F., & Puppo, F. (2005). Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kappaB and NF-AT nuclear translocation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(11), 7244–7254. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7244>
 - Danchin, E., Vitiello, V., Vienne, A., Richard, O., Gouret, P., McDermott, M. F., & Pontarotti, P. (2004). The major histocompatibility complex origin.

-
- Immunological reviews, 198, 216–232. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00132.x>
- De Silva, H. A., Gunatilake, S. B., & Smith, A. D. (2003). Prevalence of dementia in a semi-urban population in Sri Lanka: report from a regional survey. *International journal of geriatric psychiatry*, 18(8), 711–715. <https://doi.org/10.1002/gps.909>
 - Dominici, R., Finazzi, D., Polito, L., Oldoni, E., Bugari, G., Montanelli, A., Scarpini, E., Galimberti, D., & Guaita, A. (2018). Comparison of β 2-microglobulin serum level between Alzheimer's patients, cognitive healthy and mild cognitive impaired individuals. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 23(6), 603–608. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1468825>
 - Donaldson, J. G., & Williams, D. B. (2009). Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(12), 1745–1752. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00979.x>
 - Doshi, A., & Chataway, J. (2016). Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clinical medicine (London, England)*, 16(Suppl 6), s53–s59. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s53>
 - Doxiadis, I., Westhoff, U., & Grosse-Wilde, H. (1989). Quantification of soluble HLA class I gene products by an enzyme linked immunosorbent assay. *Blut*, 59(5), 449–454. <https://doi.org/10.1007/BF00349066>
 - Elmer, B. M., & McAllister, A. K. (2012). Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends in neurosciences*, 35(11), 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.08.001>
 - Ertekin, A., Demir, R., Özdemir, G., Özel, L., Özyıldırım, E., & Ulvi, H. (2015). An Investigation of the Risk Factors and Prevalence of Alzheimer's Disease in the Eastern Region of Turkey: A Population Based Door-to-Door Survey. *European journal of general medicine*, 12, 144-151. <https://doi.org/10.15197/sabad.1.12.29>
 - Esgalhado, A. J., Reste-Ferreira, D., Albino, S. E., Sousa, A., Amaral, A. P., Martinho, A., Oliveira, I. T., Verde, I., Lourenço, O., Fonseca, A. M., Cardoso, E. M., & Arosa, F. A. (2020). CD45RA, CD8 β , and IFN γ Are Potential Immune

-
- Biomarkers of Human Cognitive Function. *Frontiers in immunology*, 11, 592656. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.592656>
- Fainardi, E., Granieri, E., Tola, M. R., Melchiorri, L., Vaghi, L., Rizzo, R., Castellazzi, M., Ceruti, S., Paolino, E., & Baricordi, O. R. (2002). Clinical and MRI disease activity in multiple sclerosis are associated with reciprocal fluctuations in serum and cerebrospinal fluid levels of soluble HLA class I molecules. *Journal of neuroimmunology*, 133(1-2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00348-x](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00348-x)
 - Fainardi, E., Rizzo, R., Melchiorri, L., Castellazzi, M., Paolino, E., Tola, M. R., Granieri, E., & Baricordi, O. R. (2006). Intrathecal synthesis of soluble HLA-G and HLA-I molecules are reciprocally associated to clinical and MRI activity in patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 12(1), 2–12. <https://doi.org/10.1191/1352458506ms1241oa>
 - Filaci, G., Contini, P., Brenci, S., Gazzola, P., Lanza, L., Scudeletti, M., Indiveri, F., Mancardi, G. L., & Puppo, F. (1997). Soluble HLA class I and class II molecule levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Human immunology*, 54(1), 54–62. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(97\)00004-9](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(97)00004-9)
 - Gale, S. A., Acar, D., & Daffner, K. R. (2018). Dementia. *The American journal of medicine*, 131(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.01.022>
 - Gensterblum-Miller, E., Wu, W., & Sawalha, A. H. (2018). Novel Transcriptional Activity and Extensive Allelic Imbalance in the Human MHC Region. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 200(4), 1496–1503. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701061>
 - Global status report on the public health response to dementia. Geneva: World Health Organization; 2021 <https://www.who.int/publications/item/9789240033245>
 - Goldberg, A. C., & Rizzo, L. V. (2015). MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 13(1), 153–156. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3122>
 - Guerini, F. R., Tinelli, C., Calabrese, E., Agliardi, C., Zanzottera, M., De Silvestri, A., Franceschi, M., Grimaldi, L. M., Nemni, R., & Clerici, M. (2009). HLA-A*01 is

-
- associated with late onset of Alzheimer's disease in Italian patients. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 22(4), 991–999. <https://doi.org/10.1177/039463200902200414>
- He, Y., Agnihotri, P., Rangarajan, S., Chen, Y., Kerzic, M. C., Ma, B., Nussinov, R., Mariuzza, R. A., & Orban, J. (2020). Peptide-MHC Binding Reveals Conserved Allosteric Sites in MHC Class I- and Class II-Restricted T Cell Receptors (TCRs). *Journal of molecular biology*, 432(24), 166697. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.031>
 - Heiligenhaus, A., Rebmann, V., Neubert, A., Plewa, S., Ferencik, S., Vögeler, U., Steuhl, K. P., & Grosse-Wilde, H. (2004). Soluble HLA class I and HLA-DR plasma levels in patients with anterior uveitis. *Tissue antigens*, 63(4), 369–375. <https://doi.org/10.1111/j.0001-2815.2004.00201.x>
 - Hewitt E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110(2), 163–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x>
 - HLA Pure Protein, Manual W6/32 – Anti-b2mbio ELISA, Detecção/Quantificação de Proteínas sHLA Classe I derivadas de soro numa abordagem Sandwich ELISA padronizada, 2021.
 - Huang, J., Al-Mozaini, M., Rogich, J., Carrington, M. F., Seiss, K., Pereyra, F., Lichtenfeld, M., & Yu, X. G. (2012). Systemic inhibition of myeloid dendritic cells by circulating HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Retrovirology*, 9, 11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-11>
 - Inostroza, J., Muñoz, P., Espinoza, R., Millaqueo, L., Diaz, P., Leiva, L., & Sorensen, R. (1994). Quantitation of soluble HLA class I heterodimers and beta 2-microglobulin in patients with active pulmonary tuberculosis. *Human immunology*, 40(3), 179–182. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0198-8859(94)90066-3)
 - Kao, K. J., Scornik, J. C., Riley, W. J., & McQueen, C. F. (1988). Association between HLA phenotype and HLA concentration in plasma or platelets. *Human immunology*, 21(2), 115–124. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(88\)90086-9](https://doi.org/10.1016/0198-8859(88)90086-9)

-
- Kessler, A. L., Bruno, M. J., & Buschow, S. I. (2020). The Potential of Soluble Human Leukocyte Antigen Molecules for Early Cancer Detection and Therapeutic Vaccine Design. *Vaccines*, 8(4), 775. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040775>
 - Kukull, W. A., Higdon, R., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., Schellenberg, G. D., van Belle, G., Jolley, L., & Larson, E. B. (2002). Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Archives of neurology*, 59(11), 1737–1746. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.11.1737>
 - Kulski, J. K., Shiina, T., & Dijkstra, J. M. (2019). Genomic Diversity of the Major Histocompatibility Complex in Health and Disease. *Cells*, 8(10), 1270. <https://doi.org/10.3390/cells8101270>
 - Le Morvan, C., Cogné, M., & Drouet, M. (2001). An elevation in the concentration of HLA class I molecules in human blood due to ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 122(3), 335–340. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(00\)00250-5](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(00)00250-5)
 - Listì, F., Candore, G., Balistreri, C. R., Grimaldi, M. P., Orlando, V., Vasto, S., Colonna-Romano, G., Lio, D., Licastro, F., Franceschi, C., & Caruso, C. (2006). Association between the HLA-A2 allele and Alzheimer disease. *Rejuvenation research*, 9(1), 99–101. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.9.99>
 - Ma, S. L., Tang, N. L., Tam, C. W., Lui, V. W., Suen, E. W., Chiu, H. F., & Lam, L. C. (2008). Association between HLA-A alleles and Alzheimer's disease in a southern Chinese community. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 26(5), 391–397. <https://doi.org/10.1159/000164275>
 - Mariuzza, R. A., Agnihotri, P., & Orban, J. (2020). The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *The Journal of biological chemistry*, 295(4), 914–925. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009411>
 - Martin, R., Sospedra, M., Eiermann, T., & Olsson, T. (2021). Multiple sclerosis: doubling down on MHC. *Trends in genetics : TIG*, 37(9), 784–797. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.012>
 - Montes-Cano, M. A., Caro-Oleas, J. L., Romero-Gómez, M., Diago, M., Andrade, R., Carmona, I., Aguilar Reina, J., Núñez-Roldán, A., & González-Escribano, M. F.

-
- (2005). HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Human immunology*, 66(11), 1106–1109. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.02.001>
- Moore, C., Ehlal, M., Inostroza, J., Leiva, L. E., & Sorensen, R. U. (1997). Elevated levels of soluble HLA class I (sHLA-I) in children with severe atopic dermatitis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 79(2), 113–118. [https://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)63096-7](https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)63096-7)
 - Mosaad Y. M. (2015). Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. *Scandinavian journal of immunology*, 82(4), 283–306. <https://doi.org/10.1111/sji.12329>
 - Muñoz-Fernández, S., Martín, J., Martín-Mola, E., García-Rodríguez, M. C., Cantalejo, M., Fontán, G., & Ferreira, A. (2001). Soluble HLA class I antigens in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Rheumatology (Oxford, England)*, 40(12), 1365–1369. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.12.1365>
 - National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Health Sciences Policy; Forum on Neuroscience and Nervous System Disorders, Stroud, C., Norris, S. M. P., & Bain, L. (Eds.). (2021). *Sex Differences in Brain Disorders: Emerging Transcriptomic Evidence: Proceedings of a Workshop*. National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/26058>
 - Oliveira, A. L., Thams, S., Lidman, O., Piehl, F., Hökfelt, T., Kärre, K., Lindå, H., & Cullheim, S. (2004). A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), 17843–17848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408154101>
 - Petersdorf E. W. (2013). The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood*, 122(11), 1863–1872. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-355982>
 - Pickl, W. F., Majdic, O., Faé, I., Reuschel, R., Holter, W., & Knapp, W. (1993). The soluble pool of beta 2-microglobulin free HLA class I alpha-chains. Qualitative

- and quantitative characterization. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 151(5), 2613–2622.
- Pontes, L. F. S., Levy, R. A., Souza, E. R. M., & Sampaio, J. C. (1998). Dosagem de HLA classe I solúvel no soro humano normal e de pacientes renais pré e pós-transplante. *Braz. J. Nephrol.*, 20(4), 419-424. https://bjnephrology.org/wp-content/uploads/2019/12/jbn_v20n4a08.pdf
 - Pordata (2023), consultado a 12 de Fevereiro de 2023. Disponível em: <https://www.pordata.pt/db/municipios/ambiente+de+consulta/tabela/5832509>
 - Puppo, F., Brenci, S., Lanza, L., Bosco, O., Imro, M. A., Scudeletti, M., Indiveri, F., & Ferrone, S. (1994). Increased level of serum HLA class I antigens in HIV infection. Correlation with disease progression. *Human immunology*, 40(4), 259–266. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0198-8859(94)90025-6)
 - Puppo, F., Scudeletti, M., Indiveri, F., & Ferrone, S. (1995). Serum HLA class I antigens: markers and modulators of an immune response?. *Immunology today*, 16(3), 124–127. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80127-8](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80127-8)
 - Radwan, J., Babik, W., Kaufman, J., Lenz, T. L., & Winternitz, J. (2020). Advances in the Evolutionary Understanding of MHC Polymorphism. *Trends in genetics: TIG*, 36(4), 298–311. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.01.008>
 - Reed, E., Lewison, A., Mayeaux, R., & Suciú-Foca, N. (1983). HLA antigens in Parkinson's disease. *Tissue antigens*, 21(2), 161–163. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1983.tb00384.x>
 - Reisberg B. (2007). Global measures: utility in defining and measuring treatment response in dementia. *International psychogeriatrics*, 19(3), 421–456. <https://doi.org/10.1017/S1041610207005261>
 - Rhynes, V. K., McDonald, J. C., Gelder, F. B., Aultman, D. F., Hayes, J. M., McMillan, R. W., & Mancini, M. C. (1993). Soluble HLA class I in the serum of transplant recipients. *Annals of surgery*, 217(5), 485–491. <https://doi.org/10.1097/00000658-199305010-00008>

-
- Shiina, T., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2004). An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue antigens*, 64(6), 631–649. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00327>
 - Smith, L. K., He, Y., Park, J. S., Bieri, G., Snethlage, C. E., Lin, K., Gontier, G., Wabl, R., Plambeck, K. E., Udeochu, J., Wheatley, E. G., Bouchard, J., Eggel, A., Narasimha, R., Grant, J. L., Luo, J., Wyss-Coray, T., & Villeda, S. A. (2015). β 2-microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis. *Nature medicine*, 21(8), 932–937. <https://doi.org/10.1038/nm.3898>
 - Trowsdale, J., & Knight, J. C. (2013). Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*, 14, 301–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153455>
 - Vetrano, D. L., Rizzuto, D., Calderón-Larrañaga, A., Onder, G., Welmer, A. K., Bernabei, R., Marengoni, A., & Fratiglioni, L. (2018). Trajectories of functional decline in older adults with neuropsychiatric and cardiovascular multimorbidity: A Swedish cohort study. *PLoS medicine*, 15(3), e1002503. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002503>
 - Washburn, L. R., Zekzer, D., Eitan, S., Lu, Y., Dang, H., Middleton, B., Evans, C. J., Tian, J., & Kaufman, D. L. (2011). A potential role for shed soluble major histocompatibility class I molecules as modulators of neurite outgrowth. *PloS one*, 6(3), e18439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018439>
 - Wissemann, W. T., Hill-Burns, E. M., Zabetian, C. P., Factor, S. A., Patsopoulos, N., Høglund, B., Holcomb, C., Donahue, R. J., Thomson, G., Erlich, H., & Payami, H. (2013). Association of Parkinson disease with structural and regulatory variants in the HLA region. *American journal of human genetics*, 93(5), 984–993. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.009>
 - Wolf, R. E., Adamashvili, I. M., Gelder, F. B., Hall, V. C., Fraser, P. A., & McDonald, J. C. (1998). Soluble HLA-I in rheumatic diseases. *Human immunology*, 59(10), 644–649. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(98\)00071-8](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(98)00071-8)
 - Wyatt, R. C., Lanzoni, G., Russell, M. A., Gerling, I., & Richardson, S. J. (2019). What the HLA-II-Classical and Non-classical HLA Class I and Their Potential Roles

- in Type 1 Diabetes. *Current diabetes reports*, 19(12), 159.
<https://doi.org/10.1007/s11892-019-1245-z>
- Zavazava, N., Westphal, E., & Müller-Ruchholtz, W. (1990). Characterization of soluble HLA molecules in sweat and quantitative HLA differences in serum of healthy individuals. *Journal of immunogenetics*, 17(6), 387–394.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-313x.1990.tb00890.x>

9. ANEXOS

ANEXO 1

**CONSENTIMENTO LIVRE, INFORMADO e ESCLARECIDO (CLIE)**

O meu nome é Ignacio Verde, sou actualmente professor da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (UBI) e investigador do Centro de investigação em Ciências da Saúde da UBI (CICS-UBI). Formamos uma equipa de mais de 50 investigadores (doutores e jovens investigadores) que procuramos identificar factores que estejam envolvidos na ocorrência de doenças do sistema nervoso.

Para podermos realizar esta pesquisa necessitamos da sua colaboração, que inclui autorização para consulta de dados dos seus registos clínicos (ver abaixo), a resposta a um questionário e a permissão e ajuda para colheita de amostras de produtos biológicos seus (incluindo sangue, urina, cabelo e unhas), para estudar os efeitos, e da cedência do saco de pó do seu aspirador (para procurar possíveis factores ambientais “tóxicos”).

Fica claro que a sua participação não tem benefícios financeiros ou contrapartidas para si, nem quaisquer encargos, apenas os incómodos relacionados com a resposta ao questionário e à colheita/fornecimento das amostras previstas.

Como benefícios a longo prazo poderá vir a ter o conhecimento dos resultados da investigação, que poderá vir a identificar elementos que, se corrigidos, lhe possam melhorar a qualidade de vida.

O grupo de investigadores não tem retorno financeiro, sendo que os custos da investigação estão suportados pelo Programa Operacional Centro 2020, que é um programa apoiado financeiramente pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e pelo Fundo Social Europeu (FSE).

Os seus dados pessoais só serão do conhecimento de Ignacio Verde, Fernando Aguilar Arosa e Manuel Ramiro Pastorinho e três colaboradores próximos contratados no âmbito do projecto e que os seus dados clínicos são tratados de forma absolutamente confidencial, isto é, não há qualquer divulgação de informações usadas. Os resultados obtidos serão usados única e exclusivamente para fins científicos e toda a informação relativa a este estudo permanecerá confidencial. A sua identidade como participante não será revelada e todas as referências que a possam comprometer serão eliminadas antes da publicação de relatórios ou artigos científicos.

Fica também claro que em qualquer altura pode desistir de colaborar, qualquer que seja o motivo, e assim recusar participar neste estudo a qualquer altura sem que isso prejudique os seus direitos em termos de assistência médica.

Para que a sua colaboração seja livre e esclarecida em caso de dúvida poderá sempre que necessitar obter as informações que necessite contactando Ignacio Verde (iverde@fcsaude.ubi.pt).

Cofinanciado por:





Espaço a preencher pelo interessado e pela instituição colaboradora.

Neste âmbito, o **participante**, _____,
(ESCREVER O NOME COMPLETO DO PARTICIPANTE)

ou a pessoa **responsável**, _____, **afirma que:**
(ESCREVER O NOME COMPLETO DO RESPONSÁVEL)

- 1) Concorda na participação voluntária no presente estudo;
- 2) Aceita que as amostras sejam usadas para o desenvolvimento do estudo e que sejam preservadas para estudos futuros;
- 3) Concorda em que sejam consultados os dados clínicos estritamente necessários para realizar o estudo. Esta consulta deve ser realizada pelos investigadores do estudo (Ignacio Verde, Fernando Aguilar Arosa e Manuel Ramiro Pastorinho) e por clínicos da instituição envolvida.

Ao assinar o presente consentimento, o participante ou a pessoa responsável, **declara que:**

- Leu todo o conteúdo deste consentimento informado;
- Compreendeu e estou de acordo com o que será efetuado;
- Recebeu todas as informações que desejava conhecer e tive possibilidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas;
- Recebeu uma cópia desta informação, que mantere em minha posse.

NÃO ASSINE ESTA FOLHA ANTES DE A TER LIDO ATENTAMENTE, COMPREENDIDO E ACEITE.

DATA: ____/____/____

ASSINATURA DO PARTICIPANTE NO PROJECTO OU DO FAMILIAR RESPONSÁVEL

ASSINATURA DA TESTEMUNHA (investigador ou membro da equipa técnica da instituição)

Espaço a preencher pelo responsável do Projecto

Eu, abaixo assinado, **Ignacio Verde**, investigador responsável, certifico que foram postas à disposição, informações respeitantes ao estudo supracitado, “de modo simples, inteligível e leal”, conforme o disposto no Decreto-Lei nº 97/94, de 09 de abril, e criadas condições para respostas a dúvidas e os esclarecimentos requeridos, que foram satisfeitos adequadamente.

Data: ____/____/____

ASSINATURA DO INVESTIGADOR RESPONSÁVEL DO PROJECTO (Ignacio Verde)

Cofinanciado por:

