



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais**



**Instituto Politécnico  
de Coimbra**

# **HLA – B27 E SEVERIDADE DAS ARTROPATIAS**

**Verónica Franco Martins Comba**

**Coimbra**

**2017**



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais**



## **HLA-B27 e Severidade das Artropatias**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, equiparado a Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação do Dr. António José Martinho Gomes Teixeira, assessor superior da Carreira Técnica Superior de Saúde do Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra, IPST IP.

## **Dedicatória**

Ao Comba, meu porto seguro, pelo infinito apoio, pela força de sempre, por seu amor, pela felicidade que me concede ! A **KIESSE** que é o fruto do nosso amor.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, em que me espelho todos os dias.

**Agradecimentos** A Deus pai todo-poderoso, pelo dom da vida e proteção nos momentos atribulados.

Ao instituto português do sangue e da transplantação pela oportunidade que me foi concedida, em particular ao Dr. Artur Paiva pela acessibilidade e orientação.

Ao Dr. António Martinho pela acessibilidade, confiança, incentivo, que apesar dos inúmeros afazeres, aceitar mais este desafio de orientar o meu trabalho.

A Dra. Ana Valado pelo apoio, incentivo, confiança, que mesmo distante tirava uns minutos do seu precioso tempo para enviar-me aulas por mail visto que fui a ultima aluna a se apresentar nas aulas devido alguns problemas pessoais.

A uma amiga muito especial Olga Francisco pelo apoio nos momentos mais difíceis, infinita amizade, camaradagem, compreensão, por tudo...Obrigado!

As minhas colegas e amigas Letícia Carneiro, Ana Raquel Carvalho, Maria João Mendes Dinis dos Santos, Joana Rita, pela amizade e camaradagem.

Aos colegas João Marques, Júlio Loureiro, Rodolfo Ferreira, Susana Santos, Dalila Patrício, pela convivência e camaradagem.

Aos meus tios Lino, João, Cecília, Luzia, Júlia, por acreditarem sempre em mim e aconselhar-me quando precisei. Muito obrigado!

A direção da Clínica Sagrada Esperança, Angola pelo apoio financeiro, em particular ao Dr. Rui Pinto.

Ao Dr. Esmael Tomás, pelo apoio e incentivo. Muito obrigado!

Aos meus irmãos Franco, Lucas, e Hélio por estarem ao meu lado e aturar as minhas ausências.

A toda minha família pelos momentos de felicidade compartilhados, pelo apoio, pela amizade e carinho. Muito obrigado!

Por fim, e não menos importante, a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a minha realização pessoal e profissional.

Muito obrigado!

## **Júri**

Doutora Ana Maria de Figueiredo Valado, Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública, Professora Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutora Paula Margarida Santos Laranjeira, Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

## Resumo

**Introdução** - As espondiloartropatias formam um grupo de doenças que compartilham algumas características clínicas e genéticas. Do ponto de vista clínico, as manifestações são, frequentemente, heterogêneas. É constituído pelas seguintes doenças: espondilite anquilosante, artrite psoriásica, artrite reativa e artrite associada à doença inflamatória intestinal (Doença de Crohn/colite ulcerativa). A associação destas doenças e especialmente da espondilite anquilosante com o HLA B27, é muito poderosa, o que fez pensar que esta molécula tem um papel importante na sua patogénese.

**Objectivo**- Foi objectivo deste trabalho avaliar a frequência do antígeno HLA-B27 nas populações de doentes ainda sem diagnóstico e provenientes da consulta de reumatologia, em doentes com espondilite anquilosante comparando-as com a distribuição da frequência numa população saudável. Constituiu ainda objectivo, verificar e comparar a distribuição das frequências dos alelos HLA-B\*27, entre os indivíduos HLA-B27+.

**Material e Métodos** - Para a realização desta avaliação foram definidos 3 grupos populacionais: no grupo 1 foram incluídos doentes provenientes do serviço de reumatologia do centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, ainda sem diagnóstico atribuído enquanto que o grupo 2 foi constituído por doentes com o diagnóstico de espondilite anquilosante estabelecido. O grupo 3 serviu como controlo e era constituído por dadores saudáveis, representativos da população portuguesa.

O ADN foi extraído de sangue periférico com recurso ao reagente *MagAttract<sup>®</sup> DNA Blood Midi M48 kit*. A pesquisa de HLA-B\*27 foi executada por amplificação dos 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> exões do gene HLA-B usando o reagente *LABType<sup>®</sup> SSO Typing Tests da One Lambda<sup>®</sup>*. As amostras HLA-B27+ foram submetidas a sequenciação capilar automática para determinação dos alelos HLA-B\*27 com o kit *SeCore<sup>®</sup> Express HLA Sequence-Based typing da One Lambda*.

**Resultados** - Na população doente com EA foi encontrada uma elevada frequência antígeno HLA-B27 (93%). Nos grupo 1, a frequência do B27 foi nitidamente inferior à do grupo 2 (EA) mas, quando comparada com a frequência na população saudável, mostrou-se significativamente superior (13% versus 5%). Já no que respeita à avaliação da frequência alélica, o alelo HLA-B\*27:05 foi o mais frequente nos 3 grupos estudados.

**Conclusão** - A forte associação HLA-B27 com espondilite anquilosante foi verificada e a sua frequência foi semelhante à reportada noutros estudos. Também a nível alélico, verificou-se que o alelo mais frequente nas populações estudadas é o HLA-\*27:05.

## Palavras-chave

espondilite anquilosante, HLA-B27, alelos HLA-B\*27

## Abstract

**Introduction** - Spondyloarthropathies are a group of diseases that share some clinical and genetic characteristics. From the clinical point of view, the manifestations are often heterogeneous. It consists of the following diseases: ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, reactive arthritis and arthritis associated with inflammatory bowel disease (Crohn's disease / ulcerative colitis). The association of these diseases and especially of ankylosing spondylitis with HLA B27, is very powerful, which made think that this molecule plays an important role in its pathogenesis.~

**Objective** - The aim of this study was to evaluate the frequency of HLA-B27 antigen in the populations of patients who were not yet diagnosed and coming from the clinical consultation of rheumatology, in patients with ankylosing spondylitis, comparing them with frequency distribution in a healthy population. It was also an objective to verify and compare the frequency distribution of HLA-B \* 27 alleles among HLA-B27 + individuals.

**Material and Methods** - Three population groups were defined: group 1, patients from the rheumatology department of the Hospital and University of Coimbra, still without assigned diagnosis, while group 2 was composed of patients with the established diagnosis of ankylosing spondylitis. Group 3 served as control and consisted of healthy donors, representative of the Portuguese population.

DNA was extracted from peripheral blood using the MagAttract® DNA Blood Midi M48 kit. HLA-B \* 27 screening was performed by amplification of the 2nd and 3rd HLA-B gene samples using One Lambda® LABType® SSO Typing Tests reagent. The HLA-B27 + samples were subjected to automatic capillary sequencing for determination of the HLA-B \* 27 alleles with the One Lambda SeCore® Express HLA Sequence-Based typing kit.

**Results** - In the patient population with AS, a high HLA-B27 antigen frequency (93%) was found. In group 1, the frequency of B27 was markedly lower than that of group 2 (AE) but, when compared to the frequency in the healthy population, it was significantly higher (13% versus 5%). Regarding the evaluation of allelic frequency, the HLA-B \* 27: 05 allele was the most frequent in the 3 groups studied.

**Conclusion** - The strong association HLA-B27 with ankylosing spondylitis was verified and its frequency was similar to that reported in other studies. Also at the allelic level, the most frequent allele in the studied populations was HLA- \* 27: 05.

**Key words:** ankylosing spondylitis, HLA-B27, HLA-B\*27 alleles

# ÍNDICE

## 1. INTRODUÇÃO

1.1 Espondiloartropatias.....	1
1.2 Espondilite anquilosante.....	3
1.2.1 Características Clínicas.....	5
1.2.2 Manifestações clínicas e radiográficas.....	5
1.2.3 Características radiológicas.....	7
1.3 MHC: Complexo Major de Histocompatibilidade.....	8
1.3.1 Estrutura e Função das moléculas HLA.....	10
1.3.2 Associações HLA e doença.....	12
1.3.3 HLA-B27 e espondilite anquilosante.....	14
1.3.4 Distribuição de frequências dos alelos HLA-B*27 em diferentes grupos populacionais.....	17

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Populações incluídas no estudo.....	19
2.1.1 Ética.....	19
2.1.2 Amostra biológicas.....	20
2.2. Métodos	
2.2.1 Extracção de ADN das amostras.....	21
2.2.2 Tipagem genética- grupo antigénico HLA-B – por RSSO Luminex® (LABType® SSO Typing Tests da One Lambda®).....	22
2.2.3 Amplificação do gene HLA-B.....	23
2.2.4 Desnaturação/ Neutralização e Hibridização .....	24
2.2.5 Interpretação das leituras de fluorescência e determinação dos alelos HLA-B .....	25
2.2.6 Sequenciação do gene HLA-B para determinação da sequência alélica HLA-B27 nos doentes e dadores de painel HLA-B27+.....	25



2.2.7 Amplificação do locus HLA-B usando os reagentes <i>SeCore® Express HLA Sequence-Based typing</i> .....	26
2.2.8 Purificação dos produtos de PCR com ExoSAP-IT® .....	27
2.2.9 Reacção de sequenciação locus HLA-B usando os reagentes <i>SeCore® Express HLA Sequence-Based typing</i> .....	28
2.2.10 Análise estatística.....	30
3 - RESULTADOS.....	31
4 - DISCUSSÃO.....	33
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	37

## Lista de Figuras

- Fig.1** Localização do MHC no cromossoma 6 de acordo com a estrutura, expressão e função dos antígenos.
- Fig.2** Estrutura das moléculas HLA classe I e II
- Fig.3** Interação MHC-Peptídeo-TCR
- Fig.4** Localização espacial das posições polimórficas dos subtipos HLA-B27.
- Fig.5** Molécula HLA-B27 com um péptido encaixado, onde se encontram os resíduos mais polimórficos.
- Fig.6** Extração de ADN pelo método de *Salting out*
- Fig.7** Esquema ilustrativo da metodologia rSSO (Luminex®).
- Fig.8** Reacção de amplificação dos exões 1, 2 e 3 do gene HLA-B para posterior sequenciação.
- Fig.9** Esquema representativo da etapa de purificação dos produtos obtidos na reacção de amplificação, para posterior sequenciação.
- Fig.10** Esquema da metodologia de sequenciação para caracterização alélica HLA-B\*27
- Fig.11** Distribuição de frequências dos alelos HLA-B\*27 nas populações estudadas (Grupo1- doentes provenientes da consulta de reumatologia dos HUC; Grupo2- Doentes com espondilite anquilosante; Grupo3- população controlo saudável)

## Lista de Tabelas

- Tabela 1** Demonstração da forte associação entre a Espondilite Anquilosante e a proteína HLA-B27 e frequência na população normal, saudável não excede os 10% o que confere à presença da molécula B27, nos doentes, um risco relativo extremamente elevado (>150). (20)
- Tabela 2** Caracterização dos grupos incluídos nesta avaliação. (Grupo1- doentes provenientes da consulta de reumatologia dos HUC; Grupo2- Doentes com espondilite anquilosante; Grupo3- população controlo saudável), género e idade.
- Tabela 3** Programa de PCR usado na amplificação dos genes HLA.
- Tabela 4** Programa de *PCR* utilizado para amplificação de amostras de ADN destinadas à Sequenciação.
- Tabela 5** Programa de *PCR* utilizado para sequenciação cíclica.
- Tabela 6** Frequência do grupo alélico HLA-B\*27 nas 3 populações estudadas (Grupo1- doentes provenientes da consulta de reumatologia dos HUC; Grupo2- Doentes com espondilite anquilosante; Grupo3- população controlo saudável)