

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Espondiloartropatias

As espondiloartropatias formam um grupo de doenças que compartilham algumas características clínicas e genéticas. Do ponto de vista clínico, as manifestações podem ser muito diferentes: o comprometimento das articulações axiais (sacroilíacas), da coluna (espondilite) e das articulações periféricas, sobretudo oligoartrites que afetam preferencialmente as extremidades inferiores são características muito importantes destas manifestações embora estejam presentes em diferentes doenças com frequência diferente. (1)

A artrite periférica em geral não costuma ser erosiva, o fator reumatóide é sempre negativo, não se apresentam nódulos reumatóides mas o envolvimento extra-articular com a inflamação dos olhos, mucosas ou entese (local onde os tendões se unem ao osso) é muito comum. A entesite é uma característica comum das espondiloartropatias (SPA) e é algumas vezes mais frequente e notória que encontrar artrite na história clínica ou no exame físico. Um local de entesite é a inserção do tendão de Aquiles no calcâneo.

O termo espondiloartrite seronegativa é utilizado para denominar um grupo de enfermidades que afetam a coluna vertebral mas que apresentam resultado fator reumatóide negativo constituído pelas seguintes doenças: espondilite anquilosante, artrite psoriásica, artrite reativa e artrite associada à doença inflamatória intestinal (Doença de Crohn/colite ulcerativa).

As três entidades espondiloartropáticas mais comuns, nomeadamente espondilite anquilosante, artrite psoriática e síndrome de Reiter, partilham muitas características radiológicas e patológicas com a artrite reumatóide. Têm igualmente envolvimento das articulações sinoviais associada a considerável inflamação da membrana sinovial.

1.1.1 Quadro 1 – Espondilartrites

. Espondilite Anquilosante	
. Síndrome de Reiter	
	Pós-disentérico
	Artrite Reativa Sexualmente Adquirida
	Secundário à infeção por HIV
. Artrite Psoriásica	
. Artrite Enteropática	
	Doença Inflamatória do Intestino (Doença de Crohn, Colite
	Ulcerosa e Doença de Whipple)
. Doença de Behcet	
. Espondilartrite Indiferenciada	
. Artropatia do Acne	
. Síndrome SAPHO	

(Retirado de: Espinoza LR, Cuellar ML 1997)

As três entidades espondiloartropáticas mais comuns, nomeadamente espondilite anquilosante, artrite psoriática e síndrome de Reiter, partilham muitas características radiológicas e patológicas com a artrite reumatóide. Têm igualmente envolvimento das articulações sinoviais associada a considerável inflamação da membrana sinovial.

A associação dessas doenças e, especialmente, da espondilite anquilosante com o HLA B27, é muito poderosa, o que fez pensar que esta molécula tem um papel importante em sua patogénese. (2)

Em epidemias de diarreia causada por infecções artrítogénicas, a frequência de HLA-B27 em pacientes com artrite reativa posterior à diarreia é menor 30%, e por sua vez dos indivíduos B27 expostos à infecção, apenas 20% desenvolverá uma artrite reativa. A infecção poderia atuar como um “gatilho”.

A mucosa intestinal é uma das portas de entrada para agentes infecciosos ou antígenos bacterianos. Cerca de metade dos pacientes com espondilite anquilosante tem uma inflamação subclínica no íleo distal do tipo Doença de Crohn, diagnosticada por colonoscopia. Esses achados têm sido descritos em menor frequência na artrite psoriática, com comprometimento axial sugerindo mecanismos patogénicos comuns. (3,5)

O antecedente de uma infecção intestinal ou urinária é frequente nas artrites reativas e crê-se numa relação entre infecção persistente nas placas da psoríase e artrite. Haveria uma infecção persistente, ou uma reação a produtos bacterianos contidos nas articulações ou enteses durante uma bacteremia. Essas hipóteses têm sugerido o uso de antibióticos, pelo menos nas fases iniciais, como um tratamento para algumas artrites reativas.

1.2 ESPONDILITE ANQUILOSANTE

A espondilite anquilosante é uma desordem inflamatória crónica de causa desconhecida que afeta primariamente o esqueleto axial, embora possa haver também significativo envolvimento do esqueleto apendicular.

Ocorrem alterações nas articulações cartilaginosas e sinoviais e nos locais de inserção dos ligamentos e tendões nos ossos (enteses).

As articulações da coluna vertebral tendem a ser “soldadas” umas às outras, causando uma limitação da mobilidade (daí o termo anquilosante, que vem do

A primeira descrição detalhada da Espondilite Anquilosante terá sido feita pelo médico irlandês Bernhard Connor em 1691. De acordo com Bywaters, Connor descreveu um esqueleto que encontrou numa sepultura, no qual, o íliaco, o sacro e vértebras adjacentes formavam uma unidade única.

Seguiram-se outras descrições, como as de Thomas Sydenham e Benjamin Travers (1824). Estes autores foram claramente diferenciando a Espondilite Anquilosante de outras doenças, como a miosite ossificante progressiva, a hiperostose vertebral ou a tuberculose.

No entanto, as descrições mais conhecidas são as do neurologista russo Wladimir Von Bechterew, em 1893 (S. Petersburgo), que propôs a designação “inflamação anquilosante da coluna e grandes articulações dos membros”, de Strümpell, em 1897 (Berlim) e por Pierre Marie, em 1898 (Paris) que faz uma detalhada descrição da doença, no que foi seguido por um dos seus discípulos, Leri, o qual utilizou material de autópsia para ilustrar as manifestações patológicas.

Assim, a doença foi também conhecida por doença de síndrome von Bechterew e por doença de Marie-Strümpell.

Várias outras designações foram utilizadas, como Espondilite Reumatoide, Espondilite Rizomérica ou ainda Espondilite Anquilopoiética.(4)

É difícil determinar a prevalência verdadeira, todavia a espondilite anquilosante é uma causa comum da dor lombar e limitação funcional, especialmente nos jovens do sexo masculino; sendo estimada a sua prevalência de aproximadamente 0,1%.

O ratio da doença nos homens *versus* mulheres varia entre 4:1 a 10:1. Ocorre entre os 15 e 35 anos (média de idade entre 26 a 27 anos).

1.2.1 Características Clínicas

1.2.2 Manifestações Clínicas e radiográficas

As manifestações clínicas precoces são geralmente notadas na região lombar (70% a 80%), articulações periféricas (10 a 20%). A dor ciática pode ser o sintoma inicial em 5% a 10% dos doentes.

Os sintomas constitucionais incluem anorexia, perda ponderal e febre.

20% dos adultos com espondilite anquilosante progridem para significativa limitação funcional.

A lombalgia ocorre quando o doente está em repouso, melhorando com a actividade física. Desta forma, a dor é geralmente pior nas últimas horas da noite e de manhã cedo. Quando a pessoa se levanta e inicia a actividade normal, existe alívio ou até mesmo desaparecimento da dor.

Com o tempo, a dor e a rigidez podem evoluir para a coluna dorsal e cervical. As vértebras fundem-se, fazendo com que a coluna perca flexibilidade e se torne rígida, limitando os movimentos. A grelha costal também pode ser afectada, causando a dor e diminuição da expansão do peito.

A espondilite anquilosante é uma doença sistémica, o que significa que podem ser afetados outros órgãos do corpo. Em algumas pessoas, pode ocorrer febre, perda de apetite, fadiga ou envolvimento de outros órgãos, como pulmões e coração, embora isto aconteça raramente.

Pode haver uma diminuição da função pulmonar, por diminuição da elasticidade do tórax. Nesse sentido, as pessoas que sofram desta doença devem evitar fumar. (6)

Podemos dividir as manifestações desta doença em esqueléticas e extra-esqueléticas:

- Manifestações esqueléticas:
 - Sacroileite
 - Espondilite (lombar e cervical)
 - Artrite das articulações pélvicas e escapulares
 - Artrite periférica (Joelhos, tibiotársicas, etc.)
 - Espondilodiscite
 - Entesopatia
 - Osteoporose

- Manifestações extra-esqueléticas:
 - Uveíte anterior aguda
 - Doença cardiovascular
 - Doença pulmonar
 - Síndrome da cauda equina
 - Lesões da mucosa intestinal
 - Amiloidose

Os sintomas sistémicos, que consistem em febre, emagrecimento e mal-estar generalizado, podem estar presentes em todas as Espondiloartropatias SpA.
(7)

O quadro clínico tem muitas variantes e as suas manifestações dependem da severidade das mesmas e da simultaneidade ou não da agressão de vários órgãos.

1.2.3 Características radiológicas

A artropatia psoriática caracteriza-se radiologicamente por:

1. Tumefação fusiforme das partes moles dos dedos e das mãos, que corresponde ao diagnóstico clínico de dactilite.
2. Conservação da densidade radiológica.
3. Redução uniforme do espaço articular.
4. Proliferação óssea.
5. Erosões em “lápiz na taça”.

As características distintivas da artrite psoriática são a proliferação óssea em forma de marcada esclerose subcondral e de reação periostática, com atingimento das articulações interfalângicas distais.

As erosões articulares têm uma localização marginal, mas também podem estender-se para o centro da articulação ou ao longo da diáfise óssea, associada a esclerose endosteal ou reação periostática como manifestação da entesite.

A espondilite caracteriza-se pela apresentação de sidosmófito grosseiro, de maiores dimensões do que na espondilite anquilosante que podem ser unilaterais ou bilaterais, com uma distribuição intercalada que respeita alguns espaços disciais. As articulações interapofisárias podem ser afetadas ou não.

O atingimento das articulações sacroilíacas caracteriza-se com o predomínio das erosões e das alterações de esclerose muito mais acentuadas do que na espondilite anquilosante, sendo menos frequente nesta a anquilose.

É frequente o atingimento isolado da coluna cervical que pode cursar com afetação e subluxação atlanto-axiais. (8)

Do ponto de vista genético, estão associados com o HLA-B27, um antígeno de histocompatibilidade classe I, cuja função é apresentar peptídeos aos linfócitos CD8. Existe uma alta frequência do antígeno HLA-B27 nos doentes com espondilite anquilosante. Na maioria dos casos reportados, mais de 90% dos doentes caucasoides possuem o antígeno HLA-B27. A frequência na

população é de aproximadamente 6% a 8%. O subtipo B27 mais comum no Ocidente é o subtipo B * 27:05. (9)

1.3 MHC: Complexo Major de Histocompatibilidade

O Complexo Principal de Histocompatibilidade, “Complexo Major de Histocompatibilidade” (MHC), localizado fisicamente no braço curto do cromossoma 6 no segmento 6p21.3, ocupa aproximadamente 4 milhões de pares de base (pb) e contém, pelo menos, 200 genes, pseudogenes e fragmentos génicos (10). É um dos mais poligénicos do genoma humano, composto por genes maioritariamente funcionais, altamente polimórficos cujos produtos se expressam na superfície de uma grande variedade de células e que têm um papel central no desenvolvimento da resposta imunológica.

Inicialmente descrito por Jean Dausset nos anos de 1950, está presente em todos em todos os vertebrados e no Homem é comumente designado por sistema HLA – “Human Leucocyte Antigens”, estando historicamente associados à aceitação ou rejeição dos aloenxertos. (11)

As proteínas codificadas por estes genes são designadas por antígenos HLA e são de longe as proteínas mais polimórficas descritas nos humanos. Uma outra característica relevante é que estes genes são co-dominantes, sendo herdados de cada progenitor como haplotipos, de forma Mendeliana. Recombinações ocorridas na transmissão dos haplotipos estão na base do aparecimento de novas combinações alélicas. (12)

As pressões evolutivas proporcionaram um nível surpreendente de poligenia e polimorfismo, que agem no sentido de possibilitarem a denominação de “geneticamente único”.

O envolvimento das moléculas HLA no reconhecimento e apresentação de antígenos próprios ou externos, aos linfócitos T, está bem documentado e é reconhecidamente esta a sua principal função (13)

De acordo com a origem genética e/ou funcionalidade biológica dos seus produtos, o conjunto de genes do MHC tem sido tradicionalmente dividido em 2 – 4 grupos. (14)

Actualmente, o MHC está dividido três grandes regiões (região I, II e III), se bem que a identificação e caracterização constante de novos genes não exclua futuras revisões desta classificação (Fig 1).

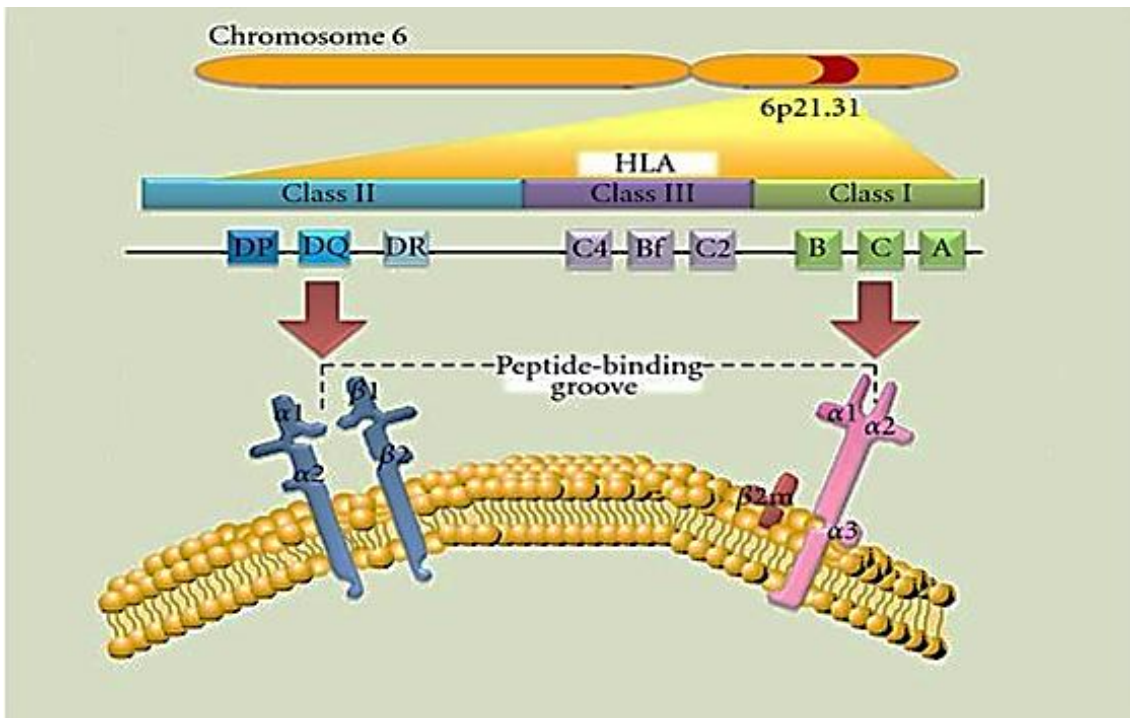


Fig. 1- Localização do MHC no cromossoma 6. Os genes HLA estão agrupados por classes (Classe I e II) de acordo com a estrutura, expressão e função dos antígenos. A Região III não é uma região HLA codificando contudo proteínas que intervêm na resposta imunológica. As estruturas das proteínas HLA classe I e II estão esquematicamente representadas. (Adaptado de : Ayala Garcia MA, Gonzalez Yebra B, Lopez Flores AL, Guani Guerra E. The major histocompatibility complex in transplantation. Journal of transplantation. 2012;2012:842141)

1.3.1 Estrutura e Função das moléculas HLA

A região HLA classe I situa-se telomericamente em relação à classe II e ocupa um segmento de 1600 kilobases (kb). Os genes HLA classe I codificam as moléculas clássicas HLA-A, -B e -C e as moléculas não clássicas HLA-E, -F e -G.

As moléculas MHC classe I codificadas pelos *loci* A, B e C foram as primeiras a serem descobertas e são expressas numa gama variada de tipos de células. São glicoproteínas transmembranares constituídas por uma única cadeia polipeptídica α . A sua estabilidade e funcionalidade à superfície da célula é garantida pela presença da β 2-microglobulina, associada à sua estrutura.

Esta cadeia polipeptídica está organizada em 3 domínios α , em que os mais distais relativamente à membrana, os domínios α 1 e α 2, estão directamente envolvidos na fixação e apresentação de peptídeos estranhos aos receptores das células T, apresentando por isso um maior grau de polimorfismo.(15)

De uma forma estrutural, as moléculas HLA Classe I podem encontrar-se na maioria das células somáticas, com diferentes níveis de expressão dependendo do tecido observado. Alguns tecidos podem expressar níveis baixos ou insignificantes de antigénios clássicos HLA classe I (ex.na interface mãe-feto para garantir e facilitar a tolerância do tecido fetal que se comporta como um aloenxerto) e, para além disso, a expressão destes antigénios é também diferenciada de acordo com o locus a que pertence (HLA-C é normalmente menos expresso que o HLA-B).

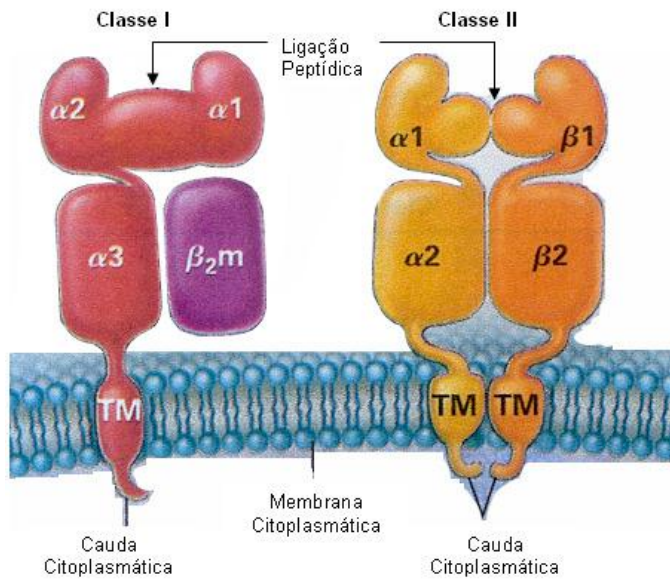


Fig. 2. Estrutura das moléculas HLA classe I e II. (retirado de Eren E, Travers P. 2000)

A região HLA classe II é a mais centromérica e compreende cerca de 900 Kb de material genético. Divide-se em três grandes sub-regiões clássicas que codificam os antígenos HLA-DP, -DQ e -DR. Estas proteínas são heterodímeros transmembranares constituídos por duas cadeias polipeptídicas glicosiladas, não covalentemente ligadas: uma cadeia α e uma cadeia β , codificadas respectivamente por um gene A e B (15).

Tal como acontece para as moléculas HLA classe I, os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ das cadeias polipeptídicas formam o sulco onde se encaixa o péptido e correspondem assim à superfície molecular reconhecida pelo receptor das células T (TCR). Nestas moléculas da classe II, o sulco é um pouco maior do que o das moléculas da classe I, o que permite a ligação de péptidos de maior dimensão, contribuindo assim para um aumento da flexibilidade da ligação.(16)

Nesta região estão localizados outros genes que codificam proteínas não HLA mas que participam activamente nos mecanismos de processamento e apresentação de antígenos. Particularmente relevantes são os conjuntos de genes TAP e LMP que codificam respectivamente as proteínas transportadoras e os proteosomas de baixo peso molecular, envolvidos no transporte e no

processamento de péptidos a serem apresentados à célula T pela molécula HLA. (17)

A expressão destas glicoproteínas HLA de classe II está confinada a células apresentadoras de antígenos (APC) incluindo células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T ativados, macrófagos e células endoteliais. A sua expressão poderá ser induzida em outras células.

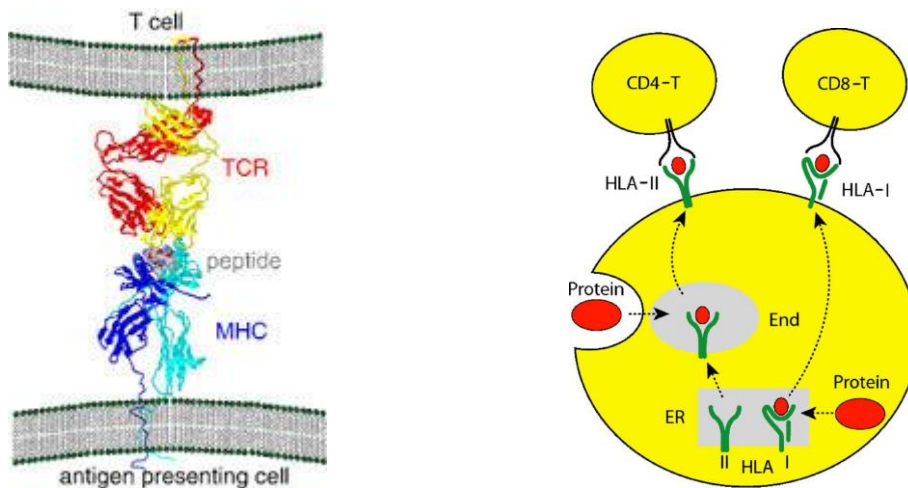


Fig 3- Interação MHC-Peptídeo-TCR. (Adaptado de Erik Thorsby, Benedicte A. Lie. 2005 Transplant Immunology 14: 175 – 182)

Tal como referido anteriormente a principal função das moléculas HLA reside na capacidade de ligar e apresentar antígenos às células T. Estes péptidos, juntamente com as proteínas HLA que os apresentam, são reconhecidos pelos receptores das células T (TCR), formando um complexo ternário trimérico, e assim dando início a uma resposta imunológica.

1.3.2 Associações HLA e doença

O complexo HLA tem vindo a ser associado com centenas de variadas doenças quase todas pertencentes ao grupo de patologias auto-imunes. (1 da Zuckman). Infelizmente, e mais de 30 anos após a determinação das primeiras associações, para a maior parte destas doenças ainda se não conseguiu descrever o mecanismo molecular que está na base da sua associação com

determinados antígenos HLA. O extenso polimorfismo e poligenia deste complexo, permitindo múltiplas combinações de proteínas HLA de diferentes locus, a sua expressão co-dominante, a transmissão em bloco haplotípico, adicionados ao facto da maioria das doenças possuírem um carácter multifactorial genético e ambiental, têm sido as mais fortes limitações ao entendimento dos referidos mecanismos (17). Para além disso, também o desconhecimento dos auto-antígenos relevantes e que poderão estar na origem de uma resposta auto-imune não permitiu ainda a análise tridimensional das interações HLA-peptídeo e receptor da célula T (TCR).

Dada a heterogeneidade clínica das doenças auto-imunes, a idade em que ocorrem e o aparecimento de outras patologias associadas, a severidade e rapidez de progressão, os mecanismos propostos para a etiopatogenia da maioria destas doenças são meramente hipotéticos. As células T serão activadas localmente por um peptídeo derivado do autoantígeno específico do tecido tendo como resultado a destruição do tecido autólogo em consequência de uma resposta imunológica.

Através de estudos familiares e populacionais foi possível encontrar associações positivas e negativas com as moléculas HLA bem como determinar o risco relativo dessas associações.

De entre as centenas de doenças associadas ao HLA, só de muito poucas foram estabelecidos de forma inequívoca o autoantígeno e os alelos HLA associados. São exemplo disso a doença celíaca e a diabetes *mellitus* tipo I. Nos outros casos, foram colocadas hipóteses com base nos alelos HLA envolvidos mas sem possibilidades de estabelecer a análise funcional em virtude de se desconhecer o autoantígeno que originou a doença. Um dos exemplos mais ilustrativos de uma doença em que há uma forte e comprovada associação a um antígeno HLA mas cujos mecanismos moleculares não estão estabelecidos é a Espondilite Anquilosante (EA). (19)

1.3.3 HLA-B27 e espondilite anquilosante

A forte associação entre a Espondilite Anquilosante e a proteína HLA-B27 é conhecida há cerca de 40 anos. Cerca de 95% dos doentes com Espondilite Anquilosante possuem o antigénio HLA classe I, HLA-B27. A sua 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).

Doença	Antigénio HLA Associado	Freq. nos Doentes	Freq. na População	Risco relativo
Espondilite Anquilosante	B27	>95%	<9%	>150
Uveíte Anterior Aguda	B27	68%	9%	>20
Psoríase Vulgar	Cw6	87%	33	7
Narcolepsia	DQ6	>95%	33%	>38
Miastenia Grave	DR3	50%	27%	2
Doença de Adisson	DR3	50%	27%	5
Artrite Reumatoide	DR4	81%	33%	9
Doença Celíaca	DQ2	99%	28%	>250
Esclerose Múltipla	DR2,DQ6	86%	33%	12
Diabetes Tipo I	DQ8	81%	23%	14

TABELA 1: Exemplos de associações HLA e doença

Esta proteína HLA da classe I é codificada por 154 sequências alélicas diferentes (*IMGT HLA database Release 32.25 de Julho de 2016*). É, juntamente com o antigénio HLA-A2, o antigénio HLA classe I mais bem conhecido. Tem sido extensivamente estudada pelas suas variações estruturais e pelo papel funcional que desempenha pela forte associação com a espondilite anquilosante (EA) e também com a artrite reactiva, incluindo o Síndrome de Reiter.

A variabilidade alélica, obtida por sequenciação exaustiva do ADN de várias populações a nível mundial, contribuiu fortemente para ilustrar a grande diversidade alélica da HLA-B27.

No anexo 1 estão representadas os alinhamentos proteicos mais frequentes nas populações estudadas. Todavia, há actualmente 154 proteínas descritas (em consequência das sequências de ADN obtidas) embora a avaliação antigénica funcional só tenha sido reconhecida em 32. (21)

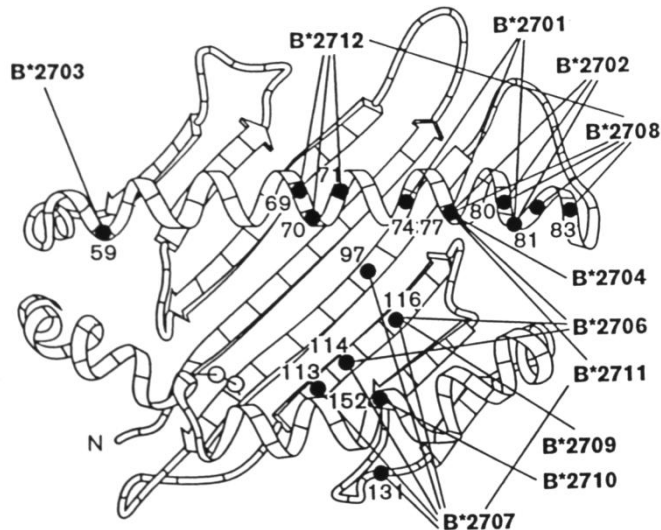


Fig. 4 Localização espacial das posições polimórficas dos subtipos HLA-B27. O alelo de referência é o HLA-B*27:05 (adaptado de Lopes de Castro J. 1998).

Alguns dos vários subtipos de proteínas diferem entre si num único aminoácido que, por vezes, tem a capacidade de conferir funcionalidades diferentes. Isto devido ao facto de a maior parte dos polimorfismos identificados estarem localizados na “groove”, local de ligação do péptido a ser apresentado ao TCR. Esta observação sugere que poderá ser a forma como o peptídeo estabelece a ligação à cavidade (groove) da HLA-B27 que estará mais intimamente relacionada com a doença.

A estrutura tridimensional da molécula foi estabelecida para o alelo HLA-B*27:05 devido ao facto de ser o mais frequente em todas as populações. Foram identificados seis “pockets” que permitem a “ancoragem do peptídeo e que foram designados de A a F. (22)

A estrutura tridimensional da molécula HLA B27 revela que a ligação dos peptídeos acontece de forma semelhante a todas as outras moléculas HLA

classe I (23). Os resíduos dos pockets A e F são conservados e permitem a estabilização dos terminais amino e carboxilo dos peptídeos. De realçar que nos peptídeos eluídos da molécula HLA-B27, em todos se mantinha conservada uma arginina na segunda posição. Como tal, este aminoácido na segunda posição foi considerado um resíduo “âncora” para a molécula HLA B27. As 12 proteínas B27 representadas no esquema da figura. 4 diferem entre si em 17 posições estando a maioria localizadas nos “pockets ancoradores” de peptídeos, particularmente nos pockets C/F mas nunca no B. A selectividade do peptídeo é grandemente determinada pelo seu pocket B, que, tridimensionalmente, é uma cavidade polar profunda na qual se aloja a cadeia lateral do 2 (segundo aminoácido) do peptídeo. Esta cadeia lateral pertencerá ao aminoácido arginina, que tal como referido, será um resíduo âncora.

Porém, os outros resíduos polimórficos presentes nos pockets mais centrais parecem contribuir de forma relevante para a ligação peptídeo / B27 seleccionando também os peptídeos que se poderão ligar a um determinado subtipo proteico HLA-B27.

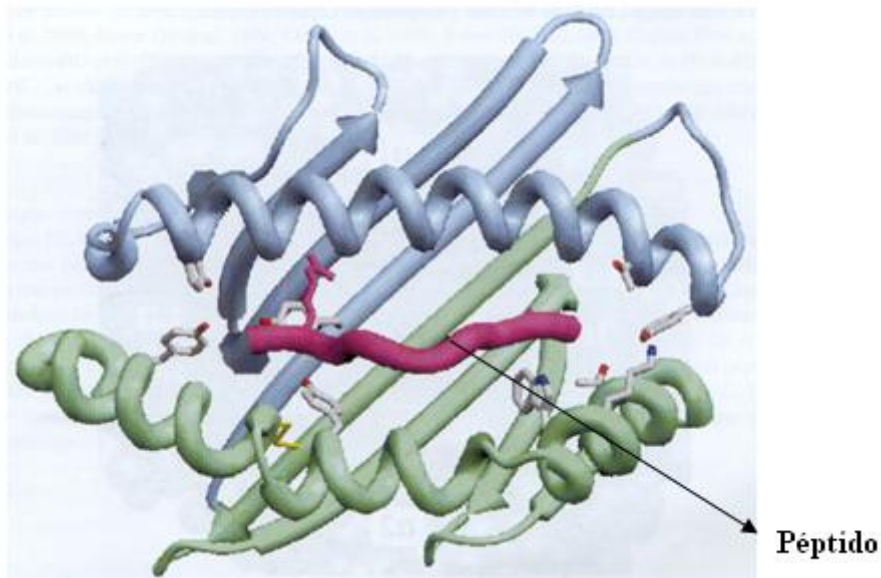


Fig. 5 Molécula HLA-B27 com um péptido encaixado, onde se encontram os resíduos mais polimórficos (retirado de: www3.ncbi.nlm.nih.gov).

Esta selecção ao nível do peptídeo suporta uma das hipóteses propostas para justificar o envolvimento das proteínas HLA B27 nas espondiloartrites: a teoria

do peptídeo “artritogénico”. Baseia-se no modelo de mimetismo molecular e sugere a existência de um peptídeo bacteriano ou viral que contenha uma sequência aminoacídica semelhante à de uma proteína presente na articulação (ex. colagénio tipo II). A corroborar esta teoria, foram identificados linfócitos T citotóxicos dirigidos contra o HLA-B27, nas articulações de doentes com EA e respostas de células T CD8+, restritas ao HLA B27 contra péptidos do colagénio tipo II. Todavia, como já anteriormente referido, esta e outras teorias não conseguem explicar a patogénese desta doença sobretudo no que respeita a ser tecido-específica (24).

1.3.4 Distribuição de frequências dos alelos HLA-B*27 em diferentes grupos populacionais

A importância do conhecimento da prevalência do HLA-B27 nas várias populações e grupos étnicos está intimamente ligada à associação entre este alelo e a Espondilite anquilosante.

O HLA-27 corresponde a uma especificidade serológica bem definida, que recebeu a designação provisória de w27 no 4º *Workshop* Internacional de Histocompatibilidade em 1970, tendo recebido a designação oficial de HLA-B27, no 6º *Workshop* Internacional de Histocompatibilidade.

As populações caucasianas compreendem diversos grupos que habitam a Europa, parte da Ásia e Norte de África.

A frequência do HLA-B27, não ultrapassa os 6% nos países do Sul da Europa, como Espanha, Itália, e Grécia. (25)

A maioria dos restantes países Europeus apresenta frequências do HLA-B27 entre 6% e 8%, exceptuando-se os países que compunham a antiga Jugoslávia (12% a 14%), o grupo Húngaro-Finlandês (12% a 16%), a Suécia, a Noruega e a Islândia (10% a 16%). (26)

A frequência do HLA-B27, na maioria dos grupos populacionais estudados na África ocidental, Equatorial e sudoeste Africano é baixa, não ultrapassando, em regra, os 3%. (25)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Populações incluídas no estudo

Para a realização desta avaliação foram definidos 3 grupos populacionais:

Grupo 1: Doentes provenientes do serviço de reumatologia do centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, durante os anos de 2012 a 2015. As amostras de sangue destes doentes deram entrada no laboratório com pedidos de pesquisa de HLA B27. Os doentes encontravam-se ainda em fase de diagnóstico, alguns dos quais tinham manifestações articulares e / ou oculares.

Grupo 2: Doentes com espondilite anquilosante (EA), diagnosticada pela consulta de reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, de acordo com os critérios de Nova Iorque modificados, e que apresentavam patologia a nível pulmonar nomeadamente fibrose pulmonar (FP), envolvimento articular e frequentemente lesões cardíacas e oculares.

Grupo 3: Dadores saudáveis, do painel de dadores voluntários de medula óssea, com residência na região Centro de Portugal.

Os dados demográficos destes 3 grupos encontram-se na tabela 2

	Grupo 1 (N=277)	Grupo 2 (N=57)	Grupo 3 (N=723)
Género (M/F)	168/109	30/27	317/406
Idade (anos; média ± dp)	55,79 ± 11,37	49,04 ± 12,92	38 ± 12,92

Tabela 2 – Caracterização dos grupos incluídos nesta avaliação.

2.1.1 Ética

O estudo foi aprovado pela comissão de ética dos Hospitais da universidade de Coimbra. Todos os participantes leram e assinaram o consentimento informado, tendo sido respeitado o anonimato e todos os princípios da Declaração de Helsínquia.

2.1.2 Amostra biológicas

A cada um dos doentes e dadores saudáveis foi colhido sangue com EDTA (3 – 5 ml) e foi preservado à temperatura ambiente para posterior isolamento de ADN.

2.2. MÉTODOS

2.2.1 Extracção de ADN das amostras

O sangue foi colhido para Tubos *VACUETTE*[®] *K₃EDTA* (Greiner Bio-One), pois com a quelatação dos iões de Ca^{2+} , a cascata de coagulação é bloqueada.

Retiraram-se 200 μL da amostra de sangue para proceder à extracção de ADN a partir dos leucócitos presentes, recorrendo-se à utilização do reagente *MagAttract*[®] *DNA Blood Midi M48 kit* (Qiagen[®] - Alemanha).

A base do procedimento de extracção deste kit está na ligação do ADN a partículas magnéticas revestidas com sílica, na presença de um sal caotrópico. Os passos constituintes deste processo de extracção são: a lise das células através do Tampão ML, seguida da adição, às amostras, da suspensão *MagAttract B* (contém as partículas magnéticas), com conseqüente ligação do ADN às partículas magnéticas. Na presença de um magnete decorre, portanto, a separação magnética, sendo efectuados passos de lavagem e, por fim, a eluição do ADN foi feita em 200 μL de tampão Tris-EDTA (TE). (27)

Os tubos contendo o ADN das amostras, com uma quantidade entre os 3,9 e 6,2 μg foram guardados a 4 °C para uma utilização imediata e preservados a -20°C para armazenamento de longo prazo.

O ADN genómico dos doentes com espondilite anquilosante já se encontrava extraído e armazenado em arcas frigoríficas de -80°C.

A extracção do referido ADN foi efectuada a partir de sangue periférico, colhido num tubo tipo *Vacutainer* de 5 ml, contendo *EDTA*, pelo método de *Salting-Out* (28).

Tomando em consideração o facto da extracção de DNA genómico por *Salting Out* depender essencialmente do número de células nucleadas e o rendimento da precipitação do ADN foi necessário proceder-se à quantificação do DNA extraído.

Estas amostras de ADN foram quantificadas com recurso a um espectrofotómetro (Gene Quant Pro, Pharmacia-amersham GMBH).

Da quantificação das amostras de ADN em estudo obteve-se uma concentração média de 245,77 ng/µl, com um grau de pureza médio de 1,7 (razão D.O260nm/D.O280nm). Esta quantificação permitiu padronizar as concentrações de utilização na reacção de *PCR*

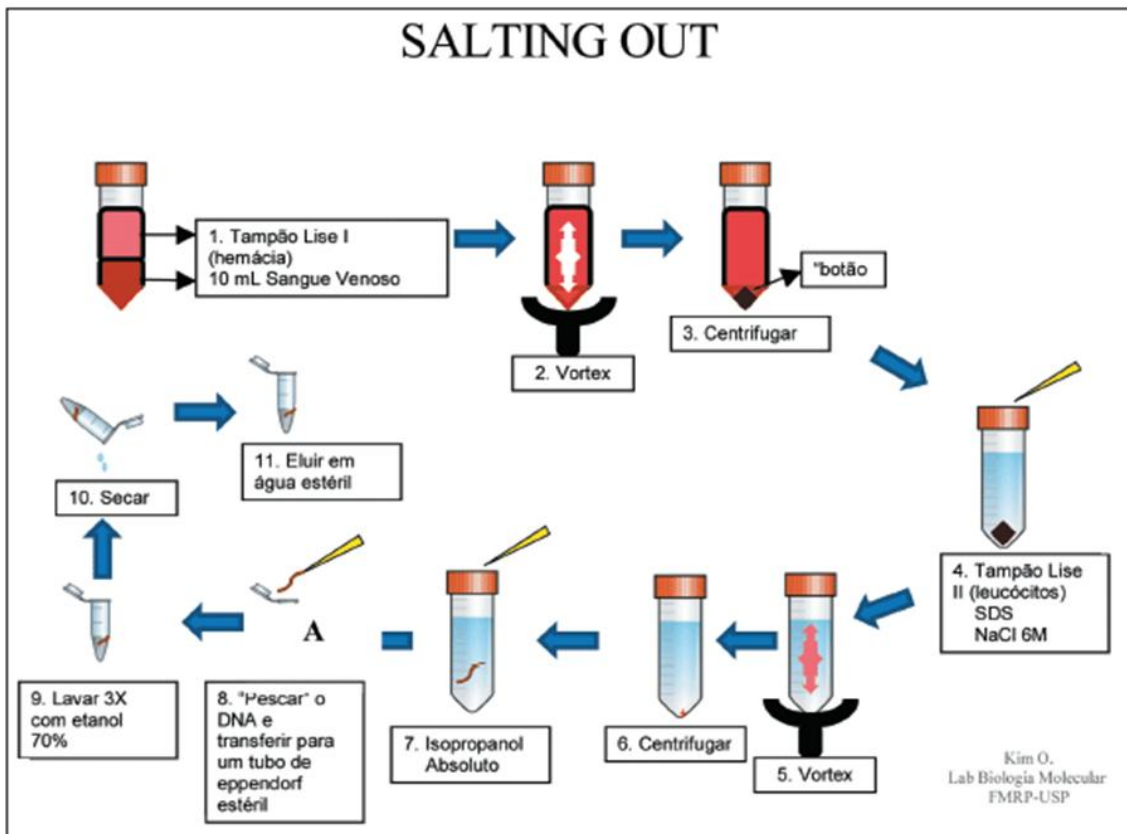


FIGURA 6 Extração de ADN pelo método de *Salting out*

Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/abd/v83n3/a02fig2.gif>

2.2.2 Tipagem genética- grupo antigénico HLA-B - por RSO Luminex® (LABType® SSO Typing Tests da One Lambda®)

Para se proceder à tipagem HLA locus B dos participantes neste estudo, começou-se por amplificar as regiões codificantes dos alelos HLA-B, usando a reacção de polimerização em cadeia (PCR). Posteriormente, a identificação do grupo alélico foi feita recorrendo à hibridização com sondas oligonucleotídicas específicas da sequência (SSO) imobilizadas em microesferas.

As microesferas são partículas de poliestireno, altamente uniformes e são internamente marcadas com quantidades variáveis de fluorocromos vermelho e infravermelho. Cada intensidade de fluorescência única define uma população de microesferas. A cor fluorescente de cada microesfera é a base para a sua identificação pelo sistema de análise e a sua precisa correlação com a sua respectiva população.

Como as microesferas estão revestidas com sondas oligonucleotídicas, é necessário um repórter, isto é, uma molécula específica de detecção desses analitos, que neste caso, é a r-Ficoeritrina (PE).

Para a leitura das fluorescências recorreu-se ao equipamento LABScan™ 100 (Luminex), o qual está equipado com um processador de sinal digital e dois lasers. O laser *Yttrium-Argon-Germanium* (YAG) de 532 nm que excita a molécula repórter, permitindo a quantificação de analito ligado à microesfera, sendo que após excitação ocorre emissão de luz a 578 nm. E o laser Diodo Vermelho de 635 nm que excita os dois marcadores presentes nas microesferas e estes após excitação emitem luz a 658 e 712 nm. (29)

2.2.3 Amplificação do gene HLA-B

Para a amplificação do gene HLA-B usaram-se os *kits* de amplificação da *One Lambda*®, nomeadamente, os primers de amplificação e a D-mix (LABType® Primer Sets and D-mix) e a TaqPolimerase (5U/μL) da *ABgene*, conforme protocolo descrito pela casa comercial.

Uma vez feita a Master Mix, esta foi distribuída pelos poços de uma placa de 96 poços e seguiu-se a adição de 1 μL de ADN aos 9 μL da Master Mix. A amplificação decorreu no termociclador C1000™ Thermal Cycler ou Biometra Professional Thermocycler com o programa de amplificação descrito na tabela 3.

Tabela 3. Programa de PCR usado na amplificação dos genes HLA.

Passos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1	96 °C	03:00	1
2	96 °C	00:20	5
	60 °C	00:20	
	72 °C	00:20	
3	96 °C	00:10	30
	60 °C	00:15	
	72 °C	00:20	
4	72 °C	10:00	1
5	4 °C	∞	1

2.2.4 Desnaturação/ Neutralização e Hibridização

Após amplificação, os produtos de PCR biotinilados foram desnaturados e neutralizados, promovendo-se a sua hibridização com uma mistura de esferas com sondas de ADN específicas dos alelos HLA-B, imobilizadas à sua superfície (LABType® SSO Bead Mixtures), durante 15 minutos a 60 °C

Após hibridação, e uma vez que os produtos de PCR são biotinilados, a sua detecção do híbrido pode ser feita utilizando Streptavidina estando esta conjugada com r-Ficoeritrina (SAPE).

Finalizada a incubação, transferiram-se os híbridos, após lavagem por centrifugação, para uma placa de ELISA de fundo cónico, estando pronta para ser feita a sua aquisição no equipamento LABScan™ 100.

As diferentes etapas desta abordagem técnica para tipagem HLA pode visualizar-se na figura 7.

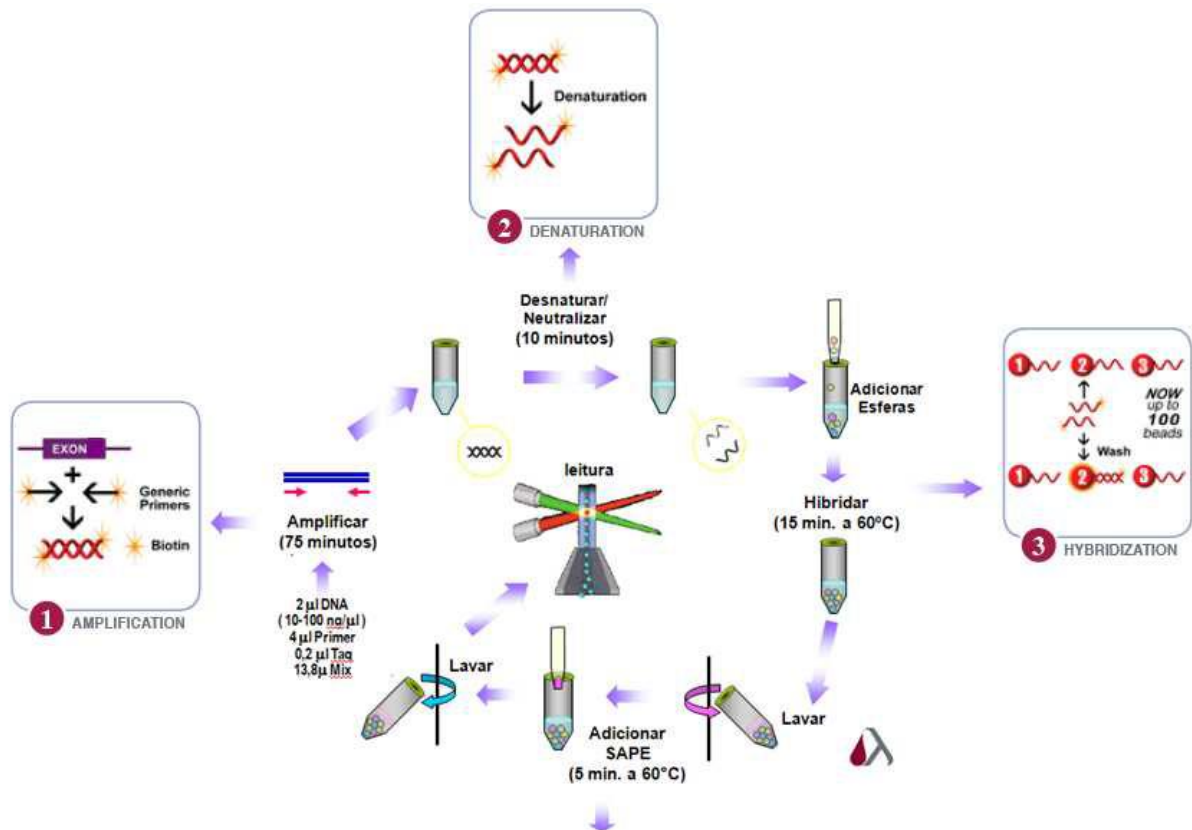


Figura 7 - Esquema ilustrativo da metodologia rSSO (Luminex®).
Fonte: www.ONELAMBDA.com

2.2.5 Interpretação das leituras de fluorescência e determinação dos alelos HLA-B

As leituras de fluorescência foram interpretadas no programa *Fusion2.2* da *OneLambda*®.

2.2.6 Sequenciação do gene HLA-B para determinação da sequência alélica HLA-B27 nos doentes e dadores de painel HLA-B27+

Seleccionaram-se os doentes e dadores saudáveis em cuja tipagem HLA-B por RSSO (Luminex) foi identificado o grupo alélico HLA-B27 (B27+).

A sequenciação cíclica (método de Sanger e colaboradores modificado) faz uso de didesoxirribonucleótidos (*ddNTP*'s) marcados com fluorocromos conhecidos como *terminadores*, que são usados em simultâneo na reacção de sequenciação. Têm a designação de *terminadores* devido ao facto de no lugar do grupo hidroxilo (-OH) na extremidade 3' terem apenas um hidrogénio (H), impedindo a adição de outros desoxirribonucleótidos uma vez que não há

possibilidade de se formar a ligação fosfodiéster. Assim, o crescimento de fragmentos de ADN em replicação pela DNA Polimerase encontra-se limitado. No trabalho realizado, o método de sequenciação usado foi o de sequenciação cíclica com a utilização de terminadores marcados com *fluorocromos* (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit – Applied Biosystem – Thermo Fisher Scientific - USA).

O ADN foi amplificado usando iniciadores de reacção (*primers*) específicos deste grupo alélico. Para a sequenciação do ADN das amostras seleccionadas utilizou-se um sequenciador capilar automático (ABI PRISM 3130-AVANT da Applied Biosystem – Thermo Fisher Scientific - USA) e o *kit* de sequenciação *SeCore® Express HLA Sequence-Based typing* (One Lambda Inc. – Thermo Fisher brand -USA).

2.2.7 Amplificação do locus HLA-B usando os reagentes **SeCore® Express HLA Sequence-Based typing**

Foram amplificados exões 1, 2 e 3 com primers específicos do locus e do grupo alélico HLA B27 (FIGURA 8). Procedeu-se conforme indicações fornecidas pelo fabricante

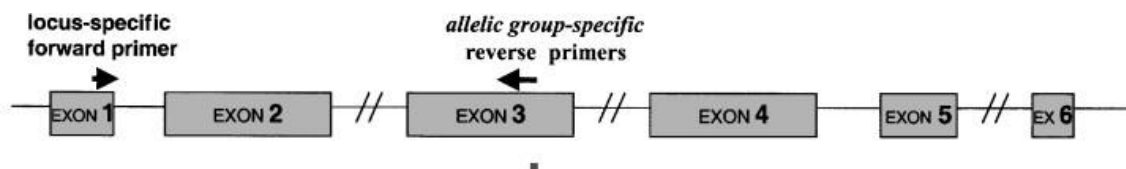


Figura 8. Reacção de amplificação dos exões 1, 2 e 3 do gene HLA-B para posterior sequenciação.

Descongelar o(s) tubo(s) com a solução Amp Mix (solução que contém todos os reagentes necessários à amplificação) e usar 9.9 ul por cada amostra a amplificar. Juntar à Mix 0,15ul de AmpliTaq (5U/ul) e 5 ul de ADN a uma concentração de 15-30 ng/ul. Agitar no vortex e colocar os tubos no aparelho de PCR com o seguinte programa:

Etapa	Temperatura(°C)	Tempo	Nº de ciclos
1	95	04:00	1
2	95	00:20	35
	63	00:20	
	72	00:40	
4	72	05:00	1
5	4	∞	1

Tabela 4 - Programa de *PCR* utilizado para amplificação de amostras de ADN destinadas à Sequenciação.

Depois de obtidos os produtos, realizou-se uma electroforese em gel de agarose com o objectivo de se confirmar quais as amostra onde tinha ocorrido amplificação.

2.2.8 Purificação dos produtos de PCR com ExoSAP-IT®

Terminada a amplificação, obteve-se o produto de PCR pretendido, mas permanecem na mistura dNTPs e primers que não foram consumidos no decorrer da reacção, que podem interferir na sequenciação. ExoSAP-IT® remove esses contaminantes.

ExoSAP-IT® tira partido da acção de duas enzimas hidrolíticas, a Exonuclease I e a Fosfatase Alcalina. A Exonuclease I degrada os primers em excesso e as cadeias simples de ADN inespecíficas e a Fosfatase Alcalina remove os dNTPs excedentes na mistura de PCR.

A adição de ExoSAP-IT® (3 µL) foi feita directamente ao produto de PCR (20 µL), sendo efectuada a sua incubação a 37 °C durante 15 minutos, passo no qual as enzimas exercem as suas funções, seguindo-se a sua inactivação através da incubação a 80 °C durante 15 minutos, conforme ilustrado na figura

9

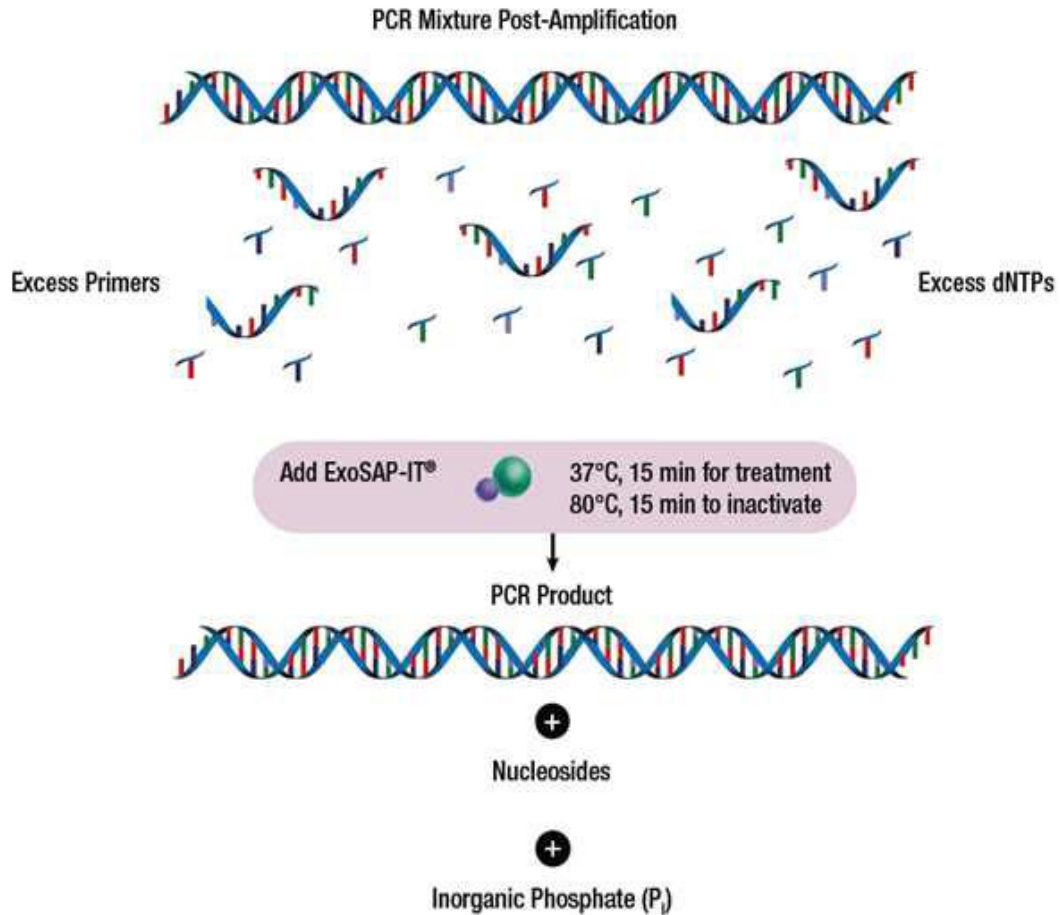


Figura 9 - Esquema representativo da etapa de purificação dos produtos obtidos na reacção de amplificação, para posterior sequenciação.
Fonte: http://tbn0.google.com/images?q=tbn:Imc_yxPR8ib9WM:http://www.usbweb.com/assets/78200_f1.gif

2.2.9 Reacção de sequenciação locus HLA-B usando os reagentes **SeCore® Express HLA Sequence-Based typing (Applied Biosystems)**.

Após purificação dos produtos de PCR, será necessário adicionar a cada amostra a mistura de sequenciação que contém já os didesoxiribonucleótidos marcados (BDT) e o respectivo *primer* de sequenciação.

A reacção de PCR processa-se nos dois sentidos para cada exão (exões 1, 2 e 3) utilizando um primer F (*forward*) e R (*reverse*) para cada exão e de acordo com o seguinte programa no termociclador

Etapa	Temperatura(°C)	Tempo	Nº de ciclos
1	95	00:20	25
	50	00:15	
	60	01:00	
2	4	∞	1

Tabela 5 - Programa de *PCR* utilizado para sequenciação ciclica.

Após a reacção de sequenciação, o produto de *PCR* foi submetido a um passo de purificação com a resina Sephadex G50 (GE Healthcare®), onde o excesso de terminadores foi removido, pois estes ficaram retidos na resina e só o produto de *PCR* conseguiu atravessar. Após este passo de purificação, as sequências estavam prontas a ser colocados no Sequenciador 3130 Genetic Analyzer (ABI Prism). O resumo do processo está ilustrado na figura 9

Como programas de análise das sequências foram usados o Sequencing Analysis® e o uTYPE® Dx Sequencing Analysis Software (One Lambda Inc. – Thermo Fisher brand -USA).

.

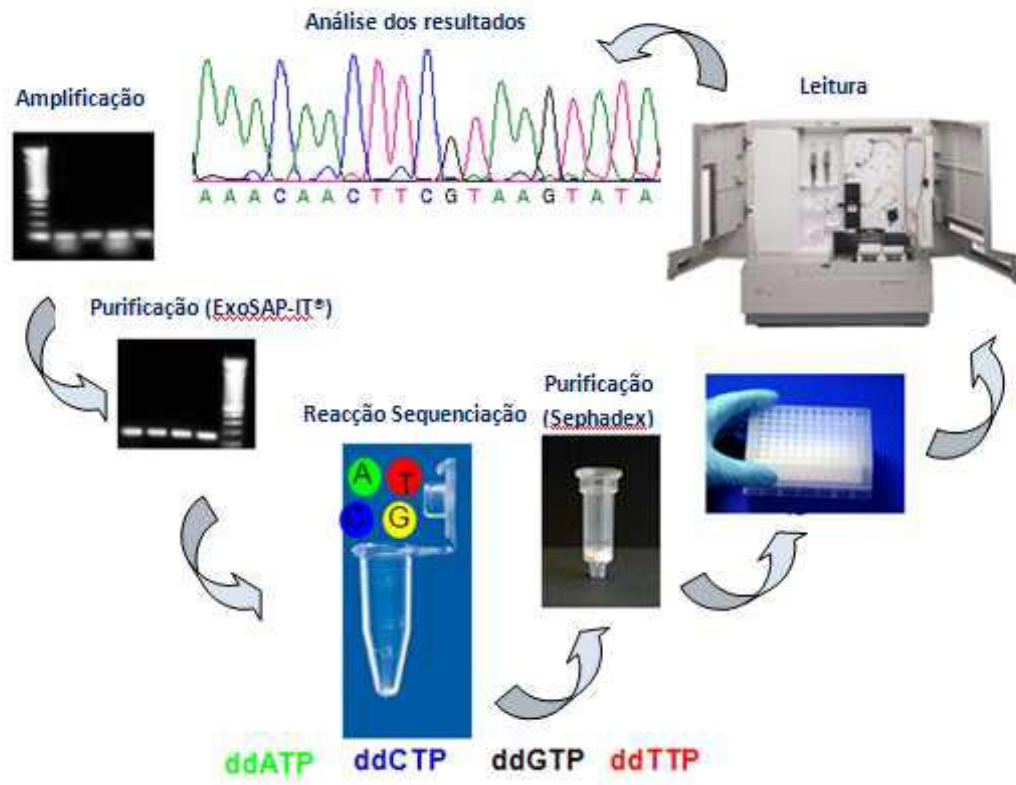


Fig. 10 - Esquema da metodologia de sequenciação para caracterização alélica HLA-B*27

2.2.10 Análise estatística

A apresentação dos resultados é feita com recurso à média \pm desvio-padrão (dp) para cada um dos grupos. A nível estatístico, os resultados foram submetidos ao teste U de *Mann-Whitney* e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

O software usado foi o IBM SPSS® Statistics 19.

3 - RESULTADOS

3.1 Determinação do grupo HLA B27 nas populações estudadas

Foi realizada a pesquisa e identificação do grupo alélico HLA-B27 nas três populações estudadas. Os resultados são ilustrados na tabela 6 com as frequências fenotípicas para cada um dos grupos. É de realçar a elevada frequência obtida nos doentes com diagnóstico de espondilite anquilosante estabelecido (Grupo 2) e o aumento da frequência nos doentes do grupo1, ainda sem diagnóstico clínico estabelecido mas com algum comprometimento ao nível articular, pulmonar, gastrointestinal e/ou ocular.

	Grupo1 N=277			Grupo2 N=57			Grupo3 N=723		
	M N=168	F N=109	Total	M N=30	F N=27	Total	M N=406	F N=317	Total
POS	13,10%	12,80%	13%	93,33%	92,60%	93%	5,17	5,04	5,11%
NEG	86,90%	87,20%	87%	6,67%	7,40%	7,00%	94,83	94,96	94,89%

Tabela 6: frequência do grupo alélico HLA-B*27 nas 3 populações estudadas.

3.2 Avaliação da frequência dos alelos HLA-B*27 nos grupos de doentes e dadores saudáveis

Como resultado da sequenciação do grupo alélico HLA-B27, verificou-se que o alelo mais frequente HLA-B*27:05 foi encontrado nos três grupos estudados, seguido do alelo HLA-B*27:02. Os restantes alelos encontrados tiveram uma distribuição pontual nos grupos de doentes e controlos saudáveis. De notar que o alelo B*27:06 não foi identificado no grupo de doentes com Espondilite Anquilosante. Este alelo O alelo HLA-B*2706 difere do alelo HLA-B*2704 por apenas dois resíduos e do alelo HLA-B*2705 por apenas um resíduo.

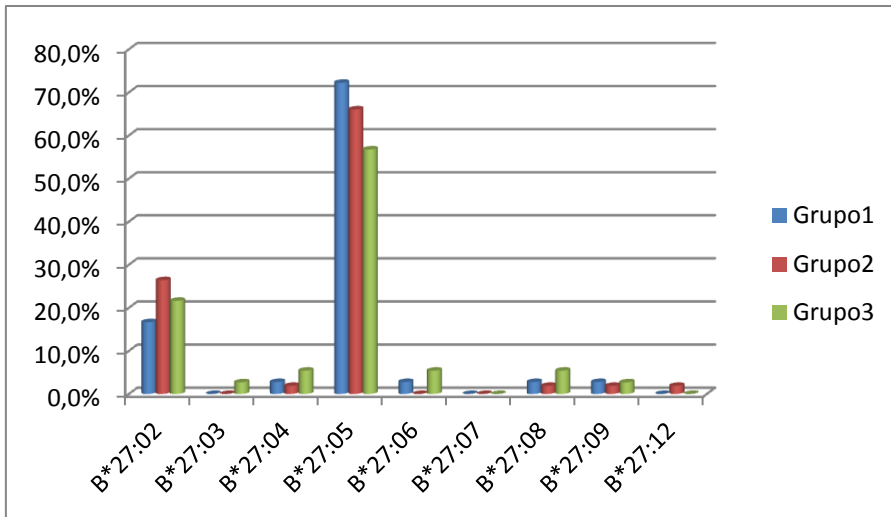


Fig.11 - Distribuição de frequências dos alelos HLA-B*27 nas populações estudadas (Grupo1- doentes provenientes da consulta de reumatologia dos HUC; Grupo2- Doentes com espondilite anquilosante; Grupo3- população controlo saudável)

4 - DISCUSSÃO

O conhecimento da diversidade alélica HLA teve um crescimento surpreendente com a aplicação das técnicas de sequenciação ao estudo dos genes que o constituem. Faz parte integrante para o sucesso desta abordagem técnica a qualidade do ADN extraído das amostras colhidas, a utilização de didesoxiribonucleótidos marcados com moléculas fluorescentes de emissões diferentes e a electroforese capilar em sequenciadores automáticos.

A quantidade e grau de pureza do ADN permite obter amplificações muito específicas melhorando o “*template*” da sequenciação cíclica e, conseqüentemente, a razão sinal/ruído dos electroforetogramas obtidos. Assim, é possível assinalar de forma inequívoca os pontos de heterozigotia em sequências tão polimórficas como as dos genes HLA.

Também, a abordagem por RSSO com sondas imobilizadas em esferas (*RSSO-Luminex*) se revelou de grande poder de discriminação no “screening” para assinalar a presença do grupo alélico HLA-B27. Está muito vocacionada para estudos populacionais e revela-se de fácil execução.

A associação da molécula HLA-B27 à espondilite anquilosante é talvez a melhor estudada mas é sobretudo aquela que é conhecida há mais tempo. Uma das dificuldades de determinar o valor desta associação prende-se com a avaliação e diagnóstico clínico da Espondilite Anquilosante. O facto de se ter feito a avaliação da frequência num grupo de doentes que apresentavam patologia a nível das articulações e algumas patologias oculares permitiu verificar com que frequência se apresentou o antigénio HLA B27 (13%) e compará-la com a frequência das populações saudáveis (5,11%) e de doentes com EA (93%). Como era esperado, verificou-se um aumento na frequência do B27 nesta população de doentes o que poderá significar que de entre os 277 avaliados alguns dos B27+ poderão ter sido diagnosticados clinicamente com espondilite anquilosante.

As frequências encontradas estão de acordo com as descritas em múltiplas populações da Europa central e do sul bem como em populações do norte de

África e Índia. Todavia, já em certos países do norte da Europa, tais como Suécia, Noruega e Islândia a frequência do grupo B27 é substancialmente mais elevada, atingindo valores entre 12 e 16%.

No que respeita à população doente, de notar que houve 4 doentes com diagnóstico estabelecido de espondilite anquilosante mas que, todavia, não possuíam a molécula HLA-B27. A frequência nesta população é idêntica a todas as populações descritas a nível mundial, atingindo nestes 57 doentes os 93%.

Foi também avaliado se eventualmente poderia haver uma distribuição diferente entre géneros. Tal como esperado não houve diferenças entre o género masculino e feminino.

Ao nível alélico, o mais frequente foi o HLA-B*27:05 com as frequências de 72,2%, 66% e 56,8% seguido do B*27:02 com 16,7%, 26,4% e 21,6% nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. São alelos comuns, que estão presentes nas populações de todo o mundo e que estão fortemente associados à espondilite anquilosante. Por outro lado, o HLA-B*2706 (prevalente no Sudeste Asiático) e o HLA-B*2709 (prevalente na Sardenha) parecem não apresentar tal associação sendo até contados como alelos protectores. De notar que no grupo de doentes não foi encontrado o alelo HLA-B*2706

O alelo HLA-B*2706 difere do alelo HLA-B*2704 por apenas dois resíduos e do alelo HLA-B*2705 por apenas um resíduo. Além disso, tanto o alelo HLA-B*2706 como o alelo HLA-B*2709 ligam-se a peptídeo endógeno (derivado do receptor de tipo 1 do peptídeo intestinal vasoativo) e também a peptídeo exógeno (proteína latente de membrana 2 do vírus Epstein-Barr), porém em duas conformações drasticamente distintas.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesta avaliação da associação HLA-B27 às espondiloartropatias são semelhantes aos já descritos por outros autores. Por outro lado, foi possível verificar o aumento estatisticamente significativo da frequência do antígeno HLA-B27 na população doente, ainda sem diagnóstico, mas com queixas ao nível das articulações. Todavia, não foi possível avaliar neste trabalho a prevalência de espondilite anquilosante neste grupo de doentes estudados.

A forte associação HLA-B27 com espondilite anquilosante foi verificada e a sua frequência é semelhante à reportada noutros estudos. Também a nível alélico, verificou-se que o alelo mais frequente nas populações estudadas é o HLA-*27:05. A teoria do “peptídeo artritogénico”, proposta para explicar a etiologia e patogénia da espondilite anquilosante, suportada pela existência de um mimetismo molecular poderá ser reforçada pela existência de um determinante comum (que seria o alelo HLA-B*27:05) muito mais frequente que todos os outros em todas as populações mundiais. (25, 26)

Por outro lado, a existência de doentes com espondilite anquilosante diagnosticada e que não possuem o antígeno HLA-B27 é indiciador de que esta doença é multifactorial, com forte envolvimento genético do MHC, de constelações de genes em ligação com o MHC (30) e, muito provavelmente, dependente de factores ambientais.

6. REFERÊNCIAS

1. Wright V, Moll JMH, Seronegative Polyarthrits. Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1976; 21(6)
2. Lopez Larrea, HLA-B27 in the Development of Spondyloarthropathies (Medical Intelligence Unit) Hardcover – July, 1996
3. De Keyser F¹, Elewaut D, De Vos M, De Vlam K, Cuvelier C, Mielants H, Veys EM. Bowel inflammation and the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am.* 1998 Nov;24(4):785-813, ix-x.
4. Baywaters EGL. Historical Introduction. In Moll JMH, *Ankylosing Spondylitis.* 1980, 1-15 (Edinburgh: Churchill Livingstone)
5. Miellands H, Veys E M et al. The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. *J. Reumathology* 1995; 22: 2266-72
6. Mackay K, Calin A, Chest expansion in Ankylosing Spondylitis. *Br J Reumathology* 1997; 36(suppl):247
7. Miellands H, Veys E M. Gastrointestinal tract and reumatic diseases. In: JH Klippel, PA Dieppe eds. *Reumathology Mosby International* 1998; 2.8.1 - 2.8.8
8. Moll JMH, Haslock I et al Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthrits, Reiter's disease, , the intestinal arthropathies and Behcet's syndrome. *Medicine (Baltimore)* 1974; 53: 343 – 364
9. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1823–8.
10. Ploegh H L, Orrt H T, Strominger J L. Major Histocompatibility Antigens:The Human (HLA-A, -B, -C) and Murine (H=2K, H-2D) Class I Molecules. *Cell* 1981; 24: 287-299.
11. SAYEGH MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *The New England journal of medicine.* 2004;351(26):2761-6.

12. Ayala Garcia, M.A. et al. - The major histocompatibility complex in transplantation. *Journal of Transplantation*.2012 (2012) 842141.
13. Janeway, C ; Travers, P ; Walport, M. *Immunobiology : the immune system in health and disease*, 6th ed. New York: Garland Science, 2005. isbn
14. Trowsdale J. Molecular genetics of the MHC. *Immunology* 1988, Supplement 1, 21-23
15. Eren E , Travers P. . The structure of the major histocompatibility complex and its molecular interactions. 2000 In: Lechler R, Warrens A, editors. *HLA in health and disease*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press. p 23-33.
16. Chakraborty, A.K., Weiss, A. - Insights into the initiation of TCR signaling. *Nature Immunology*.15 (2014) 798-807.
17. Vinasco J, Martín J et al. Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1998;57:33–37
18. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 64: 631–49.
19. Marcilla M, Lopez de Castro JA. Peptides: the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis. 2008 *Tissue Antigens*: 71: 495–506.
20. Thorsby E, HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997, 53(1) p1-11
21. Marsch, S.G. - Nomenclature for factors of the HLA system, update September 1998. WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. *Tissue Antigens*.53 (1999) 407-446.
22. Lopés de Castro J. The pathogenic role of HLA-B27 in chronic arthritis. 1998 *Current Opinion in Immunology*; 10:59-66.
23. Madden DR, Strominger J et al. The three dimensional structure of HLA-B27 at 2.1. A resolution suggest a general mechanism for tight peptide peptide binding to MHC. 1992 *Cell* 70:1035-1048.
24. McMichael A. and Bowness P. HLA-B27: natural function and pathogenic role in Spondyloarthritis 2002 *Arthritis Res* , 4 (suppl 3):S153-S158.

25. Cavalli-Sforza LL et al. The history and geography of human genes. 1994 Princeton: Princeton University Press.
26. Khan MA. HLA-B27 and its subtypes in world populations. Editorial review. 1995 Current Opinion Reumatology 7:263-269.
27. Qiagen DNA blood mini-kit. 2014 Qiagen[®] protocols.
28. Miller S A, Dykes D D, and H F Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. 1988 Nucleic Acids Res. Feb 11; 16(3): 1215.
29. LABType[®] SSO HD protocols One Lambda, Inc Canoga Park CA – USA.
30. Lopez-Larrea C et al. Contribution of KIR3DL1/3DS1 to ankylosing spondylitis in human leukocyte antigen-B27 Caucasian populations. 2006 Arthritis Res Ther; 8:R101