

# **Escola Superior de Saúde Atlântica**

## **Análises Clínicas e Saúde Pública**

### **Projecto de trabalho**

**Estudo dos Polimorfismo e Quantificação de MBL na Artrite  
Reumatóide.**

Alunos: Cátia Branco

Cecília Baptista

Hugo Damásio

M<sup>a</sup> Fátima Carvalho

Orientador:

Mestre Raquel Mareco

Barcarena, Julho de 2009

## Índice

Projecto de trabalho .....	1
Justificação do Tema .....	3
Introdução.....	3
Autoimunidade .....	3
<i>Sistema Complemento</i> .....	4
<i>Via das lectinas</i> .....	5
<i>Mannose-binding lectin</i> .....	5
<i>Polimorfismos do gene MBL2</i> .....	6
Objectivos .....	7
Hipóteses.....	7
Métodos .....	7
População.....	7
Referências .....	8

## **Justificação do Tema**

A artrite reumatóide é uma doença com elevada prevalência, afectando cerca de cem mil pessoas em Portugal <sup>(\*)</sup>, sendo uma das principais causas de incapacidade para o trabalho. Por outro lado está associada a uma significativa co-morbilidade, principalmente por doenças cardiovasculares, infecções e neoplasias.

A MBL é uma molécula altamente polimórfica e recentes demonstrações indicam que algumas isoformas desta proteína estão associadas a um aumento da incidência de doenças infecciosas e autoimunes. A presença de polimorfismos no gene que codifica a proteína MBL pode ter consequências nos seus níveis séricos, podendo contribuir para uma susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento de doença.

Desta forma torna-se útil perceber se existe relacionamento entre os níveis circulantes da proteína MBL, a associação entre os níveis de proteína e os polimorfismos identificados e a Artrite Reumatóide numa população portuguesa.

## **Introdução**

### **Autoimunidade**

Entende-se por autoimunidade a resposta imunitária de um indivíduo contra os seus próprios constituintes. No entanto a presença de linfócitos B e T auto-reactivos não significa que exista patologia, pois estão descritos inúmeros casos de indivíduos saudáveis que possuem este tipo de células. A doença surge quando a resposta imunitária específica dirigida contra antigénios do próprio excede um determinado limiar, levando à inflamação crónica e posteriores danos tecidulares. As respostas autoimunes são influenciadas pela idade, raça, sexo e por factores genéticos, contudo são principalmente as infecções e os agentes químicos e físicos que as fazem despoletar.

As doenças autoimunes podem causar uma série de patologias crónicas debilitantes e os sintomas dependem do tipo de tecido ou órgão que é afectado. O dano causado nas células ou órgãos é provocado por anticorpos ou por células CD4+. Um exemplo de destruição tecidular mediada por células CD4 é a Artrite Reumatóide (AR). Neste caso as células CD4 auto-reactivas atacam o tecido das articulações, causando uma resposta inflamatória que resulta em edema e destruição tecidular. (1).

(\*): Segundo Associação Nacional dos Doentes com Artrite Reumatóide

## *Artrite Reumatóide*

A Artrite Reumatóide pertence ao grupo das Doenças Auto-ímmunes Sistémicas. Neste grupo a resposta imunitária é dirigida a um grande número de antígenos alvo. Este grupo de doenças deve-se a uma deficiência na regulação do sistema imunitário, que resulta em células T e B hiperactivas. Os danos tecidulares são generalizados devido à resposta mediada por células ou devido ao dano celular causado por auto-anticorpos ou pela acumulação de imunocomplexos (1).

A Artrite Reumatóide é uma doença comum que afecta maioritariamente as mulheres dos 40 a 60 anos (ratio 3:1). O principal sintoma é a inflamação crónica das articulações, apesar do sistema hematológico, cardiovascular e respiratório também serem muitas vezes afectados. A maioria dos indivíduos (cerca de 70%) com esta doença produz um grupo de auto-anticorpos - Factor Reumatóide (FR). Este factor também é encontrado em pessoas saudáveis mas em menores concentrações (2). Cerca de 30% apresenta outro tipo de auto-anticorpos, nomeadamente anticorpos anti-nucleares (2). O FR clássico é uma Imunoglobulina da classe M que reage com a porção Fc das IgG circulantes, formando complexos IgM-IgG que se depositam nas articulações. Estes imunocomplexos podem activar o sistema complemento, levando à inflamação crónica das articulações (1). Com o tempo dá-se a deformação irreversível das articulações que limitam a mobilidade.

A etiologia da AR é desconhecida, no entanto, sabe-se que factores ambientais e genéticos estão envolvidos. Pensa-se que serão infecções ou processos inflamatórios que a fazem despoletar, podendo também estar envolvidos alguns componentes do sistema complemento como a MBL (3).

### **Sistema Complemento**

O Sistema Imunitário é capaz de gerar uma enorme variedade de células e moléculas que reconhecem e eliminam, teoricamente, um número ilimitado de agentes patogénicos (1). Na linha da frente na defesa do hospedeiro está a imunidade inata que fornece uma resposta rápida mas não específica. Um dos "componentes" da imunidade inata é o sistema complemento. Este sistema é constituído por uma série de proteínas plasmáticas que circulam na sua forma inactiva (zimogénios). O complemento pode ser activado através da ligação de anticorpos a certas superfícies celulares ou através da ligação de proteínas do complemento a certos componentes das paredes celulares de patogénios. Quando activo, as proteínas do sistema complemento interagem tendo a capacidade de (2): danificar a membrana dos patogénios; opsonizar, facilitando a fagocitose; ligar-se a receptores específicos desencadeando uma reacção de inflamação e secreção de moléculas reguladoras e eliminar imunocomplexos da circulação para o baço e fígado.

A activação do sistema complemento pode dar-se por três vias: Via clássica, Via alternativa e Via das lectinas. Os primeiros passos destas vias culminam na formação do C5b; os passos finais são iguais nas três vias e levam à formação do “Membrane attack complex” (MAC).

#### *Via das lectinas*

A via das lectinas inicia-se com a ligação da lectina de ligação à manose (mannose-binding lectin – MBL) à superfície de um microrganismo. Quando a MBL se liga aos resíduos de manose (ou outro tipo de açúcares) (4) presentes na superfície dos agentes patogénicos (como *Salmonella*, *Listeria*, algumas estirpes de *Neisseria*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*) é activada a via das lectinas (1). Posteriormente, as “MBL-associated serine proteases” (MASP-1, -2) em conjunto com outras duas proteínas ligam-se à MBL. Este complexo cliva e activa as proteínas C4 e C2. São produzidos dois fragmentos de cada proteína, um fragmento maior, “b”, e um fragmento mais pequeno, “a” (à excepção do fragmento C2a que é o fragmento maior). O fragmento C4b e o C2a formam o complexo C4b2a (C3 convertase), este complexo cliva o C3 em C3a e C3b. Alguns enzimas C3b ligam-se ao complexo C4b2a formando o complexo C4b2a3b (o restante C3b funciona como opsonina). Este último complexo tem actividade C5 convertase, clivando o C5 em C5a e C5b. O passo final da activação do sistema complemento envolve as proteínas C5b, C6, C7, C8 e C9. Estas proteínas interagem e levam à formação de uma estrutura macromolecular: “Membrane attack complex”. O MAC forma um grande canal através da membrana da célula alvo, que permite a entrada de electrólitos e água através da membrana, provocando assim a lise do agente patogénico (4).

#### *Mannose-binding lectin*

A MBL (mannose-binding lectin) é um membro da família das proteínas designadas colectinas e apresenta-se, em microscopia electrónica, como um bouquet. Esta proteína é um oligómero de sub-unidades, as quais compreendem 3 cadeias peptídicas idênticas. Cada cadeia é caracterizada por um domínio de lectina, uma região hidrofóbica enrolada (“neck”), uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína. As 3 cadeias estão associadas de forma a originar uma tripla hélice clássica Gly-X-Y na região colagenosa (1).

A MBL é uma proteína de fase aguda do sistema imune inato, que participa na activação do complemento e na opsonização de antígenos (2). É secretada pelo fígado e pensa-se que a sua activação é induzida por citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$  e outras).

Na circulação, a MBL associa-se a novas serina proteases conhecidas como MASPs. Esta associação gera uma unidade funcional que se torna enzimaticamente activa, promovendo a ligação da lectina a uma superfície microbiana rica em carboidratos. A ligação dá-se pela capacidade da MBL reconhecer arranjos específicos de carboidratos presentes na superfície de várias bactérias, fungos, vírus e protozoários. Os carboidratos reconhecidos são, p.e, *N*-acetilglucosamina, manose, *N*-acetilmanoseamina, L-fucose e glucose, contudo não se liga à galactose (6). Em condições normais não se liga às células do hospedeiro devido à diferença no arranjo dos carboidratos e à terminação destes em ácido siálico.

### *Polimorfismos do gene MBL2*

A MBL é codificada pelo gene *MBL2* posicionado no cromossoma 10 (10q11.2-q21) que contém quatro exões (3). Embora exista um pseudogene (*MBL1*), apenas MBL-2 foi detectado no soro humano (7).

Através da sequenciação do *MBL2* foi possível caracterizar três SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) presentes em loci diferentes no exão1 (3). Estas mutações dão-se ao nível do codão 54, pela substituição da glicina por ácido aspártico, no codão 57 pela substituição da glicina por ácido glutâmico e no codão 52 pela substituição da arginina por cistina. Estes alelos foram designados por B, C e D, respectivamente e o alelo normal por A (7). A presença de um destes alelos, B, C ou D é designado como alelo O.

Para além de características de determinadas populações estas variantes têm um papel importante no nível plasmático de MBL. Mesmo em casos de heterozigotias a percentagem de MBL funcional desce cerca de 90 %, devido à instabilidade das proteínas variantes, que são facilmente degradadas, perdendo a capacidade de se ligar e activar o sistema do complemento (7).

Desta forma, indivíduos portadores dos alelos B, C ou D apresentam menor concentração sérica de MBL, em relação a portadores do alelo normal (A) (8). Os homozigóticos OO têm um maior risco de infecções durante a infância, ou tratamentos imunossupressores, assim como de desenvolverem doenças autoimunes.

Existem também SNPs ao nível do promotor que influenciam a expressão do MBL. São consideradas as mutações em - 550 (H/L), - 221 (Y/X) e na região 5' untranslated do exão1 na posição +4 a mutação (P/Q).

Com os diferentes polimorfismos ao nível do exão1 e do promotor foram identificados sete haplótipos:

Cromossoma normal (A): *HYP A*, *LYP A*, *LYQ A*, *LXP A*.

Cromossoma com as variantes B, C ou D: *HYP D*, *LYP B* e *LYQ C*.

Os haplotipos *HY*, *LY* e *LX* estão relacionados, respectivamente, com alta, média e baixa actividade do gene promotor, de acordo com doseamentos séricos (9).

## **Objectivos**

Avaliar, em doentes com Artrite Reumatóide, o polimorfismo do gene *MBL2* e as concentrações séricas da Mannose-Binding Lectin.

Relacionar polimorfismos com concentrações séricas e com Artrite Reumatóide.

## **Hipóteses**

A presença de polimorfismos no gene que codifica a proteína MBL pode ter consequências nos seus níveis séricos, podendo contribuir para uma susceptibilidade aumentada para AR.

## **Métodos**

O estudo dos polimorfismos da MBL será realizado através de amplificação por PCR com *primers* específicos (PCR-SSP).

O doseamento sérico da MBL será realizado por ELISA.

## **População**

O estudo será efectuado em 100 indivíduos com diagnóstico de Artrite Reumatóide segundo os critérios do American College of Rheumatology.

Serão efectuadas colheitas de sangue periférico e consequente extracção do DNA.

## Referências

- (1) – GOLDSBY, Richard; KINDT, Thomas; OSBORNE, Barbara. *Kuby Immunology*. Freeman and Company: 4ª Edição.
- (2) – BURMESTER, Gerd-Rüdiger; PEZZUTTO, Antonio. *Color Atlas of Immunology*. Thieme: New York 2003.
- (3) Frederiksen P.D., Jensenius J.C., Thiel S. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Aarhus, DK8000 Denmark.
- (4) DELVES, Peter; ROITT, Ivan. *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Science.
- (5) Kilpatrick D.C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfusion Medicine*, 2002, 12, 335-351.
- (6) Jensenius J.C., Petersen S.V., Thiel S. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molecular Immunology* 38 (2001) 133-149.
- (7) Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochemical Society Transactions* (2008) Volume 36, part 6.
- (8) Tsutsumi A, Takahashi R, Sumida T. Mannose binding lectin: Genetics and autoimmune disease. 2005.
- (9) Naito, H., Ikeda, A., Hasegawa, K., Oka, S., Uemura, K., Kawasaki, N. and Kawasaki, T. (1999) Characterization of human serum mannan-binding protein promoter. *J. Biochem. (Tokyo)* 126, 1004–1012).