



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ulisses Camargo

Sistemas Histo-Sanguíneos ABO, Secretor e Lewis Como Fatores de Risco Para a Espondilite Anquilosante

São José do Rio Preto
2016

Ulisses Camargo

Sistemas Histo-Sanguíneos ABO, Secretor e Lewis Como Fatores de Risco Para a Espondilite Anquilosante

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto
2016

Camargo, Ulisses

Sistemas Histo-Sanguíneos ABO, Secretor e Lewis Como Fatores de Risco Para a Espondilite Anquilosante / Ulisses Camargo

São José do Rio Preto, 2016

71 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. Espondiloartrite; 2. Espondilite Anquilosante; 3. Sistemas Histo-Sanguíneos; 4. antígeno Le^a; 5. HLA-B*27

ULISSES CAMARGO

**Sistemas Histo-Sanguíneos
ABO, Secretor e Lewis Como
Fatores de Risco Para a
Espondilite Anquilosante**

BANCA EXAMINADORA

**TESE PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR**

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luiz C. de Mattos

2º Examinador: Profa. Dra. Sâmira Ambar Lins

3º Examinador: Prof. Dr. Marcelo A. I. Barboza

4º Examinador: Profa. Dra. Fabiana Nakashima

5º Examinador: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

Suplentes: Profa. Dra. Marilanda F. Bellini

Profa. Dra. Vânia B. Piatto

São José do Rio Preto, 22/09/2016

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas e Quadros.....	v
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	01
1.1 Espondiloartrites.....	01
1.2 Espondilite Anquilosante.....	03
1.2.1 Antígenos Leucocitários Humanos e Espondilite Anquilosante	06
1.3 Sistemas Histo-Sanguíneos ABO, Secretor e Lewis	09
1.3.1 Sistema Histo-Sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em EpA	15
2. Material e Métodos.....	17
2.1 Aspectos éticos do estudo	17
2.2 Seleção dos pacientes e controles.....	17
2.3 Diagnóstico Clínico das EpAs.....	18
2.4 Coleta de sangue.....	18
2.4.1 Identificação dos fenótipos eritrocitários ABO.....	19
2.4.2 identificação dos fenótipos eritrocitários Lewis.....	19
2.4.3 Identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor.....	20
2.4.4 Extração do DNA genômico humano.....	20
2.4.5 Avaliação da qualidade do DNA genômico humano.....	20

2.4.6 Identificação do gene <i>HLA-B*27</i>	21
2.4.7 Identificação da substituição G428A do gene <i>FUT2</i>	21
2.5 Análise estatística.....	23
3. Resultados.....	24
4. Discussão.....	31
5. Conclusões.....	42
6. Referências Bibliográficas.....	43
Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP	55

“Dedico este trabalho aos meus e àqueles que comigo andam”

Agradecimentos

À Diretoria geral da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e seu Coordenador, Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira.

À FAMERP, pelo apoio, especialmente ao Departamento de Biologia Molecular.

Ao Ambulatório de Reumatologia do Hospital de Base da FUNFARME, e aos profissionais que lá trabalham, especialmente os Doutores Roberto Acayaba de Toledo e Ricardo Acayaba de Toledo, que colaboraram com a seleção da casuística.

Ao acadêmico João Antonio de Camargos Pinto Robles pelo apoio no levantamento de dados clínicos dos pacientes e controles que compuseram a casuística deste estudo.

Aos grupos de pacientes e controles.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, pelo aprendizado, pela orientação e confiança depositada a este velho e grande amigo, que muito o considera e o admira.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Imunogenética da FAMERP pelo apoio e solidariedade, em especial à Cinara de Cássia Brandão de Mattos, pela amizade e apoio.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pelos esclarecimentos e suporte dado.

Aos meus queridos e adorados pais, João Camargo e Jacira de Oliveira Camargo que não deixam meus anjos pregarem os olhos. Obrigado.

Aos meus amados filhos Pedro, Maíra, Henrique e querida esposa Nilda Regina Meretti Camargo, esta mulher amiga e mãe que é minha cara metade e que me permite ser a sua metade cara.

Lista de Figuras

Figura 1.	Organização dos genes HLA no cromossomo 6.....	7
Figura 2.	Ilustração das fenotipagens direta e reversa do sistema histo- sanguíneo ABO	19
Figura 3.	Ilustração da fenotipagem do sistema histo-sanguíneo Lewis com os anti-soros anti-Le ^a e anti-Le ^b	20
Figura 4.	Perfil eletroforético do fragmento de 1033 pb do exon 2 do gene FUT2, após digestão com a enzima Ava II	24

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1.	Frequências de espondiloartrites em países ibero-americanos	3
Tabela 2	Prevalência da espondilite anquilosante e do gene <i>HLA-B*27</i> em três etnias	6
Tabela 3	Fenótipos eritrocitários, antígenos, anticorpos regulares e frequências dos Sistemas Histo-Sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em três grupos étnicos	11
Quadro 1	Genes, enzimas e antígenos expressos pelos sistemas histo- sanguíneos ABO, Secretor e Lewis	12
Quadro 2	Combinações de Glicosiltransferases responsáveis pela variabilidade antigênica tecidual resultante da expressão dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis	14
Tabela 4	Médias de idade, desvio-padrão, mínimo, máximo, mediana e gênero de pacientes com EpA e controles sem espondiloartrites	25
Tabela 5	Frequências das EpA de acordo com o gênero	26
Tabela 6	Valores para médias de idade e médias de idade do início dos sintomas de 119 pacientes com espondiloartrites	26
Tabela 7	Frequência dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em pacientes e controles sem espondiloartrites	27
Tabela 8	Perfis antigênicos resultantes da expressão dos genes ABO, FUT2 e FUT3 em pacientes com espondiloartrites e controles sem doença	28

Tabela 9	Perfis antigênicos resultantes da expressão dos genes ABO, FUT2 e FUT3 em pacientes com espondilite anquilosante e controles sem doença	29
Tabela 10	Frequências do antígeno Lewis a (Le ^a) em pacientes e controles com espondilite anquilosante HLA-B*27 positivos e negativos .	30
Tabela 11	Frequências do antígeno Le ^a em pacientes masculinos e femininos com espondilite anquilosante, HLA-B*27 positivos e negativos	31

Lista de Abreviaturas e Símbolos

μ l	Microlitro
ABO	Sistema histo-sanguíneo ABO
ALe ^b	Antígeno ALe ^b
ASAS	Assessment of SpondyloArthritis international Society
BLe ^b	Antígeno BLe ^b
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
dATP	Deoxiadenina trifosfato
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
dGTP	Deoxiguanina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
dTTP	Deoxitimina trifosfato
EA	Espondilite anquilosante
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzimaimunoensaio
EpA	Espondiloartrite
ESSG	European Spondylarthropathy Study Group
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
<i>FUT1</i>	Gene fucosiltransferase 1
<i>FUT2</i>	Gene fucosiltransferase 2
<i>FUT3</i>	Gene fucosiltransferase 3
FUTII	Enzima fucosiltransferase II

FUTIII	Enzima fucosiltransferase III
GTA	Enzima glicosiltransferase A
GTB	Enzima glicosiltransferase B
HLA	Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano
HLA-B27	Antígeno Leucocitário Humano de classe I do tipo B27
<i>HLA-B*27</i>	Alelo de número 27 do gene HLA*B
IC 95%	Intervalo de Confiança a 95%
IgA	Imunoglobulina A
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
KCl	Cloreto de Potássio
LE	Gene Lewis
Le ^a	Antígeno Le ^a
Le ^b	Antígeno Le ^b
Le(a+b-)	Fenótipo eritrocitário Le(a+b-)
Le(a-b+)	Fenótipo eritrocitário Le(a-b+)
Le(a-b-)	Fenótipo eritrocitário Le(a-b-)
mL	Mililitro
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MilliQ	Água ultrapura
mM	Milimol
Ng	Nanograma
OP	Oligossacarídeo Precursor
OR	Odds Ratio

Pb	Pares de bases
PCR	Proteína C-Reativa
PCR-RFLP	Reação em cadeia da Polimerase - Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
PCR-SSOP	Reação em cadeia da Polimerase – Oligonucleotídeos de Sequência Específica
rpm	Rotações por minuto
<i>SE</i>	Gene Secretor
TBE1x	Tampão Tris-EDTA Borato
TCD4	Linfócito T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
U	Unidade

Resumo

Introdução. As espondiloartrites compreendem um grupo de doenças fortemente associadas ao gene *HLA-B*27*. Tem sido proposto que genes não pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade humano influenciam a gênese destas doenças especialmente nos pacientes *HLA-B*27* negativos. **Objetivos.** O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que os antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados à espondiloartrites, especialmente a espondilite anquilosante (EA). **Material e método.** Foram analisados 394 pacientes com suspeita clínica de espondiloartrites encaminhados para identificação do gene *HLA-B*27*. Cento e dezenove (30,2%) tiveram o diagnóstico de espondiloartrite confirmado de acordo com os critérios ASAS. Os 275 (69,8%) restantes compuseram o grupo controle. A identificação do gene *HLA-B*27* foi realizada com o uso do método PCR-SSOP. A caracterização dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis foi realizada com o uso dos métodos hemaglutinação e PCR-RFLP. O teste exato de Fisher, o qui-quadrado, os valores de Odds Ratio (OR) e do intervalo de confiança a 95% foram calculados com o uso do software GraphPad InStat, aceitando o erro de 5%. **Resultados.** Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas frequências dos perfis antigênicos dos sistemas histo-sanguíneos ABO (χ^2 : 1.152; $p=0,764$; GL: 3), Secretor (χ^2 : 0.779; $p=0,377$; GL: 1) e Lewis (χ^2 : 1.853; $p=0,396$; GL: 2) de pacientes e controles. Foi observada maior frequência do antígeno Le^a em pacientes com EA, comparados aos controles (OR: 1.833; IC 95%: 1.025 – 3.284; $p=0,053$). Este antígeno mostrou-se fortemente associado à EA em pacientes *HLA-B*27* negativos comparados aos controles (OR: 4.469; IC 95%: 1.931 – 10.342; $p=0,0007$). Esta associação se manteve apenas no gênero masculino na ausência do gene *HLA-B*27* (OR: 6.880; IC 95%: 1.852 – 25.564; $p = 0,004$). **Conclusões.** A EA está associada ao antígeno Le^a nos pacientes masculinos *HLA-B*27* negativos.

Palavras-chave: Espondiloartrite, Espondilite Anquilosante, Sistemas Histo-Sanguíneos, antígeno Le^a, *HLA-B*27*.

Abstract.

Introduction. The spondyloarthritis encompasses a group of diseases strongly associated with *HLA-B*27* gene. It has been proposed that genes not belonging to the major histocompatibility complex human influence the genesis of these diseases especially in patients *HLA-B*27* negative. **Objectives.** The aim of this study was to test the hypothesis that the antigens of the ABO, Secretor and Lewis histo-blood systems are associated with spondyloarthritis, especially ankylosing spondylitis (AS). **Material and methods.** Three hundred and ninety-four patients with clinical suspicion of spondyloarthritis sent for identification of *HLA-B*27* gene were analyzed. One hundred and nineteen (30.2%) had confirmed the diagnosis of spondyloarthritis according to the ASAS criteria. The remaining 275 (69.8%) were used as controls. The identification of *HLA-B*27* gene was performed using the PCR-SSOP method. The identification of the antigens of the ABO, Secretor and Lewis histo-blood systems was performed using hemagglutination and PCR-RFLP methods. The exact Fisher's test, the chi-square, and the values of Odds Ratio (OR) and Confidence Interval set at 95% were calculated using the GraphPad INSTAT software, accepting the error of 5%. **Results.** No statistically significant differences were observed in the frequency of antigenic profiles of ABO (χ^2 : 1.152; $p = 0.764$; GL: 3), Secretor (χ^2 : 0.779; $p = 0.377$; GL: 1) and Lewis (χ^2 : 1.853; $p = 0.396$; GL: 2) histo-blood groups between patients and controls. The Le^a antigen was more frequent in patients with AS compared to controls (OR: 1.833; 95% CI: 1025-3284, $p = 0.053$). This antigen was strongly associated with AS in *HLA-B*27* negative patients compared to controls (OR: 4.469; 95% CI: 1931-10342; $p = 0.0007$). This association remained only in males in the absence of *HLA-B*27* gene (OR: 6.880; 95% CI: 1852-25564; $p = 0.004$). **Conclusions.** AS is associated to the Le^a antigen in *HLA-B*27* negative male patients.

Keywords: Spondyloarthritis, Ankylosing Spondylitis, Histo-Blood Systems, Le^a antigen, *HLA-B*27*.

1. Introdução

1.1 Espondiloartrites

O critério inicial de classificação das doenças reumáticas está baseado principalmente na ocorrência de dores associadas ao sistema locomotor com subsequentes limitações funcionais. Entretanto, com o uso de exames de imagens por raio X, da detecção do fator reumatóide e da associação de algumas doenças com o antígeno HLA-B27, muito destas doenças foram classificadas em grupo distinto por apresentarem características comuns de natureza clínica, radiológica e laboratorial⁽¹⁾. Em 1974, Moll e Wright propuseram o termo "espondiloartropatias soronegativas" a este grupo de doenças, primeiramente pela similaridade clínica, segundo pela ausência do fator reumatóide e presença do HLA-B27. Em 2009, o termo "espondiloartrites" (EpA) foi proposto pelo grupo Assessment of SpondyloArthritis international Society – ASAS (<http://www.asas-group.org/mission-statement.php>), uma vez que o mesmo reflete o acometimento axial e periférico das doenças anteriormente classificadas como "espondiloartropatias soronegativas". Assim, pertencem a este grupo, doenças como a espondilite anquilosante (EA), a artrite psoriásica (AP), a artrite reativa (AR), as espondiloartrites indiferenciadas (EI) e as artrites associadas às doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e retocolite ulcerativa)⁽²⁾.

No início dos anos 90, o Grupo Europeu de Estudo das Espondiloartropatias (ESSG) estabeleceu critérios internacionalmente reconhecidos, para o diagnóstico deste grupo de doenças⁽³⁾. Recentemente, o grupo ASAS propôs novos critérios para o diagnóstico das EpA incluindo, dentre eles, exames de imagens tomados por ressonância magnética nuclear (<http://www.asas-group.org/mission-statement.php>).

As características clínicas relevantes compreendem dor axial, sinovites assimétricas com predominância das grandes articulações dos membros inferiores, dores em nádegas alternantes e entesopatias periféricas, especialmente na inserção do tendão calcâneo e/ou fásia plantar. Além destas, são incluídas diarreias agudas e uretrites que precedem as manifestações articulares. A ocorrência de doença inflamatória intestinal e psoríase cutânea bem como história familiar positiva para uma das doenças do grupo, também são consideradas dentro deste contexto. O principal indicador de imagem das EpAs é a presença de sacroiliíte unilateral ou bilateral com graus variáveis de acometimento. O único marcador genético de suscetibilidade até então associado a este grupo de doenças, identificado no início da década de 70, é o antígeno de histocompatibilidade humano HLA-B27^(2,4,5).

Em recente revisão sistemática Stolwijk e colaboradores⁽⁶⁾ relataram que as EpAs apresentam grande variação nas taxas de prevalência. Estudos realizados nas décadas passadas em diferentes populações indicam que a prevalência destas doenças varia de 0,47%⁽⁷⁾ a 1,9%⁽⁸⁾. O Registro Ibero-Americano de Espondiloartrites (RESPONDIA), criado em 2005, vem documentando dados demográficos, clínicos e de qualidade de vida de pacientes portadores de EpAs nos países ibero-americanos⁽⁹⁾. Este grupo tem divulgado nos últimos anos a prevalência de cada uma das doenças dentro deste grupo, mas não a prevalência global nas populações destes países⁽¹⁰⁾. Entretanto, Stolwijk e colaboradores⁽⁶⁾ relatam frequências de EpAs variando de 0,10 a 1,25 em países das Américas Central e do Sul. Como a EA é a forma de EpA mais comum na região de São José do Rio Preto⁽¹¹⁾ será dado destaque às características desta doença no contexto desta tese. A tabela 1 mostra as frequências das EpAs em diversos países ibero-americanos.

Tabela 1. Frequências de espondiloartrites em países ibero-americanos de acordo com o grupo RESPONDIA.⁽¹⁰⁾

	ARG	BRA	CHI	CTR	ESP	MXC	PER	POR	URU	VEN
N	405	1036	109	33	2367	172	60	101	53	69
EA (%)	30,4	72,3	58,7	45,5	61,5	59,9	53,3	83,2	52,8	55,1
AP (%)	46,7	13,7	25,7	0,0	17,5	15,1	6,7	11,9	17,0	21,7
EI (%)	12,3	6,3	7,3	45,5	2,1	19,8	13,3	0,0	18,9	11,6
AR(%)	6,4	3,6	0,9	0,0	1,9	2,9	1,7	3,0	0,0	0,0
AE(%)	0,0	1,0	5,5	0,0	1,0	1,7	0,0	2,0	3,8	4,3

ARG: Argentina, BRA: Brasil; CHI: Chile; CTR: Costa Rica; ESP: Espanha; MXC: México; PER: Perú; POR: Portugal; URU: Uruguai; VEN: Venezuela. EA: Espondilite Anquilosante; AP: Artrite Psoriásica; EI: Espondiloartrite Indiferenciada; AR: Artrite Reativa; AE: Artrite Enteropática

1.2 Espondilite anquilosante (EA)

A expressão “espondilite anquilosante” deriva da fusão das palavras gregas *spondylos* (vértebra) e *ankylos* (fusão). Esta doença é de natureza autoimune, inflamatória, de evolução crônica e acomete principalmente as articulações sacroilíacas, a coluna vertebral, as articulações periféricas em menor grau, com eventual fusão das articulações axiais envolvidas⁽¹²⁾.

Há relatos históricos demonstrando que esta doença acomete o homem há séculos uma vez que foram descritas alterações anatômicas características em múmias do antigo Egito⁽¹³⁾. Todavia, a primeira descrição desta doença como sendo uma enfermidade que conduz à imobilidade e à rigidez de coluna, se deu em 1690 na Irlanda. Sua caracterização como entidade clínica distinta foi feita por Adolfo Strumpell, na

Alemanha em 1884, por Wladimir Von Becheterew na Rússia, em 1893, e por Pierre Marie na França, em 1898⁽¹⁴⁾.

Durante muito tempo a EA foi chamada de doença de Von Becheterew e também Doença de Marie Strumpell. A expressão “espondilite reumatóide” também foi utilizada, pois se pensava tratar de uma forma variante da artrite reumatóide. Contudo, com a caracterização da sacroilíte após o surgimento do exame radiológico, esta doença passou a ser denominada EA. A EA acomete preferencialmente a coluna vertebral. O quadro clínico se inicia normalmente com perda de peso, fadiga, dor difusa na região lombo-sacral com irradiação aos glúteos e coxas, rigidez matinal prolongada e desconforto após repouso⁽¹⁴⁾.

Com a evolução, a rigidez se acentua pela ossificação gradual da camada superficial do ânulo fibroso, fusão das articulações vertebrais, calcificação ligamentar axial; progressivamente se instala alterações posturais típicas como retificação da lordose lombar associada à retroversão pélvica e atrofia dos músculos da região. A cifose torácica se acentua, a cabeça se projeta para frente predispondo à contraturas e encurtamentos de cadeias musculares que levam o paciente a adotar a postura espondilítica chamada “postura de esquiador”. A fusão das articulações que envolvem o tórax reduz sua expansibilidade acarretando fraqueza muscular e restringindo a capacidade respiratória. A astenia do conjunto de músculos acessórios da respiração leva os pacientes a adotarem a respiração diafragmática. As entesopatias que acometem as inserções do quadríceps na patela e na tuberosidade da tíbia bem como a inserção do tríceps sural no calcâneo, além das inserções da fâscia plantar nos metatarsianos, contribuem para a origem das algias e consequentes limitações funcionais⁽¹⁵⁾.

Manifestações extra-articulares de graus variáveis são observadas em pacientes com EA e podem influenciar a morbidade e o prognóstico comprometendo a qualidade de vida. Alterações como irite, uveíte anterior aguda, fibrose pulmonar apical e cavitação, nefropatia por depósito de IgA, amiloidose secundária, osteoporose, deslocamentos de vértebras, subluxação atlanto-axial e síndrome da cauda equina são exemplos de manifestações extra-articulares^(1,15).

A prevalência de EA é variável nas diferentes populações. Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência varia de 0,1% a 0,9% em populações caucasianas⁽¹⁶⁾, 0,01% a 0,4% em asiáticos^(17,18) e é rara entre africanos⁽¹⁹⁾. Sua incidência é estimada em 6,3 casos novos por 100.000 habitantes⁽²⁰⁾. A EA acomete, via de regra, maior proporção de indivíduos do sexo masculino, portadores do gene *HLA-B*27*, preferencialmente entre a segunda e a quarta décadas de vida^(21,22). De maneira geral, entre 1 e 2% dos portadores do gene *HLA-B*27* desenvolvem a EA. Entretanto, cerca de 90% dos pacientes com EA caucasianos, portam este gene em seu genoma⁽²¹⁾. Esta coincidência faz do gene *HLA-B*27* o mais importante marcador genético de suscetibilidade a uma doença autoimune⁽²³⁾. A tabela 2 mostra a prevalência EA e as frequências do gene *HLA-B*27* em diferentes etnias.

Tabela 2. Prevalência da espondilite anquilosante e do gene *HLA-B*27* em três etnias.

Etnias	Prevalência	<i>HLA-B*27</i> em pacientes (%)	<i>HLA-B*27</i> na população geral (%)
Africanos	Baixa	Raro	Raro
Caucasianos	0,1 a 0,9	80 a 90	2 a 18
Japoneses	0,01	83	< 1

Adaptado de Stolwijk et al. 2015 ⁽⁶⁾

Estudos realizados em diferentes cidades brasileiras demonstraram frequências do gene *HLA-B*27* em pacientes com EA iguais a 82,3% em São Paulo⁽²⁴⁾, 75% em Curitiba⁽²⁵⁾, 66,6% em Recife⁽²⁶⁾, 65% em Belo Horizonte⁽²⁷⁾, 78% em Campinas⁽¹²⁾ e 61,7% em São José do Rio Preto⁽²⁸⁾.

1.2.1 Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) e a espondilite anquilosante (EA)

O HLA é um sistema genético localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21) que controla as respostas imunes adaptativas humoral e celular. Constitui-se de um grupo de genes altamente polimórficos que codificam antígenos de histocompatibilidade (glicoproteínas). Os genes HLA são agrupados nas classes I (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*), II (*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* e *HLA-DPB1*) e III (genes que codificam outros fatores imunes)⁽²⁹⁾. A figura 1 ilustra a organização dos genes HLA no cromossomo 6.

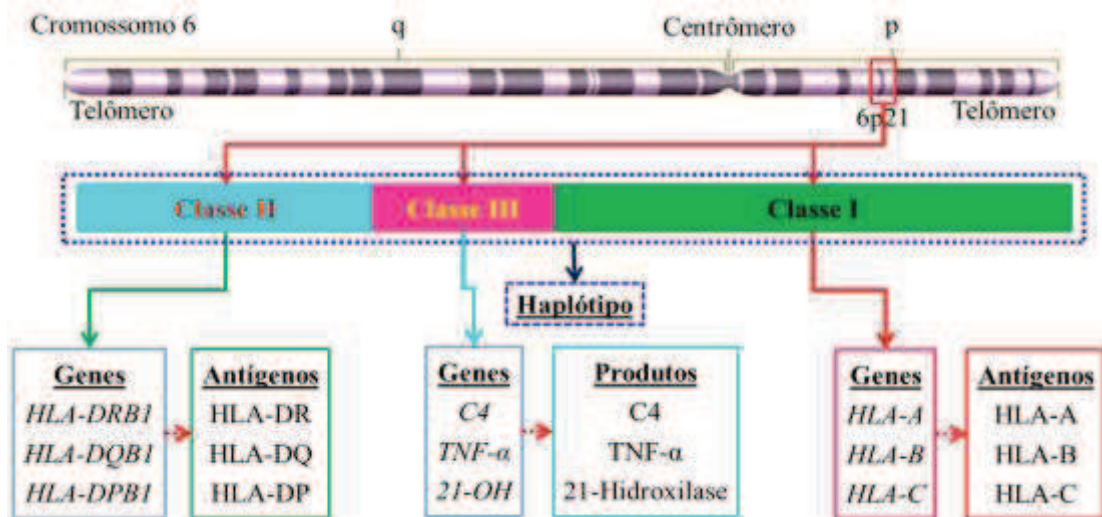


Figura 1. Ilustração da organização dos genes HLA no cromossomo 6. (Modificado de Klein & Sato)⁽³⁰⁾

A importância biológica e imune do HLA resulta do fato de seus genes codificarem glicoproteínas responsáveis pela apresentação de antígenos oriundos de microrganismos aos linfócitos T CD4 e T CD8. Os linfócitos T CD4 e CD8 reconhecem antígenos ligados ao HLA de classe II e classe I, respectivamente, e assim geram respostas imunes adaptativas com formação de memória imune⁽³¹⁾. Grande número de alelos foi identificado nos genes HLA de classe I e II. Esta elevada variabilidade parece ter implicações na eficiência das respostas imunes adaptativas e no envolvimento deste sistema genético altamente polimórfico com a suscetibilidade e a resistência a diferentes doenças⁽³⁰⁾.

Foi observado desde os anos 70 que alguns genes HLA elevam a predisposição a doenças autoimunes. Dentre eles, o gene *HLA-B*27* foi identificado como o principal marcador de suscetibilidade à EA^(2,4,5). Vários alelos do gene *HLA-B*27* foram identificados em indivíduos normais e em pacientes com EA⁽²³⁾. A comprovação da

elevada variabilidade deste gene tem despertado a atenção para a investigação da contribuição de seus alelos na suscetibilidade a esta doença.

Alguns estudos demonstraram associações entre a EA e os alelos *HLA-B*2702*, *HLA-B*2704*, *HLA-B*2705* e *HLA-B*2707* em caucasianos^(23;32). Entretanto, os alelos *HLA-B*2706* e *HLA-B*2709*, encontrados no sudoeste da Ásia e na Sardenha, Itália, não estão associados a esta doença^(33; 34). Um estudo realizado no Estado de São Paulo avaliou os subtipos do gene *HLA-B*27* em pacientes com EA⁽³⁵⁾. Os autores observaram associações positivas com os alelos *HLA-B*2702*, *HLA-B*2704* e *HLA-B*2705*, e negativas com os alelos *HLA-B*2703* e *HLA-B*2707*. Estes dados sugerem que a associação entre o gene *HLA-B*27* e a EA é influenciada pelo tipo de alelo e pela etnia.

O gene *HLA-B*27* é o único marcador genético de suscetibilidade conhecido até o momento que apresenta forte associação com a EA e que predomina na maioria das populações. Esta associação eleva de maneira acentuada o risco relativo, fazendo com que o antígeno HLA-B27, o produto protéico do gene *HLA-B*27*, constitua um fator “quase que necessário” para o desenvolvimento desta doença em populações caucasianas. Entretanto, os mecanismos pelos quais este gene e seu produto elevam a suscetibilidade à EA não foram elucidados⁽²³⁾.

Diferentes hipóteses foram apresentadas para explicar o papel biológico do antígeno HLA-B27 na gênese desta doença. Segundo a hipótese do peptídeo artritogênico, peptídeos bacterianos ou virais ligados ao antígeno HLA-B27, quando apresentados aos linfócitos T CD8, mimetizam componentes próprios que são reconhecidos pelos receptores de antígenos destas células, determinando respostas imunes de

autoagressão⁽²²⁾. A hipótese do mimetismo molecular propõe que epítopos de origem bacteriana mimetizam regiões do antígeno HLA-B27, levando ao reconhecimento desta molécula pelos linfócitos T CD8 como componente estranho. O reconhecimento do antígeno HLA-B27 por linfócitos T CD4 ao invés de linfócitos T CD8 é apontado como um possível mecanismo indutor de resposta autoimune. Finalmente, o desenvolvimento de respostas inflamatórias não dependentes da apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4 e T CD8, mas com produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) é apontado como um dos fatores que contribuem para a gênese da EA^(22;23).

1.3 Sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis

A identificação de marcadores imunogenéticos em EpAs é de extrema importância para a compreensão da epidemiologia, do diagnóstico e da fisiopatologia deste grupo de doenças, mesmo tendo em mente que as diferentes formas de manifestação clínica destas doenças autoimunes são influenciadas por múltiplos fatores. Embora associações entre o gene *HLA-B*27* e estas doenças tenham sido amplamente investigadas, são escassos os estudos correlacionando outros marcadores genéticos não ligados ao HLA (por exemplo, os sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis). É possível que em pacientes portadores de espondiloartrites, a variabilidade genética resultante dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis seja peculiar, proporcionando níveis distintos de suscetibilidade ou resistência que possam ser associados à heterogeneidade clínica destas doenças. Além disso, especula-se que interações epistáticas entre o gene *HLA-B*27* e os genes *ABO*, *FUT2* (Secretor) e *FUT3* (Lewis) contribuam, isoladamente ou em conjunto, para as espondiloartrites. Portanto, análises combinadas do sistema HLA com os sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis podem favorecer a

identificação de perfis antigênicos teciduais que possam ser utilizados como marcadores imunogenéticos.

A expressão “sistema histo-sanguíneo” foi inicialmente proposta para o sistema ABO⁽³⁶⁾, pois embora seus antígenos tenham sido originariamente identificados nos eritrócitos humanos, são amplamente expressos em uma variedade de tecidos e secreções exócrinas⁽³⁷⁾. Entretanto, os sistemas Secretor e Lewis são considerados sistemas histo-sanguíneos haja vista apresentarem relações gênicas, enzimáticas, bioquímicas e imunes com o sistema ABO. As interações epistáticas entre seus genes contribuem para seu elevado polimorfismo, sua ampla expressão tecidual, sua importância clínica e biológica⁽³⁸⁾.

O sistema histo-sanguíneo ABO permite a classificação dos humanos em quatro grupos: A, B, AB e O. O sistema Secretor, permite a classificação em dois grupos: Secretor e não Secretor. Os Secretores, além de expressar os antígenos do sistema ABO nos eritrócitos, também o fazem em outros tecidos e nas secreções exócrinas. Por outro lado, os não Secretores expressam os antígenos do sistema ABO apenas nos eritrócitos, mas não em outros tecidos e secreções exócrinas. O sistema Lewis permite a classificação em três fenótipos os quais podem ser encontrados nos eritrócitos e em outros tecidos: Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-)⁽³⁹⁾. A tabela 3 contém as frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis, seus antígenos, anticorpos em três grupos étnicos.

Tabela 3. Fenótipos eritrocitários, antígenos, anticorpos regulares e frequências dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em três grupos étnicos.

Sistemas histo-sanguíneos			Grupos étnicos		
Fenótipos	Antígenos	Anticorpos	Caucasianos	Africanos	Asiáticos
ABO					
A	A	Anti-B	40%	30%	28%
B	B	Anti-A	11%	12%	27%
AB	A, B	-	4%	5%	5%
O	H	Anti-A, anti-B	45%	53%	40%
Secretor					
Secretor	H, A, B	-	80%	85%	95%
Não Secretor	-	-	20%	15%	5%
Lewis					
Le(a+b-)	Le ^a	-	22%	23%	1%
Le(a-b+)	Le ^b	-	72%	55%	89%
Le(a-b-)	-	-	6%	22%	10%

Os antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis não são produtos gênicos primários. Estes antígenos são sintetizados por glicosiltransferases codificadas por genes específicos, as quais interagem no processo de síntese e determinam ampla variabilidade estrutural e expressão tecidual. Estas enzimas incorporam, de forma sequencial, unidades de monossacarídeos a cadeias oligossacarídicas precursoras lineares ou ramificadas, criando novas especificidades antigênicas. Estas características imputam a estes sistemas histo-sanguíneos, elevada complexidade nos níveis gênico, enzimático, antigênico e imune^(38,39,40). O quadro 1 apresenta os genes, as enzimas e os antígenos expressos pelos sistemas ABO, Secretor e Lewis.

Quadro 1. Genes, enzimas e antígenos expressos pelos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis.

Sistemas	Genes	Glicosiltransferases	Antígenos
Secretor	<i>FUT2</i>	α -2-L-Fucosiltransferase (FUTII)	H
Lewis	<i>FUT3</i>	α -3/4-L-Fucosiltransferase (FUTIII)	Le ^a , Le ^b , ALe ^b , BLe ^b
ABO	<i>ABO</i>	α -3-N-Acetil-D-Galactosaminiltransferase (GTA)	A
		α -3-D-Galactosiltransferase (GTB)	B

De acordo com a origem, os antígenos destes sistemas histo-sanguíneos são classificados em intrínsecos e extrínsecos. Aqueles do sistema ABO presentes nos eritrócitos são considerados intrínsecos, pois sua expressão ocorre nas células precursoras do tecido hematopoiético. Por outro lado, os antígenos dos sistemas ABO, Secretor e Lewis são extrínsecos pois sua expressão se dá no fígado, pâncreas, rins e intestino delgado. Estes antígenos são transportados de seus locais de síntese para o plasma e então adsorvidos às membranas eritrocitárias^(41;42).

A síntese dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis é controlada pelas glicosiltransferases codificadas pelos genes *FUT1*, *FUT2*, *FUT3* e *ABO*⁽⁴³⁾. A interação entre os genes *FUT1* e *ABO* resulta na expressão dos antígenos intrínsecos nos tecidos de origem mesodérmica como o hematopoiético e o endotélio vascular. Assim, de acordo com o tipo sanguíneo, os indivíduos expressam os antígenos H (grupo O), A (grupo A) e B (grupo B)⁽⁴⁴⁾. As interações entre os genes *FUT2*, *FUT3* e *ABO* resulta na expressão dos antígenos extrínsecos nos tecidos de origem endodérmica

como as mucosas dos tratos gastrintestinal, respiratório, geniturinário e secreções exócrinas⁽³⁹⁾. A ação integrada destes genes determina, nestes locais, a expressão de perfis antigênicos distintos daqueles encontrados nos eritrócitos⁽³⁸⁾.

A ação das enzimas FUTII, FUTIII, GTA e GTB na glicosilação dos oligossacarídeos precursores, além de criar novas estruturas antigênicas diversificam as pré-existentes elevando o grau de variabilidade dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis. Portanto, o controle genético implícito na expressão destes antígenos é complexo e depende das interações epistáticas e do nível de expressão dos genes *FUT2*, *FUT3* e *ABO* para criar variabilidade antigênica tecidual^(44;45). O quadro 2 ilustra as combinações da glicosiltransferases responsáveis pela variabilidade antigênica tecidual resultante da expressão dos antígenos que compõe os sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis.

Atualmente, existem fortes evidências de que os antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis constituem importantes elos nas relações que os seres humanos mantêm com microrganismos que colonizam sua superfície corporal, cavidades e mucosas^(46;47). A natureza das interações entre os parasitos e seus hospedeiros é complexa, mas também é possível que os antígenos destes sistemas representem importantes peças neste universo de complexidade e sobretudo, nas interações entre o ser humano e as bactérias que colonizam seu intestino delgado⁽³⁸⁾.

1.3.1 Sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em espondiloartrite

Há evidências de que bactérias Gram negativas estão envolvidas na etiopatogenia das espondiloartrites^(49;50). Paralelamente, a suscetibilidade a infecção por microrganismos é altamente influenciada pela expressão dos carboidratos que caracterizam os sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis expressos no trato gastrintestinal⁽³⁸⁾. A presença de bactérias intestinais e a expressão dos antígenos destes sistemas ocorrem no mesmo órgão e é possível que estes eventos apresentem relações biológicas entre si no sentido de modular a suscetibilidade ou a resistência à espondiloartrites.

A associação entre os sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis e as espondiloartrites foi avaliada em estudos independentes. Em um deles, Stoia e colaboradores⁽⁵¹⁾ não encontraram diferenças nas frequências dos fenótipos eritrocitários ABO em 183 pacientes com EA e controles. Em outro, Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ confirmaram os relatos de Stoia e colaboradores⁽⁵¹⁾ em relação ao sistema histo-sanguíneo ABO, mas verificaram que o fenótipo não Secretor era predominante em pacientes com EA. Em face de seus resultados Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ concluíram que o fenótipo não Secretor constitui um importante marcador imunogenético para esta doença. Em oposição a Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾, Pal⁽⁵³⁾ não encontrou diferenças nas frequências destes fenótipos na EA. Moller⁽⁵⁴⁾ também não encontrou diferenças estatisticamente significantes nas frequências do antígeno Le^a em pacientes com EA, comparados a controles.

Embora sejam relevantes pelo pioneirismo, os resultados destes estudos são parciais e inconclusivos. Estes autores utilizaram apenas testes de hemaglutinação para identificar os antígenos intrínsecos do sistema ABO. Para os sistemas Secretor e Lewis utilizaram testes de inibição da hemaglutinação em amostras de saliva. Embora estes testes sejam amplamente difundidos, apresentam limitações uma vez que a expressão dos antígenos extrínsecos dos sistemas ABO, Secretor e Lewis é complexa e requer a combinação de métodos sorológicos e moleculares para a identificação do verdadeiro perfil antigênico tecidual resultante da expressão conjunta destes sistemas⁽⁴⁸⁾.

O objetivo desta tese foi testar a hipótese de que os antígenos dos sistemas histossanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados à espondiloartrites, especialmente a EA. Um objetivo adicional foi verificar se os antígenos destes sistemas se distribuem de maneira diferente entre pacientes e controles HLA-B*27 positivos e negativos e de acordo com o sexo.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos do estudo

Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer nº 055/2011), com dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido, pois foram utilizadas amostras de sangue colhidas para a realização de exames rotineiros de identificação do *gene HLA-B*27*. Não houve necessidade de se coletar novas amostras de sangue dos pacientes selecionados.

2.2 Seleção dos pacientes e controles

No período de junho de 2007 a junho de 2015, 394 pacientes com suspeita clínica de EpA foram encaminhados rotineiramente ao Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto para investigação do *gene HLA-B*27*. Deste total, 119 pacientes que tiveram o diagnóstico de EpA confirmado pelo Ambulatório de Reumatologia da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME, de acordo com os critérios do **Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS)**, foram selecionados. As informações clínicas obtidas a partir dos prontuários médicos dos pacientes compreenderam: gênero, idade, idade de início dos sintomas. O segundo grupo foi composto de 275 pacientes também avaliados pelo Ambulatório de Reumatologia da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME, mas que não tiveram diagnóstico confirmado de EpA.

Todos os pacientes sem diagnóstico confirmado de EpA foram avaliados pela mesma equipe médica e incluídos como controles uma vez que não preencheram os critérios de diagnóstico do ASAS.

2.3 Diagnóstico clínico das EpAs

O diagnóstico clínico das EpA foi realizado pelos médicos colaboradores deste estudo, que atendem aos pacientes no Ambulatório de Reumatologia da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME. De acordo com os critérios ASAS foram considerados portadores de EpAs, pacientes com sacroiliíte observada em exames de imagem e pelo menos uma das seguintes características: lombalgia inflamatória, artrite, entesite, uveíte, dactilite, psoríase, doença de Crohn ou retocolite ulcerativa, boa resposta a anti-inflamatórios não esteroidais, história familiar, *gene HLA-B*27* e proteína C reativa elevada. O ASAS também considera como critério de diagnóstico a presença do *gene HLA-B*27* e no mínimo duas das características acima referidas.

2.4 Coleta de sangue

Uma amostra de cinco mL de sangue periférico em tubos a vácuo com EDTA foi colhido por punção venosa de cada indivíduo para identificação dos fenótipos eritrocitários ABO, Secretor e Lewis e para extração do DNA genômico, com o uso de kits comerciais (Purelink, Invitrogen).

2.4.1 Identificação dos fenótipos eritrocitários ABO

A identificação dos fenótipos eritrocitários ABO foi realizada pelo método de hemaglutinação em tubos (direta e reversa). Para a fenotipagem direta foi adicionada uma gota de suspensão de hemácias a 5% (preparada em solução isotônica) a três tubos devidamente identificados, contendo respectivamente uma gota dos anti-soros anti-A, anti-B e anti-A,B, cada. A fenotipagem reversa ocorreu pela adição de uma gota de hemácias padrão A₁ e B a dois tubos devidamente identificados contendo duas gotas do plasma, cada. Para ambas as fenotipagens os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por cerca de 1 minuto. Os resultados foram marcados em graus de aglutinação (0, 1+, 2+, 3+ e 4+) e os métodos (direta e reversa) foram absolutamente complementares e concordantes. Assim foram identificados os fenótipos A, B, AB e O, segundo o protocolo de Mattos e colaboradores⁽⁵⁵⁾. A figura 2 ilustra o resultado das fenotipagens direta e reversa do sistema histo-sanguíneo ABO.

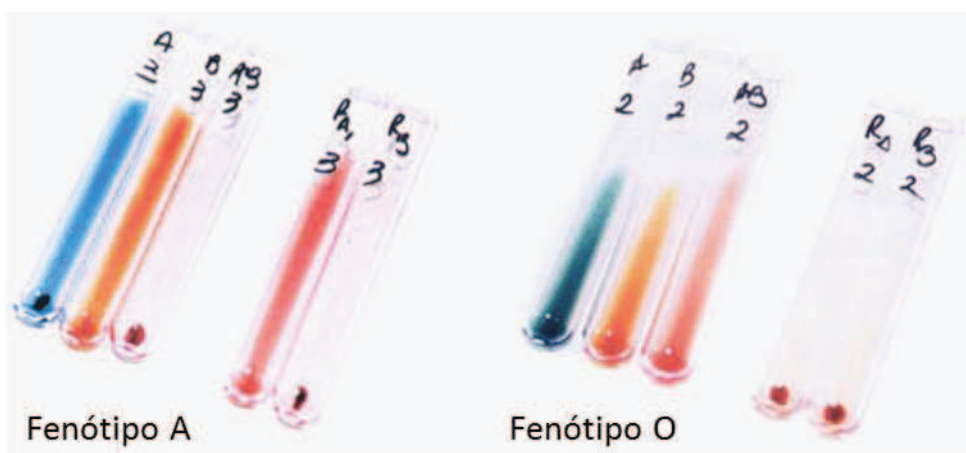


Figura 2. Ilustração das fenotipagens direta e reversa do sistema histo-sanguíneo ABO mostrando o tipo A à esquerda e o tipo O à direita.

2.4.2 Identificação dos fenótipos eritrocitários Lewis

A identificação dos fenótipos eritrocitários Lewis foi realizada pelo método de hemaglutinação em colunas de gel centrifugação da DiaMed, as quais contém os anticorpos anti-Le^a e anti-Le^b. Conforme as instruções do fabricante foi preparada uma suspensão de hemácias a 3% com o diluente I. Desta suspensão 12 µl foi adicionado as colunas de gel e centrifugados por 15 minutos a 1.000 rpm. Os resultados foram marcados em graus de aglutinação (0, 1+, 2+, 3+ e 4+), identificando se assim os fenótipos Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-). Este protocolo foi validado por Previato e colaboradores⁽⁵⁶⁾. A figura 3 ilustra o resultado das fenotipagens do sistema histo-sanguíneo Lewis.

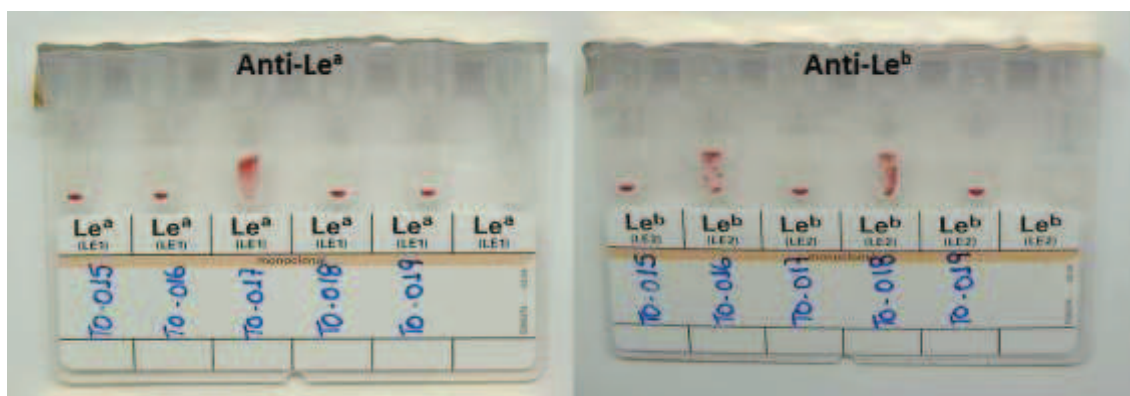


Figura 3. Ilustração da fenotipagem do sistema histo-sanguíneo Lewis com os anti-soros anti-Le^a (esquerda) e anti-Le^b (direita), cujos resultados permitem identificar os fenótipos Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-).

2.4.3 Identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor

A identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor foram inicialmente inferidas a partir da fenotipagem eritrocitária Lewis. Os indivíduos Le(a-b+) foram considerados “Secretores” enquanto os Le(a+b-) foram considerados “não Secretores” (Figura 3). Naqueles portadores do fenótipo Le(a-b-), a identificação do fenótipo secretor ou não secretor foi realizada por meio da identificação da mutação G428A do gene *FUT2*, conforme protocolo de Svensson e colaboradores⁽⁵⁷⁾. Como estes indivíduos não possuem a enzima FUTIII funcional devido a mutações que inativam o gene *FUT3*, não expressam os antígenos Le^a e Le^b.

2.4.4 Extração do DNA genômico humano

O DNA genômico foi extraído com o uso de kit comercial para extração por coluna de sílica (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen), a partir de 200 µL de sangue total colhido com EDTA. O protocolo do fabricante foi rigorosamente obedecido.

2.4.5 Avaliação da qualidade do DNA genômico humano

Utilizou-se o método de eletroforese em gel de agarose para avaliar a qualidade das amostras de DNA genômico, com a finalidade de conhecer sua integridade e o nível relativo de aparente degradação. O gel foi preparado com agarose ultrapura na concentração de 2% (Invitrogen), dissolvida em tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio (10mg / mL, Invitrogen). Na primeira canaleta foram aplicados 2 µl do

marcador de 100 pares de bases (100 pb DNA - Ladder, Invitrogen). Nas demais, aplicou-se 5 µl de DNA genômico adicionado a 2 µl de azul de bromofenol. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal (Thermo scientific – OWL Easycast™ B2) por quarenta minutos a 100 volts (Major Science – Minis-300).

2.4.6 Identificação do gene HLA-B*27

O gene HLA-B*27 foi identificado com o uso de kits comerciais (Dynal Reli™ SSO HLA-B Typing Kit, Invitrogen). As recomendações do fabricante foram rigorosamente obedecidas.

(<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/IFU%20840.01%20Rev%20014.pdf>)

2.4.7 Identificação da substituição G428A do gene FUT2

A identificação da substituição G428A do gene *FUT2* foi realizada com o uso do método de PCR-RFLP, de acordo com o protocolo de Svensson e colaboradores⁽⁵⁷⁾ e adaptações feitas por Brandão-de-Mattos e colaboradores⁽⁵⁸⁾. Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 µl, nas seguintes condições: 17,0 µL de água MilliQ, 2,5 µL de 10X PCR Buffer Minus Mg⁺⁺ (200 mM TRIS-HCL, 500 mM KCl, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM MgCl₂, Invitrogen), 1,0 µL de dNTP (100 mM de cada dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], Invitrogen), 0,4 µL de primer FUT2-G428A-9802s Sense (20 pM; 5' - GCC TTT CTC CTT TCC CAT GGC CCA C - 3'), 0,4 µL de primer FUT2-G428A-9803as Anti-sense (20 pM; 5' - TCA AAG GAC GGG CCA GCA TTA GTG C - 3') (Integrated DNA Technologies) 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl, Invitrogen) e

2,0 µL de DNA genômico (100 a 125 ng). Como controle interno de contaminação, foi realizado para cada mix, um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram 94°C 2 minutos, 5 ciclos de 94°C 30 segundos, 68°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 64°C 30 segundos e 72°C 45 segundos, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 1033 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

Uma alíquota de 15,0 µl do produto de PCR foi digerida a 37°C com 2,5 µl de água Milliq, 2,0 µl de tampão da enzima (10x Fast Digest Green Buffer– Fermentas) e 0,5 µl de Fast Digest Ava II (Fermentas) por 30 minutos. Os fragmentos foram observados em gel de agarose (Invitrogen) a 1,2% corado com brometo de etídio, a corrida eletroforética foi por 2 horas a 90 volts. O produto de PCR referente ao genótipo *GG* foi clivado em quatro fragmentos: 459, 295, 149 e 130 pb, o genótipo *GA* foi clivado em cinco fragmentos: 459, 425, 295, 149 e 130 pb e o genótipo *AA* foi clivado em três fragmentos: 459, 425 e 149 pb. A figura 4 ilustra o perfil eletroforético do fragmento de 1033 pb do exon 2 do gene *FUT2* após digestão com a enzima Ava II.

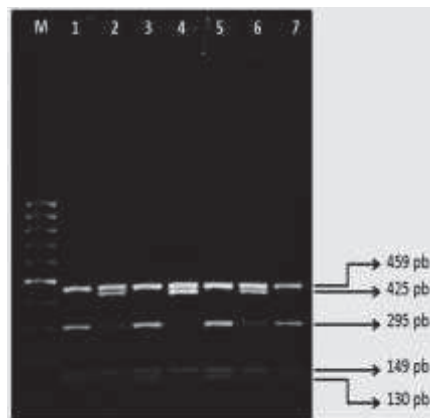


Figura 4. Perfil eletroforético do fragmento de 1033 pb do exon 2 do gene *FUT2*, após digestão com a enzima *Ava II*.

2.5 Análise estatística

O teste exato de Fisher e o qui-quadrado (χ^2) foram utilizados para comparar as proporções entre os pacientes e controles. O teste t foi utilizado para comparar as médias de idade entre pacientes e controles. Os valores de Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) a 95% também foram calculados. O valor p igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas com o uso do software GraphPad InStat versão 3.06.

3. Resultados

Os dados demográficos dos 394 pacientes selecionados neste estudo (119 pacientes; 275 controles) são apresentados a seguir. A tabela 4 contém os valores para média de idade, desvio-padrão, mínimo, máximo e mediana bem como a distribuição da casuística de acordo com o gênero. A tabela 5 mostra as frequências das EpAs de acordo com o gênero. A tabela 6 mostra os valores para médias de idade e médias de idade de início dos sintomas de 119 pacientes com EpAs.

Tabela 4. Médias de idade, desvio-padrão, mínimo, máximo, mediana e gênero de pacientes com espondiloartrites e controles sem espondiloartrites.

	Pacientes (n = 119)		Controles (n = 275)	
Média de idade ± DP*	47,2 ± 11,5		42,1 ± 12,7	
Mínimo	17		19	
Máximo	77		59	
Mediana	46		43	
Gênero**	N	%	N	%
Masculino	91	76,5	175	63,6
Feminino	28	23,5	100	36,4

*p = 0,0002, calculado com o uso do test t; ** χ^2 com correção de Yates: 5.666; OR: 1.857; IC: 1.138 – 3.031; p = 0.013.

Tabela 5. Frequências das espondiloartrites em 119 pacientes, de acordo com o gênero.

Espondiloartrites	Gêneros*			
	Masculino		Feminino	
	n	%	N	%
Espondilite Anquilosante (n = 85)	66	72,5	19	67,8
Espondiloartrite Psoriásica (n = 15)	11	12,0	4	14,3
Espondiloartrite Enteropática (n = 11)	10	10,9	1	3,6
Espondiloartrite Indiferenciada (n = 7)	4	4,4	3	10,7
Espondiloartrite Reativa (n = 1)	0	0,0	1	3,6
Total (n = 119)	91	100,0	28	100,0

* Relação de frequência entre os gêneros masculino e feminino: 3,25.

Tabela 6. Valores para médias de idade e médias de idade de início dos sintomas de 119 pacientes com espondiloartrites.

Médias de Idade	Masculinos (n = 91)	Femininos (n = 28)	p*
Idade dos pacientes			
Média ± DP*	47,5 ± 11,9	46,1 ± 10,5	0.606
Mínimo	17	17	
Máximo	77	64	
Mediana	44	48	
Idade de início dos sintomas			
Média ± DP	38,5 ± 11,3	37,8 ± 13,7	0.795
Mínimo	11	11	
Máximo	68	59	
Mediana	38	39	

*DP: Desvio-padrão; *Calculado com o uso do test t.

A tabela 7 apresenta as frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em pacientes e controles sem EpAs. A tabela 8 contém as frequências dos perfis antigênicos resultantes da expressão dos genes *ABO*, *FUT2* e *FUT3* em pacientes com EpAs e controles sem doença. A tabela 9 contém as frequências dos perfis antigênicos resultantes da expressão dos genes *ABO*, *FUT2* e *FUT3* em pacientes com EA e controles sem doença.

Tabela 7. Frequências dos fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em pacientes e controles sem espondiloartrites.

Fenótipos	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	p*
	N	%	N	%			
ABO							
A	51	42,8	112	40,7	1.092	0.706 – 1.678	0.738
B	6	5,0	22	8,0	0.610	0.240 – 1.547	0.393
AB	4	3,4	10	3,7	0.921	0.283 – 3.001	1.000
O	58	48,8	131	47,6	1.045	0.679 – 1.607	0.912
Secretor							
Secretor	94	79,0	214	77,8	1.072	0.634 – 1.812	0,894
Não secretor	25	21,0	61	22,2			
Lewis							
Le(a+b-)	22	18,5	47	17,1	1.100	0.628 – 1.925	0.773
Le(a-b+)	80	67,2	165	60,0	1.368	0.867 – 2.150	0.212
Le(a-b-)	17	14,3	63	22,9	0.763	0.444 – 1.312	0.056
Total (n = 394)	119	30,2	275	69,8			

*Calculado com o uso do teste exato de Fisher.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências gerais dos fenótipos eritrocitários ABO (χ^2 : 1.152; $p = 0.764$; Graus de Liberdade: 3), Secretor (χ^2 : 0.779; $p = 0,377$; Graus de Liberdade: 1) e Lewis (χ^2 : 1.853; $p = 0.396$; Graus de Liberdade: 2) entre pacientes e controles.

Tabela 8. Perfis antigênicos resultantes da expressão dos genes *ABO*, *FUT2* (SE) e *FUT3* (LE) em pacientes com espondiloartrites e controles sem doença.

ABO	SE	LE	PA	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	p*
A	P	P	ALe ^b	35	29,4	67	24,4	1.294	0.799 – 2.093	0.317
		N	A	6	5,0	26	9,4	0.508	0.203 – 1.270	0.163
B	P	P	BLe ^b	6	5,0	11	4,0	1.274	0.459 – 3.531	0.600
		N	B	0	0,0	5	1,8	0.205	0.011 – 3.754	0.328
AB	P	P	ALe ^b + BLe ^b	3	2,5	5	1,8	1.397	0.328 – 5.943	0.702
		N	A + B	1	0,8	2	0,7	1.000	0.103 – 12.889	1.000
O	P	P	Le ^b	38	31,9	84	30,5	1.067	0.671 – 1.695	0.812
		N	H	7	5,9	28	10,2	0.551	0.233 – 1.300	0.183
A+B+O	N	P	Le ^a	22	18,5	44	16,0	1.500	0.147 – 15.277	1.000
		N	OP	1	0,8	3	1,1	0.325	0.016 – 6.361	0.556
Total				119	100,0	275	100,0			

P = Positivo; N = Negativo; PA = Perfil Antigênico; OP = Oligossacarídeo Precursor; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança; *Calculado com o uso do teste exato de Fisher.

Tabela 9. Perfis antigênicos resultantes da expressão dos genes *ABO*, *FUT2* (SE) e *FUT3* (LE) em pacientes com espondilite anquilosante e controles sem esta doença.

ABO	SE	LE	PA	Pacientes-EA		Controles		OR	IC 95%	p*
A	P	P	ALe ^b	20	23,5	67	24,4	0.955	0.531 – 1.692	1.000
		N	A	6	7,0	26	9,4	0.727	0.288 – 1.831	0.662
B	P	P	BLe ^b	3	3,5	11	4,0	0.878	0.239 – 3,224	1.000
		N	B	0	0,0	5	1,8	0.287	0.015 – 5.258	0.595
AB	P	P	ALe ^b +BLe ^b	3	3,5	5	1,8	1.976	0.462 – 8.447	0.399
		N	A + B	1	1,2	2	0,7	1.625	0.145 – 18.156	0.555
O	P	P	Le ^b	22	25,8	84	30,5	0.794	0.458 – 1.375	0.492
		N	H	8	9,4	28	10,2	0.916	0.401 – 2.095	1.000
A+B+O	N	P	Le ^a	22	25,9	44	16,0	1.833	1.025 – 3.284	0,053
		N	OP	0	0,0	3	1,1	0.455	0.023 – 8.909	1.000
Total				85	100,0	275	100,0			

P = Positivo; N = Negativo; PA = Perfil Antigênico; OP = Oligossacarídeo Precursor; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança; *Calculado com o uso do teste exato de Fisher.

A tabela 10 contém as frequências do antígeno Le^a em pacientes com EA e controles sem espondilite, de acordo com a presença e ausência do gene *HLA-B*27*. A tabela 11 contém as frequências do antígeno Le^a em pacientes masculinos e femininos com EA, *HLA-B*27* positivos e negativos.

Tabela 10. Frequências do antígeno Lewis a (Le^a) em pacientes e controles com espondilite anquilosante HLA-B*27 positivos e negativos.

	Pacientes (EA)*				Controles**			
	B*27(-)*		B*27(+)**		B*27(-)*		B*27(+)**	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Le^a	12	46,2	10	16,9	42	16,1	2	14,3
Outros	14	53,8	49	83,1	219	83,9	12	85,7
Total	26	30,6	59	69,4	261	94,9	14	5,1

***Pacientes HLA-B*27(-) versus Controles HLA-B*27(-): OR: 4.469; IC 95%: 1.931 – 10.342; p = 0,0007; **Pacientes HLA-B*27(+) versus Controles HLA-B*27(+): OR: 1.224; IC 95%: 0.236 – 6.342; p = 1.000; */**Pacientes HLA-B*27(-) versus Pacientes HLA-B*27(+): OR: 4.200; IC 95%: 1.502 – 11.746; p = 0.007.**

A frequência do gene *HLA-B*27* foi maior em pacientes com EA (69,4%) que em controles (5,1%) (OR: 42.305; IC 95%: 20.827 – 85.834; p < 0,0001) (Tabela 10). A frequência do gene *HLA-B*27* foi maior em pacientes do sexo masculino (80,3%) que do sexo feminino (31,6%) (OR: 8.833; IC 95%: 2.819 – 27.677; p = 0,0001) (Tabela 11).

Tabela 11. Frequências do antígeno Le^a em pacientes masculinos e femininos com espondilite anquilosante, HLA-B*27 positivos e negativos.

	Masculinos				Femininos			
	B*27(-)*		B*27(+)**		B*27(-)*		B*27(+)**	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Le^a	8	61,5	10	18,9	4	30,8	0	0,0
Outros	5	38,5	43	81,1	9	69,2	6	100,0
Total	13	19,7	53	80,3	13	68,4	6	31,6

*Pacientes Masculinos HLA-B*27(-) versus Pacientes Femininos HLA-B*27(-): OR: 1.867; IC 95%: 0.831 – 4.191; p = 0.237; *Pacientes Masculinos HLA-B*27(+) versus Pacientes Femininos HLA-B*27(+): OR: 3.138; IC 95%: 0.163 – 60.257; p = 0,576; *Pacientes Masculinos HLA-B*27(-) versus Pacientes Masculinos HLA-B*27(+): OR: 6.880; IC 95%: 1.852 – 25.564; p = 0.004; *Pacientes Femininos HLA-B*27(-) versus Pacientes Femininos HLA-B*27(+): OR: 6.158; IC 95%: 0.280 – 135.080; p = 0.255

4. Discussão

A relevância científica deste estudo fundamentou-se em algumas reflexões feitas acerca das condições multifatoriais conhecidas e que estão potencialmente envolvidas na gênese das doenças que pertencem ao grupo das EpAs. A proposição que genes não pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade humano atuam como potenciais fatores de risco para EpAs, especialmente em indivíduos HLA-B*27 negativos⁽⁵⁹⁾ é desafiadora, haja vista estas doenças apresentarem forte associação com o gene *HLA-B*27*⁽⁶⁰⁾. Destaca-se ainda a proposição de que a presença de receptores para microrganismos “artritogênicos” no intestino favorece desenvolvimento da EA⁽⁶¹⁾. Alia-se a estas proposições o conhecimento prévio de que o trato gastrointestinal colonizado por grande número de microrganismos mutualísticos, comensais e patogênicos⁽⁶²⁾. Ressalta-se ainda que os sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis expressam grande variabilidade de antígenos no trato gastrointestinal⁽³⁸⁾ e que alguns dos antígenos deste sistemas são receptores para microrganismos patogênicos⁽⁶³⁾. Ao refletir sobre as potenciais relações que este conjunto de eventos biológicos pode apresentar entre si, haja vista ocorrerem no trato gastrointestinal, optamos por verificar se os perfis antigênicos resultantes da expressão dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados às doenças do grupo das EpAs.

O desenvolvimento deste estudo compreendeu a seleção de 394 indivíduos com suspeita clínica de EpA. Destes, 119 tiveram esta condição de portadores de EpA confirmada de acordo com os critérios estabelecidos pelo ASAS e foram considerados “**pacientes**”. Os 275 restantes que não tiveram sua condição de portadores de EpA confirmada pelos critérios acima referidos foram considerados “**controles**”. O uso deste último grupo como “controle” foi adotado haja vista todos terem sido avaliados pela

mesma equipe clínica, obedecendo os mesmos critérios para inclusão como “pacientes” ou “controles”.

Ao compararmos a diferença entre as médias de idade dos pacientes e controles, verificamos que a mesma foi estatisticamente significativa. Esta diferença pode ser resultante do fato de que muitos pacientes acometidos já se encontravam em tratamento e acompanhamento no Ambulatório de Reumatologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto quando se iniciou o trabalho de identificação do gene *HLA-B*27*, no ano de 2007. Por outro lado, os controles, quando da manifestação dos primeiros sintomas foram encaminhados para investigação do gene *HLA-B*27*. Contudo, ao não terem sua condição de portador de EpA confirmada deixaram de comparecer ao Ambulatório para acompanhamento. É possível que os sintomas iniciais apresentados por este grupo de indivíduos mais jovens não tenham se mantido ao longo do tempo e, portanto, não tiveram sua condição de portadores de EpA confirmada. As análises referentes à média de idade dos pacientes também não mostraram diferenças estatisticamente significantes quando as comparações compreenderam os gêneros masculino e feminino.

Os resultados deste estudo mostraram que mais de três quartos dos pacientes e aproximadamente dois terços dos controles eram masculinos. Estas diferenças reforçam a forte associação das EpA com o gênero masculino e são concordantes com os relatos do grupo Registro Ibero-americano de Espondiloartrites (RESPONDIA), para a casuística brasileira⁽¹⁰⁾. Este grupo relatou predominância do sexo masculino entre pacientes com EpAs não apenas no Brasil, mas também em vários países da América Latina incluindo Portugal e Espanha.

Nossos resultados mostraram que a frequência do gene *HLA-B*27* foi maior em pacientes, especialmente nos portadores de EA, que em controles. Este gene também predominou em pacientes com EA masculinos em relação aos femininos. Estes dados não são surpreendentes e corroboram aqueles publicados nas últimas décadas e revisados por Khan⁽⁶⁴⁾. Contudo, a maneira pela qual este gene atua na etiopatogênese das EpAs é objeto de muita discussão e apesar das hipóteses apresentadas^(22;23), ainda carece de maiores esclarecimentos.

O gene *HLA-B*27*, pertencente ao complexo principal de histocompatibilidade humano também denominado HLA (Human Leucocyte Antigens), é reconhecido como o mais importante marcador de risco para EpA, especialmente a EA^(65;66). Contudo, tem sido sugerido que outros genes não pertencentes a este complexo podem atuar como potenciais fatores de risco para EpAs, especialmente em indivíduos *HLA-B*27* negativo⁽⁵⁹⁾. Esta última proposição nos estimulou a investigar se existem associações entre as EpAs e os antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis. Neste contexto, observamos que dois eventos aparentemente independentes - o envolvimento de microrganismos na gênese das EpAs e a expressão dos antígenos destes sistemas - ocorrem no trato gastrointestinal. Portanto, é razoável ponderar se ambos apresentam ou não relações entre si e com a gênese das doenças do grupo das EpAs.

Proposições de que bactérias Gram negativas estão envolvidas na etiopatogenia das EpAs foram apresentadas nos últimos anos^(49;61). Há demonstrações de que a bactéria *Klebsiella pneumoniae* pode atuar com um “gatilho” desencadeador de EA devido ao mimetismo molecular entre seus antígenos e antígenos próprios (SELF)

expressos nos tecidos dos pacientes⁽⁶⁷⁾. Estas proposições encontram fundamento em estudos experimentais que demonstraram que modelos murinos mantidos em condições livres de microrganismos intestinais não desenvolvem entesopatia anquilosante e doença articular espontânea⁽⁶⁸⁾. Por outro lado, foi observado que a recolonização com cepas de bactérias comensais intestinais induzem o aparecimento da entesopatia anquilosante em murinos machos da linhagem B10.BR portadores do haplótipo H-2(k), o qual corresponde ao HLA⁽⁵⁰⁾.

Se o papel biológico do gene *HLA-B*27* na etiopatogênese das EpA e da EA ainda é obscuro, menos ainda é conhecido sobre a potencial participação dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis neste grupo de doenças. Em um estudo conduzido na década de 80, Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ relataram que o sistema Secretor constitui um importante fator genético de risco para a EA. Em outro artigo de revisão, este mesmo grupo propôs que os antígenos expressos no intestino humano sob controle do sistema Secretor podem ter papel relevante na interação inicial entre bactérias intestinais e o epitélio intestinal humano, atuando como fator permissivo para a EA⁽⁶⁹⁾.

Os antígenos que pertencem aos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis são expressos na forma de oligossacarídeos sob controle das enzimas GTA e GTB do sistema ABO, em combinação com as enzimas FUTII e FUTIII dos sistemas Secretor e Lewis, respectivamente⁽³⁹⁾. A expressão dos antígenos destes sistemas ocorre em vários tecidos que não o hematopoiético e o trato gastrintestinal é um dos locais em que se verifica maior nível de expressão e de variabilidade destas moléculas⁽³⁸⁾. Este

trato é colonizado por grande número de microrganismos que mantêm relações mutualísticas, comensais e eventualmente parasitárias com o ser humano⁽⁶²⁾.

Nossos dados demonstraram que as frequências dos quatro fenótipos ABO, dos dois Secretores e dos três Lewis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles, quando analisadas separadamente. Estes resultados são concordantes com os relatos prévios de Stoia e colaboradores⁽⁵¹⁾ os quais não encontraram diferenças nas frequências dos fenótipos eritrocitários ABO em um coorte composta de 701 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de artrite reumatoide, 183 com EA e 570 com doença articular degenerativa. Ressalta-se que estes autores não avaliaram os sistemas Secretor e Lewis.

Os dados deste estudo também são concordantes, pelo menos em parte, com aqueles previamente relatados por Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ os quais também não encontraram evidências de associação entre as diferentes EpAs e o sistema histo-sanguíneo ABO. Estes autores ampliaram o estudo de Stoia e colaboradores⁽⁵¹⁾ e incluíram em suas análises o sistema Secretor. Demonstraram que o fenótipo não Secretor está associado ao maior risco de EpAs, especialmente a EA.

Os resultados destes estudos prévios^(51;52) se revestem de importância pelo pioneirismo e são corroborados pelos dados relatados neste estudo no que se refere ao sistema histo-sanguíneo ABO. Contudo, seus resultados permanecem inconclusivos e podem ser questionados, haja vista não terem avaliados os sistemas histo-sanguíneo ABO, Secretor e Lewis de forma integrada. A expressão integrada dos antígenos destes sistemas cria diferentes perfis antigênicos teciduais os quais resultam da presença,

ausência ou combinação das glicosiltransferases responsáveis pela síntese destes antígenos⁽³⁸⁾.

Com o objetivo de verificar se um ou mais perfis antigênicos dos sistemas histossanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados às EpAs comparamos pacientes e controles, independente do tipo de doença. Contudo, os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes. Estas observações são concordantes com aqueles relatados por Smith e colaboradores⁽⁷⁰⁾. Estes autores reavaliaram parte da casuística analisada por Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ e concluíram que problemas metodológicos possivelmente contribuíram para as divergências observadas entre o estudo de 1987 e de 1997.

No primeiro estudo, Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ utilizaram um ensaio de inibição de hemaglutinação em amostras de saliva e verificaram que o fenótipo não Secretor estava presente em 49% dos pacientes e em 27% dos controles. Utilizando um ensaio de inibição de hemaglutinação e outro baseado em método imunoenzimático (ELISA), Smith e colaboradores⁽⁷⁰⁾ reavaliaram 43 pacientes do estudo de Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ e verificaram que a frequência do fenótipo Secretor foi igual a 28% em pacientes e controles. A diferença observada entre estes dois estudos pode ter sido influenciada pelos métodos escolhidos pelos autores para as análises dos fenótipos Secretor e não Secretor. Smith e colaboradores⁽⁷⁰⁾ sugerem cuidados na coleta e no manuseio das amostras de saliva bem como a combinação de métodos acurados é crucial para a acurada identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor. Estas proposições também foram apresentadas por Pal e colaboradores⁽⁵³⁾ os quais também não encontraram associação entre o fenótipo não Secretor e EA.

Ressaltamos que os métodos utilizados na caracterização dos fenótipos Secretor e não Secretor utilizados neste estudo são diferentes daqueles explorados por Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾, Smith e colaboradores⁽⁷⁰⁾ e Pal e colaboradores⁽⁵³⁾. A aferição do fenótipo Secretor nos 119 pacientes e 275 controles selecionados para este estudo foi feita com o uso de hemaglutinação em colunas de gel combinado com análise molecular do gene *FUT2* por PCR-RFLP. Este gene expressa a enzima FUTII responsável pela síntese dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis nas secreções exócrinas, incluindo aquelas que compõem o muco produzido pelo trato gastrintestinal^(38,39).

Salientamos que é possível, por um lado, os perfis antigênicos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis não mostrem efeitos na suscetibilidade a estas doenças quando agrupadas como uma entidade clínica única. Por outro lado, a associação de uma EpAs em particular (EA, por exemplo), com um perfil antigênico específico pode ser revelada quando as comparações entre pacientes e controles não são realizadas de forma conjunta.

É consenso que os diferentes perfis antigênicos atuam como potenciais receptores para microrganismos que habitam o trato gastrintestinal e que favorecem o desenvolvimento de reações inflamatórias que podem evoluir para as doenças específicas⁽³⁸⁾. Contudo, não se pode descartar a importância destes antígenos como possíveis “facilitadores” de infecção, inclusive nas doenças pertencentes ao grupo das EpAs, sobretudo pela proximidade do intestino, um local de elevada expressão dos

antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis, com as articulações sacroilíacas as quais são comumente acometidas em portadores de EpAs⁽⁷¹⁾.

Diante da proposição de que genes não pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade humano podem atuar como potenciais fatores de risco para a EA⁽⁵⁹⁾, avaliamos se os perfis antigênicos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão associados aos maiores riscos para esta doença. Ressalta-se que dos 119 pacientes que compuseram nossa casuística, 85 eram portadores de EA. As análises estatísticas empregadas demonstraram que o antígeno Le^a é mais comum em pacientes que em controles, revelando uma possível tendência de associação, haja vista o valor p (0.053) encontrar-se no limite de significância. Ao analisarmos a frequência do antígeno Le^a na EA, estratificada de acordo com a presença ou ausência do gene *HLA-B*27*, observamos que o mesmo ocorre com maior frequência em pacientes que em controles, ambos *HLA-B*27* negativos (p=0,0007). Análises adicionais demonstraram que o antígeno Le^a está associado à EA nos pacientes *HLA-B*27* negativos do gênero masculino, mas não naqueles do gênero feminino. Portanto, nossos dados sugerem que o antígeno Le^a está associado à EA na ausência do gene *HLA-B*27*.

O antígeno Le^a está presente em 22% dos caucasianos europeus⁽⁷²⁾ e em cerca de 18% dos brasileiros⁽⁷³⁾. Este antígeno é expresso sob controle da enzima FUTIII em indivíduos que não possuem a enzima FUTII e é encontrado em qualquer um dos quatro fenótipos ABO⁽³⁹⁾. Ressalta-se que a presença de Le^a nas secreções exócrinas é fortemente relacionada ao fenótipo não Secretor e é comum se inferir este fenótipo a partir da pesquisa do antígeno Le^a nos eritrócitos e nas secreções exócrinas⁽³⁸⁾.

As razões que fundamentam a forte associação do antígeno Le^a e a EA em pacientes HLA-B*27 negativos são desconhecidas, dada a escassez de estudos focados neste tema. Contudo, nossos resultados se opõem àqueles publicados por Moller⁽⁵⁴⁾. Este autor avaliou a presença do antígeno Le^a em pacientes com e sem EA mas não encontrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados. À luz dos conhecimentos atuais sobre a expressão dos antígenos do sistema histo-sanguíneo Lewis, seus dados são inconclusivos e podem ser questionados. Em primeiro lugar este autor incluiu em sua casuística apenas pacientes com EA HLA-B*27 positivos enquanto em nosso estudo incluímos pacientes positivos e negativos para este gene. Nosso estudo mostrou associação entre o antígeno Le^a e EA em pacientes e controles HLA-B*27 negativos mas não em pacientes e controles HLA-B*27 positivos. Além disso, em nosso estudo utilizamos um método de aglutinação em coluna de gel internacionalmente reconhecido e validado em nosso laboratório para identificar o antígeno Le^a ^(56,74).

Ressaltamos que Moller⁽⁵⁴⁾ investigou somente 104 indivíduos e destes apenas 18 eram portadores de EA. Nosso estudo incluiu 85 pacientes com EA (59 HLA-B*27 positivos e 26 HLA-B*27 negativos) e 275 controles (14 HLA-B*27 positivos e 261 HLA-B*27 negativos). Sabe-se que estudos de coorte com pequeno número de indivíduos não oferecem segurança para se estabelecer associações positivas ou negativas entre fatores genéticos e doenças uma vez que estas condições podem ocorrer meramente por acaso⁽⁷⁵⁾. Outro aspecto a ser considerado entre nossos dados e os de Moller⁽⁵⁴⁾ se refere à composição étnica da casuística e o gênero. Este autor avaliou apenas pacientes escoceses, essencialmente caucasianos, mas não estendeu as comparações entre os gêneros. Nossa casuística se compôs de pacientes brasileiros

miscigenados, comparados quanto ao gênero e a presença ou ausência do gene *HLA-B*27*.

É possível que as diferenças étnicas também contribuam com as divergências entre os resultados de nosso estudo e aqueles relatados por Moller⁽⁵⁴⁾. O fenótipo eritrocitário Le(a+b-) que se caracteriza pela presença do antígeno Le^a também apresenta variações na frequência entre brasileiros de diferentes etnias e é observado em cerca de 15,0% de caucasianos, 19,3% de mulatos e 18,5% de negros⁽⁷³⁾.

O antígeno Le^a é um oligossacarídeo monofucosilado que atua como importante receptor para microrganismos no trato gastrintestinal^(47,63,76). Diante das proposições de que bactérias Gram negativas contribuem para a gênese das EpAs^(49;61) e de estudos experimentais que reforçam essas proposições^(50,68), investigações destinadas a esclarecer a importância do antígeno Le^a na EA são desejáveis. Shinebaum e colaboradores⁽⁵²⁾ e Shinebaum⁽⁶⁹⁾ sugerem que a associação entre o fenótipo não Secretor e EA seja fortemente dependente do antígeno Le^a. É possível que este antígeno, ao atuar como receptor para bactérias “artritogênicas”, desempenhe um papel de “âncora” favorecendo a aderência e a persistência destes microrganismos no epitélio intestinal, contribuindo assim para o desenvolvimento da EA em pacientes *HLA-B*27* negativos.

Este estudo encontrou resultados interessantes que devem ser explorados e ampliados haja vista as frequências da EA, do gene *HLA-B*27* e do antígeno Le^a apresentarem variações nas populações. Contudo algumas reflexões se fazem necessárias. Por um lado analisamos uma casuística composta de pacientes e controles

brasileiros miscigenados com menor frequência do gene *HLA-B*27* em comparação às populações essencialmente caucasianas. Por outro, a menor frequência deste gene favorece estudos que objetivam compreender o impacto de outros genes não pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade humano, na etiopatogenia desta doença conforme tem sido proposto por Brionez e Reveille⁽⁵⁹⁾.

Em síntese, apesar da baixa prevalência populacional da EA, sua variabilidade clínica aliada à variabilidade do gene *HLA-B*27* e à variabilidade antigênica tecidual dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis, este tipo de abordagem oferece um vasto campo de investigações.

5. Conclusões

1. As EpAs analisadas neste estudo, em especial EA, se mostraram associadas ao gene *HLA-B*27*.
2. A EA predominou em pacientes do sexo masculino.
3. As EpAs não estão associadas aos perfis antigênicos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis.
4. A EA está associada ao antígeno Le^a nos pacientes HLA-B*27 negativos, mas não nos HLA-B*27 positivos.
5. A associação entre antígeno Le^a e a EA ocorre apenas nos pacientes HLA-B*27 negativos masculinos.

6. Referências Bibliográficas

1 - Sampaio-Barros P, Azevedo VF, Bonfiglioli R, Campos WR, Carneiro SCS, Carvalho MAP, Gonçalves CR, Hilário MOE, Keiserman MW, Leite NH, Mallmann K, Meirelles ES, Vieira WP, Ximenes AC. Consenso Brasileiro de Espondiloartropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão. Rev Bras Reumatol 2007; 47(4): 233-242.

2 - Schiotis RE, Ramos-Niembro F, Burgos-Vargas R, Collantes-Estévez E. Panorama de la clasificación y la susceptibilidad genética de las espondiloartritis. Reumatologia Clinica 2008;4 Supl4:S8-16.

3 - Dougados M, Van Der Lindén S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. The european spondylarthropathy study group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. Arthritis Rheum 1991;34:1218-1227.

4 - Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. N Engl J Med 1973;288:704–706.

5 - Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DCO, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. Lancet 1973;301:904–907.

6 - Stolwijk C, van Onna M, Boonen A, van Tubergen A. The global prevalence of spondyloarthritis: A systematic review and meta-regression analysis. Arthritis Care Res (Hoboken) 2016; 68(9):1320-1331.

7 - Saraux A, Guedes C, Allain J, Devauchelle V, Vallis I, Lamour A, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. *J Rheumatol* 1999;26(12):2622-2627.

8 - Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum* 1998;41:58-67.

9 - Vázquez-Mellado J, Font-Ugalde P, Muñoz-Gomáriz E, Collantes-Estévez E. Registro iberoamericano de espondiloartritis (RESPONDIA): ¿qué es, cómo surgió, quiénes somos y qué hacemos? Metodología general. *Reumatología Clínica* 2008;4 Supl4:S17-22.

10 - Gallinaro AL, Ventura C, Sampaio Barros PD, Gonçalves CR, Espondiloartrites: Análise de uma série brasileira comparada a uma grande casuística ibero-americana (estudo RESPONDIA). *Rev Bras Reumatol* 2010;50(5):581-589.

11 - Toledo RA, Acayaba de Toledo, Camargo U, Camargo AVS, Xavier DH, Batista MF, Carneiro AO, Robles JACP, Mattos CCB, Ricci Jr O, Mattos LC. HLA-B*27 e Frequency of clinical signs in Brazilian patients with spondyloarthritis. *Biomarkers and Genomic Medicine* 2015; 7: 72e-77.

12 - Sampaio-Barros PD, Bertolo MB, Kramer MHS, Marques Neto JF, Samara AM. Primary ankylosing spondylitis: patterns of disease in a Brazilian population of 147 Patients. *J Rheumatol* 2001;28:3560-3565.

13 - Feldtkeller E, Lemmel EM, Russel AS. Ankylosing spondylitis in the pharaohs of ancient Egypt. *Rheumatol Int* 2003;23:1-5.

14 - Armas JOB. Espondilartrites e doenças associadas. Heterogeneidade genética e sua expressão. Porto-Portugal, 2001. (Tese de Doutorado - Universidade de Porto).

15 - Chiarelo B, Driusso P, Radl ALM. *Fisioterapia Reumatológica* 2003; ed. Manole, 168-179.

16 - Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiochia G, Garchon HJ, Zins M, Breban M. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann Rheum Dis*. 2015 Apr;74(4):689-693.

17 - Liu 2000 LIU, R; HE, L; GONG, Y, et al; Epidemiological studies of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis Yinchuan areas. **Clin J Rheumatol**, 2000; 4(suppl 2):25.

18 - Hukuda S, Minami M, Saito T, Mitsui H, Matsui N, Komatsubara Y, et al. Spondyloarthropathies in Japan: nationwide questionnaire survey performed by the Japan ankylosing spondylitis Society. *J Rheumatol* 2001;28(3):554-559.

19 - Brown MA, Jepson A, Young A, Whittle HC, Greenwood B, Wordsworth BP. Ankylosin spondylitis in West Africans - evidence for a non-HLA-B27 protective effect. *Ann Rheum Dis* 1997;56:68-70.

20 - Kaipianen-Seppaenen O, Aho K. Incidence of chronic inflammatory joint diseases in Finland in 1995. *J Rheumatol* 2000;27:94-100.

21 - Olivieri I, van Tubergen A, Salvarani C, van der Linden S. Seronegative spondyloarthritides. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2002; 16(5): 723-739.

22 - Ramos M, López de Castro JA. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2002;60(3):191-205.

23 - Reveille JD. The genetic basis of ankylosing spondylitis. *Current Opinion in Rheumatology* 2006;18:332–341

24 - Chahade WB, El-Khoury AB, Szwarc IS. Incidência do HLA-B27 em espondilite anquilosante em caucasóides brasileiros. Associação dos locos A, B e C/espondilite anquilosante/tuberculose pulmonar. *Rev Bras Reumat* 1979; 19:23-26.

25 - Rachid A. Espondilites anquilosantes B27 positivas e B27 negativas. Cotejo clínico, laboratorial e radiológico. *Rev Bras Reumat* 1979;19:107-127.

26 - Ramalho ES, Freitas GG, Kosminsky S, et al. Espondilite anquilosante: estudo epidemiológico em trinta casos. *Rev Bras Reumat* 1989;28:1-2.

27 - Carvalho MAP. Espondiloartropatias. In: Moreira C, Carvalho MAP, editores. *Noções Práticas de Reumatologia*. Belo Horizonte: Health; 1996;II:437-450.

- 28 - Camargo U, Toledo RA, Cintra JR, Nunes DP, Acayaba de Toledo R, Brandão de Mattos CC, Mattos LC. Lack of association of the G22A polymorphism of the ADA gene in patients with ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res.* 2012;11(2):1178-1184.
- 29 - Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S3-23.
- 30 - Klein J, Sato A. The HLA system (Part 1) *NEJM* 2000;343(10)702-709.
- 31 - Murphy K. *Imunobiologia de Janeway*. 8ª. Ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.
- 32 - Álvarez JCM, Reyes APN, García AA, Cruz AS, Zonana-Nacach A, Coronel AC, Robles BG, López RR, Fernández RA, Jiménez-Balderas FJ. Subtipos de HLA-B27 en familias de pacientes mestizos mexicanos con espondilitis anquilosante. *Rev Mex Med Tran* 2008;1(1):18-22.
- 33 - Montserrat V, Marti M, Lopez de Castro JA. Allospecific T cell epitope sharing reveals extensive conservation of the antigenic features of peptide ligands among HLA-B27 subtypes differentially associated with spondyloarthritis. *J Immunol* 2003;170:5778–5785.
- 34 - Goodall JC, Ellis L, Hill-Gaston JS. Spondyloarthritis-associated and non spondyloarthritis-associated B27 subtypes differ in their dependence on tapasin for

surface expression and their incorporation into the peptide loading complex. *Arthritis Rheum* 2006;54:139–147.

35 - Conde RA. Frequência dos alelos do HLA-B27 em pacientes com espondilite anquilosante e controles sadios. Universidade Estadual de Campinas. 2004. (Tese). 136p.

36 - Clausen H, Hakomori SI. ABH and related histoblood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 1989;56:1-20.

37 - Nydegger U et al. Histo-blood group antigens as allo-and autoantigens. *An N Y Ac Sci* 2005;1050:40-51.

38 - Henry SM. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. *Transf Clin Biol* 2001;8:226-230.

39 – Oriol, R. ABO, Hh, Lewis and Secretion: serology, genetics and tissue distribution. In: Cartron, JP, Rouger, P. *Blood Cell Biochemistry: molecular basis of human blood group antigens*. New York: Plenum, 1995. p37-73.

40 - Olsson ML, Chester AM. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic blood grouping strategies. *Transfusion Medicine* 2001;11:295-313.

41 - Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang* 1995;69:166-182.

42 - Henry SM. Phenotyping for Lewis and Secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology* 1999;12(2):51-61.

43 - Oriol R, Le Pendu L, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang* 1986;51:161-171.

44 - Oriol R. Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J Immunogenet* 1990;17:235-245.

45 - Oriol R, Mollicone R, Couillin P, Dalix AM, Candelier JJ. Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS* 1992;27(100):28-38.

46 - Hooper LV, Gordon JI. Glycans as legislator of host-microbial interaction: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* 2001;11(2):1R-10R.

47 - Imberty A, Varrot A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 2008;18(5):567-576.

- 48 - Perry HE, Franklin RA, Bray SJ, Lo MK, Svensson LA, Henry SM. A novel study of association between *Neisseria gonorrhoeae* and the human carbohydrate blood groups. *Immunohematology* 2007;23(3):100-104.
- 49 - Berthelot JM, Glemarec J, Guillot P, Laborie Y, Maugars Y. New pathogenic hypotheses for spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine* 2002;69(2):114-122.
- 50 - Sinkorová Z, Capková J, Niederlová J, Stepánková R, Sinkora J. Commensal intestinal bacterial strains trigger ankylosing enthesopathy of the ankle in inbred B10.BR (H-2(k)) male mice. *Hum Immunol* 2008;69(12):845-850.
- 51 - Stoia I, Ramneantu R, Poitas M. Blood groups ABO and Rh (D) factor in the rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1967;26(4):332-333.
- 52 - Shinebaum R, Blackwell CC, Forster PJ, Hurst NP, Weir DM, Nuki G. Non-secretion of ABO blood group antigens as a host susceptibility factor in the spondyloarthropathies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;294(6566):208-210.
- 53 - Pal A, Hill M, Wordsworth P, Brown M. Secretor status and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1998;25(2):318-319.
- 54 - Møller P. Lewis (Secretor) Phenotype in Ankylosing Spondylitis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1990; 19(3):248-248.

55 - Mattos LC, Sanchez FE, Cintra JR, Salles ABCF, Bonini-Domingos CR, Moreira HW. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2001; 23(1): 15-22.

56 - Previato M, Borim MP, Liberatore RD Jr, Pires AC, Dias MA, Brandão de Mattos CC, de Mattos LC. Lewis histo-blood group system phenotyping and genotyping reveal divergence in the association of Le(a-b-) phenotype and type 1 diabetes. *Vox Sang* 2015;108(3):281-286.

57 - Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for *A385T*, *G428A*, *C571T*, *C628T*, *685delTGG*, *G849A*, and other mutations from single PCR. *Transfusion* 2000;40:856-860.

58 - Brandão-de-Mattos CC, Cintra JR, Ferreira AIC, Spegiorin LCJF, Galisteu KJ, Machado RLD, Mattos LC. Lack of association between ABO histo-blood groups, secretor and non-secretor phenotypes, and anti-Toxoplasma gondii antibodies among pregnant women from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Arch Med Sci* 2008; 4, 3: 254–258

59 - Brionez TF and Reveille JD. The contribution of genes outside the major histocompatibility complex to susceptibility to ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20: 384-391.

60 - Ehrenfeld M. Spondyloarthropathies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012;26:135e-145.

- 61- Manasson J, Scher JU. Spondyloarthritis and the microbiome: new insights from an ancient hypothesis. *Curr Rheumatol Rep* 2015;17(2):10.
- 62 - Bañuls AL, Thomas F, Renaud F. Of parasites and men. *Infect Genet Evol* 2013; 20:61-70.
- 63 - Kato K, Ishiwa A. The role of carbohydrates in infection strategies of enteric pathogens. *Trop Med Health* 2015;43(1):41-52.
- 64 - Khan MA. Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15(10):362.
- 65 - Breban M1, Costantino F, André C, Chiochia G, Garchon HJ. Revisiting MHC genes in spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2015;17(6):516.
- 66 - Bowness P. HLA-B27. *Annu Rev Immunol* 2015;33:29-48.
- 67 - Rashid T, Ebringer A. Gut-mediated and HLA-B27-associated arthritis: an emphasis on ankylosing spondylitis and Crohn's disease with a proposal for the use of new treatment. *Discov Med* 2011;12(64):187-194.
- 68 - Reháková Z, Capková J, Stěpanková R, Sinkora J, Louzecká A, Ivanyi P, Weinreich S. Germ-free mice do not develop ankylosing enthesopathy, a spontaneous joint disease. *Hum Immunol* 2000;61(6):555-558.

69 - Shinebaum R. ABO blood group and secretor status in the spondyloarthropathies. *FEMS Microbiol Immunol* 1989;1(6-7):389-395.

70 - Smith GW, James V, Mackenzie DA, Stewart J, Blackwell CC, Elton RA, Nuki G. Ankylosing spondylitis and secretor status: a re-evaluation. *Br J Rheumatol* 1997;36(7):778-780.

71 - Gouveia EB, Elmann D, Morales MAS. Ankylosing spondylitis and uveitis: overview. *Rev Bras Reumatol* 2012;52(5):742-756.

72 - Daniels G. *Human blood groups*. 3rd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2013.

73 - Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22 (1), 23-32.

74 - Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, Drot C. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990;30(2):109-113.

75 - Bussab WO, Morettin P. *Estatística básica*. 4 ed. São Paulo, Atual, 1987.

76 - Essery SD, Weir DM, James VS, Blackwell CC, Saadi AT, Busuttill A, Tzanakaki G. Detection of microbial surface antigens that bind Lewis(a) antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;9(1):15-21.

Anexo I

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.173 de 14/06/74)

Parecer n.º 055/2011

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP nº 1362/2011, sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos, com o título "Marcadores imunogenéticos em espondiloartropatias" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 15 de março de 2011.

Prof. Dr. Fernando Batigália
Presidente do CEP/FAMERP