

ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SUA BASE GENÉTICA

F. M. Pimentel dos Santos,^{***} E. Bastos,^{**} D. Ligeiro,^{***} A. F. Mourão,^{*} R. Chaves,^{**} H. Trindade,^{***} H. Guedes-Pinto,^{**} J. C. Branco^{*}

Resumo

A Espondilite Anquilosante (EA) é uma doença reumática inflamatória frequente na qual o componente hereditário parece ser relevante. A importância dos factores genéticos radica em grande parte no complexo *major* de histocompatibilidade (MHC). A associação estreita com o grupo de alelos HLA-B*27 tem vindo a ser descrita, desde há cerca de 30 anos, de forma consistente em diferentes regiões do globo. Estudos recentes demonstraram, no entanto, que outros genes, do MHC e não pertencentes ao MHC, poderão também estar implicados, quer na susceptibilidade, quer nas manifestações fenotípicas da doença. Por outro lado, vários estudos têm sido realizados sobre as diferentes hipóteses explicativas da fisiopatologia da doença, o que tem contribuído para um melhor conhecimento das suas bases genéticas. Este artigo de revisão tenta sumariar o estado actual do conhecimento nesta área. Os novos dados encontrados poderão, num futuro próximo, contribuir para modificar a avaliação destes doentes e perspectivar novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Espondilite Anquilosante; Genética; Complexo *Major* de Histocompatibilidade (MHC); Susceptibilidade; Fenótipo

Abstract

Ankylosing spondylitis (AS) is a common rheumatic condition, highly heritable. Much of the genetic contribution to the disease lies in the major histocompatibility complex (MHC). The association with the allele group HLA-B*27 has been described

worldwide for 30 years. On the other hand, genome wide scans have provided some interesting results showing that other MHC and non-MHC genes could be implicated either in disease susceptibility and phenotypic manifestations. Different hypothesis for disease pathophysiology have been investigated which contribute for a better understanding of the genetic basis of AS. This review aims to summarize the status of the knowledge in this exciting area. New data may, in a near future, change the screening of patients and generate new insights for the emergence of novel therapies.

Keywords: Ankylosing Spondylitis; Genetics; Major Histocompatibility Complex (MHC); Susceptibility; Phenotype

Introdução

A Espondilite Anquilosante (EA) é uma doença que se inicia habitualmente na segunda ou terceira década de vida, caracterizada pela inflamação da coluna e das articulações sacro-ilíacas, com erosões e posterior anquilose. O envolvimento de articulações periféricas, ocorre em cerca de 40% dos casos. O processo inflamatório pode ainda ter uma expressão sistémica com envolvimento da *entesis*, uvea, aorta, pulmões e rins.¹ O início em idades jovens e o envolvimento sistémico são factores condicionantes de incapacidade, com importante repercussão em termos individuais e sociais. A prevalência da EA nos caucasianos é de 0,1 a 0,9%, sendo a segunda artrite inflamatória mais frequente, após a artrite reumatóide.^{2,3} Desconhece-se a exacta prevalência da doença em Portugal, embora uma publicação recente do «Observatório Nacional das Doenças Reumáticas» aponte para 0,6%, valor obtido a partir de um questionário em que foram avaliados 1.238 indivíduos.⁴

Os factores genéticos parecem exercer um papel essencial na doença, quer em termos de susceptibi-

^{*}Serviço de Reumatologia do CHLO EPE, Hospital de Egas Moniz

^{**}Centro de Genética e Biotecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (CGB-UTAD/IBB)

^{***}Centro de Histocompatibilidade do Sul

lidade – a concordância em gémeos idênticos é superior a 90%,⁵ quer em termos da sua actividade e da incapacidade funcional provocada – em que a repercussão é de 51% e 68%, respectivamente.⁶ O Complexo *Major* de Histocompatibilidade (MHC) e o grupo alélico HLA-B*27 em particular, têm de forma continuada, vindo a ser referidos como conferindo uma forte susceptibilidade para a doença.⁷⁻⁹ Estudos recentes de análise global do genoma e de *microarrays* confirmam a associação do MHC com a EA, mas apontam para a possibilidade de outros genes não pertencentes ao MHC conferirem susceptibilidade ou condicionarem a sua expressão fenotípica.¹⁰⁻¹² Não se pode ainda excluir a influência de outros factores entre os quais os ambientais.

Nesta revisão pretende-se descrever os principais genes, pertencentes ao MHC e não pertencentes ao MHC, que parecem estar potencialmente envolvidos na EA.

Os Genes do MHC

Todos os vertebrados possuem uma região no genoma designada Complexo *Major* de Histocompatibilidade (MHC). Em humanos o MHC está localizado no braço curto do cromossoma 6 (6p21.3) numa região muito densa em genes da resposta imunitária. Na figura 1, apresenta-se o mapa físico desta região, com os vários *loci* representados. Aqui encontram-se os genes que codificam para as proteínas dos antígenos de histocompatibilidade da classe I e II. Existe ainda uma região intermédia designada como MHC classe III, que contém genes com papel relevante no processo inflamatório. As moléculas da classe I e II apresentam regiões definidas por domínios polimórficos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 1$, $\beta 1$ respectivamente) e por domínios constantes ($\alpha 3$, e $\alpha 2$, $\beta 1$, respectivamente), como representado esquematicamente na figura 2. Uma perspectiva tridimensional das moléculas classe I está representada na figura 3. Estas moléculas têm um importante papel no processamento e apresentação de antígenos ao receptor das células T (TCR), permitindo a elaboração de respostas imunes antígeno específicas.

Cada classe do MHC é representada por mais de um *locus*, sendo designados, em *Homo sapiens*, de HLA (*Human Leucocyte Antigen*). Os principais *loci* da classe I são os HLA-A, -B e -C que são expressos na maioria das células nucleadas. Na classe II destacam-se os *loci* HLA-DR, -DQ e -DP (Figura 1) de expressão restrita a células B e apresentadoras «profissionais» de antígenos (células dendríticas

de Langerhans).

HLA-B

De acordo com a informação de Janeiro de 2007, disponível na base de dados IMGT/HLA (www.ebi.ac.uk/imgt/hla), o *locus* HLA-B possui 851 alelos diferentes e entre eles destacam-se, pela sua correlação com a etiopatogenia da EA, os 43 subtipos pertencentes ao HLA-B*27. O alinhamento de várias sequências permite identificar, em detalhe, as diferenças nos nucleótidos de todos os alelos.

Os diferentes subtipos do B27 têm uma distribuição populacional variável, encontrando-se o B*2705 na generalidade das populações. Os subtipos mais frequentes (HLA-B*2705, B*2702, B*2704, B*2707) conferem claramente susceptibilidade para a EA.¹³ O B*2706, apenas identificado em algumas populações do Sudeste Asiático e o B*2709 descrito na população da Sardenha e em Italianos continentais, parecem pelo contrário, estar negativamente associados à EA.^{14,15} A distribuição dos alelos B*2701, 10, 11, 12, 13 continua a ser desconhecida, não se sabendo se existe associação com a EA por serem raros.¹⁶ Em Portugal, a avaliação da frequência das especificidades HLA (cf. Quadro I), numa população de doentes com EA (n=50) e numa população controlo de dadores voluntários de medula óssea (n= 174) revelou uma prevalência de B27 em 86% e 9,2% (p<0,0001), respectivamente. A distribuição das especificidades alélicas do HLA-B*27 parece porém ser similar nos dois grupos, sendo o alelo B*2705 o mais frequente. O facto de o alelo B*2707 ter sido detectado sómente na população livre de doença deverá ser comprovado na extensão do estudo (trabalho em decurso). Nos doentes portugueses com EA o B*27 é mais frequentemente veiculado pelos haplotipos A*2 B*27 Cw*2 DRB1*01 DQB1*05 (5.6%), A*24 B*27 Cw*2 DRB1*04 DQB1*03 (4.5%) e A*2 B*27 Cw*7 DRB1*13 DQB1*06 (4.5%). (dados não publicados).

O grupo HLA-B*27 parece ser, de facto, o mais relevante na susceptibilidade para a EA, mas muitas questões continuam por esclarecer. Tem sido apontado que mais de 95% dos indivíduos caucasianos com a doença, são HLA-B*27 positivos¹⁷ com diferentes subtipos.^{18,19} Curiosamente, na população geral, só 1-5% dos indivíduos HLA-B*27 positivos desenvolvem a doença e a sua presença, *per se*, não explica a recorrência em termos familiares.²⁰ O contributo do HLA-B*27 para a susceptibilidade parece oscilar apenas entre 20-50%.⁵ Assim, a exacta função desta especificidade do HLA-B na fisiopatologia da entidade e o factor ou factores

envolvidos na etiologia da EA, são aspectos que continuam a ser desconhecidos.

A proteína expressa como HLA B27 apresenta propriedades estruturais semelhantes a outras moléculas da classe I, mas características únicas na ligação a péptidos. Comparativamente com outras moléculas da classe I, a proteína codificada pelo grupo de alelos B*27 é particularmente eficaz na apresentação de antígenos como foi demonstrada no *clearance* do vírus da Hepatite C²¹ e na diminuição da progressão da infecção do vírus da Imunodeficiência Humana.²² Esta função e os aspectos particulares que envolve a fase inicial da sua síntese, nomeadamente a tendência para o *misfolding*²³ e a formação de homodímeros,²⁴⁻²⁶ são aspectos que poderão ter relevância na explicação dos mecanismos patogénicos em que se envolve. Estas e outras propriedades moleculares do B27 têm motivado a elaboração de diversas hipóteses explicativas do seu papel patogénico como a seguir se descrevem:

a) Péptido Artrítico: A forte associação entre a EA e o grupo alélico HLA-B*27 suscitou a hipótese de que a proteína codificada pudesse, ela própria, ter um papel activo na fisiopatologia da doença. Este modelo é baseado na função habitual de apresentação de péptidos endógenos, pelas moléculas HLA da classe I, às células T.¹³ A infecção por uma bactéria potencialmente patogénica levaria à ligação e apresentação de um «péptido artrítico» pelo HLA B27. A proliferação de clones de células T CD8⁺ motivariam a ocorrência de reacções cruzadas e o desencadear da doença.¹³

b) Mimetismo Molecular: Numa versão inicial apontava-se que anticorpos para antígenos estranhos ao *self* teriam uma reacção cruzada com a proteína HLA B27 o que promoveria o desencadear da doença.²⁷ Uma variante a esta formulação inicial é a teoria da homologia de péptidos em que um péptido artrítico autólogo é produzido em níveis baixos. Um estímulo infeccioso poderia sensibilizar as células T que, por reacção cruzada com o péptido expresso em níveis baixos, desencadeariam uma resposta imune.^{22,28}

c) Aumento do nível de expressão do HLA B27: Em ratos transgénicos para o HLA B27 e β 2 microglobulina humana documentou-se que o grau de susceptibilidade para o desenvolvimento de espondiloartropatia se correlacionava com o nível de expressão do B*27, em termos de mRNA e de proteínas.²⁹ Em humanos a análise da distribuição dos diferentes alelos B*27 associados à doença revelou não existirem diferenças nas frequências

destes entre doentes e a população saudável³⁰ embora a frequência de B*27 seja claramente superior na população doente. Tal como nos modelos animais, foi descrita uma maior expressão do HLA B27 nos doentes com EA, comparativamente aos indivíduos saudáveis, pelo que se supõe que o nível de expressão do B27 à superfície das células pudesse ter um papel importante no processo imune.³¹ Este aumento da expressão poderia determinar um aumento do *misfolding* de cadeias pesadas (da proteína expressa pelo HLA-B*27), uma sobrecarga no retículo endoplasmático, a activação do NF κ B e assim a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1.³² Foi assim proposto que o aumento do nível de expressão do HLA B27 fosse considerado como um factor de susceptibilidade para a EA mas sem aparente influência nos índices de actividade ou gravidade da doença.³¹

d) Alteração do Self: O modelo de alteração do *self* prende-se com a alteração da cisteína (cys 67) da proteína B27. A formação de uma ponte bissulfeto entre estes resíduos (cys 67) leva à formação de homodímeros de cadeias pesadas.³³ As condições que podem motivar a ocorrência destes homodímeros são o excesso de cadeias pesadas³⁴ ou a deficiência de β 2 microglobulina, como acontece nos ratos transgénicos para o HLA B27 e para a β 2 microglobulina humana.³⁵ Não se sabe como é que esta alteração poderá induzir a ocorrência de EA, sendo interessante avaliar a formação de homodímeros de cadeias pesadas nos diferentes subtipos de B27 (associados e não associados à doença).

e) Deposição de β 2 microglobulina: A dissociação de B27 à superfície da membrana celular poderia motivar uma libertação crónica, em baixos níveis, de β 2 microglobulina, que sendo captada pela sinovial, poderia conduzir a inflamação crónica.³⁶

Outros genes do MHC

A combinação de determinados alelos da região do MHC numa frequência superior à que seria esperada, desequilíbrio de ligação, envolvendo os alelos HLA-B*27 e outros localizados nesta região, pode dificultar o estudo de genes de susceptibilidade a esta doença.¹³

O HLA-B*60 foi indicado como aumentando em três vezes a probabilidade de desenvolvimento de EA nos indivíduos B27 positivos.³⁷ Hoje, pensa-se que este alelo ou outro em desequilíbrio de ligação a ele associado, possa actuar de forma independente do B27 aumentando a susceptibilidade para EA.³⁸

Os polimorfismos do promotor do gene do TNF- α (sobretudo o TNF -308 e o -238) têm vindo a mostrar resultados controversos. Em diversos estudos efectuados não se encontrou nenhuma associação entre os polimorfismos específicos do promotor do gene do TNF- α e a EA, mas em todos eles o número de doentes avaliados foi pequeno.³⁹⁻⁴⁴ Em termos funcionais, foi descrito inicialmente uma significativa redução da frequência dos alelos -308 A e -238 A nos doentes B27 positivos, comparativamente à população controlo (indivíduos saudáveis, B27 positivos ou negativos).⁴² Num estudo posterior, realizado em duas populações distintas (do sul da Alemanha e do Reino Unido), chegou-se a resultados diferentes. Na população alemã detectou-se uma redução significativa da frequência do alelo -308 A, mas não do alelo -238 A. Na população do Reino Unido não se verificou redução de nenhum. Conclui-se que estes polimorfismos não parecem exercer, por si só, um papel na susceptibilidade para a doença.⁴⁵ Um estudo realizado na população espanhola coloca no entanto a hipótese de que este polimorfismo possa influenciar a susceptibilidade para a doença nos indivíduos B27 negativos. O polimorfismo do TNF-238 A encontrava-se em 50% dos doentes B27 negativos, valor significativamente mais elevado que nos doentes B27 positivos e no grupo controlo B27 negativos.⁴⁶ Esta ideia foi posteriormente refutada por um estudo realizado na população holandesa no qual se mostrou que nem o polimorfismo -238 nem o -376 do TNF- α , se associavam à EA de forma independente do B27.⁴³ Na avaliação do possível contributo dos polimorfismos do gene do TNF- α para a susceptibilidade à EA, em função dos diferentes sub-tipos B27, conclui-se também não existirem diferenças entre doentes EA e indivíduos saudáveis B27 positivos. A maioria dos haplotipos HLA-B*27 estavam associados aos polimorfismos *wild type* do TNF- α (-238,2 e -308,2) e as suas frequências alélicas eram semelhantes na população de controlo (B27 negativa) e na população B27 positiva.¹⁶ Finalmente a análise da influência dos polimorfismos do promotor do TNF- α nos níveis de transcrição,^{47,48} conduziu a resultados muito contraditórios. Continua assim a ser difícil tirar conclusões acerca da relevância deste gene na fisiopatologia da doença.

Algumas especificidades do **HLA classe II** têm também sido implicadas na susceptibilidade para a EA e eventualmente influenciar o fenótipo dos doentes. Os resultados obtidos revestem-se de alguma controvérsia. Uma significativa associação

entre DRB1*01 e a EA e uma fraca, mas significativa, associação entre DRB1*08 (sobretudo nos indivíduos homozigóticos) e a EA, foi estabelecida independentemente do HLA-B*27.⁷ O DRB1*01 parece ainda estar associado às formas esporádicas da doença, nos indivíduos HLA-B*27 negativos⁴⁹ o mesmo acontecendo para alguns polimorfismos do LMP2.⁵⁰ Em termos da sua influência ao nível fenotípico o polimorfismo LMP2 BB parece associar-se a maior probabilidade de ocorrência de uveíte anterior aguda;^{51,52} os resultados são controversos em relação ao envolvimento articular periférico.^{50,53} Se aparentemente não parecem existir diferenças nas frequências antigénicas dos doentes com envolvimento articular periférico ou axial, a maioria dos doentes com artrite periférica erosiva parecem ser DRB1*07 positivos. É assim possível que este alelo, ou outros estreitamente ligados, possa influenciar este tipo de envolvimento.⁵⁴ O HLA-DRB1*07 parece ainda associar-se a uma idade mais jovem para o início da doença,⁷ sendo duvidoso se alguns polimorfismos do LMP2 exercerão também, neste aspecto, alguma influência.⁵⁵

Genes Não – MHC Associados à EA

Estudos recentes, baseados na análise sistemática do genoma humano, confirmaram a existência de *locus*, com possível relevância na susceptibilidade para a EA nas regiões cromossómicas 2p, 2q, 3p, 10q, 11p, 16q¹⁰ ou 1p, 2q, 6p, 9q, 10q, 16q, 19q.¹² A região 16q tem-se evidenciado de forma universal nos vários estudos efectuados.^{10,12,56} A figura 4 esquematiza as diversas regiões cromossómicas com relevância para a EA. Para além da susceptibilidade também as manifestações clínicas da EA poderão ter uma componente hereditária. Assim a actividade da doença foi associada a uma região no cromossoma 18p, a incapacidade funcional a uma região no cromossoma 2q, a idade para início da doença a uma região no cromossoma 11p⁵⁷ e a uveíte aguda anterior foi associada a uma região no cromossoma 9p⁵⁸ (cf. Quadro I). Estes dados são bons indicadores das regiões cromossómicas onde terá maior interesse a pesquisa de genes candidatos. Foram já identificados os genes MNDA (*myeloid nuclear differentiation antigen* - um modulador da transcrição e marcador de monócitos e macrófagos na inflamação crónica) o CXCR4/SDF-1 (*stromal-derived factor 1* - poderá constituir um potencial eixo pró-inflamatório na EA)¹¹ para além dos genes do

complexo da IL-1,⁵⁹⁻⁶² e o do CYP2D6 (citocromo P450 debrisoquina 4-hidroxilase),^{63,64} com associações confirmadas, e os do ANKH (ANK, *Mouse Homolog*),^{65,66} MMP3 (*Matrix Metalloproteinase 3*),⁶⁷ TGF- β (*Transforming Growth Factor*),^{68,69} TCR4 (*Toll-Like Receptor*),¹² com possível associação, à EA (cf. Quadro II).

O complexo do gene da **IL-1**, localizado no cromossoma 2p13, inclui os genes IL-1A e IL-1B (codificam as citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-1 β respectivamente) e IL-1RN (codifica uma molécula IL-1Ra com propriedades anti-inflamatórias que compete com as IL-1 α e IL-1 β) para além de mais seis genes. Assumem a seguinte ordenação do centrómero para o telómero, IL-1A, IL-1B, IL-1F7, IL-1F9, IL-1F6, IL-1F8, IL-1F75, IL-1F10, IL-1RN, ocupando uma região de ~360 Kb.⁷⁰ A importância das proteínas codificadas por estes genes na inflamação e na defesa do hospedeiro, fez com que diversos autores estudassem o seu papel na EA. Obtiveram-se resultados contraditórios de associações à EA para um número variável de sequências repetitivas dispostas em tandem localizadas no intrão 2^{59,62,71} e para dois polimorfismos localizados no exão 6 do IL-1RN.⁶⁰ Um trabalho recente demonstrou que a IL-1B-511 e a IL-1F10-3 estão fortemente associadas com a EA, quer através de estudos de famílias quer de caso-controlo.⁶¹

Os polimorfismos do gene **MMP3**, cujo locus está localizado em 11q23, não parecem associar-se à EA, apesar deste gene se encontrar numa das regiões identificadas como relevante nos estudos de análise global do genoma e de se ter verificado que elevados níveis de expressão da MMP3 nas biópsias sinoviais se correlacionavam com maior actividade da doença.⁶⁷

O gene codificante do **TGF- β** está localizado no locus 19q13.1. Esta citocina parece ter um papel crucial na neo-formação óssea pelo que o seu estudo detalhado, poderá abrir uma nova perspectiva terapêutica, no sentido de contribuir para evitar a anquilose. O polimorfismo TGF- β 1 869 C foi associado a ossificação do ligamento longitudinal posterior na coluna cervical e com sindesmofitose num grupo de doentes Japoneses.^{68,69} As variantes TGF- β 1 713-8delC,⁷² TGF- β 1 869T⁷³ e TGF- β 1 869 C⁷⁴ parecem associar-se a osteoporose, um problema relevante dos doentes com EA. No entanto, o estudo dos polimorfismos T869C e G915C não mostraram associar-se a maior susceptibilidade para a doença nem a início de sintomatologia em idade mais jovem.⁷⁵

O gene **ANKH** está localizado no locus 5p14.1-p15.2. Recentemente, foi identificada uma proteína transmembranar, denominada ANK, que exporta pirofosfato inorgânico (ppi), um importante inibidor da calcificação, dos compartimentos intracelular para o

extracelular.⁷⁶ Uma mutação espontânea no locus da anquilose progressiva do rato (ank) origina nos homozigóticos uma forma progressiva de artrite generalizada acompanhada por deposição de mineral e formação aberrante de osso novo, resultando em anquilose e eventual destruição articular,⁶⁶ muito semelhante à EA do humano. Este gene foi implicado na condrocalcinose^{77,78} (forma familiar autossómica dominante) (OMIM 118600) e na displasia craniometafisária^{79,80} (forma autossómica dominante) (OMIM 123000). Várias variantes do ANKH foram associadas à susceptibilidade para EA,⁷⁶ contudo, os resultados necessitam de confirmação em amostras de maiores dimensões.⁶⁵ É possível que o ANKH não esteja apenas relacionado com a susceptibilidade mas também com a gravidade da anquilose óssea.

O gene **CYP2D6** está localizado no cromossoma 22q13.1. O polimorfismo CYP2D6*4 parece estar presente em, aproximadamente, 5 a 10% dos caucasianos, levando a um baixo metabolismo oxidativo dos fármacos (denominado «poor metabolizer», pm). Este fenótipo pode estar associado a pelo menos 15 variantes alélicas do CYP2D6, 75% das quais são CYP2D6*4 homozigóticos,⁸¹ tendo sido associadas a diversas situações patológicas como a doença de Parkinson,⁸² a neoplasias,⁸³ à esclerose sistémica⁸⁴ e ao lúpus.⁸⁵ Uma associação significativa foi observada entre homozigóticos e a EA. Pelo contrário, o risco de desenvolver a doença em indivíduos heterozigóticos não está aumentado.⁶³

O mecanismo de acção exacto não está claro, mas ilustra a importância que a incapacidade do metabolismo xenobiótico pode ter na fisiopatologia das doenças inflamatórias.

O gene **TLR4** está localizado no locus 9q32-q33. Alguns polimorfismos deste gene poderão estar associados à EA¹² assim como o **CD14-206T** (*cluster of differentiation 14*)⁸⁶⁻⁸⁸ e uma mutação na posição 3020 do gene CARD15⁸⁹⁻⁹² a doenças intestinais inflamatórias. Estes dados colocam em evidência a função do sistema imune inato na patogenia desta doença. Esta evidência faz relançar a ideia de que os agentes infecciosos poderão, para além dos factores genéticos, exercer uma influência importante na patogenia da EA, à semelhança do que é conhecido para as artrites reactivas, embora nenhum agente tenha sido consistentemente associado à EA.⁹³ O CD14 e o TLR4 em conjunto com a proteína MD-2, fazem parte do complexo do receptor para os lipopolissacaridos (LPS- glicolípido específico das paredes celulares das bactérias gram negativas). A ligação de LPS ao receptor emite um sinal transmembranar que condiciona a activação do NF- κ B e a consequente libertação de citocinas

pró-inflamatórias, com início do processo inflamatório.⁹⁴ Outros agonistas, bacterianos e do hospedeiro, poderão ser reconhecidos pelo TLR4, como a *C trachomatis* e a HSP60 (*heat shock protein*),⁹⁵ o que reforça a ideia de que a Resposta Imunitária Inata pode ter um papel crucial no desequilíbrio dos passos iniciais da inflamação.

Conclusões

Os progressos na área da genómica humana, na análise integrada do genoma através de *microarrays* possibilitam hoje novas abordagens que muito poderão contribuir num futuro próximo para o esclarecimento do ou dos genes envolvidos na EA bem como do(s) seu(s) mecanismo(s) de acção.

Os diferentes genes poderão contribuir não só para a susceptibilidade como influenciar as manifestações e a gravidade da EA. A continuação da investigação nesta área abre perspectivas para que se possam vir a identificar os doentes com maior risco de progressão e incapacidade, bem como co-locar em evidência novos alvos terapêuticos.

Correspondência

para:

Fernando Pimentel dos Santos
Serviço de Reumatologia do CHLO
EPE Hospital de Egas Moniz, Lisboa
E-mail:
pimentel.santos@gmail.com

Referências:

- Brown MA, Wordsworth BP, Reveille JD. Genetics of ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20:S 43-49.
- van der Linden S, Valkenburg H, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA B27 positive individuals: a family and population study. *Br J Rheumatol* 1983; 22: 18-19.
- Braun J, Bollow M, Remlinger G et al. Prevalence of spondyloarthropathies in HLA B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 58-67.
- Observatório Nacional de Doenças reumáticas (ONDOR). Relatório de Actividades 2003-2005. Porto: ONDOR; 2006.
- Brown MA, Kennedy LG, Mac Gregor AJ et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins. The role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1823.
- Hamcrsma J, Cardon LR, Bradbury L et al. Is disease severity in ankylosing spondylitis genetically determined? *Arthritis Rheum* 2001; 40: 1823-1828.
- Brown MA, Kennedy LG, Darke C et al. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 460-465.
- Rubin LA, Amos CI, Wade JA et al. Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1212-1220.
- Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA B27. *Lancet* 1973; 1: 904-907.
- Brown MA, Pile KD, Kennedy LG et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 588-595.
- Gu J, Hermann M, Baeten D et al. A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients. *Rheumatology* 2002; 41: 759-766.
- Laval SH, Timms A, Edwards S et al. Whole-genome screening in Ankylosing spondylitis: Evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 918-926.
- Sims AM, Wordsworth BP, Brown MA. Genetic susceptibility to Ankylosing spondylitis. *Cur Mol Med* 2004; 4:13-20.
- López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with Ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens* 1995; 45: 169.
- Fiorillo MT, Cauli A, Carcassi C et al. Two distinctive HLA haplotypes harbor the B27 alleles negatively or positively associated with ankylosing spondylitis in Sardinia: implications for disease pathogenesis. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 1385-1389.
- Martinez-Borra J, Gonzalez S, López-Vazquez A et al. HLA-B27 alone rather than B27-related class I Haplotypes contributes to Ankylosing Spondylitis Susceptibility. *Hum Immunol* 2000; 61: 131-139.
- Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated disease. *Hum Immunol* 1997; 53: 1-11.
- Ramos M, Lopez de Castro JA. HLA B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2002; 60: 191-205.
- Arnas JB, Santos M, Peixoto MJ, Couto AR, Garret F. HLA and spondyloarthritis. *Int J Hum Genet* 2004; 4: 125-135.
- Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 883-886.
- Mckiernan SM, Hagan R, Curry M et al. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 2004; 40: 108-114.
- Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today* 1990; 11: 137-142.
- Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ et al. HLA-B27 Misfolding Is Associated with Aberrant Inter-molecular Disulfide Bond Formation (Dimerization) in the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 2002; 277: 23459-23468.
- Antoniou NA, Ford S, Taurog JD, Butcher GW, Powis SJ. Formation of HLA B27 homodimers and their relationship to assembly kinetics. *J Biol Chem* 2004; 279: 8895-8902.
- Tran TM, Satumtira N., Dorris M et al. HLA-B27 in Transgenic Rats Forms Disulfide-Linked Heavy Chain Oligomers and Multimers That Bind to the Chaperone BiP. *J Immunol* 2004; 172: 5110-

- 5119.
26. Bird LA, Peh CA, Kollinberger S, Elliot T, McMichael AJ, Bowness P. Lymphoblastoid cells express HLA B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur J Immunol* 2003; 33: 748-759.
27. Schwimmbeck PL, Oldstone MB. Molecular mimicry between human leukocyte antigen B27 and Klebsiella. Consequences for spondyloarthropathies. *Am J Med* 1988; 85: 51-53.
28. Benjamin R, Parham P. HLA-B27 and disease: a consequence of inadvertent antigen presentation? *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 11-21.
29. Taugrog JD, Maika SD, Simmons WA, Breban M, Hammer RE. Susceptibility to inflammatory disease in HLA B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J Immunol* 1993; 150: 4168-4178.
30. Coppin HL, McDevitt HO. Absence of polymorphism between HLA B27 genomic exon sequences isolated from normal donors and ankylosing spondylitis patients. *J Immunol* 1986; 137: 2168-2172.
31. Cauli A, Dessoile G, Fiorillo MT et al. Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatology* 2002; 41: 1375-1379.
32. Mear JP, Schreiber KL, Munz C et al. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol* 1999; 163: 6665-6670.
33. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting Edge: HLA-B27 Can Form a Novel β 2-Microglobulin-Free Heavy Chain Homodimer Structure. *J Immunol* 1999; 162: 5045-5048.
34. Taugrog JD, Hammer RE. Experimental spondyloarthropathy in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Rheumatol* 1996; 15 (supl 1): 22-27.
35. Khare SD, Luthra HS, David CS. Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking beta 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. *J Exp Med*. 1995; 182: 1153-1158.
36. Uchanska-Ziegler B, Ziegler A. Ankylosing spondylitis: a β 2 m-deposition disease? *Trends Immunol* 2003; 24: 73-76.
37. Robinson WP, van LS, Khan MA et al. HLA -Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA B27+ patients. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1135-1141.
38. Wei JC, Tsai WC, Lin HS, Tsai CY, Chou CT. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43: 839-842.
39. Verjans GM, van der Linden SM, van Eys GJ, de Waal LP, Kijlstra A. Restriction fragment length polymorphism of the tumor necrosis factor region in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 486-489.
40. Verjans GM, Brinkman BM, van Doornik CE, Kijlstra A, Verweij CL. Polymorphism of the tumor necrosis factor α (TNF- α) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 45-47.
41. Fraile A, Nieto A, Beraun Y, Vinasco J, Mataran L, Martin J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1998; 51: 386-390.
42. Hohler T, Schaper T, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Marker-Hermann E. Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis Rheum* 1998;41:1489-1492.
43. Kaijzel EL, Brinkman B, van Krugten M et al. Polymorphism within the Tumor Necrosis Factor α promoter region in patients with ankylosing spondylitis. *H Immunol* 1999; 60: 140-4.
44. McGarry F, Walker R, Sturrock R, Field M. The -308.1 polymorphism in the promoter region of the Tumor Necrosis Factor Gene is associated with Ankylosing Spondylitis independent of HLA B27. *J Rheumatol* 1999; 26: 110-116.
45. Milicic A, Lindheimer F, Laval S et al. Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis. *Genes and Immunity* 2000;1:418-422.
46. Gonzales S, Torre-Alonso JC, Martinez-Borra J et al. TNF-238 promoter polymorphism contributes to susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative patients. *J Rheumatol* 2001; 28: 1288-1293.
47. Rudwaleit M, Siebert S, Yin Z et al. Low T cell production of TNF α and IFN γ in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann Rheum Dis* 2000; 60: 36-42.
48. Wilsom AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195.
49. Perez-Guijo V, Munoz E, Escudero A et al. Distribution of HLA-DRB1 genes in patients with sporadic ankylosing spondylitis in the south of Spain. *Joint Bone Spine* 2002; 69: 458-462.
50. Maksymowych WP, Tao S, Vaile J, Suarez-Almazor M, Ramos-Remus C, Russell AS. LMP2 polymorphism is associated with extraspinal disease in HLA-B27 negative Caucasian and Mexican Mestizo patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2000;27:183-189.
51. Maksymowych WP, Adlam N, Lind D, Russell AS. Polymorphism of the LMP2 gene and disease phenotype in ankylosing spondylitis: no association with disease severity. *Clin Rheumatol*. 1997; 16: 461-465.
52. Maksymowych WP, Russell AS. Polymorphism in the LMP2 gene influences the relative risk for acute anterior uveitis in unselected patients with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med*. 1995;18:42-46.
53. Maksymowych WP, Gorodezky C, Olivo A et al. HLA-DRB1*08 influences the development of disease in Mexican Mestizo with spondyloarthropathy. *J Rheumatol*. 1997; 24: 904-907.
54. Sanmarti R, Ercilla MG, Brancos MA, Cid MC, Collado A, Rotes-Querol J. HLA class II antigens (DR, DQ loci) and peripheral arthritis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1987; 46:497-500.
55. Vargas-Alarcon G, Gamboa R, Zuniga J et al. Association study of LMP gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum Immunol*.

- 2004; 65: 1437-1442.
56. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Ankylosing spondylitis susceptibility loci defined by genome-search meta-analysis. *J Hum Genet* 2005; 50: 453-459.
57. Bronw MA, Brohy S, Bradbury L et al. Identification of major loci controlling clinical manifestations of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2234-2239.
58. Martin TM, Zhang G, Luo J et al. A locus on chromosome 9p predisposes to a specific disease manifestation, acute anterior uveitis, in ankylosing spondylitis, a genetically complex, multisystem, inflammatory disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 269-274.
59. McGarry F, Neilly J, Anderson N et al. A polymorphism within the interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatology Oxford* 2001; 40: 1359-1364.
60. Maksymowych WP, Reeve J, Reveille D et al. High throughput single nucleotide polymorphism (SNP) analyses of the interleukine-1 receptor antagonist (IL-1RN) locus in patients with ankylosing spondylitis by MALDI-TOF mass spectroscopy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2011-2018.
61. Timms AE, Crane AM, Sims A et al. The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 587-595.
62. van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA et al. Interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology Oxford* 2002; 41: 1419-1423.
63. Brown MA, Edwards S, Hoyle E et al. Polymorphisms of the CYP2D6 gene increase susceptibility to ankylosing spondylitis. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1563-6.
64. Beyeler C, Armstrong M, Bird HA et al. Relationship between genotype for the cytochrome P450CYP2D6 and susceptibility to ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 66-68.
65. Tsui FL, Tsui HW, Cheng EY et al. Novel genetic markers in the 5'-flanking region of ANKH are associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 791-797.
66. Timms AE, Zhang Y, Bradbury L et al. Investigation of the role of ANKH in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2898-2902.
67. Jin L, Weisman MA, Zhang G et al. Lack of association of matrix metalloproteinase 3 (MMP3) genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility and severity. *Rheumatology* 2005; 44: 55-60.
68. Kamiya M, Harada A, Mizuno M, Iwata H, Yamada Y. Association between a polymorphism of the transforming growth-factor beta1 gene and genetic susceptibility to ossification of the longitudinal ligament in Japanese patients. *Spine* 2001; 26: 1264-1266.
69. Yamada M, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. Association of transforming growth-factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 452-460.
70. Nicklin MJ, Barton JL, Nguyen M, FitzGerald MG, Duff GW, Kornman K. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics* 2002; 79: 718-725.
71. Djouadi K, Nedelec B, Tamouza R et al. Interleukin 1 gene cluster polymorphisms in multiplex families with spondyloarthropathies. *Cytokine* 2001; 13: 98-103.
72. Langdahl BI, Knudsen JY, Jensen HK, Gregersen N, Eriksen EF. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor- β 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women and increased is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 1997; 20: 289-294.
73. Yamada Y, Hosoi T, Makimoto F, Tanaka H, Seino Y, Ikeda K. Transforming growth factor- α 1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. *Am J Med* 1999; 106: 477-479.
74. Dick IM, Devine A, Li S, Dhaliwal SS, Prince RL. The T869C TGF beta polymorphism is associated with fracture, bone mineral density, and Calcaneal quantitative ultrasound in elderly women. *Bone* 2003; 33: 335-341.
75. van der Paardt M, Crusius JB, Koning MH et al. No evidence for involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) A896G and CD14-C260T polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 235-238.
76. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science*. 2000; 289: 265-270.
77. Pendleton A, Johnson M, Hughes A et al. Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 933-940.
78. Williams CJ, Zhang Y, Timms A et al. Autosomal dominant familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease is caused by mutation in the transmembrane protein ANKH. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 985-991.
79. Nurnberg P, Thiele H, Chandler D et al. Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in cranio-metaphyseal dysplasia. *Nature Genet* 2001; 28: 37-41.
80. Reichenberger E, Tiziani V, Watanabe S et al. Autosomal dominant cranio-metaphyseal dysplasia is caused by mutations in the transmembrane protein ANK. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1321-1326.
81. Brown MA, Edwards S, Hoyle E et al. Polymorphisms of the CYP2D6 gene increase susceptibility to ankylosing spondylitis. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1563-1566.
82. McCann S, Pond S, James K, Le Couteur D. The association between polymorphisms in the cytochrome P450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case control study and meta-analysis. *J Neurol Sci* 1997; 153: 50-53.
83. Wolf CR, Dale Smith CA, Gough AC et al. Relationship between the debrisoquine hydroxylase polymorphism and cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1035-1038.
84. May D, Black C, Olsen N et al. Scleroderma is associated with differences in individual routes of drug metabolism: a study with dapsone, debrisoquin, and mephenytoin. *Clin Pharmacol. Ther* 1990; 48: 286-295.
85. Baer A, McAllister C, Wilkinson G, Woosley R, Pincus T. Altered distribution of debrisoquine oxidation phenotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 843-850.
86. Obana N, Takahashi S, Kinouchi Y et al. Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 699-702.
87. Klein W, Tromm A, Griga T et al. A polymorphism in the CD14 gene is associated with Chron disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 189-191.

88. Klein W, Tromm A, Griga T et al. Interaction of polymorphism in the CARD15 and CD14 genes in patients with Chron disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 834-836.
89. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Chron's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925-1928.
90. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Chron's Disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
91. Murillo L, Crusius JBA, van Bodegraven AA, Alizadeh BZ, Peña AS. CARD15 gene and the classification of Chron's disease. *Immunogenetics* 2002; 54: 59-61.
92. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Chron's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.
93. van der Paardt M, van Denderen JC, van den Brule Aj et al. Prevalence of Chlamydia trachomatis in urine of male patients with ankylosing spondylitis is not increased. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59: 300-302.
94. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274:10689-10692.
95. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 31332-31339.

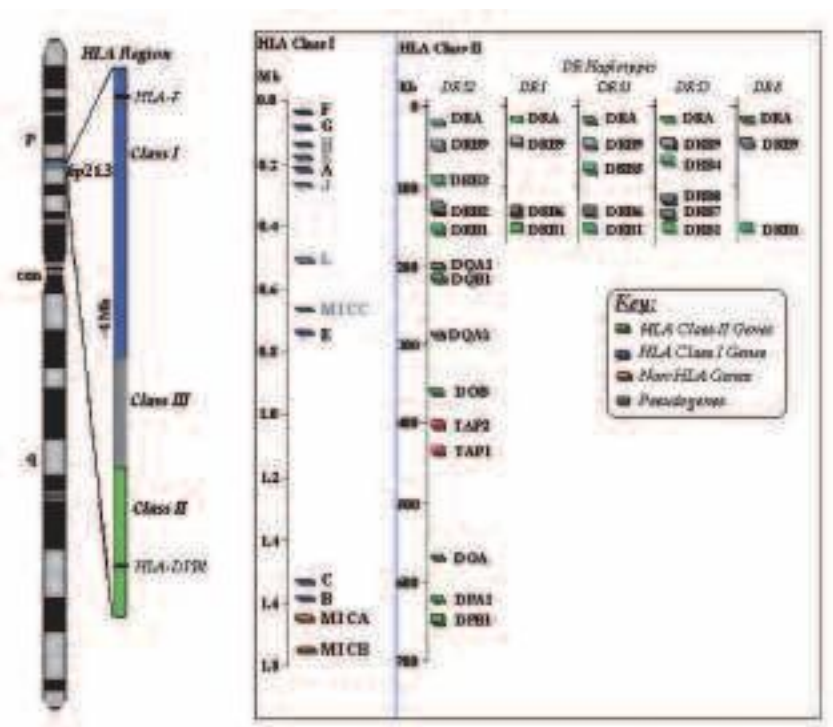


Figura 1. Representação das classes I, II e III do HLA, no cromossoma 6 (Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc).

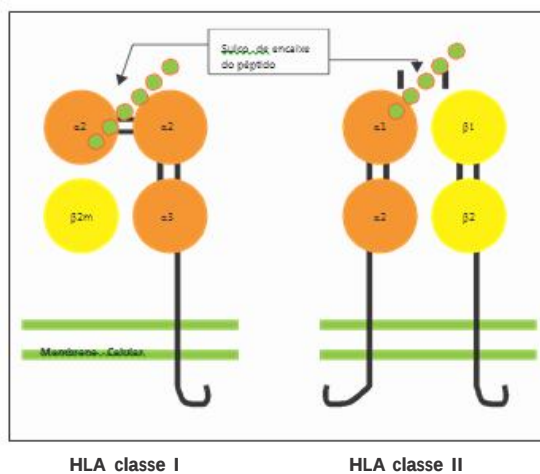


Figura 2. Representação esquemática das moléculas classe I e II do Complexo *Major* de Histocompatibilidade

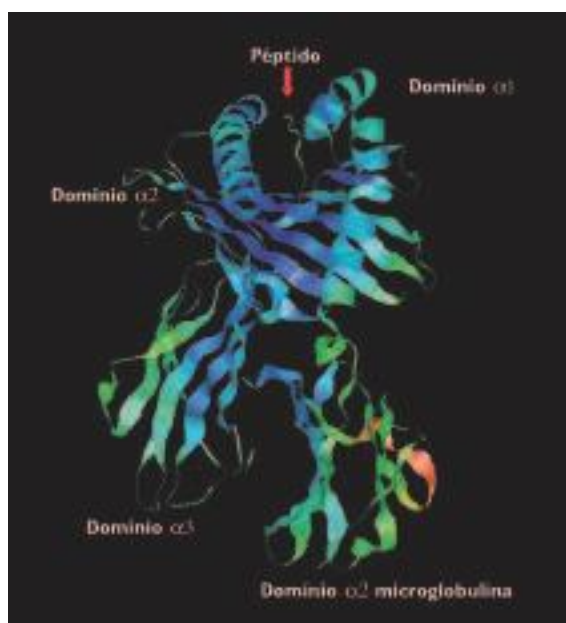


Figura 3. Estrutura de uma molécula de MHC de classe I ligada a um péptido. Imagem criada a partir do ficheiro 1HSA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Domains>) e recorrendo ao software RasMol (<http://www.rasmol.org/>).



Figura 4. Representação esquemática das regiões cromossómicas identificadas como relevantes para a EA (adaptada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, com base nos artigos 10-12).

Quadro I. Distribuição da especificidade HLA-B*27 e alelos em doentes com EA e em controlos saudáveis portugueses

Frequência da especificidade HLA-B*27			
	EA N= 50 (%)	População Controlo N=174 (%)	p OR EA (95% IC)
B*27+	43 (86)	16 (9,2)	p<0,0001 38,6 (16,7-89,3)

Distribuição de frequências dos alelos HLA B*27

	EA N= 43 (%)	População Controlo N=16 (%)	p
B*2702	5 (11,6)	1 (6,3)	ns
B*2705	38 (88,4)	13 (81,3)	ns
B*2707	0 (0)	2 (12,5)	ns

Quadro II. Potenciais correlações existentes entre os diferentes segmentos cromossómicos e as manifestações fenotípicas da doença

Segmento Cromossómico	Fenótipo cromossoma
18p	Actividade Doença
cromossoma 11p	Início em idade jovem
cromossoma 2q	Incapacidade Funcional
cromossoma 9p	Uveíte anterior aguda

Quadro III. Genes não MHC e EA

Consistentemente Associados	Inconsistentemente Associados
	IL-1R antagonista
CYP2D6	IL-6, IL-10
IL-1	TGF- β
	ANKH