

Artigo / Article

Falta de associação entre o sistema Lewis e obstrução coronariana

Lack of association between the Lewis blood group system and coronary vessel obstruction

Juliana R. Cintra^{1,4}Moacir F. Godoy²Luiz Carlos de Mattos^{3,4}

Estudos prévios demonstraram associação entre o sistema Lewis e a doença arterial coronariana (DAC) a partir da observação de que o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) era prevalente em pacientes e propuseram que esse fenótipo representava um novo marcador de risco para essa doença. Esse estudo teve como objetivo verificar a prevalência desse marcador em pacientes brasileiros com indicação de realizar cineangiogramia. A fenotipagem do sistema Lewis foi realizada pelo método gel centrifugação, e a genotipagem do loco LE foi feita pelo método PCR-RFLP. Cento e oitenta e três pacientes (114 masculinos e 69 femininos, com média de idade igual a 59,1 anos (DP ± 12,37; mediana 60) foram selecionados. Cento e vinte e um (66,1%) pacientes apresentaram obstrução coronariana de qualquer grau, sendo essa característica duas vezes mais elevada no sexo masculino do que no feminino ($p=0,07$). As frequências dos fenótipos eritrocitários Lewis foram semelhantes em ambos os grupos de pacientes e o fenótipo Le(a-b-) mostrou-se não estar associado à presença de obstrução coronariana ($p=0,36$). Elevados índices de discrepância fenótipo-genótipo foram observados entre os pacientes Le(a-b-), com base na genotipagem das mutações T59G (86,7%) e T1067A (90,0%). As frequências dos alelos T e G (posição 59) e T e A (posição 1067) não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com e sem obstrução coronariana ($p = 0,52$ e $p = 0,44$, respectivamente). Esses resultados demonstram que o sistema Lewis não está associado à presença de obstrução coronariana e não suportam a proposição de que o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) representa um marcador de risco para essa doença na casuística brasileira. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2008; **30**(2):124-131.

Palavras-chave: Sistema Lewis; obstrução coronariana; polimorfismos FUT3.

Introdução

As cardiopatias compreendem um grupo de doenças de grande importância epidemiológica e com marcante impacto médico-social em todas as populações.¹ Dentre elas, a doença arterial coronariana (DAC) tem se destacado como uma das principais causas de morte que acomete os huma-

nos em idade relativamente jovem, e tem despertado interesse pela busca de fatores de risco ambientais bem como marcadores genéticos de suscetibilidade ou resistência.² Nesse sentido, alguns sistemas de grupos sanguíneos foram explorados com vistas à definição de um ou mais fenótipos eritrocitários que possam estar associados à doença.³⁻⁶

¹Mestranda do Curso de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP.

²Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e Serviço de Hemodinâmica do Hospital de Base de São José do Rio Preto – Funfarme – SP.

³Departamento de Biologia Molecular – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP.

⁴Laboratório de Imunogenética Molecular – Hemocentro de São José do Rio Preto-SP.

Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto e Serviço de Hemodinâmica do Hospital de Base de São José do Rio Preto, com apoio financeiro BAP-Famerp.

Correspondência: Luiz Carlos de Mattos

Departamento de Biologia Molecular – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

15090-000 – São José do Rio Preto-SP – Brasil

Tel.: (17) 3201-5854

E-mail: luiz.carlos@famerp.br

Em 1992 foi descrito um novo marcador genético para a DAC a partir da observação de que homens com o fenótipo eritrocitário Lewis negativo [Le(a-b-)], o qual pertence ao sistema de grupos sanguíneos Lewis, apresentavam altos níveis de obesidade, resistência à insulina e outros fatores de risco, comparados aos portadores dos fenótipos Lewis positivos.⁷ Estudos posteriores confirmaram a associação entre o fenótipo Le(a-b-) e a presença de doença isquêmica cardíaca em pacientes russos e indianos.^{8,9} Nesse mesmo período foi verificado em pacientes norte-americanos que a associação do fenótipo Le(a-b-) com a DAC era independente de outros fatores de risco.¹⁰

Estudos mais recentes examinaram a prevalência de quatro mutações (T59G, T202C, C314T, T1067) do gene *FUT3* (19p13.3), as quais contribuem para a expressão do fenótipo eritrocitário Le(a-b-), devido à inativação parcial (T59G) ou total da fucosiltransferase FUTIII, responsável pela síntese dos antígenos Lewis [Le^a e Le^b]. Não foram encontradas diferenças significantes entre a prevalência dessas mutações e doença arterial coronariana.¹¹ Recentemente, não foi observada associação entre os genótipos Lewis, determinados com base nas mutações acima referidas, e aterosclerose subclínica de carótida.¹²

O sistema de grupos sanguíneos Lewis caracteriza-se pela expressão de dois antígenos glicolipídicos Le^a e Le^b, cuja síntese resulta da interação dos genes *FUT3* (19p.13.3) e *FUT2* (19q13.3). O gene *FUT3* codifica a fucosiltransferase FUTIII a qual fucosila o oligossacarídeo precursor lactotetraosilceramídeo (Gal β1 → 3NAcGlc β1 → 3Gal β1 → 4Glc β 1 → 1-CER), para formar o antígeno Le^a. Paralelamente, a fucosiltransferase FUTII, codificada pelo gene *FUT2*, fucosila o mesmo precursor para formar o antígeno H tipo 1. A posterior fucosilação desse antígeno pela FUTIII dá origem ao antígeno Le^b. Dessa forma, os indivíduos que possuem ambas as fucosiltransferases serão classificados como secretores positivos e expressam o fenótipo eritrocitário Le(a-b+). Aqueles que possuem apenas a FUTIII serão secretores negativos, cujo fenótipo eritrocitário será Le(a+b-). Os indivíduos que não possuem a fucosiltransferase FUTIII expressam o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) e poderão ser secretores positivos ou negativos, na dependência de possuírem ou não a fucosiltransferase FUTII. Portanto, a expressão dos antígenos Le^a e Le^b e dos fenótipos eritrocitários Lewis dependem de interações epistáticas entre os genes *FUT3* e *FUT2*.¹³

Os antígenos Le^a e Le^b são expressos no trato gastrintestinal, no fígado, no pâncreas e nos rins, de onde são transferidos para o plasma e, posteriormente, adsorvidos aos eritrócitos.¹⁴ Também podem ser detectados nas secreções, por meio de testes de inibição da hemaglutinação.¹⁵

Há relatos demonstrando que a fenotipagem eritrocitária do sistema Lewis por hemaglutinação não é confiável e que a prevalência dos fenótipos Lewis pode ser influenciada pelo tipo de reagente utilizado,¹⁵⁻¹⁷ bem como por outras condições que afetam a expressão dos antígenos Lewis.

Alterações na expressão desses fenótipos foram documentadas em gestações, cânceres, hepatite crônica, cirrose hepática, pancreatite alcoólica e cistos hidáticos.¹⁸⁻²⁵ Desde que foram observados resultados discrepantes entre os genótipos e o fenótipo eritrocitário Le(a-b-),^{17,26} tornou-se consenso que esse sistema de grupos sanguíneos deve ser determinado simultaneamente por métodos sorológicos e moleculares.²⁷

Considerando que a DAC é uma das principais causas de morte que acomete o homem em idade relativamente jovem no Brasil, e que um dos fatores que contribui para sua gênese é a obstrução coronariana, o objetivo desse trabalho foi verificar a frequência do fenótipo eritrocitário Le(a-b-) em pacientes submetidos a cineangiocoronariografia e observar se esse marcador representa um fator de risco para a obstrução coronariana. Um objetivo adicional foi verificar a prevalência das mutações T59G e T1067A do gene *FUT3* entre esses pacientes e observar se há discrepâncias entre fenótipo-genótipo nos pacientes Le(a-b-).

Casuística e Método

Foram selecionados 183 pacientes adultos, de ambos os sexos, consecutivos, submetidos a cineangiocoronariografia no Serviço de Hemodinâmica do Hospital de Base de São José do Rio Preto, no período de agosto de 2001 a janeiro de 2002. A cineangiocoronariografia foi indicação para esclarecer o diagnóstico dos pacientes com queixa de dor precordial típica e/ou alteração eletrocardiográfica sugestiva de isquemia. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Famerp (protocolo 2892/2001).

Foram excluídos pacientes menores de 18 anos e portadores de doença consumptiva.

Diagnóstico de obstrução coronariana

O diagnóstico de obstrução coronariana foi determinado pela cineangiocoronariografia, e a presença de obstrução foi considerada quando o resultado revelou redução intraluminal de qualquer grau em pelo menos um vaso coronariano principal (artéria interventricular anterior, artéria circunflexa ou artéria coronária direita). Todos os exames foram analisados por um único observador experiente, sem conhecimento prévio dos resultados das análises fenotípicas e genotípicas do sistema Lewis.

Coleta das amostras de sangue

Após obtenção do consentimento pós-esclarecido foram coletados, durante o procedimento de cineangiocoronariografia, 5 mL de sangue total em tubos a vácuo com EDTA de cada paciente.

Fenotipagem do sistema Lewis

Os fenótipos eritrocitários Lewis foram identificados pelo método de hemaglutinação em microcolunas de gel

centrifugação com os anti-soros anti-Le^a e anti-Le^b (Diamed, Lagoa Santa, MG - Brasil). As instruções do fabricante foram obedecidas rigorosamente.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído por um método enzimático-salino conforme o protocolo de Miller e colaboradores.²⁸ Resumidamente, o *pellet* de leucócitos foi incubado *overnight* em tubo tipo Falcon a 15 mL contendo 3 mL de tampão de lise (TRIS HCl 10 mM; NaCl 400 mM; Na₂EDTA 2 mM), 200 µL de SDS a 10% e 50 µL de proteinase K (Invitrogen) na concentração de 20 mg/mL. À amostra contendo DNA, foi adicionado 1 mL de NaCl 6M (Merck), seguida da incubação por 15 minutos em banho de gelo. Após a centrifugação desse material a 3.500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo ao qual foram adicionados 14 mL de etanol absoluto (Merck) para a precipitação do DNA. O DNA genômico assim obtido foi transferido para outro tubo tipo *ependorf* contendo 500 µL de etanol a 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos. Após evaporação do etanol por 1 hora, o DNA foi diluído *overnight* em 300 µL de água milliQ, quantificado em espectrofotômetro de UV (WPA Biotech Photometer) e estocado a -20° C até o momento do uso.

Genotipagem FUT3

Os genótipos FUT3 foram identificados pelo método PCR-RFLP por meio de duas reações de amplificação com *primers* que flanqueiam as regiões que contêm substituições T59G e T1067A. Para a substituição T59G foi realizada a PCR-1 com os *primers* sense (5' CCA TGG CGC CGC TGT CTG GCC GCC C 3') e antissense (5' AGT GGC ATC GTC TCG GGA CAC ACG 3'). Para a substituição T1067A foi realizada a PCR-2 com os *primers* sense (5' CGC TCC TTC AGC TGG GCA CTG GA 3') e antissense (5' CGG CCT CTC AGG TGA ACC AAG AAG CT 3'). Ambas as reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 10 Mm de TRIS-HCL, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 20mM de cada dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], 20 pM de cada *primer*, 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen) e 5 ng do DNA genômico.

As condições das amplificações realizadas em um termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) estão descritas a seguir. PCR-1: pré-desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos (94° C por um minuto, 63°C por um minuto e 72°C por um minuto) e uma extensão adicional a 72°C por cinco minutos. PCR-2: pré-desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos (94° C por um

minuto, 62°C por um minuto e 72°C por um minuto) e uma extensão adicional a 72°C por cinco minutos. A PCR-1 gerou um fragmento contendo 93 pb, o qual, após a digestão com a enzima *Msp* I (Gibco BRL), foi clivado em dois fragmentos com 68 e 25 pb. A PCR-2 gerou um fragmento contendo 109 pb, o qual, após a digestão com a enzima *Hind* III (Gibco BRL), foi clivado em dois fragmentos com 85 e 24 pb. Em ambas as digestões, foram respeitadas as instruções do fabricante. Os fragmentos oriundos da digestão foram revelados em eletroforese em gel de agarose a 2% (Ultrapure Agarose, Invitrogen), corado com brometo de etídio (Gibco BRL), sob luz UV em transiluminador (Life Tech).

Análise estatística

As comparações entre as frequências fenotípicas e genotípicas Lewis foram feitas pelo teste exato de Fisher (*two tailed*), aceitando-se o erro α de 5%. Foram calculados e comparados os valores com auxílio ODDS *ratio*, empregando-se o *software* GraphPad InStat (Versão 3.06).

Resultados

Os resultados desse estudo são apresentados na Tabela 1. As porcentagens globais dos fenótipos eritrocitários e dos genótipos do sistema Lewis são semelhantes àquelas verificadas em doadores de sangue da cidade de São Paulo²⁹

Tabela 1. Características dos pacientes com e sem obstrução coronariana

Características	Com obstrução		Sem obstrução		Total	
	N	%	N	%	N	%
Média de idade (anos)	60,6		56,1			
Sexo						
Masculino	81	66,9	33	53,2	114	62,3
Feminino	40	33,1	29	46,8	69	37,7
Faixa etária (anos)						
Até 40	6	4,9	8	12,9	14	7,6
De 41 a 60	53	43,8	30	48,4	83	45,4
Acima de 60	62	51,2	24	38,7	86	47,0
Fenótipos eritrocitários Lewis						
Le(a-b-)	22	18,2	8	12,9	30	16,4
Le(a+b-)	14	11,6	7	11,3	21	11,5
Le(a-b+)	85	70,2	47	75,8	132	72,1
Locus Lewis (T59G)						
TT	90	74,4	48	77,4	138	75,4
TG	26	21,5	13	20,9	39	21,3
GG	5	4,1	1	1,7	6	3,3
Alelo T	206	85,0	109	87,9	315	86,0
Alelo G	36	15,0	15	12,1	51	14,0
Locus Lewis (T1067A)						
TT	97	80,1	54	87,0	151	82,5
TA	22	18,2	7	11,3	29	15,8
AA	2	1,7	1	1,7	3	1,7
Alelo T	217	89,7	115	92,7	332	90,7
Alelo A	25	10,3	9	7,3	34	9,3
Total	121	66,1	62	33,9	183	100,0

e da região noroeste do estado de São Paulo,³⁰ independente da presença ou não de obstrução coronariana. Essas frequências não foram comparadas de acordo com a origem étnica dos pacientes, uma vez que a casuística era miscigenada e o objetivo principal desse trabalho foi verificar se há ou não associação do fenótipo eritrocitário Le(a-b-) com a DAC.

A maioria dos pacientes pertencia ao sexo masculino e a média de idade geral verificada foi de 59,1 anos (DP \pm 12,37; mediana = 60). Com base no critério adotado para o resultado da cineangiocoronariografia, foram observadas evidências de obstrução em 66,1% dos pacientes analisados. A média de idade dos pacientes com obstrução coronariana foi maior do que aquela verificada nos pacientes sem obstrução (60,6 X 56,2; $p = 0,010$). A frequência de obstrução mostrou-se duas vezes mais elevada no sexo masculino do que no feminino ($p = 0,07$). Para os pacientes sem evidências de obstrução coronariana, a frequência de ambos os sexos foi similar (53,2% para o masculino e 46,8% para feminino).

Diferenças significantes nas frequências de obstrução coronariana não foram observadas mesmo quando os pacientes foram divididos em três faixas etárias estabelecidas arbitrariamente (até 40 anos; de 41 a 60 anos; maior que 60 anos) ($p = 0,085$). Entretanto, evidências de maior chance de obstrução coronariana foram observadas nos pacientes com idade superior a 40 anos ($p = 0,033$).

Os fenótipos eritrocitários Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-) apresentaram frequências semelhantes entre os grupos de pacientes ($p = 0,36$). Embora tenha sido observada a prevalência do fenótipo eritrocitário Le(a-b-) nos pacientes com obstrução coronariana, a diferença não foi estatisticamente significativa. Essa homogeneidade foi mantida mesmo quando os pacientes foram agrupados em diferentes faixas etárias, inclusive até 40 anos e acima dessa idade ($p = 0,59$), bem como por sexo. Essas comparações não revelaram diferenças estatisticamente significantes e sugerem que o fenótipo Le(a-b-) não representa um marcador de risco para obstrução coronariana na amostra analisada.

A genotipagem do loco Lewis, determinada pelo método PCR-RFLP para as posições 59 e 1067, revelou frequências similares dos genótipos *TT*, *TG* e *GG* (posição 59) *TT*, *TA* e *AA* (posição 1067) em ambos os grupos de pacientes. Embora o genótipo *GG* tenha sido prevalente nos pacientes com obstrução coronariana, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,66$). As frequências dos alelos *T* e *G* (posição 59), *T* e *A* (posição 1067), deduzidas dos genótipos, mostraram-se homogêneas entre os pacientes com e sem obstrução coronariana, conforme indicado na Tabela 1.

As frequências dos fenótipos eritrocitários Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-), independente da presença ou não de obstrução coronariana, foram 11,5%, 72,1% e 16,4%, respectivamente (Tabela 2). Entre os trinta pacientes fenotipados como Le(a-b-), quatro (13,3%) apresentaram o genótipo *GG* na posição 59, três (10,0%), o genótipo *AA* na posição 1067 e

Tabela 2. Frequências das mutações T59G e T1067A de acordo com os fenótipos eritrocitários Lewis

	Le(a+b-)		Le(a-b+)		Le(a-b-)	
	N	%	N	%	N	%
T59G						
TT	18	85,8	106	80,3	14	46,7
TG	3	14,2	24	18,2	12	40,0
GG	0	0,0	2	1,5	4	13,3
T1067A						
TT	17	81,0	115	87,1	20	66,7
TA	4	19,0	17	12,9	7	23,3
AA	0	0,0	0	0,0	3	10,0
Total	21	100,0	132	100,0	30	100,0

apenas um dentre eles (3,0%) apresentou ambos os genótipos. Esses resultados revelam índices de discrepâncias iguais a 86,7% e 90,0% entre o fenótipo eritrocitário Lewis negativo e os genótipos definidos para as posições 59 e 1067, respectivamente.

Dos 132 pacientes fenotipados como Le(a-b+), 106 foram genotipados como *TT*, 24 como *TG* e dois como *GG* na posição 59. A homozigose *GG*, a qual inativa parcialmente a FUTIII, parece não abolir totalmente a expressão do antígeno Le^b dos indivíduos Lewis positivos e secretores positivos. Não foram verificadas discrepâncias entre os fenótipos eritrocitários Le(a+b-) e seus respectivos genótipos nas posições 59 e 1067, bem como entre o fenótipo Le(a-b+) e seus respectivos genótipos na posição 1067.

Discussão

Vários estudos realizados nos últimos 12 anos confirmaram que o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) está associado ao maior risco para a DAC.^{7,9,10,11,31-33} Como a DAC resulta da obstrução de vasos cardíacos importantes e representa uma das causas de morte que afeta ambos os sexos em idade relativamente jovem, o objetivo desse trabalho foi verificar se o fenótipo eritrocitário Lewis negativo está associado à presença ou ausência de obstrução coronariana. Um objetivo adicional foi determinar a prevalência das mutações T59G e T1067A do gene Lewis e observar se há discrepâncias entre o fenótipo e o genótipo nos pacientes Lewis negativo.

A cineangiocoronariografia permite identificar claramente a presença ou não de obstrução coronariana e, portanto, seu uso facilitou a adequada composição dos dois grupos de pacientes bem como a análise comparativa das variáveis escolhidas para esse estudo.

A frequência de obstrução coronariana foi elevada entre os 183 pacientes selecionados e a porcentagem de afetados foi duas vezes maior que a dos não afetados. Esses resultados não são surpreendentes visto que todos os pacien-

tes tinham indicação de realizar cineangiogramia e esse procedimento é indicado para os casos com suspeita clínica de DAC.

A média de idade dos pacientes com obstrução coronariana foi maior que a dos pacientes sem obstrução. Foi observado maior chance de doença em pacientes com idade acima de 40 anos bem como foi encontrado maior número de pacientes do sexo masculino entre aqueles com obstrução coronariana. Essas diferenças demonstram que os dois grupos de pacientes não estavam totalmente pareados, mas são justificáveis, pois idade avançada e sexo masculino constituem fatores de risco para doenças cardíacas resultantes de obstrução coronariana. Os resultados verificados nesse trabalho são coincidentes com aqueles que integram estudos sobre taxas de mortalidade para doenças cardiovasculares no Brasil,³⁴⁻³⁷ além daqueles divulgados pelo Ministério da Saúde no ano de 2002.³⁸

As freqüências dos fenótipos eritrocitários Lewis dos indivíduos selecionados no presente estudo, independente da presença ou não de obstrução coronariana, apresentaram valores semelhantes àqueles estimados para a população brasileira.²⁹ Portanto, pode-se inferir que a casuística desse estudo é representativa da população brasileira, pelo menos com base nesse sistema de grupos sanguíneos.

As freqüências dos fenótipos eritrocitários Lewis foram semelhantes entre os pacientes com e sem obstrução coronariana, mas diferiram daquelas observadas nos estudos que confirmaram associação entre o fenótipo Lewis negativo e a doença arterial coronariana.⁷⁻¹⁰ Embora esse estudo tenha observado maior percentual de pacientes do sexo masculino com obstrução coronariana, não foram verificadas diferenças significantes na freqüência do fenótipo Le(a-b-) entre os sexos. A falta de associação entre o fenótipo Le(a-b-) também foi verificada quando as análises se restringiram aos pacientes que apresentavam grau de obstrução coronariana maior que 50% em, pelo menos, um vaso coronariano principal.

Nossos resultados foram concordantes com aqueles previamente observados por Mansur,³⁹ o qual também não encontrou associação entre angina estável e instável e o fenótipo Lewis negativo em um grupo de pacientes da cidade de São Paulo. Tomados em conjunto, nossos resultados e os de Mansur³⁹ não parecem validar a hipótese de que o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) representa um marcador de risco para a DAC na casuística brasileira.

A maioria dos estudos que demonstraram associação entre o fenótipo Lewis negativo e a doença arterial coronariana baseou-se apenas na fenotipagem eritrocitária Lewis. Nesse estudo, a fenotipagem foi feita com o método gel centrifugação, e a genotipagem, pelo método PCR-RFLP.

A fenotipagem eritrocitária do sistema de grupos sanguíneos Lewis pode ser influenciada por vários fatores. Esse sistema não deve ser considerado "um tudo ou nada" quando analisado sorologicamente em seu nível fenotípico

eritrocitário.¹⁴ Em indivíduos com fenótipo eritrocitário Lewis negativo foram isolados os antígenos Le^a e Le^b do plasma sanguíneo e de secreções colhidas do intestino delgado.⁴⁰ Sob certas condições normais ou patológicas, a expressão dos antígenos Lewis pode ser reprimida e, portanto, eritrócitos anteriormente fenotipados como Lewis positivo [Le(a+b-) ou Le(a-b+)] podem ser identificados como Lewis negativo.¹⁵

A escolha do método para a fenotipagem eritrocitária Lewis é de crucial importância.^{14,17} Embora a hemaglutinação em tubos seja amplamente difundida, a mesma não apresenta o mesmo grau de sensibilidade do método gel centrifugação e pode levar à identificação errônea dos fenótipos eritrocitários Lewis. Além disso, mutações em ponto podem enfraquecer a expressão da fucosiltransferase Lewis e reduzir a expressão dos antígenos Le^a e Le^b em seus portadores, caracterizando-os como Le(a-b-).⁴¹ Portanto, a freqüência do fenótipo Lewis negativo, quando determinada apenas por métodos sorológicos, pode ser superestimada em função de múltiplos fatores que afetam a expressão dos antígenos Le^a e Le^b.

Um estudo recente conduzido em pacientes com aterosclerose subclínica de carótida e seus controles não encontrou associação entre os genótipos Lewis, com base nas mutações T59G, T202C, C314T, T1067, analisadas isoladamente ou em conjunto.¹² Esses autores argumentam que a falta de associação com os genótipos Lewis verificada em seus resultados, comparada às associações anteriormente relatadas em nível fenotípico em outros estudos, podem refletir aspectos da biologia do sistema Lewis. Além disso, sugerem que o aumento na concentração de lipoproteínas plasmáticas pode alterar a adsorção de antígenos Lewis na membrana eritrocitária, gerando fenótipos Lewis negativos não genuínos.

As discrepâncias na fenotipagem do sistema Lewis também podem resultar de possíveis reações cruzadas dos anticorpos anti-Le^a e anti-Le^b com as estruturas precursoras dos antígenos Lewis, revelando falsos resultados.¹⁵ A utilização de suspensões de hemácias não lavadas previamente também pode causar a neutralização dos reagentes para a fenotipagem, devido à presença de antígenos Lewis no plasma sanguíneo de indivíduos Lewis positivos.⁴²

Um dos objetivos adicionais desse estudo foi verificar a ocorrência de discrepâncias entre fenótipo e genótipo nos pacientes Le(a-b-), utilizando o método PCR-RFLP para a identificação das mutações T59G e T1067A. As freqüências dessas mutações ainda são desconhecidas na população brasileira, pois não parecem haver relatos prévios. Ambas foram escolhidas arbitrariamente, pois esse estudo procurou comparar suas freqüências em dois grupos de pacientes selecionados com base na presença ou não de obstrução coronariana. Portanto, as freqüências das mutações T59G e T1067A aqui relatadas não devem ser tomadas como referência para a população geral.

Os resultados revelaram baixos percentuais de concordância para essas alterações visto que, dos trinta pacientes fenotipados como Le(a-b-), apenas sete (quatro GG e três AA) apresentaram genótipos que podem se correlacionar, pelo menos em parte, com esse fenótipo. Como os genótipos dos 23 pacientes restantes não foram concordantes com o fenótipo eritrocitário Le(a-b-), pode-se deduzir que seus percentuais representam elevados índices de discrepância. Esses resultados são semelhantes àqueles obtidos em um recente estudo, que relatou a presença do genótipo GG na posição 59 do gene Lewis em apenas dois indivíduos dentre 11 fenotipados como Le(a-b-), mas não encontrou genótipo AA na posição 1067.¹⁷

A mutação T59G substituiu o aminoácido leucina por uma arginina na posição 20 do domínio transmembrana, enfraquecendo a atividade da FUTIII. Na sua presença ocorre a expressão reduzida de antígenos Lewis e isso pode produzir um fenótipo Le(a-b-) que não é genuinamente negativo.⁴³ Antígenos Lewis foram detectados no plasma e nas secreções de indivíduos fenotipados como Lewis negativos, cujo genótipo era GG na posição 59.¹⁴ A mutação T1067A substituiu o aminoácido isoleucina pela lisina na posição 356 do domínio catalítico da FUTIII, reduzindo a atividade dessa enzima para menos de 10% em relação à sua forma normal.¹³ A presença simultânea dessas mutações leva à completa inativação da FUTIII e à expressão do fenótipo eritrocitário Le(a-b-).⁴³⁻⁴⁵ Com base nessas informações, pode-se presumir que, entre os trinta pacientes fenotipados como Lewis negativo, apenas sete, de fato, apresentam o verdadeiro fenótipo eritrocitário Le(a-b-).

Nesse estudo encontramos dois pacientes pertencentes ao grupo O, com fenótipo eritrocitário Le(a-b+), ambos genotipados como GG na posição 59, mas como TT na posição 1067. A presença do antígeno Le^b nos eritrócitos desses indivíduos pode resultar do fato de não possuírem as glicosiltransferases A e B competindo com a FUTIII parcialmente ativa. Portanto, essa FUTIII poderia utilizar tanto os oligossacarídeos precursores do tipo 1 como o antígeno H tipo 1 para a síntese dos antígenos Le^a e Le^b, respectivamente.¹⁴ Como a FUTII parece ser mais competitiva que a FUTIII pelo oligossacarídeo precursor do tipo 1, esses indivíduos podem sintetizar maior quantidade de antígeno Le^b do que Le^a e expressar o fenótipo eritrocitário Le(a-b+).⁴⁵

As discrepâncias verificadas nesse estudo deixam claro que as mutações analisadas criam um nível de complexidade que afeta a correta interpretação dos fenótipos do sistema Lewis, e requer grande atenção na análise dos resultados. De fato, outras mutações do gene Lewis também comprometem a expressão dos antígenos Le^a e Le^b¹⁷ e, portanto, não se pode descartar o potencial efeito de outras mutações na expressão do fenótipo eritrocitário Le(a-b-).

As divergências entre os resultados desse e de outros estudos também podem ter sido influenciadas por outros fatores além daqueles relacionados ao sistema Lewis. A

presença de um gene de suscetibilidade para a DAC em desequilíbrio de ligação com o loco *LE* pode diferir entre as etnias, e as análises em outras populações com diferentes graus de heterogeneidade étnica poderiam revelar resultados distintos.

O menor número de pacientes que compõem a casuística desse estudo não parece representar um fator responsável pela falta de associação relatada com o fenótipo Le(a-b-). Alguns estudos avaliaram grande número de pacientes^{7,10}, mas outros selecionaram menor número de indivíduos^{8,9} que aquele utilizado nesse estudo.

As bases que fundamentam a associação do sistema Lewis com a doença arterial coronariana ainda são especulativas. Tem sido sugerido que os antígenos Lewis, por serem glicolípídios solúveis no plasma sanguíneo, interagem com antígenos de *Chlamydia pneumoniae*, um microrganismo que parece influenciar a patogênese da aterosclerose.⁴⁶ É possível que essas interações sejam influenciadas pelo fato da variabilidade na expressão dos antígenos Lewis, favorecer a formação de placas de ateroma em maior ou menor grau. O gene *FUT3* localiza-se no cromossomo 19 (19p13.3) próximo ao gene que codifica o receptor do LDL (19p13.3).^{13,47} Considerando-se que alguns polimorfismos do gene *LDL-R* elevam o risco de hipercolesterolemia e que essa condição contribui para obstrução coronariana,⁴⁷ pode-se especular a ocorrência de desequilíbrios de ligação entre as mutações do gene *FUT3*, responsáveis pela expressão do fenótipo eritrocitário Le(a-b-), e os polimorfismos do gene *LDL-R*. Se confirmado, esses desequilíbrios poderiam representar um fator genético adicional que contribui para a associação entre o sistema Lewis e doenças coronarianas, pelo menos em algumas populações. Análises voltadas para identificar esses desequilíbrios de ligação estão em andamento em nosso laboratório.

Esse estudo procurou determinar a associação entre o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) e a obstrução coronariana, visto que, devido ao seu caráter crônico, a doença arterial coronariana resulta da obstrução de importantes vasos do coração. Portanto, a demonstração positiva de associação entre um fator genético e a presença de obstrução arterial coronariana em uma fase precoce poderia ter um grande impacto na prevenção primária da DAC. Entretanto, os resultados desse estudo são contrários à proposição de que o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) está associado a doenças resultantes de obstrução coronariana.

Conclusão

Respeitando-se todos os fatores que possam ter influenciado uma ou mais etapas desse trabalho, conclui-se que o fenótipo Le(a-b-) não está associado à presença de obstrução coronariana. As frequências das mutações T59G e T1067A não diferem entre os grupos analisados, mas estão relacionadas à elevada discrepância fenótipo-genótipo em

indivíduos Lewis negativo. Portanto, apenas o uso da fenotipagem eritrocitária como instrumento de determinação do fenótipo Le(a-b-) em estudos de associação com doenças não é confiável e pode superestimar a frequência do fenótipo Lewis negativo.

Abstract

Previous studies have shown an association between the Lewis blood group system and coronary artery disease (CAD) from the observation that the Le(a-b-) red blood cell phenotype was prevalent among these patients and thus proposed this red blood cell phenotype as a new genetic marker for the disease. The aim of this study was to verify the prevalence of this genetic marker among Brazilian patients who had undergone coronary arteriography. Phenotyping of the Lewis system was carried out using gel centrifugation and genotyping of the LE locus was made using PCR-RFLP. One hundred and eighty-three patients, 114 male and 69 female, with an average age of 59.1 years (SD ± 12.37; median 60), were enrolled. One hundred and twenty-one (66.1%) patients presented some degree of coronary obstruction, which was two times more frequent in men compared to women (p=0.07). The frequencies of the Lewis red blood cell phenotypes were similar between patients with and without coronary obstruction and the Le(a-b-) was not associated to the presence of coronary obstructions (p=0.36). A high level of discrepancies between phenotype and genotype were observed in Lewis negative patients based on genotyping of the T59G (86.7%) and T1067A (90.0%) SNPs. The frequencies of T and G alleles (position 59) and T and A alleles (position 1067) were similar among patients with and without coronary obstructions (p = 0.52 and p=0.44, respectively). These results show that the Lewis system is not associated with the presence of coronary artery obstruction and do not support the proposition that the Le(a-b-) red blood cell phenotype represents a risk marker for this disease among Brazilian patients. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008; 30(2):124-131.

Key words: Lewis system; coronary artery obstruction; FUT3 polymorphisms .

Referências Bibliográficas

1. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 2001;104(22):2746-53.
2. Gianini SD, Forti N, Diamont J. *Cardiologia Preventiva. Prevenção Primária e Secundária*. Ed. Ateneu, 2000, 405 p.
3. Garrison RJ, Havlik RJ, Harris RB, Feinleib M, Kannel WB, Padgett SJ. ABO blood group and cardiovascular disease. The Framingham Study. *Atherosclerosis*. 1976;25(2-3):311-8.
4. Erikssen J, Thaulow E, Stormorken H, Brendemoen, Hellem A. ABO blood groups and coronary heart disease (CHD). A study in subjects with severe na latent CHD. *Thromb Haemost*. 1980;43(2):137-40.
5. Whincup PH, Cook DG, Phillips AN, Shaper AG. ABO blood group and ischaemic heart disease in British men. *BMJ*. 1990;300(6741):1679-82.
6. Nydegger UE, Wuillemin WA, Julmy F, Meyer BJ, Carrel TP. Association of ABO histo-blood group B allele with myocardial infarction. *Eur J Immunogenet*. 2003;30(3):201-6.
7. Hein HO, Sorensen H, Suadicani P, Gyntelberg F. The Lewis blood group - a new genetic marker of ischaemic heart disease. *J Intern Med*. 1992;232(6):481-7.
8. Zhiburt BB, Chepel AI, Serebrianaia NB, Mineeva NV, Ignatovich GP, Shcherbak IuA, et al. The Lewis antigen system as a marker of IHD risk. *Ter Arkh*. 1997;69(1):29-31.
9. Chaudhary R, Shukla JS. Association of Lewis blood group with ischaemic heart disease. *Indian J Med Res*. 1999;109:103-4.
10. Ellison RC, Zhang Y, Myers, RH, Swanson JL, Higgins M, Eckfeldt, J. Lewis blood group phenotype as an independent risk factor for coronary heart disease (the NHLBI Family Heart Study). *Am J Cardiol*. 1999;83(3):345-8.
11. Salomaa V, Pankow J, Heiss G, Cakir B, Eckfeldt JH, Ellison RC, et al. Genetic background of Lewis negative blood group phenotype and its association with atherosclerotic disease in the NHLBI Family Heart Study. *J Intern Med*. 2000;247(6):689-98.
12. Cakir B, Heiss G, Pankow JS, Salomaa V, Sharrett R, Couper D, et al. Association of the Lewis genotype with cardiovascular risk factors and subclinical carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J Intern Med*. 2004;255(1):40-51.
13. Schenkel-Brunner H. *Human Blood groups. Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity*. 2ª edição. Ed. Springer Wien New York 2000. p.184-248.
14. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*. 1995;69(3):166-82.
15. Henry SM. Review: phenotyping for Lewis and secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology*. 1996;12(2):51-61.
16. Swanson JL, McCullough J. Lewis phenotypes. *J Lab Clin Med*. 1996;127(1):104.
17. Grahn A, Elmgren A, Aberg L, Svensson L, Jansson PA, Lönnroth P, et al. Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum. Mutat*. 2001;18(4):358-9.
18. Hammar L, Mansson S, Rohr T, Chester MA, Ginsburg V, Lundblad A et al. Lewis phenotype of erythrocytes and Leb-active glycolipid in serum of pregnant woman. *Vox Sang*. 1981;40(1):27-33.
19. Taylor PA, Rackewich RA, Gare DJ, Falk JA, Shumak KH, Crookston MC. Effect of pregnancy of the reactions of lymphocytes with cytotoxic antisera. *Transplantation*. 1974;17(1):142-6.
20. Langkilde NC, Wolf H, Meldgard P, Orntoft TF. Frequency and mechanism of Lewis antigen expression in human urinary bladder and colon carcinoma patients. *Br J Cancer*. 1991;63(4):583-6.
21. Yazawa S, Nishihara S, Iwasaki H, Asao T, Nagamachi Y, Matta KL et al. Genetic and enzymatic evidence for Lewis enzyme expression in Lewis-negative cancer patients. *Cancer Res*. 1995; 55(7):1473-8.
22. Makni S, Dalix AM, Caillard T, Compagnon B, Le Pendu J, Ayed K et al. Discordance between red cell and saliva Lewis phenotypes in patients with hydatid cysts. *Exp Clin Immunogenet*. 1987; 4(3):136-43.
23. Stigendal L, Olsson R, Rydberg L, Samuelsson BE. Blood group Lewis phenotype on erythrocytes and in saliva in alcoholic pancreatitis and chronic liver disease. *J Clin Pathol*. 1984;37(7):778-82.
24. Pompecki R, Shively JE, Todd CW. Demonstration of elevated anti-Lewis antibodies in sera of cancer patients using a carcinoembryonic antigen-polyethylene glycol immunoassay. *Cancer Res*. 1981;41(5):1.910-5.
25. Orntoft TF, Vestergaard EM, Holmes E, Jakobsen JS, Grunnet N, Mortensen M et al. Influence of Lewis alpha 1-3/4-L-fucosyltransferase (FUT3) gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating tumor marker sialyl-Lewis a levels. *J Biol Chem*. 1996;271(5):32260-8.

26. Larson G, Svensson L, Hynsjö L, Elmgren A, Rydberg L. Typing for the human Lewis blood group system by quantitative fluorescence-activated flow cytometry: large differences in antigen presentation on erythrocytes between A(1), A(2), B, O phenotypes. *Vox Sang.* 1999;77(4):227-36.
27. Henry SM. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood-group-related chart of microorganism receptors. *Transfus Clin Biol.* 2001;8(3):226-30.
28. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 1988;16(3):1215.
29. 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.
30. Cintra JR, Mattos LC. Prevalência das substituições T59G, T202C, C314T e T1067A do gene FUT3 em doadores de sangue da região noroeste paulista. *Rev bras hematol hemoter.* 2006;28(supl 2):342.
31. Hein HO, Sorensen H, Suadicani P, Gyntelberg F. Alcohol consumption, Lewis phenotypes, and risk of ischaemic heart disease. *Lancet.* 1993;341(8842):392-6.
32. Clausen JO, Hein HO, Suadicani P, Winther K, Gyntelberg F, Pedersen O. Lewis phenotypes and the insulin resistance syndrome in young healthy white men and women. *Am J Hypertens.* 1995; 8(11):1060-6.
33. Petit JM, Morvan Y, Mansuy-Collignon S, Viviani V, Vaillant G, Matejka G, *et al.* Hypertriglyceridaemia and Lewis (A-B-) phenotype in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Metab.* 1997;23(3):202-4.
34. Mansur Ade P, Mattar AP, Rolim AL, Yoshi FR, Marin JF, Cesar LA *et al.* Distribution of risk factors in parents and siblings of patients with early coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol.* 2003;80(6):582-4,579-81.
35. Gus I, Fischmann A, Medina C. Prevalence of risk factors for coronary artery disease in the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Arq Bras Cardiol.* 2002;78(5):478-90.
36. Lotufo PA, de Lolio CA. Mortality trends in ischaemic heart disease in São Paulo State: 1970-1989. *Arq Bras Cardiol.* 1993; 61(3):149-53.
37. Lotufo PA. Premature mortality from heart diseases in Brazil. A comparison with other countries. *Arq Bras Cardiol.* 1998;70(5):321-5.
38. Datasus. Mortalidade - Brasil. <http://tabnet.datasus.gov.br> (capturado em 16/10/2005).
39. Mansur AP. Análise dos genótipos das apolipoproteínas A1, B, E, enzima conversora da angiotensina e dos fenótipos Lewis nos pacientes com síndromes coronárias estável e instável. São Paulo, 1998. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
40. Henry SM, Oriol R, Samuelsson BE. Detection and characterization of Lewis antigens in plasma of Lewis-negative individuals. Evidence of chain extension as a result of reduced fucosyltransferase competition. *Vox Sang.* 1994;67(4):387-96.
41. Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for A385T, G428A, C571T, C628T, 685delTGG, G849A, and other mutations from a single PCR. *Transfusion.* 2000;40(7):856-60.
42. Perry EH. Association of ABO, Lewis and Secretor phenotypes and genotypes with *Neisseria gonorrhoeae* [dissertation]. Auckland: Auckland University of Technology, New Zealand; 2003.
43. Mollicone R, Cailleau A, Oriol R. Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes. *Transfus Clin Biol.* 1995; 2(4):235-42.
44. Nishihara S, Narimatsu H, Iwasaki H, Yazawa S, Akamatsu S, Ando T *et al.* Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem.* 1994;269(46):29271-8.
45. Henry SM, Jovall PA, Ghardashkhani S, Gustavsson ML, Samuelsson BE. Structural and immunochemical identification of Le^b glycolipid in the plasma of a group O Le(a-b-) secretor. *Glycoconj J.* 1995;12(3):309-17.
46. Angiolillo DJ, Liuzzo G, Pelliccione S, De Candia E, Landolfi R, Crea F, *et al.* Combined role of the Lewis antigenic system, *Chlamydia pneumoniae*, and C-reactive protein in unstable angina. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(4):546-50.
47. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992;1(6):445-6.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 26/02/2007
Aceito após modificações: 21/09/2007