



# REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



## Artigo original

# Características clínicas e frequência de polimorfismos em TLR4 em pacientes brasileiros com espondilite anquilosante



Natalia Pereira Machado<sup>a</sup>, Eliana Nogueira<sup>b</sup>, Karen Oseki<sup>a</sup>,  
Pâmela Carolina Cruz Ebbing<sup>a</sup>, Clarice Silvia Taemi Origassa<sup>b</sup>, Tatiane Mohovic<sup>b</sup>,  
Niels Olsen Saraiva Câmara<sup>b</sup> e Marcelo de Medeiros Pinheiro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Divisão de Reumatologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>b</sup> Divisão de Nefrologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 10 de fevereiro de 2016

Aceito em 1 de maio de 2016

On-line em 8 de julho de 2016

Palavras-chave:

Espondilite anquilosante

Polimorfismos em TLR-4

HLA-B27

### R E S U M O

**Objetivos:** A imunidade inata está envolvida na fisiopatologia da espondilite anquilosante (EA), com a participação de bactérias gram-negativas, modulação do antígeno leucocitário humano (HLA) B27 e o envolvimento de receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores Toll-like (TLR). O objetivo deste estudo foi investigar as características clínicas e a frequência de polimorfismos em TLR4 (Asp299Gly e Thr399Ile) em uma coorte de pacientes brasileiros com EA.

**Métodos:** Fez-se um estudo transversal que envolveu 200 pacientes com diagnóstico de EA e um grupo controle saudável de 200 indivíduos. Mediram-se a atividade da doença, a gravidade e a capacidade funcional. O estudo dos polimorfismos em TLR4 foi feito com o método de polimorfismo de fragmentos de restrição. O HLA-B27 foi analisado por reação em cadeia da polimerase convencional. Usou-se o programa SPSS Statistics 20 da IBM para a análise estatística e foram considerados significativos valores de p inferiores a 0,05.

**Resultados:** A média de idade e a duração da doença foram de  $43,1 \pm 12,7$  e  $16,6 \pm 9,2$  anos, respectivamente. A amostra foi predominantemente do sexo masculino (71%) e de não brancos (52%). Do grupo de pacientes 66% eram HLA-B27 positivos. A amostra de pacientes foi caracterizada por uma alteração funcional moderada e um elevado grau de atividade da doença. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos em TLR4 e a susceptibilidade à EA.

**Conclusões:** Os polimorfismos em TLR4 399 e 299 não foram mais frequentes em pacientes com EA em comparação com controles saudáveis e nenhuma das variáveis clínicas esteve associada a esses polimorfismos.

© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondência.

E-mail: [mpinheiro@uol.com.br](mailto:mpinheiro@uol.com.br) (M.M. Pinheiro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.05.004>

0482-5004/© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Clinical characteristics and frequency of TLR4 polymorphisms in Brazilian patients with ankylosing spondylitis

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Ankylosing spondylitis  
TLR-4 polymorphisms  
HLA-B27

**Objectives:** Innate immunity is involved in the physiopathology of ankylosing spondylitis (AS), with the participation of Gram-negative bacteria, modulation of human leukocyte antigen (HLA) B27 and the involvement of pattern recognition receptors, such as Toll-like receptors (TLRs). The aim of this study was to investigate the clinical characteristics and frequency of TLR4 polymorphisms (Asp299Gly and Thr 399Ile) in a cohort of Brazilian patients with AS.

**Methods:** A cross-sectional study was carried out involving 200 patients with a diagnosis of AS and a healthy control group of 200 individuals. Disease activity, severity and functional capacity were measured. The study of TLR4 polymorphisms was performed using the restriction fragment length polymorphism method. HLA-B27 was analyzed by conventional polymerase chain reaction. The IBM SPSS Statistics 20 program was used for the statistical analysis, with p-values less than 0.05 considered significant.

**Results:** Mean age and disease duration were  $43.1 \pm 12.7$  and  $16.6 \pm 9.2$  years, respectively. The sample was predominantly male (71%) and non-Caucasian (52%). A total of 66% of the group of patients were positive for HLA-B27. The sample of patients was characterized by moderate functional impairment and a high degree of disease activity. No significant association was found between the two TLR4 polymorphisms and susceptibility to AS.

**Conclusions:** TLR4 polymorphisms 399 and 299 were not more frequent in patients with AS in comparison to the health controls and none of the clinical variables were associated with these polymorphisms.

© 2016 Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

Receptores de reconhecimento de padrões (PRR) são um conjunto de receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos em organismos multicelulares. Receptores Toll-like (TLR)<sup>1</sup> atuam como PRR e desempenham um papel essencial no reconhecimento de componentes microbianos e ligantes endógenos induzidos durante a resposta inflamatória.<sup>2-4</sup>

Entre os polimorfismos genéticos do TLR, alguns dos mais amplamente estudados são duas mutações funcionais cossegregadas no domínio extracelular do TLR4 humano, localizadas no cromossomo 4 e associadas a uma resposta diminuída a lipopolissacarídeos bacterianos (LPS).<sup>5</sup> Com base em sua evidência de associação a um risco aumentado de infecção por bactérias Gram-negativas,<sup>5</sup> esses polimorfismos foram avaliados em algumas doenças inflamatórias nas quais a participação desses microrganismos tem sido implicada na etiopatogenia, como a espondilite anquilosante (EA).

Baseado na premissa de colite subclínica em pacientes com EA e modelos animais que demonstram a participação de um gatilho infeccioso por bacilos gram-negativos<sup>6,7</sup> modulada pela apresentação do antígeno ao HLA-B27,<sup>8</sup> o objetivo do presente estudo foi identificar a frequência de polimorfismos em TLR4 (Asp299Gly e Thr399Ile) em pacientes brasileiros com EA e investigar possíveis associações entre esses polimorfismos e uma maior suscetibilidade à doença, bem como aspectos clínicos e laboratoriais da atividade da doença e cronicidade.

Os resultados da associação entre polimorfismos em TLR e a EA foram controversos em alguns ensaios clínicos,<sup>9</sup> provavelmente por causa da população distinta estudada. Esse

fato motiva a investigação desta associação em populações miscigenadas, como a brasileira.

## Material e métodos

Duzentos pacientes com diagnóstico de EA de acordo com os critérios de Nova York modificados<sup>10</sup> ou espondiloartrite axial<sup>11</sup> foram recrutados da clínica de espondiloartrite do Setor de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo (Brasil); selecionaram-se ainda 200 indivíduos saudáveis entre voluntários que doaram sangue no hospital da mesma instituição entre maio de 2011 e outubro de 2013. Todos os participantes concordaram em participar do estudo e assinaram um termo de consentimento informado (pesquisa número 1.804/10 no Comitê de Ética).

Coletaram-se dados demográficos e clínicos e empregaram-se ferramentas de avaliação específicas para a caracterização da atividade e gravidade da doença, como o Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (Basdai),<sup>12</sup> Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (Asdas),<sup>13</sup> Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (Basfi),<sup>14</sup> Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (Basmi)<sup>15</sup> e Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (mSASSS).<sup>16</sup>

A análise dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile nos TLR4 foi feita com a reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida pela digestão com enzimas de restrição para cada alelo (NCOI para 299 e HinfI para 399).<sup>17,18</sup> A extração do DNA genômico foi feita com sangue total com etilenodiaminotetraacetato (EDTA) com um kit de extração de DNA (DNA NucleoSpin®, Macherey-Nagel). A amplificação por PCR foi

feita com 50 ng do DNA a ser estudado em um volume total de 20  $\mu$ L com 0,8  $\mu$ L de cloreto de potássio 50 mM, 2  $\mu$ L de Tris (pH 8,4), 0,6 mM de cloreto de magnésio, 0,4 mL de cada *primer* (10 nM), 0,4  $\mu$ L de mistura de desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,06  $\mu$ L de unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (0,015 U/ $\mu$ L).

O termociclador automático (MJ Research PTC-200) foi programado para amplificação: desnaturação inicial (95° C durante quatro minutos), seguido de 35 ciclos de 95° C durante 45 segundos, 55° C durante 30 segundos e 72° C durante 90 segundos, com uma extensão final a 72° C durante 10 min. Os *primers forward* e *reverse* foram, respectivamente, 5'-GAT TAG CAT ACT TAG ACT ACC TCC ATG-3' e 5'-GAT CAA CTT CTG AAA AAG CAT TCC CAC-3' para o Asp299Gly e 5'-GGT TGC TGT TCT CAA AGT GAT TTT GGG AGA A e 5'-CCT GAA GAC TGG AGA GTG AGT TAA ATG CT-3' para o Thr399Ile. Fez-se eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmar a amplificação de DNA.

Usou-se uma alíquota de 5  $\mu$ L com a enzima de restrição adequada para a digestão do produto da PCR a 37° C durante duas horas. Fez-se eletroforese em gel de agarose a 4% (Agarose 1000 Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) para a identificação dos alelos do TLR4. O gel foi corado com Sybr Gold (Nucleic acid gel stain, Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) e visualizado com o Storm 849 system (Molecular Dynamics, EUA).

A análise do HLA-B27 foi feita com a PCR convencional em um termociclador automático (MJ Research PTC-200): 70 ng de DNA de cada amostra, 0,9  $\mu$ mol/L de cada *primer forward* e *reverse*, 1,1 mmol/L de cloreto de magnésio, 200  $\mu$ mol/L de mistura de desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2 U de Taq DNA Polymerase para um volume total de 25  $\mu$ L. Os *primers forward* e *reverse* foram, respectivamente, E91S (5'-GGG TCT CAC ACC CTC CAG AAT-3') e 136AS (5'-CGG CGG TCC AGG AGC T-3'). As condições dos ciclos foram de 100 segundos a 94° C, seguido por 30 ciclos de um minuto a 94° C, um minuto a 64° C e dois minutos a 72° C, com uma extensão final a 72° C durante 10 minutos em 40 ciclos consecutivos.

Para avaliar a qualidade da reação (controle interno), as reações foram feitas com *primers* para  $\beta$ -globina para todas as amostras, nas mesmas condições usadas para as reações do HLA-B27. Os *primers* para essas reações foram o PCO4 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') e GH20 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'). Os produtos da PCR foram analisados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% durante uma hora a 100 V.

Os dados numéricos foram expressos como a média e desvio padrão. Usou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar a distribuição dos dados (normal ou não normal). Usou-se o teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis para comparações entre dados categóricos e numéricos. O teste de qui-quadrado foi usado para determinar a distribuição dos polimorfismos em TLR4 entre os grupos, bem como para a comparação das variáveis categóricas. Calcularam-se os coeficientes de correlação de Spearman para determinar a força da correlação entre as variáveis contínuas. Construíram-se modelos de regressão logística bivariada e multivariada com as variáveis que apresentaram associações estatisticamente significativas nos testes anteriores. Usou-se o programa SPSS 20 da IBM para a análise estatística e foram considerados significativos os valores de *p* inferiores a 0,05.

## Resultados

A **tabela 1** apresenta os dados clínicos e demográficos dos 200 pacientes. Como esperado, o sexo masculino foi predominante. Aproximadamente um quarto dos pacientes tinha antecedentes familiares de EA e metade da amostra relatou envolvimento periférico atual ou pregresso. Quase 40% dos pacientes tinha uveíte anterior. As taxas de prevalência de tabagismo atual e a prática regular de exercícios físicos foram baixas.

A média na atividade da doença foi elevada, com um comprometimento significativo na função e mobilidade que refletiu a duração prolongada da doença. Mais de 60% dos pacientes fazia uso regular de um fármaco anti-inflamatório não esteroide e 35% usavam um fármaco antirreumático modificador da doença sintético. Quase metade dos pacientes usava inibidores do TNF- $\alpha$ , com igual distribuição entre etanercept, infliximabe e adalimumabe.

O estudo do HLA-B27 foi feito em 197 (98,5%) pacientes com EA e 60 (30%) indivíduos saudáveis, 66% (n = 130) e 1,6% (n = 1) dos quais testaram positivo, respectivamente. Manifestações extra-articulares foram encontradas em 80 pacientes (40%), a mais frequente das quais foi a uveíte anterior aguda (n = 74; 37%), seguida pela balanite circinada (n = 3; 1,5%), colite não específica (n = 2; 1%) e uretrite estéril (n = 1; 0,5%).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e controles saudáveis em relação aos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile. Em decorrência da quantidade muito baixa de homozigotos, os heterozigotos e os homozigotos foram incluídos no mesmo grupo para os testes. Os polimorfismos 299 e 399 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) nos pacientes (HW- $\chi^2 = 0,73$ , *p* = 0,39 e HW- $\chi^2 = 0,22$ , *p* = 0,63, respectivamente) e controles (HW- $\chi^2 = 0,68$ , *p* = 0,41 e HW- $\chi^2 = 0,26$ , *p* = 0,61, respectivamente), o que demonstra a conservação de frequências de genótipos ao longo das gerações (**tabela 2**). Encontrou-se uma tendência a maior frequência de não cossegregação dos alelos no grupo controle em comparação com os pacientes com EA (**tabela 3**).

Para uma análise mais detalhada, os pacientes foram divididos em subgrupos com base em características clínicas. As pacientes do sexo feminino tinham maior índice de massa corporal (IMC), bem como maiores escores no HAQ-S e Asdas-VHS. As mulheres também tinham uma menor duração da doença, menor gravidade do envolvimento sacroilíaco, bem como menores escores no mSASSS e Basmi em comparação com os homens (**tabela 3**). Depois de controlar variáveis de confusão no modelo de regressão logística, apenas o IMC (*p* = 0,014) e a pontuação no Basmi (*p* = 0,02) permaneceram significativamente associados ao sexo.

Na análise de regressão logística, com a positividade para o B27 como variável dependente, foram encontradas associações significativas com a artrite periférica (*p* = 0,039), uveíte (*p* = 0,033) e uso de inibidores do TNF- $\alpha$  (*p* = 0,003) (**tabela 4**). Entre os pacientes HLA-B27 positivos, encontrou-se uma tendência a um predomínio de brancos (*p* = 0,058). Além disso, encontraram-se nesse grupo maiores taxas de prevalência de uveíte anterior, envolvimento sacroilíaco mais grave (grau IV), maior tempo de duração da doença e uma maior frequência de uso de agentes biológicos (*p* < 0,05) (**tabela 5**).

**Tabela 1 – Dados clínicos e demográficos de pacientes com espondilite anquilosante e controles saudáveis**

Características clínicas	Pacientes (n = 200)	Controles (n = 200)	p
Idade (anos)	43,1 ± 12,7	38,5 ± 11,2	0,001
Sexo masculino (n,%)	142 (71)	121 (60,5)	0,027
Etnia branca (n,%)	96 (48)		
Duração dos sintomas (anos)	16,6 ± 9,2		
Tempo de diagnóstico (anos)	7,6 ± 6,2		
Antecedentes familiares de EA (n,%)	46 (23)		
Presença de HLA-B27 (n,%)	130 (66)		
Envolvimento periférico (n,%)			
Artrite (pregressa ou atual)	99 (49,5)		
Entesite (pregressa ou atual)	129 (64,5)		
Envolvimento axial (n,%)	42 (21)		
Envolvimento do quadril (n,%)	26 (13)		
Uveíte anterior (pregressa ou atual) (n,%)	74 (37)		
Hábitos de vida atuais (n,%)			
Tabagista	19 (9,5)		
Atividade física regular	44 (22)		
Índices de doenças específicas			
BASDAI	2,25 ± 2,02		
BASMI	4,28 ± 2,30		
BASFI	3,80 ± 2,52		
ASDAS-VHS	2,20 ± 1,06		
ASDAS-PCR	2,07 ± 1,08		
HAQ-S	1,05 ± 1,35		
mSSASS	19,0 ± 22,32		
Testes da atividade inflamatória			
VHS (mm)	21,92 ± 20,47		
PCR-us (mg/dL)	8,96 ± 13,53		
Tratamento convencional atual (n,%)			
AINE	125 (62,5)		
Glicocorticoides	12 (6)		
Metotrexato	34 (17)		
Sulfassalazina	18 (9)		
Inibidores do TNF- $\alpha$ (n,%)	81 (40,5)		
Infliximabe	35 (17,5)		
Etanercept	24 (12)		
Adalimumabe	22 (11)		

AINE, anti-inflamatório não esteroide; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Function Index; BASMI, Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; EA, espondilite anquilosante; HAQ-S, Health Assessment Questionnaire-Spondylitis; mSSASS, modified Stokes Ankylosing Spondylitis Spine Score; PCR-us, proteína C reativa ultrassensível; VHS, velocidade de hemossedimentação.

Teste U de Mann-Whitney.

**Tabela 2 – Frequência de polimorfismos em TLR4 (299 e 399) em pacientes e controles**

Polimorfismos em TLR4	Pacientes n = 200	Controles n = 200	p
Asp299Gly			
Selvagem	182 (91%)	178 (89%)	0,505
Heterozigoto	17 (8,5%)	22 (11%)	
Homozigoto	1 (0,5%)	0	
Thr399Ile			
Selvagem	187 (93,5%)	186 (93%)	0,50
Heterozigoto	13 (6,5%)	14 (7%)	
Homozigoto	0	0	
Teste de qui-quadrado.			

Os pacientes com a forma adulta da doença tiveram uma maior pontuação no Basfi, Basdai e HAQ-S, tinham mais idade e maior tempo de duração da doença. Aqueles com a forma juvenil da doença apresentavam mais relatos de antecedentes familiares de EA, faziam mais uso de sulfassalazina e relatavam mais efeitos colaterais de inibidores do TNF- $\alpha$ . No entanto, nenhuma dessas variáveis permaneceu estatisticamente significativa no modelo de regressão múltipla final.

Pacientes não brancos tiveram maior pontuação no IMC e Basmi em comparação com brancos (tabela 6). No entanto, apenas a pontuação do Basmi permaneceu estatisticamente significativa na análise de regressão logística ( $p = 0,004$ ). O grau mais frequente de sacroileíte radiográfica foi o III ( $n = 103$ ; 51,8%), seguido pelos graus IV (40,5%) e II (7,5%).

**Tabela 3 – Características dos pacientes com espondilite anquilosante de acordo com o sexo**

Variáveis	Masculino (n = 142)	Feminino (n = 58)	p
<b>Etnia</b>			
Branca	67 (47,2%)	29 (50%)	0,717
Não branca	75 (52,8%)	29 (50%)	
<b>Início</b>			
Adulto	118 (83,1%)	50 (86,2%)	0,586
Juvenil	24 (16,9%)	8 (13,8%)	
<b>HLA-B27+</b>	96 (67,6%)	34 (58,6%)	0,158
Artrite	68 (47,9%)	31 (53,4%)	0,475
Entesite	93 (65,5%)	36 (62%)	0,646
Uveíte anterior	53 (37,3%)	21 (36,2%)	0,882
Antecedentes familiares de EA	36 (25,3%)	10 (17,2%)	0,216
Envolvimento axial puro	29 (20,4%)	13 (22,4%)	0,754
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,81 ± 3,72	25,80 ± 3,87	<b>0,02</b>
BASMI	4,63 ± 2,22	3,43 ± 2,27	<b>0,001</b>
mSASSS	22,54 ± 23,34	10,64 ± 17,2	<b>&lt; 0,0001</b>
ASDAS-VHS	2,11 ± 1,05	2,42 ± 1,04	<b>0,036</b>
HAQ-S	1,03 ± 0,61	1,11 ± 2,33	<b>0,03</b>
VHS (mm)	19,3 ± 19,6	28,35 ± 21,31	<b>0,001</b>
Duração da doença (anos)	17,5 ± 9,43	14,43 ± 8,5	<b>0,02</b>
<b>Sacroileíte radiográfica</b>			
II	11 (7,7%)	4 (7,0%)	<b>0,044</b>
III	66 (46,5%)	38 (65,5%)	
IV	65 (44,0%)	16 (27,6%)	

ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASMI, Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; EA, espondilite anquilosante; IMC, índice de massa corporal; HAQ-S, Health Assessment Questionnaire-Spondylitis; mSASSS, modified Stokes Ankylosing Spondylitis Spine Score; VHS, velocidade de hemossedimentação.

Testes de qui-quadrado e Mann-Whitney.

The p value in bold means statistically significant.

Entre os pacientes em uso de inibidores do TNF- $\alpha$ , 20 (24,7%) precisaram mudar de agentes: cinco (6,2%) em decorrência de falha primária (6,2%), seis (7,4%) em razão de falha secundária e 13 (16%) em decorrência de eventos adversos, especialmente reações à infusão e infecções. Além disso, quatro (2%) desses pacientes mudaram mais de duas vezes de inibidores de TNF- $\alpha$ .

A uveíte anterior esteve associada a um maior tempo de duração da doença ( $p=0,002$ ), mas perdeu sua significância estatística no modelo final. O envolvimento do quadril esteve associado a cronicidade e contagens mais baixas de atividade da doença (dados não mostrados). No modelo de regressão logística final, o maior tempo de duração da doença ( $p=0,039$ ), uma pontuação mais elevada no Basfi ( $p=0,027$ ) e uma menor pontuação no Basdai ( $p=0,024$ ) mantiveram-se estatisticamente significativos.

Os pacientes com maior tempo de duração da doença tinham maior pontuação no mSASSS e Basmi, bem como um menor escore no Asdas-VHS. No modelo final, apenas o escore do Asdas-VHS ( $p=0,015$ ) permaneceu significativo. A maior duração dos sintomas se correlacionou com escores mais altos no Basmi, Basfi, HAQ-S e mSASSS, bem como a uma pontuação mais baixa no Basdai. No modelo final, os escores do Basmi

**Tabela 4 – Características dos pacientes com espondilite anquilosante de acordo com a positividade para o HLA-B27**

Variáveis	HLA-B27 positivo (n = 130)	HLA-B27 negativo (n = 67)	p
<b>Etnia</b>			
Branca	69 (53,1%)	26 (39%)	<b>0,058</b>
Não branca	61 (46,9%)	41 (61,2%)	
<b>Início</b>			
Adulto	103 (82,4%)	55 (87,3%)	0,386
Juvenil	22 (17,6%)	8 (12,7%)	
<b>Artrite</b>	58 (44,6%)	40 (59,7%)	<b>0,045</b>
Entesite	85 (65,4%)	43 (64,2%)	0,867
Uveíte	56 (43,1%)	17 (25,4%)	<b>0,015</b>
Antecedentes familiares de EA	31 (23,8%)	14 (20,9%)	0,640
<b>Sacroileíte radiográfica</b>			
II	9 (6,9%)	6 (8,9%)	<b>0,01</b>
III	59 (45,4%)	44 (65,7%)	
IV	62 (47,7%)	17 (25,4%)	
Envolvimento axial puro	28 (21,5%)	12 (17,9%)	0,549
Duração da doença (anos)	8,28 ± 6,57	6,39 ± 5,07	<b>0,039</b>
Inibidores do TNF- $\alpha$	59 (45,4%)	16 (23,9%)	<b>0,003</b>

EA, espondilite anquilosante.

Testes de qui-quadrado e Mann-Whitney.

The p value in bold means statistically significant.

**Tabela 5 – Características dos pacientes com espondilite anquilosante de acordo com a etnia**

Variáveis	Branca (n = 96)	Não branca (n = 104)	p
<b>Início</b>			
Adulto	78 (81,3%)	90 (86,5%)	0,3
Juvenil	18 (18,7%)	14 (13,5%)	0,8
<b>Artrite</b>	47 (49%)	52 (0,5%)	0,883
Entesite	61 (63,5%)	68 (65,4%)	0,786
Uveíte	34 (35,4%)	40 (38,5%)	0,656
Antecedentes familiares de EA	23 (24%)	23 (22,1%)	0,757
<b>Sacroileíte radiográfica</b>			
II	6 (6,2%)	9 (8,6%)	<b>0,037</b>
III	59 (61,4%)	45 (43,3%)	
IV	31 (32,3%)	50 (48,1%)	
Envolvimento axial puro	21 (21,8%)	21 (20,2%)	0,770
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,81 ± 3,72	25,8 ± 3,87	<b>0,048</b>
BASMI	3,89 ± 2,18	4,65 ± 2,36	<b>0,023</b>

BASMI, Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; EA, espondilite anquilosante; IMC, índice de massa corporal.

Testes de qui-quadrado e Mann-Whitney.

The p value in bold means statistically significant.



**Tabela 6 – Características dos pacientes com espondilite anquilosante de acordo com o envolvimento do quadril**

Variáveis	Envolvimento do quadril		p
	Sim (n = 26)	Não (n = 174)	
Idade (anos)	47,7 ± 11,3	42,4 ± 12,7	0,035
Tempo de diagnóstico (anos)	10,3 ± 7,9	7,2 ± 5,9	0,04
Duração da doença (anos)	23,4 ± 9,6	15,6 ± 8,8	< 0,0001
BASDAI	1,20 ± 1,43	2,42 ± 2,06	0,001
BASMI	5,55 ± 1,52	4,10 ± 2,33	0,002
BASFI	5,03 ± 2,52	3,61 ± 2,48	0,011
mSASSS	27,33 ± 24,46	17,77 ± 21,80	0,035
ASDAS-PCR	1,55 ± 0,88	2,14 ± 1,09	0,009
HAQ-S	1,86 ± 3,72	0,93 ± 0,61	0,017

ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Function Index; BASMI, Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index; mSASSS, modified Stokes Ankylosing Spondylitis Spine Score. Testes de qui-quadrado e Mann-Whitney. The p value in bold means statistically significant.

( $p < 0,0001$ ) e Basdai ( $p = 0,016$ ) permaneceram estatisticamente significativos após ajustes múltiplos.

Quando os pacientes foram classificados – de acordo com os escores do Asdas – em remissão ( $< 1,3$ ), atividade da doença moderada ( $\geq 1,3$  e  $< 2,1$ ), alta ( $\geq 2,1$  e  $< 3,5$ ) ou muito alta ( $\geq 3,5$ ), encontraram-se as seguintes frequências: 14% ( $n = 28$ ), 31,5% ( $n = 63$ ), 37% ( $n = 74$ ) e 17,5% ( $n = 35$ ), respectivamente.

A pontuação no Basdai se correlacionou positivamente com o Basfi, Asdas-VHS, Asdas-PCR, VHS, PCR e HAQ-S e se correlacionou negativamente com o mSASSS. Após regressão linear multivariada, o Basdai permaneceu significativamente correlacionado com o Basfi ( $p = 0,001$ ), HAQ-S ( $p = 0,047$ ), Asdas-VHS, Asdas-PCR e VHS ( $p < 0,0001$ ), mas não com a PCR ( $p = 0,247$ ).

## Discussão

Os polimorfismos em TLR4 399 e 299 não foram mais frequentes em pacientes brasileiros com EA em comparação com controles saudáveis, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes e o grupo controle. A influência dos polimorfismos em TLR4 na etiopatogenia de infecções, especialmente por bactérias gram-negativas, é bem conhecida,<sup>19</sup> já que esses polimorfismos resultam em um fenótipo que é pouco sensível às endotoxinas derivadas do processo infeccioso que provocam a transdução aberrante do sinal na presença de microrganismos. No entanto, diversos autores recentemente questionaram a influência de polimorfismos desse receptor na progressão, gravidade e desfecho de infecções, o que sugere que os fatores relacionados com o hospedeiro são mais importantes do que os polimorfismos propriamente ditos.<sup>20,21</sup>

Componentes bacterianos ou intracelulares podem iniciar o processo inflamatório e provocar sensibilização a um antígeno endógeno por meio do mimetismo molecular, ativar persistentemente a imunidade inata adaptativa e perpetuar

o processo inflamatório. O gatilho pode não ser necessariamente patogênico, mas fazer parte da microbiota residente normal e pode culminar com o desenvolvimento de doenças, como a EA, em indivíduos geneticamente susceptíveis.<sup>2</sup>

Há algumas evidências de uma associação entre polimorfismos em TLR (299 e 399) e a EA,<sup>6,22,23</sup> mas essa associação não foi confirmada por outros estudos.<sup>24-26</sup> O mesmo é verdadeiro para o Asp896Gly.<sup>27</sup> O polimorfismo S180L de uma proteína adaptadora do TLR 2 e 4 (TIRAP), que demonstrou desempenhar um papel protetor contra a ocorrência de lúpus eritematoso sistêmico, também demonstrou não ter associação com a EA.<sup>28</sup>

Kyo et al. descobriram que camundongos mutantes (C3H/HeJ) para TLR4 não desenvolveram artrite após a injeção intra-articular de LPS de *E. coli*, ao contrário do grupo selvagem.<sup>29</sup> Isso levantou a hipótese de que a mutação no TLR4 pode diminuir a intensidade da resposta imune inata e ter um papel protetor, em vez de promover a autoimunidade.

Os presentes dados mostram que os polimorfismos 299 e 399 em TLR4 não são fatores genéticos de maior susceptibilidade à EA, o que está de acordo com uma metanálise recente que envolveu dados compilados de nove estudos sobre esse tema.<sup>30</sup> Além disso, é importante ressaltar que um dos maiores estudos genéticos feitos (*The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium*), que envolveu mais de dois mil pacientes de ascendência europeia com EA, também não encontrou associação entre os TLR e a susceptibilidade à doença.<sup>9</sup> De acordo com os autores citados, as principais associações ocorreram com dois genes isolados (2p15 e 21q22), bem como com a IL-23R, IL-1R2, ANTXR2 e ERAP-1.

A expressão do TLR4 está relacionada com a interface entre o sistema imune e o ambiente, bem como com as respostas inflamatórias agudas e crônicas em pacientes com EA,<sup>31-33</sup> mas os polimorfismos não parecem estar associados a um maior risco de desenvolver a doença.<sup>30</sup> Estudos populacionais que envolveram indivíduos saudáveis indicam heterogeneidade na distribuição geográfica desses polimorfismos. As frequências variaram de 4 a 10% em brancos<sup>34</sup> na presente coorte, enquanto se relatou uma frequência de 16% entre os africanos.<sup>35</sup> Não há relatos desse polimorfismo em asiáticos.<sup>25</sup>

Considerando que a população brasileira é altamente miscigenada entre diversos grupos étnicos, não se podem garantir resultados semelhantes se pacientes de outras partes do país, especialmente sem origem europeia, tivessem sido incluídos.

Não se pode descartar a possibilidade de uma associação fraca, que pode ser representativa em um tamanho de amostra maior do que a usada no presente estudo. No entanto, um trabalho feito no Reino Unido que envolveu mais de 500 pacientes com EA também não encontrou associação.<sup>6</sup> O mesmo é verdade para outras etnias, como populações húngaras, finlandesas, coreanas, canadenses e holandesas. Outro ponto a considerar é a baixa prevalência de genótipos homocigotos para os polimorfismos em TLR4 na presente coorte, que é semelhante aos resultados descritos em outras populações.

Demonstrou-se que ratos transgênicos para HLA-B27 não desenvolvem inflamação das ênteses ou intestinos, embora esses animais desenvolvam lesões genitais e de pele sob condições estéreis, o que demonstra o papel dos agentes infecciosos como um gatilho inflamatório.<sup>36</sup> Além disso, a

participação do ambiente é um fator determinante no surgimento da doença, já que apenas 2 a 5% da população positiva para HLA-B27 a desenvolvem. Baseado neste fato, investigou-se a interação entre o HLA-B27 e polimorfismos em TLR4 na presente amostra, mas essa não foi encontrada, pois não foram detectadas diferenças significativas nos polimorfismos entre os pacientes e controles saudáveis. Além disso, a quantidade de pacientes com polimorfismos foi relativamente pequena.

Em relação aos aspectos clínicos, os homens apresentaram danos radiográficos axiais mais graves e maior tempo de duração da doença do que as mulheres, o que é semelhante aos resultados descritos por outra coorte brasileira,<sup>37</sup> bem como em outras populações, embora sem diferença significativa de gênero em relação ao envolvimento periférico.<sup>38</sup> No entanto, esses achados devem ser interpretados com cautela, uma vez que as únicas diferenças estatisticamente significativas após o controle por variáveis de confusão, especialmente a duração da doença e a idade, foram a pontuação no Basmi, que foi maior no sexo masculino, e o IMC, que foi maior entre as mulheres.

A miscigenação provavelmente contribuiu para as duas peculiaridades encontradas na presente amostra. A primeira foi a menor frequência de positividade para o HLA-B27 (66%) em comparação com outra coorte brasileira (78,2%)<sup>37</sup> e estudos que envolveram populações brancas (mais de 90%).<sup>39</sup> Da amostra em questão, 52% eram não brancos, o que reflete melhor a população brasileira em comparação com estudos anteriores (75,5% de pacientes brancos).<sup>37</sup> A segunda particularidade foi o maior envolvimento periférico ou misto, o que também foi relatado em outras populações miscigenadas.<sup>39,40</sup> Entre apenas os pacientes brancos do presente estudo, a frequência de positividade para o HLA-B27 foi de 75%, o que é muito próximo da frequência relatada em uma coorte brasileira anterior,<sup>39</sup> bem como a relatada em um estudo francês recente.<sup>41</sup>

Os pacientes com altos escores no índice de cronicidade geralmente tinham menor pontuação no índice de atividade da doença, tal como a associação entre o envolvimento do quadril e uma pontuação pior no Basfi e menor no Basdai. Do mesmo modo, a duração da doença se correlacionou com uma menor pontuação no Basdai e uma maior pontuação no Basmi. Curiosamente, a pontuação no Basdai se correlacionou com outros marcadores de atividade (Asdas-VHS e PCR), bem como com uma pior funcionalidade, mas a correlação com a PCR, que é um dos parâmetros mais padronizados para estudar a atividade inflamatória em pacientes com EA,<sup>42</sup> não foi significativa.

Como esperado, a presença de HLA-B27 esteve significativamente associada a manifestações extra-articulares (uveíte)<sup>43</sup> e menor envolvimento periférico, mas não foram encontradas associações com o escore radiológico ou qualquer ferramenta de avaliação específica da EA, incluindo a atividade, função e mobilidade. Esse achado reflete o conhecimento mais recente de que esse aspecto genético não é um fator associado a um pior prognóstico em relação à formação de novo osso.<sup>44</sup>

A prevalência da forma juvenil (16%) foi semelhante à encontrada em caucasianos (8,6 a 21%), turcos (13,4%) e outra coorte brasileira (16%),<sup>45</sup> bem como mais baixa do que as taxas

relatadas para mexicanos (28 a 54%) e coreanos (41,3%).<sup>46</sup> A inclusão desses pacientes não exerceu um impacto importante sobre os desfechos clínicos, laboratoriais e de imagem analisados, o que está de acordo com a noção de que esse subgrupo é parte do mesmo espectro da doença. Em contraste, alguns autores relataram menor envolvimento axial e uma maior proporção de envolvimento periférico, especialmente nos joelhos, em comparação com o início da doença após os 16 anos.<sup>37,45,46</sup>

O presente estudo tem limitações que devem ser abordadas, como o tamanho da amostra para estudos sobre polimorfismos genéticos e a maior proporção de indivíduos caucasianos nessa coorte, o que pode não refletir a população brasileira com EA. Os dados do presente estudo sugerem que essas variações em TLR4 não são susceptíveis de influenciar na etiopatogenia da EA. Esse achado, no entanto, não exclui a possibilidade de que as anormalidades funcionais nos TLR ou outras moléculas intimamente associadas à sinalização de TLR sejam importantes na patogênese das espondilartropatias.

---

## Financiamento

Bolsa de pesquisa da agência de fomento brasileira Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 2011/05517-6).

---

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

---

## Agradecimentos

À Divisão de Reumatologia e Nefrologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp).

---

## REFERÊNCIAS

1. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
2. Pollanen R, Sillat T, Pajarinen J, Levon J, Kaivosoja E, Konttinen YT. Microbial antigens mediate HLA-B27 diseases via TLRs. *J Autoimmun*. 2009;32(3-4):172-7.
3. Pacheco-Tena C, Zhang X, Stone M, Burgos-Vargas R, Inman RD. Innate immunity in host-microbial interactions: beyond B27 in the spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14(4):373-82.
4. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
5. Leaver SK, Finney SJ, Burke-Gaffney A, Evans TW. Sepsis since the discovery of Toll-like receptors: disease concepts and therapeutic opportunities. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1404-10.
6. Lamarque D, Nhieu JT, Breban M, Bernardeau C, Martin-Garcia N, Szepes Z, et al. Lymphocytic infiltration and expression of inducible nitric oxide synthase in human duodenal and colonic mucosa is a characteristic feature of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2003;30(11):2428-36.

7. De Rycke L, Kruithof E, Vandooren B, Tak PP, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: insights from synovial membrane studies. *Curr Rheumatol Rep.* 2006;8(4):275-82.
8. Sparks JA, Costenbader KH. Genetics environment, and gene-environment interactions in the development of systemic rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2014;40(4):637-57.
9. Reveille JD, Sims AM, Danoy P, Evans DM, Leo P, Pointon JJ, et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(2):123-7.
10. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984;27(4):361-8.
11. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(6):777-83.
12. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2286-91.
13. Machado P, Landewe R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, et al. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):47-53.
14. Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O'Hea J, Mallorie P, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2281-5.
15. van der Heijde D, Landewe R, Feldtkeller E. Proposal of a linear definition of the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) and comparison with the 2-step and 10-step definitions. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(4):489-93.
16. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(1):127-9.
17. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature.* 1985;316(6023):76-9.
18. Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *BioTechniques.* 2001;31(1):22-4.
19. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-45.
20. Draisma A, Dorresteyn M, Pickkers P, van der Hoeven H. The effect of systemic iNOS inhibition during human endotoxemia on the development of tolerance to different TLR-stimuli. *Innate Immun.* 2008;14(3):153-9.
21. Jessen KM, Lindboe SB, Petersen AL, Eugen-Olsen J, Benfield T. Common T.N.F-alpha, IL-1 beta, PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. *BMC Infect Dis.* 2007;7:108.
22. McCormack WJ, Parker AE, O'Neill LA. Toll-like receptors and NOD-like receptors in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):243.
23. Snelgrove T, Lim S, Greenwood C, Peddle L, Hamilton S, Inman R, et al. Association of toll-like receptor 4 variants and ankylosing spondylitis: a case-control study. *J Rheumatol.* 2007;34(2):368-70.
24. Gergely P Jr, Blazsek A, Weiszhar Z, Pazar B, Poor G. Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45(10):1194-6.
25. Na KS, Kim TH, Rahman P, Peddle L, Choi CB, Inman RD. Analysis of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 4 shows no association with ankylosing spondylitis in a Korean population. *Rheumatol Int.* 2008;28(7):627-30.
26. Adam R, Sturrock RD, Gracie JA. TLR4 mutations (Asp299Gly and Thr399Ile) are not associated with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(8):1099-101.
27. van der Paardt M, Crusius JB, de Koning MH, Morre SA, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, et al. No evidence for involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) A896G and CD14-C260 T polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(2):235-8.
28. Cantaert T, Stone MA, ter Borg M, Mogg R, De Vries N, Wilson AG, et al. A functional polymorphism of TIR-domain-containing adaptor protein is not associated with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(5):720-2.
29. Kyo F, Futani H, Matsui K, Terada M, Adachi K, Nagata K, et al. Endogenous interleukin-6, but not tumor necrosis factor alpha, contributes to the development of toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88-mediated acute arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2530-40.
30. Xu WD, Liu SS, Pan HF, Ye DQ. Lack of association of TLR4 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2012;79(6):566-9.
31. De Rycke L, Vandooren B, Kruithof E, De Keyser F, Veys EM, Baeten D. Tumor necrosis factor alpha blockade treatment down-modulates the increased systemic and local expression of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 2005;52(7):2146-58.
32. Assassi S, Reveille JD, Arnett FC, Weisman MH, Ward MM, Agarwal SK, et al. Whole-blood gene expression profiling in ankylosing spondylitis shows upregulation of toll-like receptor 4 and 5. *J Rheumatol.* 2011;38(1):87-98.
33. Yang ZX, Liang Y, Zhu Y, Li C, Zhang LZ, Zeng XM, et al. Increased expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood leucocytes and serum levels of some cytokines in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(1):48-55.
34. Carvalho A, Marques A, Maciel P, Rodrigues F. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of the Portuguese population. *Mol Cell Probe.* 2007;21(4):316-20.
35. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, et al. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(1):177-82.
36. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med.* 1994;180(6):2359-64.
37. Sampaio-Barros PD, Bertolo MB, Kraemer MH, Neto JF, Samara AM. Primary ankylosing spondylitis: patterns of disease in a Brazilian population of 147 patients. *J Rheumatol.* 2001;28(3):560-5.
38. Lee W, Reveille JD, Davis JC Jr, Learch TJ, Ward MM, Weisman MH. Are there gender differences in severity of ankylosing spondylitis? Results from the PSOAS cohort. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(5):633-8.
39. Gallinaro AL, Ventura C, Sampaio Barros PD, Goncalves CR. Spondyloarthritis: analysis of a Brazilian series compared with a large Ibero-American registry (RESPONDIA group). *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(5):581-9.
40. Kohem CL, Bortoluzzo AB, Gonçalves CR, Braga da Silva JA, Ximenes AC, Bértolo MB, et al. Profile of the use of disease modifying drugs in the Brazilian Registry of Spondyloarthritides. *Rev Bras Reumatol.* 2015;55(1):48-54.



41. Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiochia G, et al. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:689-93.
42. Machado P, Landewe R. Spondyloarthritis. Is it time to replace Basdai with Asdas? *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(7):388-90.
43. Khan MA. Update: the twenty subtypes of HLA-B27. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12(4):235-8.
44. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, et al. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(5):1388-98.
45. Duarte AP, Marques CDL, Bortoluzzo AB, Gonçalves CR, da Silva JA, Ximenes AC, et al. Epidemiologic profile of juvenile-onset compared to adult onset spondyloarthritis in a large Brazilian cohort. *Rev Bras Reumatol*. 2014;54(6):424-30.
46. Baek HJ, Shin KC, Lee YJ, Kang SW, Lee EB, Yoo CD, et al. Juvenile onset ankylosing spondylitis (JAS) has less severe spinal disease course than adult onset ankylosing spondylitis (AAS): clinical comparison between JAS and AAS in Korea. *J Rheumatol*. 2002;29(8):1780-5.