

Sistema sanguíneo Lewis em pacientes hansenianos¹

Lewis blood group system in leprosy patients

Eliane Aparecida Silva²Eliana Milanesi Rúbio³Somei Ura⁴

RESUMO

No presente estudo avaliamos a distribuição fenotípica do grupo sanguíneo Lewis na saliva e nos eritrócitos de pacientes hansenianos. Foram analisados 47 pacientes e 40 indivíduos controles quanto a presença de antígenos ABH bem como dos antígenos Lewis nos eritrócitos e na saliva, pela reação de aglutinação e inibição de aglutinação. As frequências dos fenótipos Lewis e secretor/não secretor nesses pacientes e no grupo controle foram: Le(a- b+) = 29,8% (62,5%); Le(a+ b-) = 25,5% (7,5%); Le(a- b-) = 44,7% (30,0%); secretor = 59,5% (85%) e não secretor = 40,5% (15%). Em análise do χ^2 encontramos diferença significativa tanto para o fenótipo Lewis como para o fenótipo secretor, em relação ao grupo controle respectivamente: $\chi^2 = 10,46$; GL = 2; $p = 0,005$ e $\chi^2 = 5,64$; GL = 1; $p = 0,018$. Da mesma forma, o teste Z de proporções foi realizado obtendo resultados significativos para os fenótipos Le (a+ b-) e Le (a- b+), que foram respectivamente: Z = 2,219; $p = 0,027$ e Z = 3,058; $p = 0,002$. Os resultados indicam que o fenótipo Le (a+ b-) parece estar associado à suscetibilidade à hanseníase e fenótipo secretor com proteção. Discute-se que a presença de Leb na saliva pode inibir a aderência do *M. leprae* às células da mucosa, protegendo assim contra infecção.

Descritores: *Mycobacterium leprae*, Fenótipo Lewis, Fenótipo secretor, Grupo sanguíneo, Hanseníase.

INTRODUÇÃO

Desde que foi demonstrado que diversos microrganismos patogênicos apresentam estruturas antigênicas semelhantes e(ou) complementares com as dos grupos sanguíneos humano, várias pesquisas foram desenvolvidas na tentativa de estabelecer uma relação entre grupos sanguíneos e suscetibilidade do hospedeiro aos diversos patógenos²⁸.

Na hanseníase, doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), o grau de resistência ou de suscetibilidade à infecção parece depender de fatores herdados do hospedeiro, mas pouco se sabe acerca deles.

A hipótese de uma eventual associação entre grupo sanguíneo e suscetibilidade à hanseníase, tem sido o objetivo de numerosas investigações^{3,4,12}. Entretanto, encontramos na literatura poucos trabalhos que avaliam a distribuição do sistema sanguíneo Lewis em hansenianos²⁷.

Mourant, em 1946²², encontrou no soro do Sr. H. D. G. Lewis um anticorpo que aglutinava 20% dos eritrócitos de doadores de sangue. O antígeno foi denominado Lewis e mais tarde Lewis(a) ou Le'. Dois anos depois, Andresen (1948)² descreveu um antígeno que achava ser codificado pelo alelo de Le d' e que foi chamado de Lewis b ou Le^b.

Os antígenos Lewis solúveis, são glicoproteínas controladas pelo gene secretor (Se), sintetizadas nas glândulas salivares que podem ser encontradas na maioria dos fluidos e secreções orgânicas. Eles estão estreitamente relacionados aos antígenos ABH, determinados geneticamente por um par de alelos autossômicos responsáveis pela manifestação dos fenótipos secretor/não secretor dessas glicoproteínas²³.

Atualmente sabe-se que a expressão dos antígenos Lewis sobre a superfície das células endoteliais e epiteliais é controlada pelos genes Le e seu alelo le, e os genes H e Se que agem intrinsecamente ligados, na formação dos antígenos glicolipídicos pela adição de açúcares específicos a uma cadeia oligossacáride precursora²¹.

1Projeto financiado pela Fundação Paulista Contra a Hanseníase (Proc.n0 001/97).

2 Pesquisadora Científica, Equipe Técnica de Imunologia, Instituto "Lauro de Souza Lima", Bauru-SP.

3 Professora Doutora, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP/Botucatu-SP.

4Pesquisador Científico, Equipe Técnica de Clínica Médica, Instituto "Lauro de Souza Lima", Bauru-SP.

Há estudos reconhecendo a complexidade do sistema Lewis e sua associação com doenças, tais como câncer gástrico e intestinal¹⁷, infecções do trato urinário^{13,16,18} e anemia hemolítica auto-imune decorrente de complicação da mononucleose infecciosa²⁰.

Sendo assim, esses dados nos motivaram a avaliar a distribuição do grupo sanguíneo Lewis na saliva e nos eritrócitos de pacientes hansenianos em relação a população sadia, com o objetivo de elucidar os possíveis determinadores da resistência e suscetibilidade a essa enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Casuística

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de sangue e de saliva de 47 pacientes hansenianos caucásicos, não aparentados, de ambos os sexos, com idades variando entre 18 e 80 anos, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru (SP), e classificados segundo os critérios propostos no VI Congresso Internacional de Leprologia realizado em Madri, no ano de 1953⁸, em 9 virchovianos, 12 tuberculóides e 26 dimorfos. Quanto à classificação operacional, para fins de tratamento, foram agrupados em paucibacilares (12) e multibacilares (35).

Ao serem incorporados ao estudo, os pacientes foram esclarecidos sobre os propósitos dos procedimentos a serem adotados, os quais só foram realizados com plena concordância dos mesmos.

Integraram o grupo controle, para o fenótipo secretor e Lewis, 40 profissionais sadios, de ambos os sexos, do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, também esclarecidos sobre o propósito da pesquisa.

2. Coleta

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa, usando-se como anticoagulante 1 mg/ml de EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético, sal di-sódico) para identificação do fenótipo Lewis nas hemácias.

As salivas utilizadas para determinação do fenótipo secretor e Lewis, foram obtidas em recipientes limpos e secos. As amostras foram fervidas em banho-maria por 15 minutos, centrifugadas durante 2 minutos a 3000 rpm e o sobrenadantes estocado a -20°C até o momento do uso.

3. Determinação dos Grupos Sanguíneos ABO

Os fenótipos ABO foram definidos pela presença dos antígenos nas hemácias através dos soros anti-AB, anti-A e anti-B monoclonais (prova direta de Beth

Vincent)⁵ e confirmados pela presença dos anticorpos nos soros, através de hemácias-padrão dos grupos A1, A2 e B.

Os soros utilizados foram de procedência nacional (ASEM NPBI Produtos Hospitalares Ltda) e adotados tanto para a tipagem ABH no sangue quanto na saliva.

4. Determinação do Fenótipo Secretor

O fenótipo secretor foi determinado pelo teste de reação de inibição de aglutinação usando a técnica de Dunsford e Bowley¹⁰.

Duas séries de tubos de ensaio foram utilizadas, sendo que em uma delas os tubos foram identificados por 1A, 1B e 1H e na outra por 2A, 2B e 2H. Nas duas séries foram pipetadas uma gota de anti-soro diluído nos tubos A, B e H correspondentes. Tais anti-soros foram previamente titulados contra suspensões salinas de hemácias A2, B e O a 5%.

A seguir acrescentou-se uma gota da saliva a ser testada, a cada um dos tubos da série 1. Na série 2 adicionou-se uma gota de solução salina (controle negativo). Após estes tubos terem ficado em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente, acrescentou-se uma gota de suspensão a 5% de hemácias A2 no tubo A, de hemácias B nos tubos B e hemácias O nos tubos H. A leitura foi realizada após um período de 60 minutos à temperatura ambiente.

A inibição de aglutinação foi interpretada como manifestação do fenótipo secretor de substância ABH correspondentes aos anti-soros. Em oposição, a aglutinação demonstrou que o indivíduo não possui fenótipo secretor.

6. Determinação do Fenótipo Lewis

A tipagem sanguínea Lewis nos eritrócitos foi realizada pela técnica de aglutinação em tubo, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante dos anticorpos monoclonais Le^a e Le^b (ASEM NPBI Produtos Hospitalares Ltda).

O resultado foi considerado positivo quando as hemácias eram aglutinadas com os respectivos anti-soros, e negativo, na ausência de aglutinação.

Para a determinação do fenótipo Lewis na saliva foram utilizados dois tubos identificados por Le^a e Le^b. Nesses tubos foram pipetados 50 μ l de saliva. A essas amostras foram adicionadas 50 μ l de anticorpos monoclonais anti-Lewis específicos para os antígenos correspondentes Le^a e Le^b. A seguir, os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram acrescentados 50 μ l de suspensão de hemácias Lewis indicadoras, e os tubos foram mantidos em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos,

sendo posteriormente centrifugados e feita a leitura de aglutinação como recomendado pelo fabricante .

A inibição de aglutinação foi interpretada como a presença da substância Lewis correspondente.

6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados pelos testes do χ^2 e teste Z de proporções, para comparação de prevalência dos fenótipos Lewis e secretor/não secretor, adotando-se o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados expressos nas tabelas 1 e 2 mostram, respectivamente, as freqüências do grupo sangüíneo Lewis e dos fenótipos secretor e não secretor dos pacientes e dos controles.

Como o número de pacientes agrupados nas formas clínicas da doença não são uniformes, verificamos a necessidade de reuni-los em uma única amostra, para assim

compararmos as freqüências fenotípicas determinadas neste trabalho.

A comparação da distribuição do grupo sangüíneo Lewis nos pacientes favoreceu a hipótese de existir diferenças significativas entre pacientes e grupo controle ($\chi^2 = 10,46$; GL = 2; $p = 0,005$).

Analisando qual fenótipo Lewis mostrou diferença significativa quanto as proporções dos grupos hansenianos e controle, verificamos que não houve diferença estatística significativa para o fenótipo Le (a- b-) ($Z = 1,407$; $p = 0,160$). Já para o tipo Le (a+ b-) houve diferença estatística significativa entre as proporções ($Z = 2,219$; $p = 0,027$), bem como para o Le (a- b+), cuja diferença entre as proporções foram também significativas ($Z = 3,058$; $p = 0,002$), em relação aos pacientes hansenianos e grupo controle.

No que se refere à distribuição dos fenótipos secretor e não secretor, a comparação das amostras de pacientes com o controle, revelou que as diferenças entre as proporções foram significativas ($\chi^2 = 5,64$; GL = 1; $p = 0,018$).

Tabela1. Distribuição do fenótipo Lewis em hansenianos e no grupo controle

Fenótipo Lewis	Hanseniano n(%)	Controle n(%)
Le(a- b-)	21(44.7)	12(30.0)
Le(a+ b-)	12(25.5)	3(7.5)
Le(a- b+)	14(29.8)	25(62.5)
Total	47	40

$X^2 = 10,46$; GL = 2, $p = 0,005$

Tabela2: Distribuição do fenótipo secretor/não secretor nos pacientes hansenianos e grupo controle

Fenótipo secretor/não secretor	Hanseniano n(%)	Controle n(%)
Secretor	28(59.5)	34(85)
Não secretor	19(40.5)	6(15)
Total	47	40

$X^2 = 5,64$; GL = 1, $p = 0,018$

DISCUSSÃO

Apesar de já terem sido analisados quase quarenta sistemas polimórficos nas amostras de pacientes hansenianos, poucos estudos em hanseníase se desenvolveram com sistema sangüíneo Lewis".

Os antígenos do grupo sangüíneo Lewis possuem a peculiaridade de não serem expressos geneticamente na membrana do eritrócito. O trato digestivo é provavelmente o principal sítio de síntese dos glicolípideos Lewis nas células da mucosa intestinal, de onde são transportados para o plasma. Posteriormente os glicolípideos plasmáticos são adsorvidos à membrana eritrocitária caracterizando a especificidade Lewis nessas células¹⁵.

Outro dado a ser salientado é que pessoas com fenótipo Le(a+ b-) nos eritrócitos não secretam antígenos ABH, mas têm Le' em suas secreções. Os indivíduos com Le (a- b-) não têm nem Lea nem Le^b no fluido corpóreo nem na superfície das hemácias, podendo ser secretor ou não de substância ABH. As células de fenótipo Le(a- b+) pertencem às pessoas que secretam tanto antígenos ABH como substância Le" nos fluidos e secreções orgânicas.

Ao compararmos as freqüências fenotípicas do sistema Lewis, obtidas em nosso estudo (Tabela 1), observamos diferença significativa para fenótipo Le (a- b+) nos pacientes acometidos de hanseníase em relação ao grupo controle.

Sabemos que pessoas com tal fenótipo podem ter um decréscimo na disponibilidade de receptores para a bactéria *Escherichia coli*, devido às estruturas fucosiladas na superfície das células epiteliais urinárias. Esse fato sugere existir um efeito protetor contra infecção do trato urinário. Essa pesquisa foi realizada por Sheinfeld et al. em 1989²⁶, onde os autores estudaram a associação de fenótipo do grupo sangüíneo Lewis e predisposição a infecção recorrente do trato urinário em mulheres.

Provavelmente, o mesmo argumento possa ser apoiado pelos resultados encontrados no presente trabalho.

Os indivíduos não secretores de seus antígenos do grupo sangüíneo ABO, estão super dimensionados entre pacientes com alguma doença infecciosa ou portadores de microrganismos potencialmente patogênicos²⁴. Uma hipótese apresentada para explicar esse fato é de que algumas cepas de microrganismos possuem adesinas que se ligam aos antígenos Lea, os quais são expressos em quantidades maiores sobre as células epiteliais dos não secretores comparados aos secretores¹.

Com relação aos nossos dados, estes mostram diferença significativa no fenótipo Le (a+ b-) entre as proporções de pacientes avaliados em relação ao grupo controle, levando á pensar que possíveis moléculas de

adesinas do *M. leprae* poderiam ligar-se aos antígenos Lea dos indivíduos, aumentando a interação com a micobactéria.

Essa hipótese também tem sido estudada com *Candida albicans*, em que foi demonstrado na cepa 2346, através da técnica de ELISA^{9,1}, a expressão de uma adesina que se liga a fucose, o açúcar imunodominante do Lea.

As fenotipagens Lewis realizadas por Chain et al. (1997)⁷ em mulheres com candidíase vaginal recorrente, apresentam freqüência aumentada de fenótipo Lea e de ABO-Le não secretor, sendo considerado como fator de risco adicional para o desenvolvimento da enfermidade ,

No estudo feito por W. Spielmann et al. (1970)¹ em moçambicanos, foram comparados diversos grupos sangüíneos em pacientes hansenianos e não hansenianos, sendo um deles o grupo Lewis (Le^a) que apresentou diferença estatisticamente significativa, Como os autores não descreveram o método, mencionando apenas que foi utilizado teste de aglutinação, e apresentando resultados somente para Lea, julgamos ser difícil comparar esse dado com os nossos, ainda que qualquer discrepância entre esses pode ser devido a várias razões, tais como a heterogeneidade genética e as diferentes abordagens metodológicas utilizadas.

O fenótipo Le (a- b-) também tem sido associado com doença pulmonar¹⁹, associado a fator de risco nas coronariopatias²¹ e um número de achados fisiológicos, incluindo baixos níveis de ácido ascórbico gástrico e plasmático²⁵ e níveis baixos de mucina em pacientes com fibrose cística²⁴. Outros mecanismos podem estar relacionados ao processo de doença através desse fenótipo.

Entretanto, nossos dados não apoiam esses resultados para o fenótipo Le (a- b-), pois não encontramos diferença estatística significativa nos pacientes por nós estudados em comparação ao grupo controle, Por outro lado, estes achados confirmam a hipótese, por nós levantada, de que os antígenos Lea e Le' seriam respectivamente um fator determinante de suscetibilidade e de resistência à hanseníase, Além disso, esses antígenos poderiam ter importantes implicações na transmissão e infecção da hanseníase, em que, possíveis receptores do bacilo poderiam ser protegidos ou cobertos por produtos dos genes Lewis e secretor, impedindo ou facilitando a aderência do *M. leprae* na superfície das células.

Sendo assim, os dados disponíveis até o momento, tornam claro a necessidade da determinação do grupo sangüíneo Lewis como marcador de suscetibilidade na população hanseniana, podendo ser útil em estudos epidemiológicos.

SUMMARY

The distribution of Lewis blood group phenotypes in the saliva and on the erythrocytes of leprosy patients were evaluated, Forty seven patients and forty controls were analyzed by means of an agglutination and agglutination inhibition test for the presence of ABH and Lewis antigens on erythrocytes and in the saliva, The frequency of the Lewis phenotypes and secretor and non-secretor phenotypes were determined among the patients and in the control group. The results were: Le(a- b+) =29,8% (62,5%); Le(a+ b-) = 25,5% (7,5%); Le(a- b-) = 44,7% (30,0%); secretor = 59,5% (85%) and non secretor = 40,5% (15%) respectively. Statistical analysis using the χ^2

test showed significant difference between patients and controls concerning the Lewis phenotype ($\chi^2 = 10,46$; D.F. = 2; $p = 0,005$) and secretor phenotype ($\chi^2 = 5,64$; D.F. = 1; $p = 0,018$), Using the Z test significant differences were found concerning the phenotypes Le (a+ b-) and Le (a- b+) ($Z = 2,219$; $p = 0,027$ and $Z = 3,058$; $p = 0,002$). The results indicate that phenotype Le (a+ b-) is associated with susceptibility to leprosy and secretor phenotype with protection. It is speculated that the presence of Le^b in the saliva inhibits the adherence of *M. leprae* to the mucosa cells thus protecting against infection.

Uniterms: *Mycobacterium leprae*, Lewis phenotype, Secretor phenotype, Blood group, Leprosy.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALY, F.Z.M. **Oral yeast infection among patients with diabetes melitus**. Edinburgh: University of Edinburgh 1992, Tese (Doutorado)
2. ANDRESEN, P. H. The blood group system L. A new blood group L2. A case of epistasy within the blood groups, **Acta path. Microbial. Scand.**, v.25, p 728-731, 1948.
3. BEIGUELMAN, B. Sistema ABO e epidemiologia de lepra. **Rev. paul. med.**, v.65, n.2; p,80-86, 1964.
4. BEIGUELMAN, B, Leprosy and genetics - review. **Braz. J. genet.**, v,6, n.1, p,109-172, 1983.
6. BETH VINCENT, Técnicas aplicadas à imuno-hematologia eritrocitária. In, Alves de Lima, L., Callado,M, R, L., Santos, J, A, **Curso de Imuno-hematologia**. Botucatu. Faculdade de Medicina, p. 122, 1992.
8. BLACKWELL, C.C. Genetic susceptibility to infections agents, **Proc. Roy. Coll. Phys.** (Edinburgh), v19, p.129-138, 1989.
- 7,CHAIN, W, FOXMAN, B., SOHEL, JD, Association of recurrent vaginal candidiasis and secretory ABO and Lewis phenotype. **J. Infect Dis.**, v,17; n.3, p,828-30, 1997,
8. CONGRESSO NACIONAL DE LEPROLOGIA 6s, Madrid, 1953. **Memória**. Madrid, Association International de Lepra, 1953. 1344p.
9. CRITCHLEY, I, A. AND DOUGLAS, L.J, Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. **J. Gen. Microbial.**, v.133, p.637-643, 1987
- 10, DUNSFORD, I., BOWLEY, C,C, apud SALDANHA, S,G, ABO blood groups and salivary secretion of ABH substances among three racial groups in São Paulo, **Rev. Brasil. Genet.**, v,1, p.175-186, 1982,
11. ELLISON, R.C., ZHANG, Y., MYERS, R,H,, SWANSON, J.L., 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**; v,83; n.3; p,345-8, 1999.
13. FEITOSA, M.F., KRIEGER, H,, BEIGUELMAN, B. Epidemiologia genética da hanseníase e da reação de Mitsuda, **Hans. Internat.**, v.20; n,2, p,5-8, 1995,
15. GAFFNEY, R,A,, SHAEFFER, A.J., DUNCAN, J,L. Lewis blood group antigen expression by cultured normal urethral epithelial cells, **J. Urology**, v.148, p,1341-46, 1992
16. GIBBONS, R,J,, QURESHI, J,V. Selective binding of blood group-reactive salivary mucins by *Streptococcus mutans* and other oral organisms, **Infect. Immun.**, v.22, p.665-671, 1978.
17. HENRY, S., ORIOL, R., SAMUELSSON, Bo, Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes - Review. **lox Sang**, v.69, p.166-182, 1995.
18. JACOBSON, S.H,, LOMBERG, H. Over-representation of blood group non-secretors in adults with renal scarring, **Scand. J. Urol Nephrol.**, v,24, p.145-150, 1990.
19. KABAYASHI, C., SAKAMOTO, J. KITO, T,, YAMAMURA, Y,, KASHIKAVA, T., FUJITA, M,, WATANABE, T,, NAKAZATO, H,, Lewis blood group — related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma and gastric carcinoma, **Am. J. Gastroenterology**, v,88; n.6, p.919-924, 1993
20. KALLENIUS, G,, SVENSON, S,B,, MÖLLBY, R., CEDERGREN, B., HULTBERG, H., WINBERG, J, Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia coli*. **Lancet**. v.2, p.604-606, 1981.

19. KAUFFMANN, F., FRETTE, C., PHAM, Q.T., NAFISSI, S., BERTRAND, J.P., ORIOL, R. Associations of blood group-related antigens to FEV1, wheezing and asthma, *Am. J. Resp Crit Cure Med.*, v.153,, p.76-82, 1996
20. LEE, C, H,, HAGEN, M. A,, CHONG, B. H,, GRACE, C. S,, ROZEMBERG, M, C, The Lewis system and secretor status in autoimmune hemolytic anemia complicating infectious mononucleosis. *Transfusion*, v,20; n.3, p,585-588, 1980.
21. MOLLISON, P.L, Blood transfusion in clinical medicine, Oxford, *Blackwell Scientific Publications*, 1979,
22. MOURANT, A,E, A "new" human blood group antigen of frequent occurrence, *Nature, Lond*, v,158, p.237, 1946,
23. MOURANT, A.E., KOPEC, A,C,, DOMAMIEWSKA-SOBEZA, K, Oxiford University Press, *The blood groups and other polymorphic systems*, 1978.
24. ROBINSON, C.B., MARTIN, W,R., RATLIFF, J,L., HOLLAND, P.V., WU, R,, CROSS, C. E. Elevated levels of serum mucin-associated antigen in adult patients with cystic fibrosis, *Am. Rev. Respir. Dis.* v.148, p,385-89, 1993,
25. RUIZ, B., CORREA, P., FONTHAM, E.T,H,, ROOD, J. C,, MALCOM, G, T,, TORRADO, J,, PEREZ, A., RAMAKRISHNAN, T,, HUNTER, F. M, Ascorbic acid, Helicobacter pylori and Lewis phenotype among blacks and whites in New Orleans, *Cancer Letters*, v,83, p,323-29, 1994.
26. SHEINFELD, J,, SCHAEFFER, A,J., CORDONCARDO, C., ROGATKO, A., FAIR, W.R, Association of the Lewis-blood phenotype with recurrent urinary tract infections in women. *N. Engl. J. Med.*, v,320, p,773-777, 1989,
27. SPIELMANN, W,, TEIXIDOR, D., RENNINGER, W,, MATZNETTRE, T, Blutgruppen und Lepra bei moçambiquanischen Völkerschaften, *Hummangenetik*, v.10, p.304-317, 1970.
28. WIENER, A.S, Blood groups and disease, *Lancet.*, v,1., p,813-816, 1962.