

IGOR KUNZE RODRIGUES

**RELAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ANTI-SACCHAROMYCES
CEREVISIAE (ASCA) E ANTI-HELICOBACTER PYLORI EM
PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE AXIAL: UM
ESTUDO COMPARATIVO COM DOENÇA DE CROHN**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do grau
de Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração:
Investigação clínica

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Souza Neves

**FLORIANÓPOLIS
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária

Rodrigues, Igor Kunze

Relação entre anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e anti-*Helicobacter pylori* em pacientes com espondiloartrite axial: um estudo comparativo com doença de Crohn / Igor Kunze Rodrigues; orientador, Fabrício de Souza Neves. – Florianópolis, SC, 2013.

78 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Espondilite Anquilosante. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. *Helicobacter pylori*. 5. Doença de Crohn. I. Neves, Fabrício de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

IGOR KUNZE RODRIGUES

**RELAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ANTI-SACCHAROMYCES
CEREVISIAE (ASCA) E ANTI-HELICOBACTER PYLORI EM
PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE AXIAL: UM ESTUDO
COMPARATIVO COM DOENÇA DE CROHN**

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS


E aprovada em 30 de agosto de 2013, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Clínica.**



Profª Drª Tânia Silvia Fröde

Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:



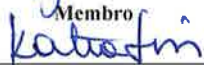
Prof. Fabrício de Souza Neves

Presidente/Orientador



Profª Drª. Monique da Silva Gevaerd

Membro



Profª Drª Kátia Lin

Membro



Profª Drª Alacoque Lorenzini Erdmann

Membro

Florianópolis, 2013

Dedico esta dissertação aos meus
queridos pais Ricardo e Valdete.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo Dr. Fabrício de Souza Neves pela presença constante em todo o processo de execução deste trabalho, pela confiança, incentivo, auxílio e ensinamentos.

Aos médicos e professores dos Serviços de Reumatologia e Gastroenterologia do HU-UFSC e da UNISUL pela cooperação na pesquisa. Aos colegas mestrandos Cristiano Novotny e Kênia Rodrigues, assim como ao aluno de graduação Leonardo Freitas pela parceria nas etapas de realização da mesma.

Aos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), em particular à professora Maria Luíza Bazzo, pela colaboração irrestrita, que foi essencial à realização deste projeto.

Ao professor Paulo Fontoura Freitas pela assessoria na análise estatística.

Aos pacientes e seus familiares que consentiram em participar deste estudo.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta dissertação.

A Deus.

“Prefiro os que me criticam, porque me corrigem, aos que me adulam, porque me corrompem.”

Santo Agostinho

“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Introdução: Espondiloartrites (SpA) são doenças musculoesqueléticas inflamatórias crônicas, possivelmente associadas à resposta do sistema imune à microbiota intestinal, bem como a ulcerações intestinais subclínicas. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma causa comum de ulcerações gastroduodenais. Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) estão associados à inflamação intestinal em pacientes com doença de Crohn (DC) e em SpA. Pesquisou-se a relação entre anti-*H. pylori* e ASCA (frequência de sorologia positiva e titulação) em pacientes com SpA axial, comparando-a em DC. **Materiais e Métodos:** Estudo observacional transversal de 91 pacientes com SpA axial, em acompanhamento no HU-UFSC, no período de janeiro a novembro de 2012. Quarenta pacientes com DC foram incluídos como grupo controle. Títulos de ASCA IgG/IgA e anti-*Helicobacter pylori* IgG foram avaliados utilizando-se ensaio imunoenzimático (ELISA). O teste do Qui-quadrado foi empregado para comparar a proporção de casos ASCA positivo entre subgrupos anti-*H. pylori* positivo e anti-*H. pylori* negativo. Para correlacionar os títulos de anti-*H. pylori* e ASCA foi realizado o coeficiente de Spearman. **Resultados:** Ocorreu uma correlação negativa significativa entre os títulos de ASCA IgG e anti-*H. pylori* IgG ($\rho = -0,563$, $p < 0,001$) e entre ASCA IgA e anti-*H. pylori* IgG ($\rho = -0,342$, $p = 0,019$) nos pacientes com SpA axial. O mesmo padrão de correlação negativa foi observado nos pacientes com DC. Sorologia anti-*H. pylori* positiva foi significativamente mais frequente em SpA axial que em pacientes com DC (52,4% versus 18,4%, $p < 0,001$), enquanto ASCA foi menos frequente em SpA axial que DC (26,8% contra 59,5%, $p = 0,001$, para ASCA IgG e 4,9% versus 43,2%, $p < 0,001$ para ASCA IgA). **Conclusão:** Observou-se uma correlação negativa entre anti-*H. pylori* e ASCA nos pacientes com SpA axial e DC. Sorologia anti-*H. pylori* positiva foi mais frequente em SpA axial que em DC. Já as sorologias ASCA foram mais frequentes em DC que em SpA axial. Propõe-se que *H. pylori* possa ser um agente ambiental capaz de reduzir a gravidade da inflamação intestinal em pacientes com SpA, porém esta hipótese requer investigação adicional.

Descritores: Espondilite Anquilosante. *Helicobacter pylori*. *Saccharomyces cerevisiae*. Doença de Crohn.

ABSTRACT

Background: Spondyloarthritis (SpA) are musculoskeletal inflammatory diseases possibly linked to immune responses to intestinal microbiota and subclinical intestinal ulcerations. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a common cause of gastroduodenal ulcerations. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) are associated with intestinal inflammation in Crohn's disease (CD) and SpA. We research the relationship between anti-*H. pylori* and ASCA to determine their frequencies and titers in axial SpA and compare them with CD patients.

Material and Methods: Cross-sectional study of 91 patients with axial SpA at a University Hospital in Florianópolis, Brazil, from January to November 2012. 40 patients with CD were included for comparative purposes. ASCA IgG and IgA and anti-*H. pylori* IgG titers were assessed by ELISA. Chi-square test was used to compare the proportion of positive ASCA patients between the positive anti-*H. pylori* IgG and negative anti-*H. pylori* IgG groups. Anti-*H. pylori* IgG and ASCA titers were correlated using the Spearman coefficient. **Results:** We noticed a significant negative correlation between ASCA IgG and anti-*H. pylori* IgG titers ($\rho = -0.563$, $p < 0.001$) and between ASCA IgA and anti-*H. pylori* IgG titers ($\rho = -0.342$, $p = 0.019$) in axial SpA patients. The same pattern of negative correlation was observed in CD patients. Anti-*H. pylori* positive serology was significantly more frequent in axial SpA than in CD patients (52.4% versus 18.4%, $p < 0.001$), while ASCA was less frequent in axial SpA than in CD group (ASCA IgG: 26.8% versus 59.5%, $p = 0.001$; ASCA IgA: 4.9% versus 43.2%, $p < 0.001$). **Conclusions:** A negative correlation between anti-*H. pylori* and ASCA was observed in axial SpA and CD. Anti-*H. pylori* positive serology was more frequent in axial SpA than in CD patients. ASCA positive serologies were more frequent in CD than in axial SpA patients. We propose that *H. pylori* negatively modulate the severity of intestinal inflammation in SpA. This hypothesis requires further investigation.

Key Words: Ankylosing spondylitis. *Helicobacter pylori*. *Saccharomyces cerevisiae*. Crohn's disease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas, clínicas, positividade de ASCA e escores de doença em pacientes com espondiloartrite axial (SpA axial) e pacientes com doença de Crohn (DC) de acordo com sorologia anti-*H. pylori* IgG..... **35**

Tabela 2 - Proporção dos resultados de sorologia anti - *H. pylori* IgG, ASCA IgG e ASCA IgA de acordo com diagnóstico (espondiloartrite axial *versus* Doença de Crohn)..... **36**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Correlação entre títulos de ASCA IgG e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com espondiloartrite axial (SpA axial) em que pelo menos um dos testes foi positivo..... **37**
- Figura 2** - Correlação entre títulos de ASCA IgA e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com espondiloartrite axial (SpA axial) em que pelo menos um dos testes foi positivo..... **38**
- Figura 3** - Correlação entre títulos de ASCA IgG e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com doença de Crohn (DC) em que pelo menos um dos testes foi positivo..... **39**
- Figura 4** - Correlação entre títulos de ASCA IgA e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com doença de Crohn (DC) em que pelo menos um dos testes foi positivo..... **40**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINH: Anti-inflamatório não hormonal

APs: Artrite psoriásica

ASAS: Sociedade internacional de avaliação das espondiloartrites (do inglês *Assessment of SpondyloArthritis international Society*)

ASCA: Anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*

ARe: Artrite reativa

BASDAI: Índice de atividade da doença espondilite anquilosante de Bath (do inglês *Bath ankylosing spondylitis disease activity index*)

BASFI: Índice funcional da espondilite anquilosante de Bath (do inglês *Bath ankylosing spondylitis functional index*)

BASMI: Índice metrológico da espondilite anquilosante de Bath (do inglês *Bath ankylosing spondylitis metrology index*)

DII: Doença inflamatória intestinal

DC: Doença de Crohn

DMARD: Drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença (do inglês *disease-modifying antirheumatic drugs*)

EA: Espondilite anquilosante

ELISA: Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*)

HLA27: Antígeno leucocitário humano B27 (do inglês *human leukocyte antigen B27*)

IgA: Imunoglobulina tipo A

IgG: Imunoglobulina tipo G

PCR: Proteína C reativa

PTI: Púrpura trombocitopênica idiopática

SpA: Espondiloartrite (do inglês *spondyloarthritis*)

TNF: Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

VHS: Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4 RESULTADOS	33
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	53
APÊNDICE A – PROTOCOLO DE COLETA	53
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO	60
ANEXOS	62
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS	62
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO	63
ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO (Versão língua inglesa)	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPONDILOARTRITES

Espondiloartrites (SpA) são um grupo de doenças inflamatórias crônicas que comprometem as articulações e as áreas de inserção de tendões e ligamentos ao periósteo (ênteses), causando dano estrutural e perda da função articular. Espondilite anquilosante (EA), artrite reativa (ARe), artrite psoriásica (APs), artrite relacionada à doença inflamatória intestinal (DII) - tanto doença de Crohn (DC) quanto colite ulcerativa – e espondiloartrite indiferenciada são as entidades clínicas que compõem este grupo¹⁻³.

A EA é apresentação mais comum deste conjunto de doenças reumáticas inter-relacionadas¹⁻⁴, sendo considerada o protótipo das SpA². Sua patogenia dependeria de predisposição genética, fortemente relacionada ao alelo HLA-B27⁵⁻⁶ (que está presente em 95% dos casos de EA na população caucasiana, em que a prevalência deste alelo na população geral é de 3% a 8%)⁷, sobre a qual atuariam fatores desencadeantes ambientais^{2,3}.

Assim como na EA, supõe-se que a patogênese das demais formas de SpA também dependeria de predisposição genética e exposição a determinados desencadeantes ambientais¹⁻⁴. De todas as SpA, é na artrite reativa que o papel de um gatilho ambiental é claramente definido, constituído pela exposição do indivíduo a determinadas infecções bacterianas⁸. Nesta entidade, semanas antes do aparecimento da artrite, os pacientes sofrem infecção por bactérias do gênero *Chlamydia* no trato genitourinário (TGU) ou *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ou *Campylobacter* no trato gastrointestinal⁸⁻¹⁰.

A relação com agentes bacterianos ainda não foi claramente estabelecida em outros tipos de SpA. Entretanto, muitos achados clínicos e experimentais sugerem que o processo inflamatório que leva à inflamação articular nas demais SpA estaria associado à microbiota do intestino¹¹⁻¹³.

A presença de inflamação intestinal crônica, de forma leve e assintomática, é descrita em dois terços dos casos de EA¹¹. Resultados de vários estudos sugerem que a ativação do sistema imune intestinal poderia levar, em determinadas condições, à geração de clones de células T, que deixariam este compartimento para se abrigar nas

articulações¹³. Estes linfócitos T ativados contribuiriam para a inflamação articular na artrite relacionada à DII, pelo reconhecimento de antígenos específicos na sinóvia inflamada¹². Entretanto, ainda não está claro qual destas reatividades da célula T induz o processo de artrite¹⁴.

Cabe destacar que, em alguns indivíduos, as bactérias são translocadas para as articulações^{2,12,14} e sua eliminação ineficaz pelas células imunes sinoviais pode resultar em inflamação articular transitória ou crônica¹². Além disso, no modelo animal do rato transgênico HLA-B27 (que desenvolve vários dos achados clínicos de SpA - artrite, doença inflamatória intestinal, uveíte), o crescimento do camundongo em estado livre de bactérias (“*germ-free*”) impede o surgimento destas manifestações¹⁵.

Essas evidências reforçariam a hipótese de que a relação inadequada entre o sistema imune e antígenos bacterianos da mucosa intestinal poderia estar envolvida na gênese das espondiloartrites.

1.2 *HELICOBACTER PYLORI*

Dentre as bactérias que colonizam o trato gastrointestinal, destaca-se o *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), uma bactéria gram-negativa flagelada encontrada na mucosa gástrica¹⁶. Este micro-organismo foi descrito, inicialmente, em 1983, após ser isolado por Warren e Marshal¹⁶⁻¹⁸, entretanto, sua denominação atual foi estabelecida apenas em 1990 por Goodwin e Armstrong¹⁹. Infecção gástrica inicial por este agente tipicamente ocorre durante a infância^{16,20-21} após ingestão oral e, a menos que seja tratada, a bactéria tende a permanecer durante toda a vida em seu hospedeiro^{16,20}.

H. pylori é o agente causador de uma das infecções mais comuns no mundo^{20,22}, com uma média global de acometimento na população de 50%²². No entanto, estima-se que a prevalência de *H. pylori* entre adultos seria maior que 80% em muitos países em desenvolvimento, em comparação a 20% e 50% em nações desenvolvidas²⁰. A infecção por *H. pylori* é considerada a maior causa de doenças gástricas tais como: gastrite crônica, doença ulcerosa péptica e neoplasias gástricas malignas^{16,20,23}. Apesar disso, a maioria dos pacientes acometidos pelo *H. pylori* não manifesta nenhuma destas complicações clínicas¹⁶.

Particularmente em pacientes com SpA, trabalho de Otasevic *et al.*²⁴ evidenciou a presença de anticorpos contra bactérias gram-negativas em 93,3% desta população, em confrontação a 66,7% em um

grupo controle ($p < 0,05$). Neste mesmo estudo, revelou-se que *H. pylori* é a bactéria com o maior percentual de positividade no grupo de SpA (73,3%), comparado a 26,7% com anti-*H. pylori* positivo no grupo controle ($p < 0,05$)²⁴.

1.3 ANTICORPOS *ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (ASCA)

O sistema imune da mucosa intestinal pode ser ativado devido ao aumento da permeabilidade gastrointestinal. Um dos fenômenos associados a esta ativação é o aparecimento de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Estes anticorpos, descritos em 1988 por Main *et al.* em pacientes com doença de Crohn (DC), atuam contra epitopos oligoamnosídicos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (fungo utilizado como composto alimentar nas indústrias panificadoras e cervejeira)²⁵.

Apesar de inicialmente descrito na DC, onde está presente em até 69% dos pacientes²⁶, ASCA também é observado em outras doenças intestinais, como na doença celíaca, em que se manifesta em cerca de 40% dos casos²⁷. Nestes pacientes, foi relatada uma redução dos níveis deste anticorpo com o controle da doença (obtido mediante uma dieta livre de glúten)²⁷. A presença de ASCA também foi constatada em SpA, outra doença caracteristicamente associada à inflamação intestinal. Estudos com EA demonstraram a presença deste anticorpo em cerca de 20% dos casos²⁸⁻²⁹.

Na patogênese da DC, é postulado que o evento inicial seria a ruptura da integridade da mucosa intestinal, o que promove aumento da permeabilidade a macromoléculas. Este fato gera um aumento da exposição do sistema imune a antígenos oriundos de alimentos e de micro-organismos, com consequente produção de anticorpos (incluindo ASCA) pelas células de defesa^{13,30,31}. Este fenômeno levaria à perda de tolerância à microbiota intestinal normal naqueles indivíduos com suscetibilidade genética, provocando a DII autoimune¹³. Assim, um aumento da permeabilidade intestinal poderia ser a base da presença de ASCA^{30,31}.

Mecanismo similar pode ser postulado para explicar a patogênese da SpA. Alguns autores até mesmo sugerem que a DII e SpA possam ser diferentes fenótipos de uma mesma doença autoimune de base. A origem da SpA também estaria relacionada à intolerância à microbiota

intestinal, mas a doença se expressaria através de característica diferente da DC, devido a influências genéticas ou ambientais ainda desconhecidas¹³.

Apesar disso, estudos relacionando associação de ASCA com mecanismos de permeabilidade intestinal são controversos. Vermeire *et al.*³² afirmam que ASCA é um marcador de aumento de permeabilidade intestinal em populações com DC. Já trabalhos de Benjamim *et al.*³³ e Harrer *et al.*³¹ não demonstraram associação entre alteração da permeabilidade intestinal e ASCA em pacientes com DC, sugerindo um mecanismo próprio para o desenvolvimento do aumento dos níveis séricos de ASCA.

1.4 ASCA NAS ESPONDILOARTRITES

Espandiloartrites (SpA) são também doenças com inflamação intestinal aumentada e sua relação com a presença de ASCA já foi evidenciada em alguns estudos^{28,34-37}.

Trabalho de Andretta *et al.* (coorte de 70 pacientes com SpA) encontrou ASCA IgA positivo em 18,6% dos casos, no grupo com SpA e 5,2% no grupo controle ($p = 0,031$)³⁶. Neste estudo não se estabeleceu uma relação de positividade de ASCA IgA com atividade da doença - medida por proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), e índice BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*) - , presença de uveíte ou artrite periférica nem com estado funcional medido por BASFI (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*).

Já estudos de Aydin *et al.* e Hoffmann *et al.* demonstraram que os níveis de ASCA IgA eram maiores em EA e SpA indiferenciada^{28,35}, e Aydin relatou que estes níveis eram mais elevados em pacientes com danos articulares radiológicos mais severos²⁸.

1.5 *HELICOBACTER PYLORI* E PERMEABILIDADE INTESTINAL

H. pylori é uma causa comum de ulcerações gástricas e já se observou que sua presença em pacientes com SpA aumenta a permeabilidade gastrointestinal, que volta ao normal após sua erradicação³⁸. Este fato sugere a ideia de que *H. pylori*, sendo causador

de aumento de permeabilidade gastrointestinal, possa estar relacionado a mecanismos de patogênese das SpA.

Por outro lado, diferentes estudos revelaram que a frequência de anticorpos anti-*H. pylori* é menor em pacientes com DII em comparação a controles saudáveis: 27,5% versus 41,7%³⁹ e 24% contra 37%⁴⁰. Estes autores sugeriram um papel protetor da infecção por *H. pylori* contra o aparecimento da DII, concordante com a “hipótese da higiene”, segundo a qual a exposição a determinadas bactérias (*H. pylori*, no caso), ao longo da vida, modularia a atividade imunológica, reduzindo a incidência de autoimunidade³⁹.

Sendo assim, questionamos se a presença de *H. pylori* poderia influenciar no aparecimento de ASCA e fenômenos imunomediados (que ocorreriam a partir de alteração da permeabilidade intestinal) nos pacientes com SpA axial.

Até o presente momento, a associação entre a positividade de sorologia anti-*H. pylori* e ASCA ou a correlação entre os títulos destas sorologias ainda não foi investigada em pacientes com SpA, ou mesmo em outras doenças associadas a ASCA (como a DC), o que confere originalidade ao trabalho em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Principais

1. Determinar a frequência de sorologia ASCA positiva em pacientes com espondiloartrite axial (SpA axial) de acordo com seu estado sorológico anti-*H. pylori* (i.e., anti-*H. pylori* IgG positivo *versus* anti-*H. pylori* IgG negativo).

2. Correlacionar os títulos de ASCA com os títulos de anti-*H. pylori* nos pacientes com SpA axial.

3. Estudar a relação entre sorologias ASCA e anti-*H. pylori* em uma amostra de pacientes com doença de Crohn (DC) e comparar a proporção de sorologias anti-*H. pylori* e ASCA positivas entre os pacientes com SpA axial e DC.

2.2 Secundário

Verificar a frequência de manifestações clínicas da SpA de acordo com o estado sorológico anti-*H. pylori* dos pacientes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo do tipo observacional, analítico, de delineamento transversal.

3.2 População do estudo

Foram incluídos pacientes com diagnóstico estabelecido de SpA axial, definido de acordo com os critérios de classificação do *Assessment of SpondyloArthritis International Society* (ASAS) para SpA axial⁴¹⁻⁴², em acompanhamento no ambulatório de reumatologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Tiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), situado em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, no período de janeiro a novembro de 2012, em amostragem consecutiva.

Foram excluídos deste estudo pacientes com diagnóstico de ARE (definida através de uma história de uretrite ou doença diarréica previamente ao desenvolvimento de manifestações articulares) e aqueles com diagnóstico de DII ou doença celíaca. Estes critérios de exclusão foram estabelecidos no intuito de não incluir pacientes com SpA axial sabidamente relacionadas a outros desencadeadores bacterianos já conhecidos (i.e., ARE), e aqueles com doença intestinal relacionada ao ASCA (i.e., DII e doença celíaca). Também não foram considerados aqueles pacientes que se recusaram a participar da referida pesquisa.

Uma amostra consecutiva de pacientes com diagnóstico definido de doença de Crohn (um subtipo de DII) foi utilizada como grupo de comparação. Estes pacientes eram provenientes do ambulatório de gastroenterologia do HU-UFSC e de uma clínica privada de gastroenterologia, ambos situados em Florianópolis, Santa Catarina. Todos os pacientes com DC tiveram seu diagnóstico estabelecido através de biópsias obtidas por colonoscopia. Pacientes com DC que apresentassem manifestações músculoesqueléticas do tipo axial, conforme definido por critérios da ASAS⁴¹⁻⁴² foram excluídos deste grupo.

3.3 Hipóteses

Para o cálculo do tamanho da amostra, considerou-se como hipótese do estudo que, dentre os pacientes portadores de SpA axial, a frequência da sorologia ASCA positiva (ASCA +) é diferente (maior ou menor) no grupo anti-*H. pylori* positivo (anti-*H. pylori* +), em comparação ao grupo anti-*H. pylori* negativo (anti-*H. pylori* -).

3.4 Cálculo do tamanho da amostra

De acordo com estudo realizado por Aydin *et al.*, a prevalência de sorologia ASCA + foi de 20% entre pacientes com SpA²⁸. Logo, para calcular o tamanho necessário da amostra, foi estimado que, no grupo SpA axial anti-*H. pylori* IgG +, a frequência de sorologia ASCA + poderia estar na faixa de 30%. Já para o grupo SpA axial anti-*H. pylori* IgG -, supôs-se que a ocorrência de sorologia ASCA + poderia ser similar àquela de controles saudáveis (geralmente menos de 5%). Para alcançar um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), com poder estatístico de 80%, 33 pacientes foram requeridos em cada grupo para determinar se a presença da sorologia anti-*H. pylori* IgG + modifica a frequência de ASCA em 30 pontos percentuais.

3.5 Coleta de dados clínicos

Os pacientes com SpA axial incluídos neste estudo foram entrevistados pelos pesquisadores, que aplicaram o protocolo de pesquisa (Apêndice A). Seus prontuários foram também revisados para determinação de suas características demográficas e clínicas.

As características clínicas avaliadas das SpA axiais foram: artrites periféricas; uveíte e manifestações cutâneas. Os critérios usados para identificar artrite periférica foram presença de uma história ou exame físico que evidencie dor ou edema articular em joelho, tornozelos, cotovelos, punhos, mãos e pés. Para detectar uveíte, considerou-se a presença de uma história típica recorrente de olho vermelho doloroso ou um diagnóstico oftalmológico da referida enfermidade. Foram consideradas manifestações cutâneas de SpA axial a presença de exantema psoriasiforme caracterizado pela história ou exame físico.

Foram utilizados os instrumentos BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*), que avalia a atividade da doença;

BASFI (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*), que analisa a capacidade funcional do paciente; e BASMI (*Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index*), que mede a mobilidade do esqueleto axial destes enfermos. Todos estes testes foram realizados em versão adaptada para a língua portuguesa do Brasil ⁴³.

3.6 Exames laboratoriais

Após realização da entrevista, os pacientes foram conduzidos ao Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC. Amostra de sangue dos mesmos foi obtida por punção venosa periférica e armazenada em tubo sem anticoagulante. Após período de 30 minutos, as amostras foram submetidas à centrifugação (3.000 r.p.m., durante 10 minutos) para a separação do soro, que foi congelado em alíquotas a - 20°C para armazenamento, até a realização dos ensaios laboratoriais de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os seguintes kits de ELISA, para detecção de anticorpos ASCA IgG e IgA e anticorpos anti-*H. pylori* IgG foram utilizados:

- Teste ELISA ASCA IgG/IgA denominado ORG 545@ ASCA IgG/IgA da marca Orgentec Diagnostika GmbH (Mainz, Alemanha). Valor de referência para IgG/IgA utilizado de 10 U/ml (< 10 normal; ≥ 10 positivo). Desempenho do teste: precisão (reprodução) intra-teste 4,3 a 8,8% e inter-teste 3,8 a 7,5% para IgG; precisão intra-teste 5,2-6,1% e inter-teste 6,0 a 6,6% para IgA.

- Teste de ELISA *Helicobacter pylori* IgG denominado Ridascreen® *Helicobacter* IgG da marca R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemanha). Valor de referência para IgG utilizado de 16 U/ml (< 10 negativo; 10 a 16 duvidoso; ≥ 16 positivo). Desempenho do teste: precisão intra-teste 3,0 a 4,8% e inter-teste 4,4 a 9,9% para IgG.

3.7 Análise Estatística

Para comparar proporções das variáveis categóricas “ASCA IgG +”, “ASCA IgA +” e “presença de manifestações clínicas”, de acordo com o grupo “anti-*H. pylori* IgG +” versus “anti-*H. pylori* IgG -”, foi aplicado o teste estatístico de qui-quadrado (ou exato de Fisher, quando indicado). Para comparar variáveis contínuas entre estes grupos, empregou-se o teste *t* de Student. Foram excluídos desta análise os

pacientes com títulos duvidosos de anti-*H. pylori* IgG. Esta avaliação foi realizada tanto no grupo SpA axial quanto no grupo DC.

Para avaliar a correlação dos títulos de “anti-*H. pylori* IgG” e “ASCA”, foi utilizado o coeficiente de Spearman, devido à distribuição não-paramétrica dos resultados. Os pacientes que obtiveram ambos os testes sorológicos negativos foram suprimidos desta análise. Esta avaliação foi realizada tanto no grupo SpA axial quanto no grupo DC.

O teste *t* de Student foi empregado para comparar a média dos resultados de “BASDAI”, “BASFI” e “BASMI” entre os grupos “anti-*H.pylori* IgG +” e “anti-*H. pylori* IgG -”, em virtude da distribuição normal dos resultados. Este estudo foi realizado no grupo SpA axial.

Para comparar as proporções de variáveis categóricas “ASCA IgG +”, “ASCA IgA +” e “anti-*H. pylori* IgG +” entre os grupos SpA axial e DC utilizou-se o teste de qui-quadrado.

A distribuição dos resultados foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Todos os testes foram bi-caudais e todas as análises foram realizadas com o software para Windows SPSS® 17.0 (Chicago, IL, EUA).

3.8 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH-UFSC). O protocolo de pesquisa (Processo 2395 do CEPSH-HU, aprovado em 13 de dezembro de 2011, folha de rosto 479992 do CONEP), obedece às determinações da Declaração de Helsinki (1995), da Associação Médica Mundial (revisado em Edinburgo, 2000). O termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B) foi apresentado, lido e assinado por todos os pacientes incluídos no estudo, que tiveram seu anonimato preservado.

4 RESULTADOS

Da amostra de 93 pacientes com diagnóstico de SpA axial, elegíveis, inicialmente, ao estudo, 2 se recusaram a participar e foram excluídos. Não havia casos, previamente diagnosticados, de ARE, DII ou doença celíaca. Assim, 91 pacientes com SpA axial foram incluídos e completaram a pesquisa.

Dos 91 pacientes com SpA axial testados, 43 (47,3%) apresentaram anti-*H. pylori* IgG + (titulação maior que 16 U/ml), e 39 (42,8%) obtiveram anti-*H. pylori* IgG - (titulação menor que 10 U/ml). Nove pacientes (9,9%) alcançaram títulos indeterminados (duvidosos) de anti-*H. pylori* IgG (titulação entre 10 e 16 U/ml) e foram excluídos das análises seguintes. Assim, restaram 82 pacientes, cujas características demográficas e clínicas de base são expostas na Tabela 1.

Destes 82 pacientes com SpA axial, 22 (26,8%) apresentavam sorologia ASCA IgG +, enquanto que 4 (4,9%) obtiveram ASCA IgA+. A Tabela 1 também mostra os resultados alcançados para a frequência de sorologia ASCA +, a presença de artrites periféricas, de manifestações extra-articulares de SpA (i.e, uveíte e exantema psoriásico) e as médias dos índices BASDAI, BASFI e BASMI em relação ao estado sorológico anti-*H. pylori* IgG. Os dados indicam que há uma menor frequência de sorologia ASCA + no grupo anti-*H. pylori* IgG + do que no grupo anti-*H. pylori* IgG - (20,9% versus 33,3%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,224$). A frequência de artrites periféricas, manifestações extra-articulares e os índices BASDAI, BASFI e BASMI foram bastante similares entre os 2 grupos.

Quarenta pacientes com diagnóstico de DC foram incluídos como um grupo de comparação. Sete (17,5%) dos pacientes com DC apresentavam anti-*H. pylori* IgG + e 31 deles (77,5%) obtiveram anti-*H. pylori* IgG -. Dois alcançaram títulos duvidosos de anti-*H. pylori* IgG e foram excluídos da análise a seguir. Um paciente com DC (2,5%) não retornou para a coleta de soro. A tabela 1 revela as características demográficas de base e a frequência de sorologias ASCA +, nos 37 pacientes restantes com DC, de acordo com estado sorológico anti-*H. pylori* IgG. Embora tenha sido observada uma menor frequência de ASCA+ no grupo anti-*H. pylori* IgG +, uma significância estatística também não foi alcançada, assim como no grupo de SpA axial.

A proporção de pacientes anti-*H. pylori* IgG +, no grupo com DC, foi significativamente menor do que no grupo com SpA axial (18,4% versus 52,4%, $p < 0,001$). Inversamente, as proporções de ASCA IgG + e ASCA IgA + foram significativamente maiores no grupo com DC em comparação ao grupo com SpA axial (59,5% versus 26,8%, $p = 0,001$ e 43,2% contra 4,9%, $p < 0,001$, respectivamente). Estes dados são apresentados na tabela 2.

A Figura 1 mostra o gráfico de correlação entre os “títulos de ASCA IgG” e os “títulos de anti-*H. pylori* IgG” nos pacientes com SpA axial. Para esta análise, os pacientes cujos testes sorológicos resultaram negativos para ambos os anticorpos foram excluídos. Entre os 58 remanescentes, foi observada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os títulos de ASCA IgG e os títulos de anti-*H. pylori* IgG ($\rho = -0,563$, $p < 0,001$).

A Figura 2 apresenta o gráfico de correlação entre os “títulos de ASCA IgA” e os “títulos de anti-*H. pylori* IgG” nos pacientes com SpA axial. Foram excluídos desta avaliação os pacientes com testes sorológicos negativos para ambos os anticorpos. Entre os 47 pesquisados restantes, também foi verificada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os títulos de ASCA IgA e os títulos de anti-*H. pylori* IgG ($\rho = -0,342$, $p = 0,019$).

A Figura 3 revela o gráfico de correlação entre os “títulos de ASCA IgG” e os “títulos de anti-*H. pylori* IgG” em pacientes com DC. Suprimiu-se deste estudo pacientes com testes sorológicos duplamente negativos para ambos os anticorpos, restando 29 avaliados. Do mesmo modo que no grupo com SpA axial, foi identificada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os títulos de ASCA IgG e os títulos de anti-*H. pylori* IgG ($\rho = -0,527$, $p = 0,003$).

A Figura 4 expõe o gráfico de correlação entre os “títulos de ASCA IgA” e os “títulos de anti-*H. pylori* IgG” naqueles pacientes com DC. Para esta avaliação, os pacientes cujos testes sorológicos resultaram negativos para ambos os anticorpos foram excluídos, restando 22 pesquisados. Assim como no grupo com SpA axial, também foi evidenciada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os títulos de ASCA IgA e os títulos de anti-*H. pylori* IgG ($\rho = -0,701$, $p < 0,001$).

Tabela 1. Distribuição das características demográficas, clínicas, positividade de ASCA e escores de doença em pacientes com espondiloartrite axial (SpA axial) e pacientes com doença de Crohn (DC) de acordo com sorologia anti-*H. pylori* IgG

	Anti- <i>H. pylori</i> IgG		Total	Anti- <i>H. pylori</i> IgG		Total
	Positivo	Negativo		Positivo	Duvidoso	
SpA axial, n (% do total)	43 (47,3%)	39 (42,8%)	82 (90,1%)	9 (9,9%)	91 (100%)	
	n = 82 (100%)					
	Anti- <i>H. pylori</i> IgG		Total (n=82)			<i>p</i>
	Positivo (n=43)	Negativo (n=39)	43,2 ± 12,2	43,2 ± 12,2	0,288	
Idade, anos ± D.P.	44,6 ± 12,5	41,7 ± 11,9	62 (75,6%)	26 (66,4%)	0,200	
Gênero masculino, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	35 (81,4%)	27 (69,2%)	26,6 ± 4,2	8,9 ± 6,5	0,430	
IMC, Kg/m ² ± D.P.	26,9 ± 5,0	26,1 ± 3,0	8,7 ± 6,3	8,9 ± 6,5	0,604	
Tempo desde o diagnóstico, anos ± D.P.	9,1 ± 6,8	8,7 ± 6,3	26 (66,7%)	6 (15,4%)	0,560	
Agente anti-TNF, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	26 (60,5%)	26 (66,7%)	14 (17,1%)	37 (45,1%)	0,699	
DMARD, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	8 (18,6%)	6 (15,4%)	16 (41,0%)	37 (45,1%)	0,478	
AINH, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	21 (48,8%)	16 (41,0%)	13 (33,3%)	22 (26,8%)	0,224	
ASCA IgG+, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	9 (20,9%)	13 (33,3%)	3 (7,7%)	4 (4,9%)	0,342	
ASCA IgA+, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	1 (2,3%)	3 (7,7%)	25 (64,1%)	54 (65,9%)	0,750	
Artrite periférica, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	29 (67,4%)	25 (64,1%)	20 (51,3%)	44 (53,7%)	0,681	
Uveíte, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	24 (55,8%)	20 (51,3%)	11 (28,2%)	20 (24,4%)	0,444	
Raspsoriásico, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	9 (20,9%)	11 (28,2%)	4,2 ± 3,0	4,3 ± 2,9	0,775	
BASDAI, média ± D.P.	4,4 ± 2,8	4,2 ± 3,0	4,1 ± 2,5	4,4 ± 2,8	0,310	
BASFI, média ± D.P.	4,1 ± 2,5	4,7 ± 3,0	2,8 ± 2,3	3,1 ± 2,5	0,570	
BASMI, média ± D.P.	2,8 ± 2,3	3,1 ± 2,5				
	n = 38 (100%)					
	Anti- <i>H. pylori</i> IgG		Total	Anti- <i>H. pylori</i> IgG		Total
Doença de Crohn, n (% do total)	7 (17,5%)	31 (77,5%)	38 (95,0%)	2 (5,0%)	40 (100%)	
	n = 38 (100%)					
	Anti- <i>H. pylori</i> IgG		Total (n=38)			<i>p</i>
	Positivo (n=7)	Negativo (n=31)	36,2 ± 13,9	36,2 ± 13,9	0,123	
Idade, anos ± D.P.	44,4 ± 13,8	36,0 ± 12,6	26 (68,4%)	26 (68,4%)	0,389	
Gênero masculino, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	6 (85,7%)	20 (64,5%)	18 (58,1%)	22 (57,9%)	1,000	
Agente anti-TNF, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	4 (57,1%)	18 (58,1%)	13 (41,9%)	16 (42,1%)	1,000	
Imunossupr., n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	3 (42,9%)	13 (41,9%)	Total (n=37)	Total (n=37)	<i>p</i>	
ASCA IgG+, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	3 (42,9%)	19 (63,3%)	22 (59,5%)	22 (59,5%)	0,408	
ASCA IgA+, n (%) no grupo sorológico <i>H.pylori</i>	2 (28,6%)	14 (46,7%)	16 (43,2%)	16 (43,2%)	0,674	

SpA, espondiloartrite; *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; ASCA, antígeno anti-Saccharomyces cerevisiae; IMC, índice de massa corporal; TNF, Fator de Necrose Tumoral; DMARD, drogas anti-reumáticas; AINH, artrite inflamatória não hormonal; BASDAI, score Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, score Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASMI, score Bath Ankylosing Spondylitis Metabolic Index; Imunossupr., acetopirina e/ou metotrexato.

Tabela 2. Proporção de sorologias anti - *H. pylori* IgG, ASCA IgG e ASCA IgA de acordo com diagnóstico (espondiloartrite axial versus doença de Crohn)

Grupo	Anti - <i>H. pylori</i> IgG		
	Positivo	Negativo	Total
SpA axial	43 (52,4%)	39 (47,6%)	82 (100%)
DC	7 (18,4%)	31 (81,6%)	38 (100%)
	p < 0,001		

Grupo	ASCA IgG		
	Positivo	Negativo	Total
SpA axial	22 (26,8%)	60 (73,2%)	82 (100%)
DC	22 (59,5%)	15 (40,5%)	37 (100%)
	p = 0,001		

Grupo	ASCA IgA		
	Positivo	Negativo	Total
SpA axial	4 (4,9%)	78 (95,1%)	82 (100%)
DC	16 (43,2%)	21 (56,8%)	37 (100%)
	p < 0,001		

SpA, espondiloartrite ; DC, doença de Crohn; p de acordo com teste Qui-quadrado

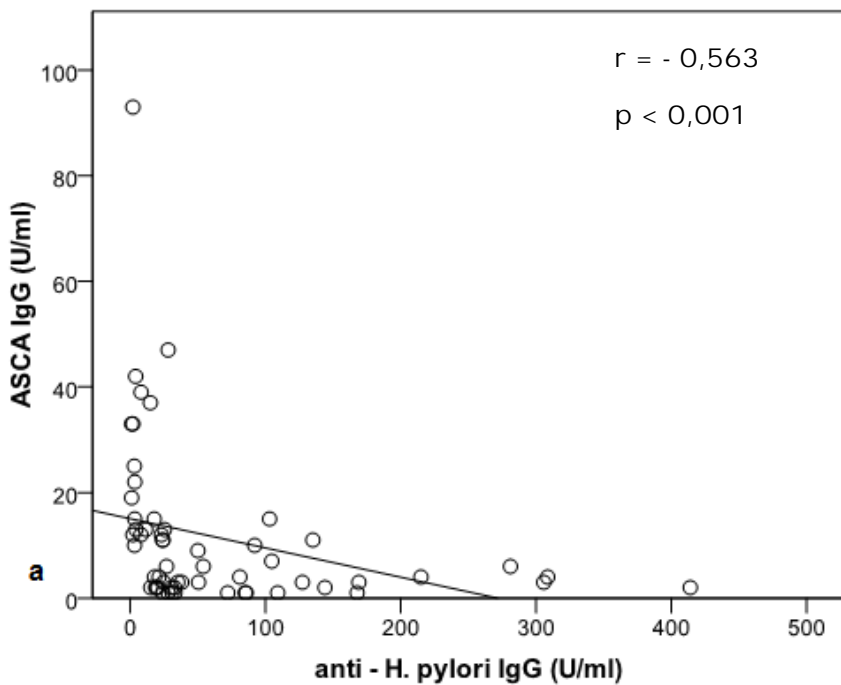


Figura 1. Correlação entre títulos de ASCA IgG e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com espondiloartrite axial em que pelo menos um dos testes foi positivo (n= 58)

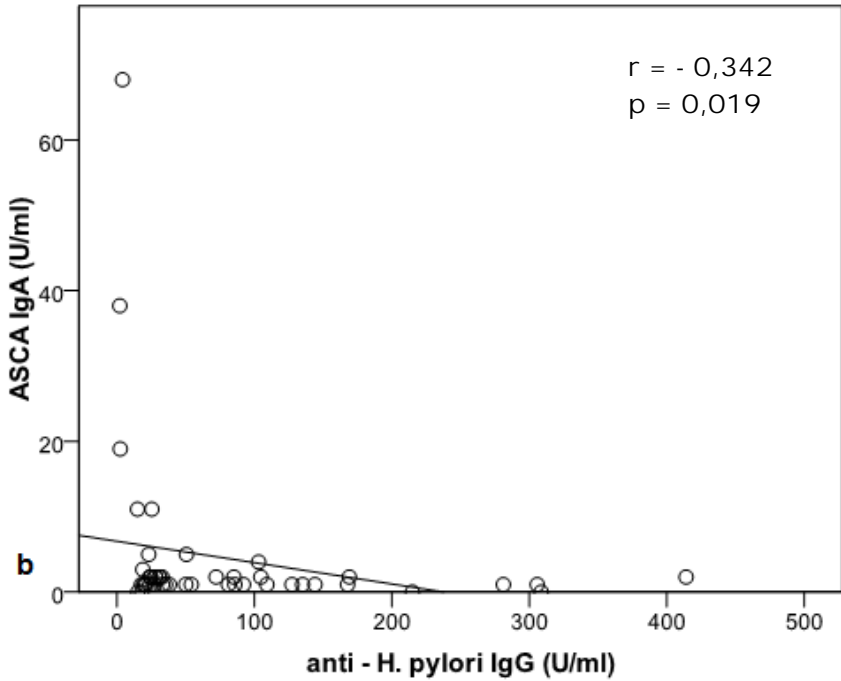


Figura 2. Correlação entre títulos de ASCA IgA e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com espondiloartrite axial em que pelo menos um dos testes foi positivo (n= 47). ASCA, anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*.

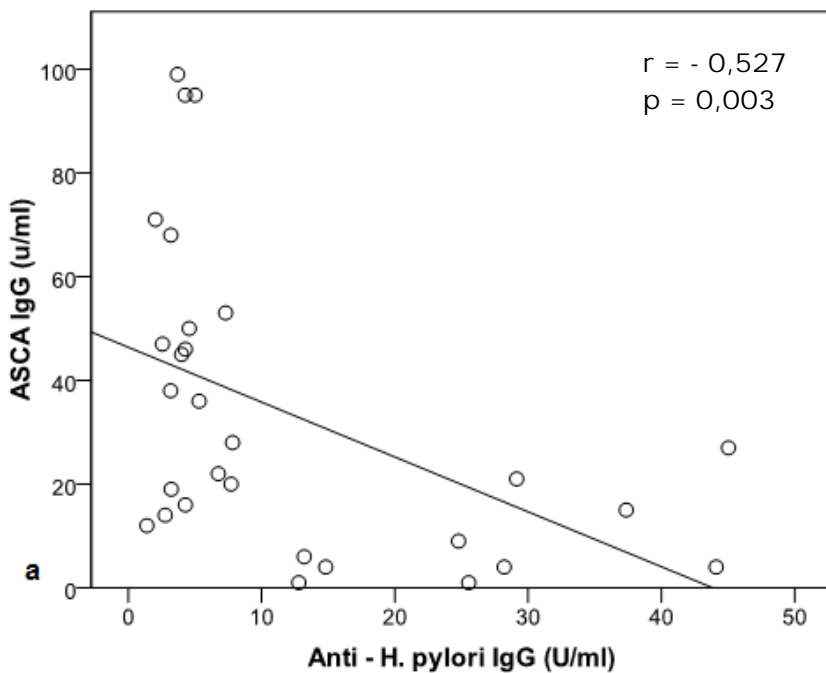


Figura 3. Correlação entre títulos de ASCA IgG e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com doença de Crohn em que pelo menos um dos testes foi positivo (n = 29)

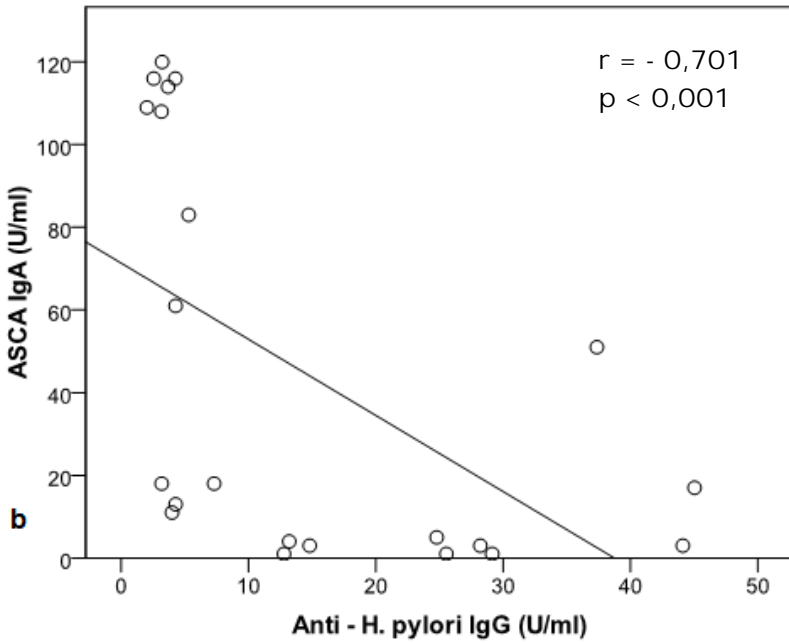


Figura 4. Correlação entre títulos de ASCA IgA e anti-*H. pylori* IgG em pacientes com doença de Crohn em que pelo menos um dos testes foi positivo (n=22). ASCA, anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*.

5 DISCUSSÃO

O papel de infecções bacterianas a distância como gatilho para doenças musculoesqueléticas está claramente definida na ARE, um subgrupo de SpA ⁴⁴. O debate a respeito do potencial papel de bactérias na fisiopatologia de outras SpA, especialmente na EA, é controverso. *H. pylori* representa a mais comum infecção gastrointestinal e que caracteristicamente se comporta com cronicidade. Trata-se de uma espécie de bactéria que cursa com inflamação, ulceração e maior permeabilidade da mucosa gastroduodenal ¹⁶. Estudo de Melby *et al.* detectou os anticorpos anti-*H. pylori* no soro de pacientes com ARE, sugerindo que esta bactéria possa ser incluída na lista de possíveis gatilhos para SpA ⁴⁵. Estas características nos levaram a formular a hipótese de que *H. pylori* poderia ser um fator associado à fisiopatologia das SpA.

Tinha-se a intenção de avaliar a relação entre títulos de sorologia anti-*H. pylori* e ASCA pelo fato deste último ser um marcador de doença intestinal (bem como também se apresentar nas SpA). A associação entre sorologias de *H. pylori* e ASCA não havia sido investigada previamente em nenhuma doença associada ao ASCA (i.e., doença de Crohn, doença celíaca ou SpA) até o momento de realização deste estudo.

Já é conhecido que *H. pylori* pode causar fenômenos patológicos de natureza imunológica fora do trato gastrointestinal. Estudos demonstraram melhora da contagem plaquetária em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), que trataram a infecção por *H. pylori* ⁴⁶⁻⁴⁷. Por este motivo, segundo os consensos mais recentes, haveria a indicação, inclusive, de tratamento contra o *H. pylori* em pacientes com PTI ²². Publicações de Otasevic *et al.*, em outro modelo de doença, mostram a relação desta bactéria com uveíte anterior e SpA ^{18,24}.

Em nosso estudo trabalhamos com testes de hipótese bilaterais, porém a expectativa inicial seria uma correlação positiva entre a sorologia anti-*H. pylori* e as características da SpA, incluindo os títulos de ASCA. Entretanto, com alguma surpresa, observamos uma correlação negativa entre sorologias anti-*H. pylori* IgG e ASCA, e isto ocorreu em ambas as subclasses de anticorpos (IgG e IgA). Importante destacar que a mesma correlação negativa também foi encontrada em pacientes com DC.

Todavia, apesar de contrária à nossa hipótese inicial, esta correlação negativa é coerente com resultados previamente relatados na literatura médica. Diferentes estudos demonstraram que a frequência de anti-*H. pylori* é menor em pacientes com DII em comparação a controles saudáveis (27,5% contra 41,7%³⁹ e 24% versus 37%⁴⁰). Estes autores sugerem um papel protetor da infecção por *H. pylori*, que se contraporaria à manifestação de DII. A exposição a determinadas espécies de bactérias (*H. pylori* neste caso) modularia a atividade imune, reduzindo a incidência de inflamação intestinal, consistente com a “hipótese da higiene”³⁹. A associação negativa também é observada entre *H. pylori* e a ocorrência de asma, com o aumento da prevalência em asma e alergia com o declínio de taxas de *H. pylori*⁴⁸.

Estudo experimental também relatou uma correlação negativa entre *H. pylori* e mecanismos inflamatórios de doenças. Infecção por *H. pylori* protegeu eficientemente camundongos da hiperresponsividade das vias aéreas e da inflamação broncoalveolar induzidas por alérgeno, devido à indução de linfócitos T reguladores⁴⁹. Estes dados sugerem que a infecção por *H. pylori* pode, de fato, desencadear fenômenos de regulação da resposta imunológica, indutores de tolerância, fato condizente com os menores níveis de ASCA encontrados nos pacientes com *H. pylori* em nosso estudo (tanto em pacientes com SpA axial quanto em pacientes com DC).

Juntamente com outros anticorpos contra epitopos de micro-organismos intestinais (anti-OmpC e anti-CBir1), ASCA é um marcador de pior prognóstico em pacientes com DC. Estes anticorpos estão associados às formas fistulizante, estenosante e perfurativa da doença⁵⁰. Pacientes com DII, que apresentam ASCA, desenvolvem maior probabilidade de progredir com necessidade de cirurgia²⁶.

Acreditamos que devam ser considerados os seguintes dados de informação em nossa análise: 1) ASCA é um marcador de maior gravidade da inflamação intestinal em pacientes com DC^{50,26}. 2) Inflamação intestinal crônica é também uma característica de SpA, entretanto apresenta-se geralmente de forma leve e sem relevância clínica¹¹. Supõe-se que ASCA seja um marcador de acometimento intestinal também em SpA. 3) Foi encontrado em nosso estudo que a sorologia anti-*H.pylori* + é significativamente menos frequente em DC que em SpA axial, enquanto que a sorologia ASCA é mais comum em DC que em SpA axial. 4) Observou-se em nosso estudo uma correlação negativa (inversa) entre títulos de ASCA e anti-*H.pylori* IgG em SpA

axial, que foi também demonstrada no grupo de pacientes com DC. 5) Infecção por *H. pylori* geralmente ocorre na infância^{16, 20}, sendo provavelmente precedente ao início da SpA. Sendo assim, e tomando-se como princípio que SpA e DII são provavelmente condições relacionadas em sua etiopatogênese, poder-se-ia formular a hipótese de que *H. pylori* seria um agente ambiental que modula o fenótipo de um indivíduo com SpA, protegendo-o contra o aparecimento de manifestações inflamatórias intestinais clinicamente importantes (que aparecem na DC, em que encontramos taxas mais baixas de infecção por *H. pylori*).

Nosso estudo não foi delineado para confirmar esta hipótese, já que suas conclusões são limitadas em virtude de seu desenho transversal e do pequeno número de casos. Com este tamanho de amostra, a diferença de frequência de ASCA+ não foi estatisticamente significativa entre grupos anti-*H. pylori* IgG + e anti-*H. pylori* IgG - nos pacientes com SpA axial (20,9% versus 33,3%). Estudos com populações maiores são necessários para confirmar esta diferença (próximo de 12 pontos percentuais). Do mesmo modo, mister se faz de estudos prospectivos e mecanísticos para investigar se *H. pylori* realmente é um modulador negativo para inflamação intestinal, ou se esta é uma associação fortuita, e outro agente da microbiota intestinal poderia ser o verdadeiro modulador.

Além disso, nós também não podemos afirmar se *H. pylori* seria um agente causador ou protetor para a incidência de SpA. Este estudo apenas demonstra a relação entre infecção por *H. pylori* e títulos de ASCA (supostamente marcador de acometimento intestinal) em pacientes com diagnóstico prévio de SpA axial (i.e., investigamos uma característica fenotípica de SpA e não a incidência de SpA, de acordo com o estado sorológico anti-*H. pylori*).

Deve-se notar, também, que nesta pesquisa foram usados testes sorológicos como marcadores para inflamação intestinal e infecção por *H. pylori*. Há vários exames na rotina clínica que podem ser adotados para realizar o diagnóstico de *H. pylori*. A detecção de anticorpos anti-*H. pylori* IgG por sorologia ELISA foi o método escolhido para este estudo devido a sua disponibilidade, baixo custo, facilidade de execução e por se tratar de um método menos invasivo, sem grandes riscos ao paciente. Vale destacar, ainda, que a sorologia é o único teste que não é afetado por mudanças locais no estômago que poderiam levar à baixa carga de bactérias e a resultados falso-negativos que ocorrem em outras

provas, como o teste respiratório da ureia ⁵¹. Isto é decorrente da permanência de anticorpos contra *H. pylori* de forma elevada, apesar do decréscimo da carga bacteriana, que acontece com a terapia com inibidores da bomba de prótons ou imediatamente após sangramento gastrointestinal. Estudo de Kuipers *et al.* demonstrou que aquisição da infecção por *H. pylori* ocorre durante a juventude e que as concentrações de anticorpos não mudam com a idade ⁵¹. Destacamos, ainda, que a sensibilidade da sorologia para o diagnóstico da infecção por *H. pylori* é bastante alta, sendo próxima de 100% ²².

Entretanto, Feldman *et al.* demonstraram que 60% dos pacientes curados da infecção por *H. pylori* passam a ter níveis indetectáveis de anticorpos anti-*H. pylori* 18 meses após o tratamento ⁵². A negatização da sorologia anti-*H. pylori* após o tratamento é, inclusive, usada como um critério de cura da infecção por *H. pylori* ²². Em nossa pesquisa, apenas cinco pacientes dos 82 analisados com SpA axial haviam recebido previamente o diagnóstico de infecção por *H. pylori* e receberam o tratamento com antibióticos e inibidores de bomba de prótons anteriormente à pesquisa. Apenas um destes casos apresentava sorologia positiva anti-*H. pylori* no momento do exame e somente um dos avaliados apresentava ASCA IgG positivo. Nós mantivemos estes pacientes no grupo analisado, já que o estudo pretendia investigar a relação entre a presença atual de anticorpos ASCA e anti-*H. pylori* IgG, e não exatamente a eventual exposição prévia a esta bactéria. Entretanto, curiosamente, se nós pudéssemos incluir estes cinco pacientes (que foram previamente tratados da infecção por *H. pylori* e, portanto, certamente expostos a esta bactéria ao longo da vida) no grupo anti-*H. pylori* +, independentemente do seu estado sorológico anti-*H. pylori*, a associação negativa entre anti-*H. pylori* e ASCA se reforçaria, uma vez que ASCA apareceu apenas em um destes pacientes (com esta mudança o valor de *p* no teste qui-quadrado entre os grupos ASCA+/- e *H. pylori*+/- seria 0,145 ao invés de 0,224 como foi relatado).

A importância do ASCA como marcador da doença ou de sua gravidade em pacientes com SpA permanecem ainda controversas na literatura. Andretta *et al.* não encontraram relação entre positividade do ASCA e características clínicas da EA (presença de doença periférica, uveíte ou atividade da doença avaliada por BASDAI) ³⁶. Entretanto, Hoffmann *et al.* observaram níveis mais altos de proteína C reativa e de velocidade de hemossedimentação e Aydin *et al.* relataram maior dano radiológico nos SpA estudados que apresentavam ASCA + ^{28,35}.

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura extensivamente usada na indústria cervejeira e panificadora. Portanto, o trato alimentar humano é amplamente exposto a estes antígenos. Entretanto, níveis elevados de ASCA são apenas encontrados em menos de 5% da população saudável, indicando uma tolerância geral à levedura e seus antígenos⁵³. Em pacientes com Doença de Crohn (DC), os anticorpos ASCA são demonstrados no soro em cerca de 70% dos pacientes, particularmente, naqueles com envolvimento ileal⁵³. Há uma interessante relação inversa entre DII e soroprevalência de infecção por *H. pylori*^{39,40}. Assim, é especulado se o *H. pylori* teria um efeito protetor contra o aparecimento da DII, concordante com a “hipótese higiênica”³⁹. Esta relação negativa entre *H. pylori* e DII é coerente com a correlação negativa entre ASCA e anti-*H. pylori* encontrada na DC em nosso estudo. O fato de encontrarmos, também, uma correlação negativa entre os títulos de ASCA e anti-*H. pylori* nos pacientes com SpA axial pode ser considerado uma evidência da relação que existe entre SpA e DC, e a frequência mais elevada de anti-*H. pylori* no grupo SpA axial em relação ao grupo DC sugere que *H. pylori* (ou outros fatores ambientais a ele associados) possam ser determinantes da intensidade da inflamação intestinal tanto em SpA quanto em DC.

6 CONCLUSÕES

1. A frequência de sorologia ASCA + em pacientes com SpA axial anti-*H. pylori* + não foi superior em comparação àqueles com SpA axial anti-*H. pylori* -, de forma estatisticamente significativa, neste estudo. Também não foi significativa esta diferença no grupo com DC.

2. A presença de altos títulos de anti-*H. pylori* IgG está associada significativamente a baixos títulos de ASCA na SpA axial. Esta correlação negativa também foi evidenciada de forma significativa nos indivíduos com DC.

3. A sorologia anti-*H. pylori* + foi significativamente menos frequente em pacientes com DC que naqueles com SpA axial. As sorologias ASCA IgG + e ASCA IgA + foram, ambas, significativamente mais frequentes no grupo de pacientes com DC que em pacientes com SpA axial.

4. Não foi observada nenhuma influência da positividade de anti-*H. pylori* IgG nas características clínicas ou gravidade da SpA axial no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007; 369(9570):1379-90.
2. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 6(7):399-405.
3. Zeidler H, Calin A, Amor B. A historical perspective of the spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23(4):327-33.
4. Skare TL, Bortoluzzo AB, Gonçalves CR, et al. Ethnic Influence in Clinical and Functional Measures of Brazilian Patients with Spondyloarthritis. *J Rheumatol*. 2012; 39(1):141-7.
5. Brown MA. Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*. 2008; 47(2):132-7.
6. The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010; 42(2):123-7.
7. Khan MA. Update: the twenty subtypes of HLA-B27. *Curr Opin Rheumatol*. 2000; 12(4): 235-8.
8. Carter JD. Bacterial agents in spondyloarthritis: a destiny from diversity? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010; 24(5):701-14.
9. Hannu T, Inman R, Granfors K, Leirisalo-Reppo M. Reactive arthritis or post-infectious arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006; 20(3):419-33.
10. Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Carter JD, Hudson AP. The pathogenic role of *Chlamydia* in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22(4):363-7.
11. De Keyser F, Baeten D, Van den Bosch F, et al. Gut inflammation and spondyloarthropathies. *Curr Rheumatol Rep*. 2002; 4(6):525-32.

12. May E, Märker-Hermann E, Wittig BM, et al. Identical T-Cell Expansions in the Colon Mucosa and the Synovium of a Patient With Enterogenic Spondyloarthritis. *Gastroenterology*. 2000; 119(6):1745–55.
13. Fantini M, Pallone F, Monteleone G. Common immunologic mechanisms in inflammatory bowel disease and spondyloarthropathies. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(20):2472–8.
14. Appel H, Kuon W, Kuhne M, et al. Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in *Chlamydia*-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6(6):521-34.
15. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, 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.
16. McColl KEL. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2010; 362(17):1597-604.
17. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983; 1(8336):1273-5.
18. Otasevic L, Walduck A, Meyer TF, et al. *Helicobacter pylori* Infection in Anterior Uveitis. *Infection*. 2005; 33(2):82–5.
19. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990; 9(1):1-13.
20. Hasni S, A Ippolito A, Illei GG. *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. *Oral Dis*. 2011; 17(7):621–7.
21. Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, et al. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*. 2002; 359(9310):931–5.

22. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*. 2012; 61(5):646-64.
23. Baik SJ, Yi SY, Park HS, Park BH. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in female Vietnamese immigrants to Korea. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(6):517-21.
24. Otasevic L, Zlatanovic G, Stanojevic-Paovic A, et al. *Helicobacter pylori*: an underestimated factor in acute anterior uveitis and spondyloarthropathies? *Ophthalmologica*. 2007; 221(1):6-13.
25. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ*. 1988; 297(6656):1105-6.
26. Prideaux L, De Crux P, Ng SC, et al. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18(7):1340-55.
27. Mallant-Hent RC, Mary B, von Blomberg E, et al. Disappearance of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in coeliac disease during a gluten-free diet. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18(1):75-8.
28. Aydin SZ, Atagunduz P, Temel M, Bicakcigil M, Tasan D, Direskeneli H. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in spondyloarthropathies: a reassessment. *Rheumatology*. 2008; 47(2):142-4.
29. Kotze LMS, Nisihara RM, Utiyama SRR, Kotze PG, Theiss PM, Olandoski M. Antibodies anti-*Saccharomyces cerevisiae* do not differentiate Crohn's disease from celiac disease. *Arq Gastroenterol*. 2010; 47(3):242-5.
30. Wolters VM, Alizadeh BZ, Weijerman ME, et al. Intestinal barrier gene variants may not explain the increased levels of antigliadin antibodies, suggesting other mechanisms than altered permeability. *Hum Immunol*. 2010; 71(4):392-6.

31. Harrer M, Reinish W, Dejaco C, et al. Do high serum levels of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies result from a leakiness of the gut barrier in Crohn's disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 15(12):1281-5.
32. Vermeire S, Peeters M, Vlietinck R, et al. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: a study in IBD families. *Inflamm Bowel Dis.* 2001; 7(1):8-15.
33. Benjamin J, Makharia GK, Joshi YK. Association Between Intestinal Permeability and Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antibodies in Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14(11):1610-1.
34. de Vries M, van der Horst-Bruinsma I, van Hoogstraten I, et al. pANCA, ASCA, and OmpC Antibodies in Patients with Ankylosing Spondylitis without Inflammatory Bowel Disease. *J Rheumatol.* 2010; 37(11):2340-4.
35. Hoffman IEA, Demetter P, Peeters M, et al. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Ig A antibodies are raised on ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62(5):455-9.
36. Andretta M, Vieira T D, Nishiara R, et al. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) and anti-endomysial antibodies in spondyloarthritis. *Rheumatol Int.* 2012; 32(2):551-4.
37. Fernandez-Sueiro JL, Wikkisch A, Lopez-Armanda M. HLA B27 does not influence the presence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in a population of ankylosing spondylitis patients from the Northwest part of Spain. *Ann Rheum Dis.* 2005; 65 Suppl 3:S1084.
38. Di Leo V, D'Inca R, Bettini MB, et al. Effect of Helicobacter pylori and eradication therapy on gastrointestinal permeability. Implications for patients with seronegative spondyloarthropathies. *J Rheumatol.* 2005; 32(2):295-300.

39. Lidar M, Langevitz P, Barzilai O, et al. Infectious Serologies and Autoantibodies in Inflammatory Bowel Disease: Insinuations at a True Pathogenic Role. *Ann NY Acad Sci.* 2009; 1173:640–8.
40. Väre PO, Heikius B, Silvennoinen JA, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in inflammatory bowel disease: is *Helicobacter pylori* infection a protective factor? *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36(12):1295–300.
41. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(1):25-31.
42. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68 Suppl 2:S1-44.
43. Shinjo SK, Gonçalves R, Gonçalves CR. Medidas de Avaliação Clínica em Pacientes com Espondilite Anquilosante: Revisão de literatura. *Rev Bras Reumatol.* 2006; 46(5):340-6.
44. Garg AX, Pope JE, Thiessen-Philbrook H, Clark WF, Ouimet J. Arthritis risk after acute bacterial gastroenteritis. *Rheumatology.* 2008; 47(2):200–4.
45. Melby KK, Kvien TK, Glennås A. *Helicobacter pylori* – A Trigger of Reactive Arthritis? *Infection.* 1999; 27(4-5):252-5.
46. Pellicano R, Franceschi F, Saracco G, et al. *Helicobacters* and extragastric diseases. *Helicobacter.* 2009; 14 Suppl 1:S58-68.
47. George JN. Definition, diagnosis and treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2009; 94(6):759-62.
48. Chen Y, Blaser MJ. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med.* 2007; 167(8):821-7.

49. Arnold IC, Dehzad N, Reuter S, et al. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2011; 121(8):3088–93.
50. Sellin JH, Shah RS. The Promise and Pitfalls of Serologic Testing in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2012; 41(2):463–82.
51. Kuipers EJ, Peña AS, van Kamp G, et al. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1993; 342(8867):328-31.
52. Feldman M, Cryer B, Lee E, Peterson WL. Role of seroconversion in confirming cure of *Helicobacter pylori* infection. *JAMA*. 1998; 280(4):363-5.
53. Eser A, Papay P, Primas C, et al. The impact of intestinal resection on serum levels of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012; 35(2):292–9.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Protocolo de Pesquisa

“Avaliação da variabilidade dos resultados obtidos na Clinimetria da Espondilite Anquilosante de acordo com o período do dia” e “Frequência de anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) em pacientes com Espondilite Anquilosante colonizados por Helicobacter pylori”

Data avaliação: __/__/_____
 Nome: _____
 Idade: _____ anos Sexo: _____ Prontuário: _____
 Data de nascimento: __ / __ / ____ Naturalidade: _____
 Estado civil: _____ Profissão: _____
 Endereço: _____ Nº: _____
 Complemento: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____ Estado: _____
 Telefone residencial: _____ Telefone celular: _____
 e-mail: _____

Primeiros sintomas em: _____
 Diagnosticado em: _____
 Medicações atuais: _____
 Medicações prévias: _____
 Comorbidades: _____
 História progressa/tratamento de: gastrite/úlcera /HDA: S() N()

Realização endoscopia: S() N()
 Diagnóstico de H. pylori: S() N()
 Tratamento H. pylori: S() N() Quando? _____
 Diagnóstico de doença inflamatória intestinal: S() N()
 Chron () RCUI ()
 Doença celíaca: S() N()

Tabagismo: S() N()
 Álcool: S() N()

Exame Físico

Peso: _____ Altura: _____ PA: _____x_____

Manifestações extra - axiais

* Articulações periféricas (aumento volume e dor recorrente/persistente)

S () N ()

- Mãos () PP () CC () Ombros () QQ () JJ () TT () Pés ()

- simétrico () assimétrico ()

- se assimétrico: direito () esquerdo ()

Manifestações extra-articulares S () N ()

* Uveíte (olho vermelho, dor no olho, lacrimejamento recorrentes)

S () N ()

* Cutâneo (lesões descamativas): S () N ()

* Gastro-intestinais: S () N ()

- Dor abdominal S () N ()

- Diarréia recorrente S () N ()

- Sintomas dispépticos: S () N ()

pirose () dor epigástrica () plenitude pós-prandial () náuseas ()

* Prostatite: S () N ()

dor perineal () dor na ponta do pênis () dor ao ejacular () disúria ()

Laboratório

* HLA-B27 testado: S () N ()

resultado: Positivo () Negativo ()

Ht/ Hb:	Leucograma/Plaq:
VHS:	PCR:
Creatinina:	Ácido Úrico:
Gama-GT:	TGO/TGP:
FA (total e frações):	

ASCA IgA:
ASCA IgG:
H. pylori IgG:
PSA:

Outros exames complementares:

* EDA (_ / _ / _____): _____

* Densitometria (_ / _ / _____)

		T	Z
Lombar (L1-L4)			
Femoral (colo)			

* Outros:

TESTE

Horário que acordou: _____

Horário de aplicação: _____

Índice Metrológico da Espondilite Anquilosante (BASMI)**Escore**

() **Distância parede-trago:** **Direita** **Esquerda**
 M1 () M2 () M1 () M2 ()
 Final: _____cm Final: _____cm
 Média: _____cm

() **Flexão lombar:** M1() M2 ()
 Final: _____cm

() **Rotação cervical:** **Direita** **Esquerda**
 M1 () M2 () M1() M2 ()
 Final: _____cm Final: _____cm
 Média: _____cm

() **Flexão lombar lateral:** **Direita** **Esquerda**
 M1() M2 () M1() M2 ()
 Final: _____cm Final: _____cm
 Média: _____cm

() **Distância intermaleolar:** M1() M2 ()
 Final: _____cm.

Resultado BASMI: _____

Expansão torácica: _____

Índice Metrológico de Espondilite Anquilosante
(*The Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index*)

	Pontuação (Score)		
	0	1	2
Distância parede-trago <i>Wall-tragus distance</i>	<15 cm	15~30 cm	>30 cm
Flexão lombar <i>Lumbar flexion</i>	>4 cm	2~4 cm	< 2 cm
Rotação cervical <i>Cervical rotation</i>	> 70°	20~70°	< 20°
Flexão lombar lateral <i>Lumbar side flexion</i>	> 10cm	5~10 cm	< 5 cm
Distância intermaleolar <i>Intermalleolar distance</i>	> 100 cm	70~100 cm	< 70 cm

TABELA 2
BASDAI, VALIDADO PARA O PORTUGUÊS

Coloque uma marca em cada linha abaixo, indicando sua resposta para cada questão relacionada à semana passada

1. Como você descreveria o grau de fadiga ou cansaço que você tem tido?

2. Como você descreveria o grau total de dor no pescoço, nas costas e no quadril relacionada à sua doença?

3. Como você descreveria o grau total de dor e edema (inchaço) nas outras articulações sem contar com pescoço, costas e quadril?

4. Como você descreveria o grau total de desconforto que você teve ao toque ou à compressão em regiões do corpo doloridas?

5. Como você descreveria a intensidade da rigidez matinal que você tem tido a partir da hora em que você acorda?

6. Quanto tempo dura sua rigidez matinal a partir do momento em que você acorda?

BASDAI: soma dos valores das questões 1, 2, 3, 4 e a média dos valores da 5 e 6, dividindo este total por 5.

Resultado BASDAI: _____

Como você descreveria a intensidade de sua Espondilite (doença/sintomas em geral), em média, nos últimos 7 dias?

TABELA 3
BASFI, VALIDADO PARA O PORTUGUÊS

Faça uma marca em cada linha abaixo de cada pergunta, indicando o seu grau de capacidade para realizar as seguintes atividades durante a última semana

1. Vestir meias ou meia-calça sem ajuda ou auxílio de aparelhos.

2. Curvar o corpo da cintura para cima para pegar uma caneta no chão sem o uso de um instrumento de auxílio.

3. Alcançar uma prateleira alta sem ajuda ou auxílio de um instrumento.

4. Levantar-se de uma cadeira sem braços da sala de jantar sem usar as mãos ou qualquer outro tipo de ajuda.

5. Levantar-se quando deitado de costas no chão sem ajuda.

6. Ficar em pé sem ajuda por 10 minutos sem desconforto

7. Subir 12 a 15 degraus sem usar o corrimão ou outra forma de apoio (andador); um pé em cada degrau.

8. Olhar para trás, virando a cabeça sobre o ombro sem virar o corpo.

9. Realizar atividades que exijam esforço físico, isto é, fisioterapia, jardinagem ou esporte.

10. Ter um dia repleto de atividades, seja em casa ou no trabalho.

BASFI: Somatório dos valores em cm anotados nas EVA é dividido por 10 e dado o valor final.

Resultado BASFI: _____

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, portador do RG: _____ e CPF: _____, estou sendo convidado a participar de um estudo denominado “Investigação sobre o papel da próstata e do intestino como fontes de estimulação inflamatória na Espondilite Anquilosante”, que está sendo conduzida pelo prof. Fabrício de Souza Neves e pelos Drs. Igor Kunze Rodrigues e Cristiano Novotny, no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os objetivos dessa pesquisa são avaliar a presença de inflamação na próstata e no intestino dos pacientes com Espondilite Anquilosante. Para realizar a pesquisa serão coletados amostras para exame de sangue, fezes e urina, com os mesmo procedimentos da coleta de rotina de exames médicos. Além disso, será realizada consulta médica com urologista, que fará o exame da próstata por meio do toque retal. Este exame é igual ao que se recomenda que todo homem faça após os 40 anos de idade.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de que, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo.

Fui avisado de que me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Sei, também, que partes desse trabalho poderão ser apresentadas em salas de aula, congressos e outros encontros científicos, ou seja, os resultados da pesquisa poderão ser comunicados em ambientes de estudo como forma de contribuição para a construção de conhecimentos sobre o assunto que foi estudado.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando

totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico a receber, e que o benefício relacionado a minha participação será de aumentar o conhecimento científico para a área da Reumatologia e da Urologia.

Atesto recebimento de uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido onde consta o celular e o e-mail do pesquisador responsável e demais membros da equipe que terão contato com os pacientes, podendo tirar as minhas dúvidas sobre o projeto e sobre a minha participação, agora ou a qualquer momento.

Nome do Pesquisador: Prof. Fabrício de Souza Neves; Celular: 9977-6815; Email: fabricio.souza.neves@gmail.com

Nome do Pesquisador: Cristiano Novotny; Celular: 91150555; Email: cristianonovotny@yahoo.com

Nome do Pesquisador: Igor Kunze Rodrigues; Celular 9909-5016; Email: igorkunzerodrigues@hotmail.com

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em participar do estudo proposto, sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento.

Florianópolis, ____ de _____ de 2012.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO nº 2395

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 034/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o pedido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2395 **FR:** 47992

TÍTULO: In estigação sobre o papel do paciente e do estudante como fontes de produção de conhecimento em Engenharia Adaptativa

AUTOR: Fabiana de Sousa Barros, Maria Lucia Basso, André Luiz Barbosa Pedron, Fernando Spiller, Daniel Santos Lemos, Valério Alves Pereira, Gilmar Ricardo Soares de Castro, Leonardo Santana de Freitas, Cleofeide Perceira Vilelas, Carlos Edo, Tiago de Fozes Heck, Christiana Silveira, Eduardo Torres.

FLORIANÓPOLIS, 11 de Dezembro de 2011.

Coordenador do CEPSH/CTIC

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

B1: Submissão Inicial (em 15/03/2013)



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

Helicobacter

[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

SCHOLARONE™ Manuscripts

You are logged in as **Fabrice Neves**

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Helicobacter*.

Manuscript ID: HEL-0A-13-0055


Does *Helicobacter pylori* infection influence the expression of spondyloarthritis or inflammatory bowel disease? A clue would come from ASCA.

Authors:

- Rodrigues, Igor
- Andrugueti, Michele
- Giá, Lore
- Schievon, Leonardo
- Andrade, Keria
- Pereira, Ivânio
- Castro, Gláucio
- Zimmermann, Adriana
- Bazzo, Maria
- Neves, Fabrício

Date Submitted: 15-Mar-2013

B2: Submissão após Análise dos Revisores (em 19/08/13)



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

Helicobacter

[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

SCHOLARONE™ Manuscripts

You are logged in as **Fabrice Neves**

Submission Confirmation

Thank you for submitting your revised manuscript to *Helicobacter*.

Manuscript ID: HEL-0A-13-0055.R1

The relation of anti-*Helicobacter pylori* and anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in patients with axial spondyloarthritis: a comparative study with Crohn's disease.

Authors:

- Rodrigues, Igor
- Andrugueti, Michele
- Giá, Lore
- Schievon, Leonardo
- Andrade, Keria
- Pereira, Ivânio
- Castro, Gláucio
- Zimmermann, Adriana
- Sapich, Luciano
- Bazzo, Maria
- Neves, Fabrício

Date Submitted: 19-Aug-2013

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ 4.1.1 (pages 17, 237, 787 and 17,243,485). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
 ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

Terms and Conditions of Use - ScholarOne Privacy Policy - [Get Help Now](#)

ANEXO C - ARTIGO CIENTÍFICO (Versão língua inglesa)

The relation of anti-*Helicobacter pylori* and anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in patients with axial spondyloarthritis: a comparative study with Crohn's disease.

Running title: *H. pylori* and ASCA in spondyloarthritis

Igor Kunze Rodrigues, M.D.¹,
Michele Andrigueti²,
Ione Dilma de Oliveira Gil, M.Sc.²,
Leonardo de Lucca Schiavon, M.D., Ph.D.³,
Kenia Rodrigues de Andrade, M.D.¹,
Ivanio Alves Pereira, M.D., Ph.D.^{4,5},
Gláucio Ricardo Werner de Castro, M.D., M.Sc.⁵,
Adriana Fontes Zimmermann, M.D., Ph.D.⁴,
Luciano Nascimento Saporiti, M.D.⁶,
Maria Luiza Bazzo, Ph.D.^{2,7},
Fabricio Souza Neves, M.D., Ph.D.⁸

¹Post-graduating student, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ²Clinical Analysis Laboratory, University Hospital, UFSC, ³Professor of Gastroenterology, Internal Medicine Department, UFSC, ⁶Professor, Rheumatology, Internal Medicine Department, UFSC, ⁴Rheumatology Unit, University Hospital, UFSC, ⁵Rheumatology Professor, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), ⁶Gastroenterology Professor, UNISUL, ⁷Professor, Biochemistry and Pharmacy Department, UFSC, ⁸Professor of Rheumatology, Internal Medicine Department, UFSC.

Corresponding author:

Fabricio Souza Neves
Hospital Universitário (UFSC) – 3 andar – Departamento de Clínica Médica
Trindade, Florianópolis, SC, Brazil. 88040-900.
Phone: 55-48-37219149. E-mail: nevesfds@gmail.com

ABSTRACT

Background: Spondyloarthritis (SpA) are musculoskeletal inflammatory diseases linked to immune responses to intestinal microbiota and subclinical intestinal ulcerations. *Helicobacter pylori* is a common cause of gastroduodenal ulceration. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) are associated with intestinal inflammation in Crohn's disease (CD) and SpA. The relationship between *H.pylori* and ASCA has not been investigated.

Material and Methods: We included 91 patients with axial SpA at a University Hospital in Florianópolis, Brazil, from January 2012 to November 2012. 40 patients with CD were included for comparative purposes. ASCA IgG and IgA and anti-*H. pylori* IgG titers were assessed by ELISA. Chi-square test was used to compare the proportion of ASCA+ patients between the anti-*H. pylori* IgG+ and anti-*H. pylori* IgG- groups. Anti-*H.pylori* IgG and ASCA titers were correlated using the Spearman coefficient.

Results: We observed a significant negative correlation between ASCA IgG and anti-*H. pylori* IgG titers ($\rho=-0.563$, $p<0.001$) and between ASCA IgA and anti-*H. pylori* IgG titers ($\rho=-0.342$, $p = 0.019$) in axial SpA patients. The same pattern of negative correlation was observed in CD patients. Anti-*H.pylori*+ serology was significantly more frequent in axial SpA than in CD patients (52.4% versus 18.4%, $p< 0.001$).

Conclusions: A negative correlation between anti-*H. pylori* and ASCA was observed in axial SpA and CD. Anti-*H.pylori*+ serology was more frequent in axial SpA than in CD patients. We propose that *H. pylori* negatively modulate the severity of intestinal inflammation in SpA. This hypothesis requires further investigation.

Key Words: *Helicobacter pylori*; *Saccharomyces cerevisiae*; spondylarthritis; ankylosing spondylitis; Crohn disease; Inflammatory bowel diseases.

INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) are chronic inflammatory diseases that primarily affect areas where tendons and ligaments insert into the periosteum (entheses), causing structural damage and loss of joint function. Ankylosing spondylitis (AS) is the major subtype of this group of rheumatic diseases, which also includes reactive arthritis (ReA), psoriatic arthritis (PsA) and arthritis associated with inflammatory bowel disease (IBD), as ulcerative colitis and Crohn's disease (CD) (1-3). The pathogenesis of SpA involves both genetic predisposition and environmental triggers, which often include bacteria in the gastrointestinal or genitourinary tracts.

Evidence indicates that bacteria play a role in triggering ReA (4). In patients with this disease, a bacterial infection of the genitourinary (*Chlamydia*) or gastrointestinal tract (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*) occurs weeks before the acute onset of arthritis (4-6). A relationship between bacterial agents and other types of SpA has not been clearly established. However, many clinical and experimental studies suggest that the musculoskeletal inflammatory process that occurs in other forms of SpA is linked to the gut microbiota (7-9). Chronic intestinal inflammation that is mild and asymptomatic is described in two thirds of patients with AS (7). In SpA associated with IBD, bacterial antigens in the intestinal mucosa activate T lymphocytes that recognize specific antigens in the inflamed synovium (8). In fact, SpA and IBD are supposed to be closely related diseases regarding pathogenesis, with different phenotypic presentations (7). In addition, in chronic ReA, bacteria are carried to the joints (2, 8, 10), and ineffective elimination of bacteria by immune synovial cells may result in chronic joint inflammation (8). These data support the hypothesis that certain chronic infections, which are not adequately resolved by the immune system in the intestinal mucosa, may be involved in the pathogenesis of SpA.

Helicobacter pylori is a Gram-negative, flagellate bacterium, which was first isolated in 1983 by Warren and Marshall (11). The designation of this bacterium was established in 1990 by Armstrong and Goodwin (12). Initial gastric infection with *H. pylori* typically occurs during childhood after oral intake, and the bacteria tend to remain in the host unless treated (13-15). *H. pylori* is one of the most common infections

worldwide. Globally, the average rate of *H. pylori* infection is 50% (16). The prevalence of this infection among adults is higher than 80% in many developing countries, compared with 20% to 50% in developed nations (13). *H. pylori* infection is associated with the development of a number of upper gastrointestinal diseases, such as chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric malignant neoplasms (14, 15).

Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) are antibodies against epitopes in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, commonly known as baker's yeast, an alimentary compound. These antibodies were initially described in 1988 by Main *et al.* in patients with CD (17). ASCA are present in up to 69% of patients with CD (18) and are also observed in nearly 43% of patients with celiac disease; in these patients, ASCA levels are reduced if the disease is controlled with a gluten-free diet (19, 20).

It is postulated that the initial event in the pathogenesis of CD is the disruption of mucosal integrity, followed by increased macromolecule permeability. This permeability promotes a high level of exposure of alimentary antigens to intestinal immune cells, and antibodies against these antigens, including ASCA, are subsequently produced (21, 22). The same mechanism is postulated in SpA in general, and previous studies have demonstrated the presence of ASCA in patients with SpA. Andretta *et al.* demonstrated that 18.6% of patients in the group with SpA were positive for ASCA IgA, compared with 5.2% of the control group ($p = 0.031$) (23). Aydin *et al.* demonstrated that ASCA IgA levels were higher in patients with AS and undifferentiated SpA and that these levels were higher in patients with more severe radiological joint damage (24). Hoffmann *et al.* reported that ASCA IgA levels were higher in patients with AS or undifferentiated SpA (25).

H. pylori is a common cause of gastric ulcers. In SpA patients, *H. pylori* infection increases gastrointestinal permeability, which returns to normal levels after eradication of the infection (26). Thus, we asked whether the presence of *H. pylori* could facilitate the emergence of ASCA and immune-mediated phenomena that arise from increased intestinal permeability. The primary objective of this study is to determine the frequency of ASCA positive (ASCA +) serology in patients with axial SpA according to their anti-*H. pylori* IgG serological

status, i.e., anti-*H. pylori* IgG positive (anti-*H. pylori* IgG +) versus anti-*H. pylori* IgG negative (anti-*H. pylori* IgG -) and to correlate ASCA titers with anti-*H. pylori* IgG titers in axial SpA patients. For comparative purpose, the relation between ASCA and *H. pylori* serology was also studied in a sample of CD patients. The secondary objective of this study is to determine the frequency of clinical manifestations of axial SpA with respect to anti-*H. pylori* IgG serostatus.

METHODS

We conducted a cross-sectional study. A consecutive sampling of patients with axial SpA, which was defined according to the classification criteria for axial SpA established by the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) (27), who were followed at the rheumatology outpatient clinic of the University Hospital of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) in Florianópolis, Brazil, from January 2012 to November 2012, were included in this study. Patients with a diagnosis of ReA, which was defined by a history of urethritis or diarrheal illness before the onset of articular manifestations, and patients with a diagnosis of IBD or celiac disease were excluded from the axial SpA group. These exclusion criteria were intended to exclude patients with other known ASCA-related intestinal disease (i.e., IBD and celiac disease) and patients with SpA due to a known bacterial trigger (i.e., ReA).

To calculate the required sample size, we considered the following hypothesis: among patients with axial SpA, the frequency of ASCA + serology is not equal in the anti-*H. pylori* IgG + group and in the anti-*H. pylori* IgG - group. According to the study conducted by Aydin *et al.*, the prevalence of ASCA+ serology was 20% among patients with SpA (24). Thus, to calculate the required sample size, we estimated that in the anti-*H. pylori* IgG+ SpA group, the frequency of ASCA + serology would be at least 30% and in the anti-*H. pylori* IgG - SpA group, the frequency of ASCA + serology would be similar to that of healthy controls (usually less than 5%). To reach a significance level of 95% ($p < 0.05$), with statistical power of 80%, 33 patients were required in each group to determine whether the presence of anti-*H. pylori* IgG + serology modifies the frequency of ASCA + in 30 percentage points.

As a comparator group we included a sample of consecutive patients with CD to also assess the relation between anti-*H. pylori* serology and ASCA. All patients with CD were diagnosed with biopsies obtained through colonoscopy. CD patients with axial musculoskeletal involvement, as defined by the ASAS criteria (27), were excluded from this group.

The axial SpA patients included in this study were interviewed by the researchers, and their charts were reviewed to determine their demographic and clinical characteristics. The criteria used to identify peripheral arthritis were the presence of a history or physical evidence of joint pain and edema in the knees, ankles, elbows, hands or feet. The following extra-articular manifestations were assessed: uveitis (defined by the presence of a typical history of recurrent painful red eye or an ophthalmologic diagnosis of uveitis) and cutaneous disease (defined by a history or physical evidence of psoriatic rash). The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) and the Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), previously adapted to the Portuguese language that is used in Brazil, were used for disease assessment of axial SpA patients (28).

Blood samples were collected from axial SpA and CD patients by venipuncture and centrifuged to separate the serum, which was frozen at -20°C until Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tests were performed in the laboratory. We used the following tests: the Ridascreen™ ELISA test for anti-*Helicobacter pylori* IgG (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), with a reference value of 16 U/ml ($< 10\text{U/mL}$ negative; $10\text{-}16\text{ U/mL}$ doubtful; $\geq 16\text{ U/mL}$ positive), intra-assay reproducibility of 3.0-4.8% and inter-assay reproducibility of 4.4-9.9%; the ORG 545 ELISA test for ASCA IgG/IgA (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) with a reference value of 10 U/ml ($< 10\text{ U/mL}$ negative, $\geq 10\text{ U/mL}$ positive), intra-assay reproducibility of 4.3-8.8% and inter-assay reproducibility of 3.8-7.5%.

Patients with dubious titers of anti-*H.pylori* IgG (i.e., between 10 and 16 U/ml) were excluded from the analysis in order to compare the proportion of patients with ASCA + serology and the frequency of clinical manifestations between the anti-*H. pylori* IgG + group and the

anti-*H. pylori* IgG - group. For this analysis we used the Chi-square test or Fisher's exact test, when indicated. In order to correlate anti-*H. pylori* IgG titers with ASCA titers, patients who had negative results for both tests were excluded from the analysis. The Spearman coefficient was applied, due to the non-parametric distribution of these results. Student's *t* test was used to compare the BASDAI, BASFI and BASMI results between the anti-*H. pylori* IgG + and anti-*H. pylori* IgG - groups, due to the normal distribution of these results. The distribution of the results was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. All tests were two-tailed, and all analyses were performed using SPSS™ 17.0 for Windows® (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Ethical approval was obtained from the Ethical Committee of human being research of the Federal University of Santa Catarina (UFSC) (protocol 2395). The research protocol conforms to the provisions of the World Medical Association's Declaration of Helsinki, 1995 (as revised in Edinburgh, 2000). All subjects gave written informed consent before being included in the study and patient anonymity was preserved.

RESULTS

Of 93 axial SpA patients who were initially eligible, 2 patients refused to participate and were excluded from the study. There were no previously diagnosed cases of ReA, IBD or celiac disease. A total of 91 axial SpA patients were enrolled in and completed the study.

Of the 91 tested axial SpA patients, 43 patients (47.3%) were anti-*H. pylori* IgG + (> 16 U/ml), and 39 patients (42.8%) were anti-*H. pylori* IgG - (<10U/ml). 9 patients (9.9%) had doubtful titers of anti-*H. pylori* IgG (10-16 U/ml) and were excluded from further analysis. The baseline demographic and clinical characteristics of the remaining 82 patients are presented in Table 1. Twenty-two patients (26.8%) were ASCA IgG +, and 4 patients (4.9%) were ASCA IgA+. Table 1 also shows the obtained results for the frequency of ASCA+ serology, the presence of extra-articular manifestations of SpA (i.e., uveitis and psoriatic rash) and the BASDAI, BASFI and BASMI scores with respect to anti-*H. pylori* IgG serostatus. The data indicate that there is a lower frequency of ASCA + serology in the anti-*H. pylori* IgG + group than in the anti-*H. pylori* IgG - group (20.9% versus 33.3%), but this difference was not

statistically significant ($p = 0.224$). The frequency of extra-articular manifestations and the BASDAI, BASFI and BASMI scores were quite similar between the 2 groups.

Forty patients with biopsy-proven CD, without axial musculoskeletal involvement, were included as a comparison group. Seven (17.5%) CD patients were anti-*H. pylori* IgG + and 31 (77.5%) were anti-*H. pylori* IgG -. Two (5.0%) of them had doubtful titers of anti-*H. pylori* IgG and were excluded from further analysis. One CD patient (2.5%) was missed for ASCA serology. Table 1 presents the baseline demographic characteristics and frequency of ASCA+ serology of the remaining 37 CD patients according anti-*H. pylori* serostatus. As in the axial SpA patients, although lower frequency of ASCA+ was observed in the anti-*H. pylori* + group, statistical significance was not reached.

The proportion of anti-*H. pylori* IgG + patients in the CD group was significantly lower than in the axial SpA group (18.4% versus 52.4%, $p < 0.001$). Inversely, the proportions of ASCA IgG + and ASCA IgA + were significantly higher in the CD group than in the axial SpA group (59.5% versus 26.8%, $p = 0.001$ and 43.2% versus 4.9%, $p < 0.001$, respectively). Data are presented in table 2.

Figure 1a shows a graph of the correlation between ASCA IgG titers and anti-*H. pylori* IgG titers in axial SpA patients. For this analysis, patients with negative serologic tests for both antibodies were excluded. Among the remaining 58 patients, we observed a significant negative correlation between ASCA IgG titers and anti-*H. pylori* IgG titers ($\rho = -0.563$, $p < 0.001$). Figure 1b shows a graph of the correlation between the titers of ASCA IgA with anti-*H. pylori* IgG titers in axial SpA patients. For this analysis, patients with both negative serologic tests were excluded. Among the remaining 47 patients, a significant negative correlation between ASCA IgA and anti- *H. pylori* IgG titers was also observed ($\rho = -0.342$, $p = 0.019$).

Figure 2a shows a graph of the correlation between ASCA IgG titers and anti-*H. pylori* IgG titers in CD patients. For this analysis, patients with negative serologic tests for both antibodies were excluded. Among the remaining 29 patients, we observed a significant negative correlation between ASCA IgG titers and anti-*H. pylori* IgG titers ($\rho = -0.527$, $p =$

0.003). Figure 2b shows a graph of the correlation between the titers of ASCA IgA with anti-*H. pylori* IgG titers in CD patients. For this analysis, patients with both negative serologic tests were excluded. Among the remaining 22 patients, a significant negative correlation between ASCA IgA and anti- *H. pylori* IgG titers was also observed ($\rho = -0.701, p < 0.001$).

DISCUSSION

The role of intestinal bacterial infections as triggers for musculoskeletal inflammation is clearly defined in ReA, a subgroup of SpA (29). The potential role of bacteria in the pathophysiology of other types of SpA, particularly in AS, is controversial. *H. pylori* is a bacterial species responsible for the most common chronic gastrointestinal infection, which causes gastroduodenal inflammation, ulceration and higher mucosal permeability. These characteristics led us to hypothesize that *H. pylori* could be associated with the pathophysiology of SpA. Because ASCA is a marker of intestinal disease, which is also a feature of SpA, we aimed to assess the relationship between anti-*H. pylori* serology and ASCA titers. The association between positivity of anti-*H. pylori* and ASCA and the correlation between the titers of these serological tests have not been previously investigated in any disease associated with ASCA (i.e., CD, celiac disease or SpA).

Even though we employed bilateral hypothesis tests, we predicted that there would be a positive correlation between anti-*H. pylori* serology and ASCA titers in axial SpA patients. We unexpectedly observed a negative correlation between anti-*H. pylori* IgG and ASCA serology, and this negative correlation occurred for both antibody subclasses (i.e., IgG and IgA). Furthermore, the same negative correlation was observed in CD.

Although contrary to our initial hypothesis, this negative correlation is consistent with previously reported results in medical literature. Previous studies have demonstrated that the frequency of anti-*H. pylori* antibodies is lower in patients with IBD than in healthy controls (27.5% versus 41.7% (30), and 24% versus 37% (31)). These authors suggested a protective role of *H. pylori* infection against the appearance of IBD, consistent with the “hygiene hypothesis”, whereby exposure to certain

bacterial species (*H. pylori*, in this case) modulates immune activity, reducing the incidence of intestinal inflammation (30). Previous studies have also reported a negative correlation between *H. pylori* and asthma; *H. pylori* infection efficiently protected mice from bronchoalveolar allergen-induced inflammation through the induction of regulatory T lymphocytes (32). These data suggest that infection with *H. pylori* may actually trigger systemic regulatory immune responses.

In addition to other antibodies against epitopes from intestinal microorganisms (e.g., anti-OmpC and anti-CBir1 antibodies), ASCA is a marker of worse prognosis in patients with CD. These antibodies are associated with fistulizing, structuring and perforating disease (20), and patients with ASCA at the time of CD diagnosis are more likely to require surgery (18).

We considered the following pieces of information in our analysis: 1) ASCA is a marker of more severe intestinal inflammation in patients with CD. 2) Chronic intestinal inflammation is a feature of axial SpA, but, contrary to CD, in SpA it is usually mild, without clinical relevance. As in CD, ASCA is supposed to be a marker of intestinal disease in axial SpA. 3) In this study, we found that anti-*H. pylori* + serology is significantly less frequent in CD than in axial SpA, while ASCA is more frequent in CD than in axial SpA. 4) We found a negative correlation between ASCA and anti-*H. pylori* IgG titers in axial SpA; we also found this negative correlation in patients with CD. 5) *H. pylori* infection primarily occurs in childhood, probably prior to the onset of SpA or CD. Because axial SpA and CD are related diseases in several aspects, may we hypothesize that *H. pylori* is an environmental agent that protects axial SpA patients against the appearance of ASCA-related marked inflammatory intestinal manifestations, as it appears in CD patients, who have lower rates of *H. pylori* infection?

Our study was not designed to confirm this hypothesis, and our conclusions are limited by the cross-sectional design and the small number of cases. The observed difference in the frequency of ASCA IgG + between anti-*H. pylori* IgG+ and anti-*H. pylori* IgG - groups in axial SpA patients (20.9% versus 33.3%, 12.4 percentage points) was not statistically significant with our sample size. Studies of larger populations are needed to confirm this difference. In addition,

prospective and mechanistic studies are needed to determine whether *H. pylori* is really a negative modulator of intestinal inflammation.

Moreover, we cannot determine whether *H. pylori* is a causative or protective agent for the onset of axial SpA. This study only assessed the relationship between *H. pylori* infection and intestinal disease in patients who were already diagnosed with axial SpA.

We must also note that in this study we used serological tests as surrogate markers for *H. pylori* infection and intestinal inflammation. A number of diagnostic tests for *H. pylori* infection have been established in the clinic. The detection of anti-*H. pylori* IgG by ELISA was the method chosen for this study due to its availability, low cost, ease of implementation and status as a non-invasive method that does not pose risks to the patient. Serology is the only test that is not affected by local changes in the stomach, which could lead to low bacterial load and false-negative results for other tests, such as the urea breath test (33). Antibodies against *H. pylori* remain elevated despite the decrease in bacterial load that occurs after proton pump inhibitor therapy or gastrointestinal bleeding. Kuipers *et al.* demonstrated that *H. pylori* infection is acquired during youth and that antibody concentrations do not change with age (33). The sensitivity of serology for the diagnosis of *H. pylori* infection is very high, with a reported value close to 100% (16). However, Feldman *et al.* demonstrated that 60% of patients who were cured of *H. pylori* infection had undetectable levels of anti-*H. pylori* antibodies after 18 months of treatment (34). The disappearance of anti-*H.pylori* antibodies after treatment is a criterion for the cure of *H. pylori* infection (16). In our study, only 5 of the 82 analyzed axial SpA subjects had a previous diagnosis of infection with *H. pylori* and received treatment with antibiotics and proton pump inhibitors prior to the survey. Only one of these patients had positive anti-*H. pylori* serology at the time of the survey, and only one additional patient tested positive for ASCA IgG. We kept these patients in the analysis because the study aims to investigate the relationship between the current presence of ASCA antibodies and anti-*H. pylori* IgG, not previous exposure to this bacterium. In fact, if we could include these five patients (who were treated for *H. pylori* infection) in the anti-*H. pylori* + group, regardless of their anti-*H. pylori* serostatus, the negative association between anti-*H. pylori* and ASCA titers would be

strengthened, because ASCA appeared in only one of these patients (with this change, the p value of the Chi-square test between the ASCA+/- and anti-*H. pylori*-/+ groups in axial SpA patients would be 0.145 (instead of 0.224, as we reported).

The importance of ASCA as a marker of disease pattern or disease severity in patients with SpA remains controversial. Andretta *et al.* did not find a relationship between ASCA positivity and clinical features of AS (e.g., presence of peripheral disease, uveitis or disease activity evaluated by BASDAI) (22). However, Hoffmann *et al.* observed higher levels of C-reactive protein and higher erythrocyte sedimentation rates and Aydin *et al.* observed increased radiological damage in patients with SpA and positive ASCA (24, 25). In our study, we observed that anti-*H. pylori* IgG antibodies are associated with lower ASCA titers, but no significant differences in the clinical features of SpA or disease impact were observed between the anti-*H. pylori* IgG + and anti-*H. pylori* IgG - groups. Our study also lacked adequate statistical power to address this question, making larger samples necessary.

In summary, this study demonstrated that the presence of high titers of anti-*H. pylori* IgG is associated with low titers of ASCA in patients with axial SpA. We demonstrated that this negative correlation also occurs in patients with CD. Moreover, we observed that anti-*H. pylori* IgG + serology is less frequent in patients with CD than in patients with axial SpA. Thus, a role for *H. pylori* infection as an environmental agent that may prevent intestinal inflammatory involvement in SpA patients could be hypothesized. However, we did not detect any influence of anti-*H. pylori* seropositivity on clinical features or severity of axial SpA in the current study. Larger studies are needed to confirm our preliminary findings, and further investigations are needed to determine whether *H. pylori* exposure can exert a protective effect against autoimmune intestinal inflammation.

ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

We are grateful to Dr. Paulo Fontoura Freitas for statistical help and to laboratory technician Maria Aparecida Rosa Cunha Cordeiro (Cida) for her kind cooperation during this study.

Competing interests: the authors have no competing interests.

REFERENCES

1. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007; 369: 1379-90.
2. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 6: 399-405.
3. Zeidler H, Calin A, Amor B. A historical perspective of the spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23: 327-33.
4. Carter JD. Bacterial agents in spondyloarthritis: a destiny from diversity? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010; 24: 701-14.
5. Hannu T, Inman R, Granfors K, Leirisalo-Reppo M. Reactive arthritis or post-infectious arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006; 20:419-33.
6. Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Carter JD, Hudson AP. The pathogenic role of *Chlamydia* in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22:363-67.
7. De Keyser F, Baeten D, Van den Bosch F, *et al*. Gut inflammation and spondyloarthropaties. *Curr Rheumatol Rep*. 2002; 4:525-32.
8. May E, Märker-Hermann E, Wittig BM, Zeitz M, Büschenfelde KHMZ, Duchmann R. Identical T-Cell expansions in the colon mucosa and the synovium of a patient with enterogenic spondyloarthropathy. *Gastroenterology*. 2000; 119:1745-55.
9. Fantini M, Pallone F, Monteleone G. Common immunologic mechanisms in inflammatory bowel disease and spondyloarthropaties. *World J Gastroenterol*. 2009; 15:2472-78.
10. Appel H, Kuon W, Kuhne M, *et al*. Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in *Chlamydia*-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6:R521-R534.
11. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983; 1:1273-75.
12. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol*. 1990; 9:1-13.
13. Hasni S, AIPpolito A, Illei GG. *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. *Oral Dis*. 2011; 17:621-27.
14. McColl KEL. *Helicobacter pylori* infection. *New Engl J Med*. 2010; 362:1597-1604.

15. Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, *et al.* Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet.* 2002; 359:931–35.
16. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain CA, *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut.* 2012; 61:646-64.
17. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, *et al.* Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers’ yeast) in Crohn’s disease. *Brit Med J.* 1988; 297:1105–6.
18. Prideaux L, De Crux P, Ng SC, Kamm MA. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18:1340-55.
19. Mallant-Hent RC, Mary B, von Blomberg E, *et al.* Disappearance of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in coeliac disease during a gluten-free diet. *Eur J Gastroen Hepat.* 2006; 18:75-78.
20. Sellin JH, Shah RS. The Promise and Pitfalls of Serologic Testing in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin N.* 2012; 41:463–82.
21. Wolters VM, Alizadeh BZ, Weijerman ME, *et al.* Intestinal barrier gene variants may not explain the increased levels of anti gliadin antibodies, suggesting other mechanisms than altered permeability. *Hum Immunol.* 2010; 71:392–96.
22. Harrer M, Reinish W, Dejaco C, *et al.* Do high serum levels of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies result from a leakiness of the gut barrier in Crohn’s disease? *Eur J Gastroen Hepat.* 2003; 15:1281-85.
23. Andretta M, Vieira T D, Nishiara R, Skare T L. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) and anti-endomysial antibodies in spondyloarthritis. *Rheumatol Int.* 2012; 32:551–54.
24. Aydin SZ, Atagunduz P, Temel M, Bicakcigil M, Tasan D, Direskeneli H. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in spondyloarthropathies: a reassessment. *Rheumatology.* 2008; 47:142-44.
25. Hoffman IEA, Demetter P, Peeters M, *et al.* Anti-*Saccharomyces cerevisiae* IgA antibodies are raised on ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthropathy. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:455–59.
26. Di Leo V, D’Inca R, Bettini MB, *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* and eradication therapy on gastrointestinal permeability.

- Implications for patients with seronegative spondyloarthropaties. *J Rheumatol.* 2005; 32:295-300.
27. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, 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; 68:777-83.
 28. Shinjo SK, Gonçalves R, Gonçalves CR. Measures of clinical assessment in patients with ankylosing spondylitis: review of literature. *Rev Bras Reumatol.* 2006; 46:340-46.
 29. Garg AX, Pope JE, Thiessen-Philbrook H, Clark WF, Ouimet J. Arthritis risk after acute bacterial gastroenteritis. *Rheumatology.* 2008; 47: 200–204.
 30. Lidar M, Langevitz P, Barzilai O, et al. Infectious serologies and autoantibodies in inflammatory bowel disease: Insinuations at a true pathogenic role. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173:640-48.
 31. Väre PO, Heikius B, Silvennoinen JA, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in inflammatory bowel disease: is *Helicobacter pylori* infection a protective factor? *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36:1295–1300.
 32. Arnold IC, Dehzad N, Reuter S, et al. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2011; 121:3088–93.
 33. Kuipers EJ, Peña AS, van Kamp G, et al. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1993; 342:328-31.
 34. Feldman M, Cryer B, Lee E, Peterson WL. Role of seroconversion in confirming cure of *Helicobacter pylori* infection. *JAMA.* 1998; 280:363-5.